

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05543

研究課題名(和文) デジタルLAMP法による簡易迅速遺伝子定量技術の開発

研究課題名(英文) Development of rapid digital quantitative technology using loop-mediated isothermal amplification

研究代表者

高畠 令王奈 (Takakabatake, Reona)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：20463466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デジタルLAMP定量法を開発するためには、二種類の増幅産物を検出可能な技術が必要である。現行のデジタルPCRに利用されている検出系では、蛍光プローブを用いたTaqMan法が利用されており、プローブの蛍光波長によって標的由来の増幅産物を識別することが可能となっている。一方、LAMPでは、鎖置換型のDNAポリメラーゼを使用していることからTaqMan法が使用できない。そこで、ヘアピン型プローブであるMolecular Beaconの適用を試みたところ、遺伝子組換え(GM)ダイズおよびトウモロコシにおいて、GM配列と作物種特異的な内在性配列を同時に検出可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、デジタルLAMP定量法の開発に先立ち、異なるLAMP増幅産物の同時検出を試みた。一般的に、LAMP法では、標的ごとに増幅産物を区別することが困難であるが、Molecular Beaconを適用することにより、同時検出が可能であることを示した。本研究により、LAMP法においても多検体の同時検出が可能となり、遺伝子検査の効率化の可能性が広がった。

研究成果の概要(英文)：To develop digital quantitative method using loop-mediated isothermal amplification (LAMP), it is indispensable for a duplex detection system. In current digital PCR technique, TaqMan probes which are labeled with two different fluorescent dyes, has been used to distinct amplification products with different emitted wavelengths. The TaqMan method is inapplicable to LAMP since DNA polymerase with high strand displacement activity has been used in the DNA amplification. Molecular beacons are fluorescent nucleic acid probes with a hairpin structure. We attempted for duplex detection of LAMP amplification products using molecular beacons and succeeded to simultaneously detect two targets consisting of genetically modified (GM) and species-specific endogenous sequences in GM soybean and maize events.

研究分野：食品分析

キーワード：定量分析 LAMP 簡易迅速

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子検査は、いまや、ガンや感染症といった病理検査、水質等の環境検査、さらに食品検査等において幅広く活用されている。また、このような遺伝子検査では、標的核酸の存在を定性的に確認するだけでなく、どの程度存在しているのか？といった定量的なデータも必要とされることが多い。食品分野で広く用いられている遺伝子検査の一つに、遺伝子組換え食品検査がある。わが国では、遺伝子組換え (GM) 農産物は、安全性が確認されたものだけが利用可能となっており、食品表示法に基づく表示が義務付けられている。ただし、適切な分別生産流通管理が行われた非 GM 農産物に関しては、組換えに関する表示が免除され、非意図的な混入が 5% まで許容されている。このような食品表示制度の実効性を維持するためには、信頼性の高い定量検査が不可欠である。また、食品の品質管理という観点においては、食品中の微生物が、流通のどの段階で、どの程度増殖するか、というのは非常に重要な情報である。食品中での、食中毒菌等の増殖・挙動を予測するために、細菌の遺伝子を定量する方法が有効という報告もある。

現状では、核酸を定量する方法は、PCR を応用した二種類の技術しか存在しない。一つはリアルタイム PCR であり、もう一つはデジタル PCR である。リアルタイム PCR では、DNA が増幅する様子を観察することにより、一定の値に達するまでに要した PCR のサイクル数から元々存在していた DNA の分子数 (コピー数) を理論的に求め、変動が少ない DNA 配列を標準に利用する相対的な定量法である。一方、デジタル PCR では、増幅したウェルの数と増幅しなかったウェルの数を比較し、統計学的な処理を行うことによって、溶液中の DNA のコピー数を定量する技術である。とくに、デジタル PCR のようなデジタルな定量法は、核酸の絶対分子数を測定可能とされており、より正確な定量が可能であると考えられている。ただし、これらの核酸定量法は、分析に使用する装置が高価で、検査にかかる時間も長いため、専門施設等での利用に限定されるといった制約があった。

2. 研究の目的

遺伝子定量検査には、PCR が広く利用されており、PCR は増幅のために細かな温度制御 (変性、アニーリング、伸長) が必要である。一方、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は等温増幅反応であり、さらに、極めて短時間で標的の検出が可能であることから、PCR に代わり得る有力な技術として期待されている。しかしながら、LAMP は非常に優れた技術ではあるものの、標的核酸が存在するか否か、という定性的な分析にしか利用できず、定量分析ができないところに課題があった。

本研究では、LAMP を定量分析へ適用可能とするために、デジタル LAMP 法の開発を試みる。デジタル LAMP 法とは、デジタル PCR と同様に、標的核酸の希釈液を、多数のウェルを有するチップに注入し、等温反応により増幅したウェル数をカウントすることによって、元の溶液中の標的核酸の分子数を測定する方法である。

3. 研究の方法

現状、LAMP では、増幅産物を検出する手法として、副産物であるピロリン酸マグネシウムの濁度を利用する方法や、二本鎖 DNA に結合して蛍光を発するインターカレーターを検出する方法が主流である。しかしながら、デジタル LAMP では、一枚のチップ上で、実験系が正常に機能していることを確認するための内部標準配列由来の増幅産物と、標的配列由来の増幅産物を

区別する必要がある。すなわち、現行の LAMP 検出系では、増幅産物の識別は困難である。さらに、同時に複数の標的を定量する場合を想定すると、それぞれ標的ごとに定量可能であることが望ましい。そこで、本研究では、DNA プローブを用いた LAMP 産物の検出を試みる。DNA プローブには FAM や VIC といった様々な波長の蛍光物質が標識可能であり、標的配列に特異的な DNA プローブを利用することによって蛍光標識を使い分け、同時に多検体の定量が可能となる。本研究では、DNA プローブを用いた LAMP 増幅産物の検出等、デジタル LAMP に適した検出法を検討する。DNA プローブはリアルタイム PCR にも利用されているが、最も一般的な TaqMan 法は、DNA ポリメラーゼの性質の違いにより、LAMP には原理的に適用困難である。そこで、LAMP 技術にも適用可能と予想される様々な蛍光プローブを用いた検出技術の導入を試みる。標的プローブの検出には、多色蛍光検出が可能な、OptiGene 社の等温増幅蛍光測定装置である Genie III を用いた。

4. 研究成果

デジタル LAMP に適した様々な検出法を検討した。デジタル定量法の要件を満たすには、同時に二種類以上の増幅産物を検出する必要がある。リアルタイム PCR では、DNA プローブを用いた TaqMan 法が利用されており、DNA プローブの蛍光波長を使い分けることによって標的由来の増幅産物を識別することが可能となっている。一方、LAMP では、増幅反応において鎖置換型 DNA ポリメラーゼが利用されており、TaqMan 法が適用できない。そこで、TaqMan 法以外の蛍光プローブによる検出法を検討する必要があった。最初に、蛍光消光現象 (QP: Quenching phenomenon) を利用した核酸プローブである QProbe を用いて LAMP 増幅産物の検出を試みた。多くの GM 農産物に導入されているカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (P35S) を標的に Qprobe を用いて、P35S を有する GM ダイズである RRS から抽出した DNA を鋳型に検出を行ったところ、時間と共に蛍光が減少していく様子が確認された (データ省略)。さらに、対照配列として、ダイズ内在性配列である LectinI (LeI) を標的に検出を行ったところ、同様に蛍光が減少していく様子が確認できた (データ省略)。最後に、P35S と LeI の同時検出を試みるため、P35S 増幅用のプライマーセットに P35S を標的とした Qprobe-G (励起波長 505 nm / 蛍光波長 515 nm) および LeI 増幅用のプライマーセットに LeI を標的とした Qprobe-S (励起波長 665 nm / 蛍光波長 685 nm) を混合して RRS を鋳型に検出を行ったところ、反応開始後 30 分以内に FAM 用検出系で P35S の蛍光の減少、ROX 用の検出系で、LeI の蛍光の減少が確認された (図 1)。これらの結果から、QProbe による蛍光検出は、LAMP 法に適用可能であることが示された。

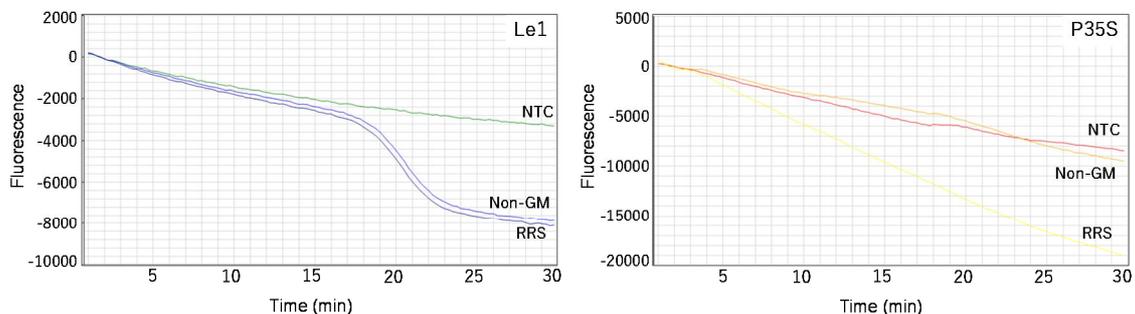


図1 QProbeによるLAMP増幅産物の検出結果
 左側がダイズ内在性配列であるLeIを標的とした場合、右側がP35Sを標的とした場合の結果を示す。RRSは除草剤耐性GMダイズ由来のDNA、Non-GMは非組換えダイズから抽出したDNAを鋳型に用いた場合、NTCは鋳型DNAなし

しかしながら、LAMP 産物が増幅すると蛍光が消光する系であることから、デジタル検出系には不向きであることが予想された。そこで、次に、ヘアピン型プローブである Molecular Beacon の適用を試みた。P35S を標的としたプローブの 5'側を蛍光物質 FAM、3'側をクエンチャー Dabcyl

で修飾した Molecular Beacon 用プローブを設計し、LAMP 反応液に添加したところ、LAMP の増幅に伴い蛍光の増加が確認された。また、Le1 を標的に、プローブの 5'側を蛍光物質 ROX、3'側をクエンチャー Dabcyl で修飾した Molecular Beacon 用プローブを設計し、検出の可否を検討したところ、特異的に検出可能であった。また、FAM と ROX の二種類の蛍光物質を用いた P35S と Le1 の同時検出も可能であった（データ省略）。さらに、RRS から抽出した DNA 溶液を非組換えダイズから抽出した DNA で希釈し、検出限界を評価したところ、0.5%という微量混入であっても、三回の繰り返し測定中、三回とも検出可能であった（図2）。GM 配列である P35S とダイズの内在性配列 Le1 をそれぞれ特異的に検出可能な系が開発できたことから、DNA プローブを用いた LAMP 増幅産物の検出に関して、Molecular Beacon が有効であることが示された。

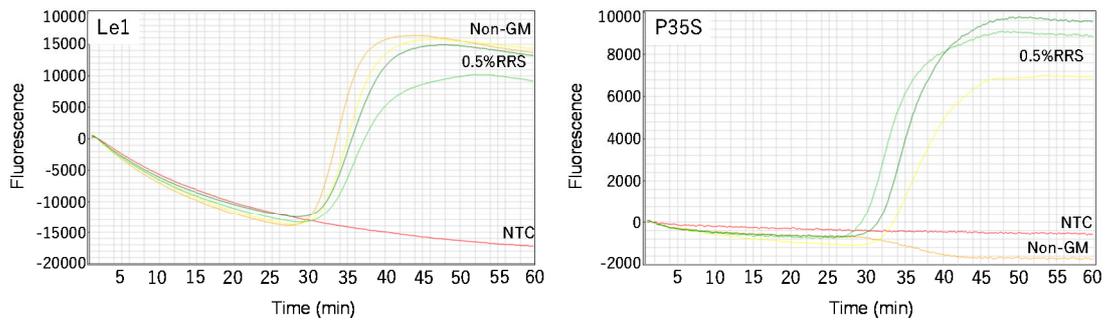


図2 Molecular BeaconによるLAMP増幅産物の検出結果
 左側がLe1を標的とした場合、右側がP35Sを標的とした場合の結果を示す。0.5%RRSから抽出したDNA（三回の繰り返し）、Non-GMは非組換えダイズから抽出したDNAを鋳型に用いた場合、NTCは鋳型DNAなし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------