

# RT-LAMP 法によるシンビジウムモザイクウイルス (CyMV) の検出

愛知県農業総合試験場・環境基盤研究部・生物工学グループ 福田 至 朗

## はじめに

近年、農作物の病害診断において、ELISA 法など抗原抗体反応を利用した診断法とともに、検出精度が高い遺伝子診断が用いられている。現在、このような遺伝子診断の中で一般的に利用されているのが PCR 法である。PCR 法は、二つのプライマーに挟まれた塩基配列を好熱性細菌由来の DNA polymerase によって増幅する反応だが、遺伝子を増幅するためには熱変性・プライマーのアニーリング・伸長の三つの反応を数十回繰り返すことが必要である。

LAMP 法は Loop-mediated isothermal amplification 法の略で、日本で開発された PCR 法に代わる迅速・精確・簡便な遺伝子増幅法である (MORI et al., 2001; NAGAMINE et al., 2002; NOTOMI et al., 2000)。LAMP 法の利用に関する研究は、ペロ毒素産生大腸菌やサルモネラ菌の検出というような食品衛生関連分野や、SARS ウイルスの検出をはじめとした臨床検査の分野で広く行われている。また、農業分野においても、キクスタントウイルス (平田ら, 2002)・トマト黄化葉巻ウイルス (FUKUTA et al., 2003 a)・ジネンジョモザイクウイルス (FUKUTA et al., 2003 b)・シンビジウムモザイクウイルス (福田ら, 2003)・トマト黄化えそウイルス (FUKUTA et al., 2004) についての検出法が報告されている。

本稿では、LAMP 反応の仕組みと、その応用例として LAMP 反応に逆転写反応を組み合わせた RT-LAMP 反応によるシンビジウムモザイクウイルス (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV) の簡易な検出について紹介する。

## I LAMP 反応の特徴

LAMP 反応と PCR 反応は、共に DNA polymerase によって DNA を増幅する反応であるが、この両者は以下の点で大きく異なっている。

① 一般的に PCR 反応は、熱変性・アニーリング・伸長の三つの反応をそれぞれ異なる温度で行う。一方、LAMP 反応では、*Bst* DNA polymerase の鎖置換活性に

よって熱変性を行う必要がない。さらに、アニーリングと伸長反応を同じ温度で行うことができるため、一定温度 (60 ~ 65°C) での DNA 増幅が可能である。

② PCR 反応では、増幅部位の両端にプライマーを設計する。一方、LAMP 反応では、増幅部位から 6 箇所を選び出し、これらの配列から四つのプライマーを設計する。これらが一致していないと DNA が増幅されないため、PCR に比べ反応の特異性が高い。

③ PCR 反応では、増幅された反応産物を電気泳動によって確認する必要がある。LAMP 反応では、DNA 増幅に伴って生成するピロリン酸マグネシウムによって反応液が白濁するため、DNA の増幅の有無を目視によって確認することができる。

このように、優れた特徴をもっている LAMP 法であるが、以下にその反応の仕組みについて説明する。

まず、LAMP 法では、四つのプライマー：F3・B3・FIP・BIP を用いる (図-1A)。このうち、FIP と BIP プライマーはそれぞれ 2 箇所の配列を認識している。すなわち、FIP プライマーは F1C と F2 の配列を、BIP プライマーは B1C と B2 の配列をそれぞれつなげたものである (図-1A)。

LAMP 反応における DNA 合成の流れを図-1B ~ D に示した。まず、FIP プライマーが相補配列の F2 部位にアニーリングし、*Bst* DNA polymerase によって DNA 鎖が合成される (図-1B)。続いて、F3 プライマーがアニーリングし DNA 鎖が合成される。この際、*Bst* DNA polymerase の鎖置換活性によって、先に合成された DNA 鎖をはがしながら合成が進む (図-1C)。はがされた DNA 鎖の 5' 末端には F1 の相補配列 (FIP プライマーの一部) が存在するが、これが内部の F1 配列とアニーリングすることにより、ループ状の構造が形成される (図-1C)。このループ構造をもった DNA を鋳型として、B 側からも同様の反応が起こると、5' と 3' の両末端にループ構造をもった“鉄あれい”状の DNA が作られ、これがその後続く Cycling ステップの鋳型となる (図-1D)。

Cycling ステップでは、この“鉄あれい”状の DNA の自己アニーリング部位からの DNA 合成とプライマーのアニーリングによる DNA 合成が並行的に進む。その結果、1 回の Cycling 反応によって、“鉄あれい”状の DNA

Detection of *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) by RT-LAMP.  
By Shiro FUKUTA

(キーワード: RT-LAMP, シンビジウムモザイクウイルス (CyMV), 遺伝子診断)

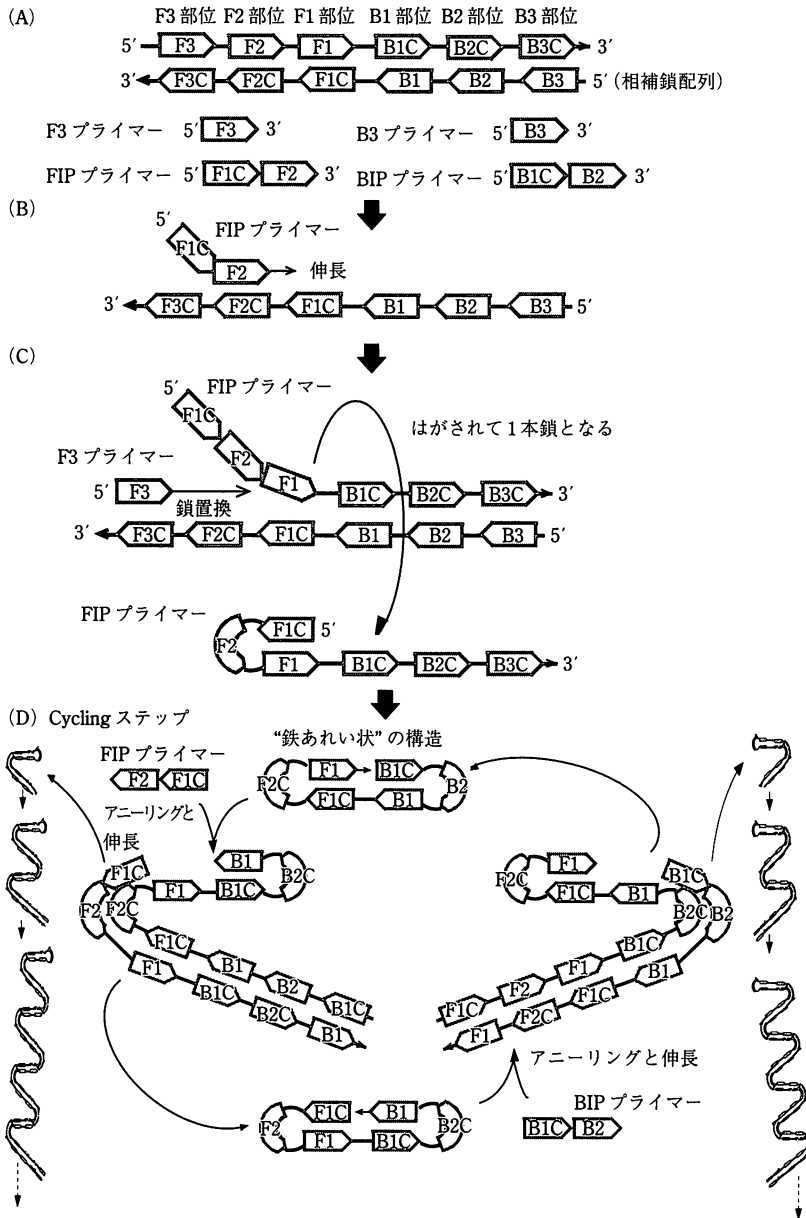


図-1 LAMP 反応の概要. FIP プライマーのアニーリングからの反応

と F2 ~ B2 までの領域がそれぞれ自己アニーリングして 2 本鎖様の構造となった DNA が作られる。さらに、これらすべてが鋳型となって、倍化しながら DNA が合成される (図-1 D)。その結果、LAMP 反応産物を電気泳動すると、ラダー状の DNA が観察される。

## II RT-LAMP 法による CyMV の検出

CyMV はシンビジウムやカトレヤ、エビネなど 40 属以上のラン科植物に感染する病原ウイルスであり、

CyMV に感染したランは葉に退色斑やモザイク症状を起こす (井上, 1993)。洋ランにおける CyMV の感染は、我が国では 1964 年井上により最初に報告された。その後の 40 年間で洋ランの栽培は飛躍的に増加したため、CyMV による国内の被害も拡大している。特に愛知県は全国有数の洋ランの栽培産地を有しており、ウイルスによる被害も大きいことからその対策が求められている。

CyMV の検出法としては、電子顕微鏡による観察、抗原抗体反応を用いた ELISA 法や DIBA 法・RIPA 法が

一般的に用いられている (HSU, 1992; TANAKA et al., 1997; PEARSON and COLE, 1991; VEJARATPIMOL, 1999)。一方、遺伝子診断としては、RT-PCR 法 (LIM et al., 1993)・immunocapture PCR 法 (BARRY et al., 1996)・DIG 標識 cRNA プロブ法 (HU and WONG, 1998) 等が報告されているが、これらの遺伝子診断には特別な機器や技術が必要であることから、圃場レベルで利用することは難しかった。そこで、LAMP 法を利用した簡易で高精度な CyMV 検出技術を確認することにより、現場での診断の可能性を検討した。

### 1 CyMV を検出する LAMP プライマーの設計

LAMP 法によるウイルス検出を行うためには、まず LAMP プライマーの設計を行う必要がある。そのため、CyMV を検出するための LAMP プライマーを、外被タンパク質遺伝子配列 (GenBank accession number: AY429021) から設計した。CyMV の検出には、前述した 4 種のプライマーに加え、LAMP 反応を促進する 2 種の Loop プライマーも用いた (表-1)。LAMP プライマーの設計には、インターネット上の「プライマー設計支援ソフト」の利用が便利であるが (<https://biodb.netlaboratory.com/lamp/index.html> 参照)、このようなソフトを使わない場合には、以下の点に注意して設計する必要がある。

- ① それぞれの部位の長さを 20 bp 程度にすること。
- ② F1 と F2 および B1 と B2 の間を 20 bp ~ 40 bp 程度あけること。その結果、これに F2 または B2 領域を加えた 40 bp ~ 60 bp でループ状の構造を作ることになる。
- ③ F1 と B1 の間はなるべく短くする。長ければ長いほど、合成の効率が悪くなる。
- ④ F1・F2・B1・B2 領域の GC 含量を 50 ~ 60% にすることが望ましい。特に、それぞれの領域の中心に近い側の末端の配列が重要になる。

また、LAMP 反応には HPLC グレードのプライマーの使用が推奨されているが、通常の PCR グレードでも検出可能である。

## 2 RT-LAMP 法による診断のプロトコール

### (1) 試薬の準備

RT-LAMP 反応試薬のうち、図-2 A に示した 2 × LAMP 試薬・プライマーミックス・100 mM DTT はあらかじめ調整し、-30℃で保存しておく。当研究室では、2 × LAMP 試薬に用いる Betaine は Sigma-Aldrich 製の 5 M Betaine、また、dNTPs は Amersham Pharmacia 製の Ultrapure dNTP Set の 100 mM 溶液を用いている。

これ以外の試薬として、RNase Inhibitor (Promega 製)、Bst DNA polymerase (New England Biolabs 製)、AMV reverse transcriptase (Invitrogen 製) を用意する。これらの試薬については Loopamp RNA 増幅試薬キット (RT-PCR) を購入すれば一度にそろえることができる (<http://loopamp.eiken.co.jp/j/index.html> 参照)。

### (2) RT-LAMP 反応

RT-LAMP 法を利用した CyMV の検出は以下の手順で行う。

#### ① 鋳型の調整

診断したい植物体を、100 ~ 200 倍容の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) で磨砕する。磨砕液を 10,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を新たなチューブに回収する。

#### ② 反応液の調整

図-2 B に示したように RT-LAMP 反応液を調整し、最後に①の鋳型を添加して 25 μl とする。

#### ③ RT-LAMP 反応

反応液を 65℃で 1 時間インキュベートする。インキュベートには、サーマルサイクラーやヒートブロックなどを用いているが、恒温槽でも行うことができる。

#### ④ 判定

インキュベート後、反応液が白く濁っているか否かを確認する。CyMV が感染しているサンプルでは図-3 に示したように反応液が白濁する。

## III RT-LAMP 反応の注意点

最後に、RT-LAMP 反応を行うに当たり、注意する

表-1 CyMV を検出する LAMP プライマー

	塩基配列	部位 <sup>a)</sup>
F3	5'-TCCAAGAGTGCTACCCCTGC-3'	234 ~ 253
B3	5'-CGACGGCATCGAAGAAGTCA-3'	447 ~ 466
F1P	5'-TTGGCTACAAGATCTGCGC-TTTCTGCCCTACGAAACCTG-3'	301 ~ 320, 258 ~ 277
B1P	5'-TGGTGTGGAATCTGATGCTGGC-CTCCTGGAAACCAGCCTTG-3'	359 ~ 380, 408 ~ 426
F-Loop	5'-AAGAGCGGCGCGACGACAT-3'	278 ~ 297
B-Loop	5'-TAACGATCCGCCGCCAA-3'	384 ~ 401

<sup>a)</sup> CyMV の外被タンパク質遺伝子の塩基配列 (GenBank Accession No. AY429021) 上のプライマー設計位置。

## A. あらかじめ調整しておく試薬

## ① 2×LAMP 試薬

- 40 mM Tris-HCl (pH 8.8),  
 20 mM KCl,  
 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
 16 mM MgSO<sub>4</sub>,  
 0.2% Tween 20,  
 1.6 M Betaine,  
 2.8 mM dNTPs,

となるように混合し, 1 ml ずつ分注し -30℃で保存する。

## ② プライマーミックス

- 1.25 μM F3 および B3 プライマー,  
 10 μM FIP および BIP プライマー,  
 5 μM F-Loop および B-Loop プライマー,  
 となるように混合し, -30℃で保存する。

## ③ 100 mM DTT

となるように調整し, -30℃で保存する。

## B. RT-LAMP 反応試薬の調整

- 12.5 μl 2×LAMP 試薬  
 4 μl プライマーミックス  
 1.25 μl 100 mM DTT  
 0.2 μl RNase Inhibitor (40 units/μl)  
 1 μl Bst DNA polymerase (8 units/μl)  
 0.5 μl AMV reverse transcriptase (2.5 units/μl)  
 1 μl 植物磨砕液  
 4.55 μl RNase free water

全量 25 μl

図-2 RT-LAMP 反応試薬の調整

点を記す。上記のように, RT-LAMP 法は極めて簡易なウイルス診断法である。ところが, LAMP 法は微量な鋳型をもとにして短時間に大量の DNA を増幅することができるため, コンタミネーションが最も大きな問題となる。特に, 反応後の陽性チューブ内には多量の増幅産物が含まれており, これが反応ストック液やマイクロピペットなどにコンタミネーションすると, すべての検体で短時間に白濁が起こってしまう。こうなってしまうと, 試薬をすべて更新し, 少なくとも 2 週間程度は同じプライマーを利用した病気の診断をすることができなくなる。LAMP 反応を行う場合, このようなコンタミネーションを防ぐことが最も重要であり, そのためには以下の点に注意する必要がある。

① LAMP 試薬の調整と LAMP 反応は別々の実験室で行う。

② 反応後のチューブは白濁を確認した後, キャップを開けずに廃棄する。

③ 電気泳動やサザンブロッティングなど反応産物を使った実験を行う場合は, 試薬調整室と離れた実験室で行い, 実験後, なるべく試薬調整室に立ち入らないようにする。

チューブ1 チューブ2

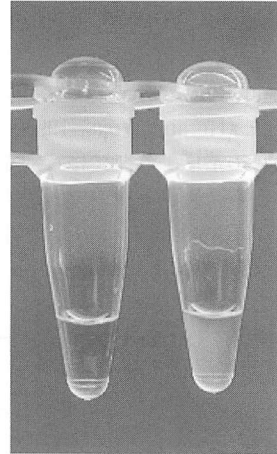


図-3 CyMV 検出後の LAMP 反応液

チューブ1: 健全コショウラン

チューブ2: CyMV 感染コショウラン

## おわりに

以上のように, RT-LAMP 法は CyMV をはじめとした植物ウイルスの検出に有効な技術である。RT-LAMP 法は, サンプルの調製や増幅反応・判定などの操作を短時間で簡易に行うことができるため, 栽培現場での高精度なウイルス診断が可能である。既に愛知県では, 一部の農業改良普及課(旧普及センター)において LAMP 技術が導入されており, 農家からの診断依頼に添えている。今後, LAMP 技術を利用した病害診断技術をさらに開発するとともに, それらを現場で利用できるよう普及していきたいと考えている。

## 引用文献

- 1) BARRY, K. et al. (1996): J. Phytopathol. 144: 179 ~ 186.
- 2) FUKUTA, S. et al. (2003 a): J. Virol. Methods 112: 35 ~ 40.
- 3) ——— et al. (2003 b): Arch. Virol. 148: 1713 ~ 1720.
- 4) ——— et al. (2004): J. Virol. Methods 121: 49 ~ 55.
- 5) 福田至朗ら (2003): 日本植物病理学会報 69: 411 ~ 414.
- 6) 平田行正ら (2002): 園学雑 71 別 2: 261 (講要).
- 7) Hsu, H. T. et al. (1992): Phytopathology 82: 491 ~ 495.
- 8) Hu, W. W. and S. M. WONG (1998): J. Virol. Methods 70: 193 ~ 199.
- 9) 井上成信 (1993): 作物ウイルス病辞典 (土崎常男ほか編), 全国農村教育協会, 東京, p. 571 ~ 587.
- 10) LIM, S. T. et al. (1993): J. Virol. Methods 41: 37 ~ 46.
- 11) MORI, Y. et al. (2001): Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 150 ~ 154.
- 12) NAGAMINE, K. et al. (2002): ibid. 290: 1195 ~ 1198.
- 13) NOTOMI, T. et al. (2000): Nucleic Acids Res. 28: e63.
- 14) PEARSON, M. N. and J. S. COLE (1991): J. Phytopathol. 131: 193 ~ 198.
- 15) TANAKA, S. et al. (1997): Plant Dis. 81: 167 ~ 170.
- 16) VEJARATPIMOL, R. et al. (1999): J. Biosci. Bioengin. 87: 161 ~ 168.