

|              |                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Loop-mediated isothermal amplification of DNA                                     |
| Author(s)    | 納富, 継宣                                                                            |
| Citation     |                                                                                   |
| Issue Date   |                                                                                   |
| Text Version | none                                                                              |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/43151">http://hdl.handle.net/11094/43151</a> |
| DOI          |                                                                                   |
| rights       |                                                                                   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

|            |                                                                    |
|------------|--------------------------------------------------------------------|
| 氏名         | 納富 継宣                                                              |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学)                                                            |
| 学位記番号      | 第 16491 号                                                          |
| 学位授与年月日    | 平成13年8月8日                                                          |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当                                                       |
| 学位論文名      | Loop-mediated isothermal amplification of DNA<br>(DNA のループ介在等温増幅法) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 網野 信行<br><br>(副査)<br>教授 長田 重一 教授 辻本 賀英                  |

## 論文内容の要旨

### 【目的】

遺伝子検査に用いられている手法は、未だ特殊技術の域を脱せず、高価で煩雑なものであり、普及の障害となっている。遺伝子検査を実施する上で最も重要なポイントは遺伝子の増幅である。PCR (polymerase chain reaction) 法は最も広く普及しているが、温度コントロール装置 (サーマルサイクラー) が必要となる。また遺伝子検査用途の場合、検査の信頼性が要求されるが、PCR は2つの領域の認識で反応を行うので特異性の保証が難しく、検出には別途プローブを用いた検出反応を行わなければならない、検査全体としての煩雑性をともなう。そこで、等温で1種類の合成酵素のみで増幅反応を行わせることにより、診断技術として特に重要視される特異性と増幅効率が高い非常に簡単な新規遺伝子増幅法を考案した。この新規遺伝子増幅法は、一定温度下にプライマーが結合出来る1本鎖 DNA ループ構造を利用した方法であることから、LAMP 法 (loop-mediated isothermal amplification) と命名された。

### 【方法ならびに成績】

#### 1. LAMP 法の反応機構

LAMP 法は鎖置換合成を行う1つの DNA polymerase と1対の inner primer と1対の outer primer を利用している。inner primer は、増幅領域の両端に位置する配列を3'末端に持ち、5'末端にその配列の内側の領域と同一配列を持つ構造をしている。まず inner primer で合成を開始し、この合成伸長鎖を outer primer により、1本鎖として遊離させる。これを鋳型に、対となる inner primer と outer primer で同様の鎖置換合成伸長反応を行い、1本鎖として遊離させる。この1本鎖 DNA は両側の末端部分がループを形成し、ダンベル型構造となる。この構造は、以下の反応の起点構造となる。この分子内で DNA 鎖が自己結合した構造の3'末端から DNA 合成が起り、更に1本鎖ループ部分に inner primer がアニールし、プライマーからの DNA 合成が続いて起こる。この行程が繰り返しおこり、その間に互いに相補的な配列が交互に繰り返した構造の増幅産物 DNA が蓄積する。

#### 2. LAMP 原理の確認

鋳型 DNA として M13ファージ DNA を使用し本反応の原理を確認した。鋳型 DNA、4種のオリゴヌクレオチドプライマー、及び基質である dNTPs を含む反応溶液を95°C、5分間加熱後、水冷し、鎖置換型 DNA ポリメラーゼである *Bst* DNA polymerase を添加し、65°C で1時間反応させた。反応液の一部をアガロースゲル電気泳動し、SYBR Green I 染色した。その結果、原理から予想される通り、ラダー状の泳動パターンを示した。この増幅産物を

増幅領域内を認識する制限酵素 *Bam* HI, *Pst* I, 及び *Pvu* II で切断すると、予想されるサイズのバンド数本に集約された。また、増幅領域内部を認識するプローブ (M13-281、M13-333) を用いてのサザンプロット、及び増幅産物をゲルより切り出して、クローニング後シーケンスすることで、増幅産物が鋳型由来であること、原理通りの互いに相補的な配列が交互に連結された構造を持っていることを確認した。

### 3. 感度及び特異性

鋳型として、HBV 配列を持つプラスミド DNA を用い、60°C、1 時間反応させた。10 コピー以下の鋳型 DNA を検出でき、従来の遺伝子増幅法と遜色ない感度をもつことが明らかとなった。また、100ng のゲノム DNA 存在下に増幅反応を行った場合でも特異的な DNA 増幅が起こり、鋳型以外の DNA が大量に存在していても微量の DNA を高効率に検出が出来ることがわかった。これは使用した inner primer と同じ領域を用いて nested PCR を行ったときと同等の感度を示した。本増幅法は、原理上、鋳型上の 6 つの領域を認識して増幅するため、特異性がきわめて高くなると考えられた。

### 4. RNA からの増幅

逆転写酵素も鎖置換合成を行うことが知られている。LAMP 反応の最初のステップを逆転写酵素で行えば、以降は反応の鋳型は DNA であるので、DNA からの増幅反応組成に単に逆転写酵素を添加することで、1 ステップで鋳型 RNA からの増幅も可能と考えられた。前立腺特異抗原 (PSA) 産生細胞 (LNCaP) を、PSA 非産生細胞 (K562) にて希釈して総 RNA 抽出後、これを鋳型 RNA とし LAMP 反応 (RT-coupled LAMP) を行ったところ、100 万個中に 1 個しか存在しない PSA 産生細胞を検出可能であった。従って、本法は DNA からの増幅のみならず、RNA からの増幅においても、高い効率にて増幅を行えることがわかった。

#### 【総括】

LAMP 法は以下の特徴を持つことが確認された。1) 6 領域を認識するために特異性が高い。2) 増幅効率が高く、短時間に増幅可能である。3) 増幅産物は特徴的な構造を有する。4) 等温で反応が進行するため、一度プライマーを決定すれば、反応自体は機器を含め極めて簡易に行える。5) 逆転写酵素を追加するだけで、RNA からの増幅も DNA と同様に簡単に高効率で行うことが可能である。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子検査に用いられている手法は、未だ特殊技術の域を脱せず、高価で煩雑なものであり、普及の障害となっている。遺伝子検査を実施する上で最も重要なポイントは遺伝子の増幅である。

納富継宣君は、等温で 1 種類の合成酵素のみで増幅反応を行わせることにより、診断技術として特に重要視されている特異性と増幅効率が高い非常に簡単な新規遺伝子増幅法 (LAMP 法) を考案した。鋳型 DNA として M13 ファージ DNA を使用し本反応を行い、増幅産物を制限酵素切断、サザンプロット、及びクローニング後シーケンスすることで、増幅産物が鋳型由来であること、原理通りの互いに相補的な配列が交互に連結された構造を持っていることを確認した。また LAMP 法は以下の特徴を持つことが確認された。1) 6 領域を認識するために特異性が高い。2) 増幅効率が高く、短時間に増幅可能。3) 等温で反応が進行するため、一度プライマーを決定すれば、反応自体は機器を含め極めて簡易に行える。4) 逆転写酵素を追加するだけで、RNA からの増幅も DNA と同様に簡単に高効率で行うことが可能である。

以上のことから納富継宣君の研究は学位に値するものとする。