イネ育種選抜 DNA マーカーへの Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の適用

水上優子・福田至朗・石田 朗・加藤恭宏・上田淳一・神戸三智雄

(愛知県農業総合試験場, 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字三ヶ峯 1-1, 〒480-1193)

Convenient DNA marker based on Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for Rice breeding

Yuko Mizukami, Shiro Fukuta, Akira Ishida, Takahiro Kato, Junichi Ueda and Michio Kanbe

(Aichi prefecture Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi 480-1193, Japan)

**キーワード: LAMP法, DNAマーカー, 育種, ツマグロ
ヨコバイ抵抗性, イネ**

はじめに

DNA マーカーは, 選抜マーカーとして育種の簡易化短期間化に大きく貢献している. 従来の DNA マーカーには RFLP マーカー, RAPD・STS マーカー, CAPS マーカー, SSR マーカー, SNPs マーカーなどがある (鵜飼 2000). このうち, PCR 増幅と電気泳動によって多型を認識できる RAPD, STS, SSR マーカーは精度が高く操作も比較的簡便で数~十数時間の操作で結果を確認することができるため, 選抜マーカーとして広く用いられるようになっているが, 実験にはいずれも何らかの DNA 抽出が必要であり, かつサーマルサイクラーなどの設備を要する.

一方, 近年開発された DNA 断片増幅法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は, 標的領域の 6 か所の領域に対して FIP, F3, BIP, B3 という 4 種類のプライマーを設定し, 鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用い一定温度で反応させることを特徴とする. フォワードプライマーである FIP のプライマーの 5' 側にターゲット DNA と同一配列を連結しておくことにより, 最初に伸長反応を行う際に鋳型 DNA の 3' 末端部分にループ構造を作らせ, その後自己アニールにより 3' 末端から自己を鋳型とした合成反応を行わせる. 鎖置換型ポリメラーゼを使用するため, 一定温度 (60 ~ 65°C) での 1 時間の反応のみで合成が終了し, サーマルサイクラーを必要としない (Notomi *et al.* 2000, Nagamine *et al.* 2002). さらに DNA 増幅の副産物としてピロリン酸マグネシウムが生成され, 目的とする DNA 断片が増幅された場合, 反応液が白濁する (Mori *et al.* 2001). このため, 電気泳動

を行わなくても, 反応液の白濁の有無で目的断片の増幅を検出することができる. また, LAMP 反応はごく微量の鋳型 DNA に反応し, pBR322 に組み込んだ HBV ウィルス DNA 断片を標的とした場合, 反応液中にわずか 6 個のベクター量で標的断片の増幅が認められるとともに (Notomi *et al.* 2000), 4 種のプライマーで塩基配列を認識することから反応特異性が非常に高く, PCR 法の 10 数倍の感度を示す. このようにごくわずかな DNA サンプルでの検出が可能で, サーマルサイクラーや電気泳動装置を必要とせず, 従来の PCR 法の 1/5 以下の時間で特定の塩基配列を検出できる方法として, LAMP 法は動物植物を問わず広く利用されるようになってきており, 植物ウィルス (福田ら 2003a, Fukuta *et al.* 2003b)・病原細菌 (Iwamoto *et al.* 2003, 安中ら 2003)・遺伝子組換え食品 (Fukuta *et al.* 2004) の検出に有効性が報告されている.

ここではイネを試料として, ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子 *Grh3* (*t*) の STS マーカーを LAMP マーカーに改変し, LAMP 反応に用いるサンプル DNA の抽出の簡易化と判定結果の安定性を検討した. その結果, DNA 抽出操作をほとんど行わなくても判定が可能であり, LAMP マーカーの有用性が示されたため, イネにおける簡易 DNA マーカー検出方法として報告する.

材料および方法

イネツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子 *Grh3* (*t*) は, 第 6 染色体上に位置し, イネゲノムプロジェクトで公開されている CAPS マーカー RAO538 (67.7 cM) と RFLP マーカー CKO133 (68.5 cM) 間に座乗することが明らかになっている (辻ら 1996). これに連鎖する DNA マーカーを対象に LAMP 化を検討した. 材料は感受性品種: 日本晴, ツマグロヨコバイ抵抗性品種・系統: 愛知 66 号, 大地の風, Rantaj-emas2 (*Grh3* (*t*) の導入親) と, 日本晴/愛知 66 号 F₁ 個体を用いた.

ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子の下流に位置し, RFLP マーカー CKO133 の上流にある日本晴 BAC クローン

OSJN0043B22 の塩基配列を基に、日本晴・愛知 66 号を識別できる PCR プライマーセットを複数作出した。その中から、CKO133 の上流 20 kb の位置に、増幅バンド長に差がある STS マーカー：5470M1 (Forward Plimer 5'-GGGT TTCTTCGCTTCCATCCTA-3', Reverse Plimer 5'-CATAC CGTCACAAGGGGCACAT-3') を得た (図 1)。

日本晴、愛知 66 号の DNA を鋳型にし、STS プライマーセット 5470M1 により増幅された DNA 断片は愛知 66 号の方が短く、両者の塩基配列解析から、連続した約 200 bp の塩基欠失が愛知 66 号側に認められた。この欠

図 1. STS マーカー「5470M1」電気泳動像

M : マーカー (1kbPlus, Promega)
N : 日本晴 (感受性)
A : 愛知 66 号 (抵抗性)
Ra : Rantaj-emas2 (抵抗性)

失部分を利用して感受性 (日本晴) 特異的、抵抗性 (愛知 66 号) 特異的な LAMP プライマーをそれぞれ設計した (図 2)。LAMP プライマーの実効性は日本晴、日本晴／愛知 66 号 (感受性／抵抗性ヘテロ)、愛知 66 号、大地の風 (抵抗性)、Rantaj-emas2 (抵抗性導入親インディカ種)、コシヒカリ (感受性) から CTAB 法で抽出した DNA を鋳型として調査した。

LAMP 反応は反応液組成・反応時間とも福田らの方法に準じて行った。反応液組成は、0.2 μ M F3 プライマーおよび B3 プライマー、1.6 μ M FIP プライマーおよび BIP プライマー、1.4 mM dNTPs, 0.8 M ベタイン、8 mM $MgSO_4$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Tween20, 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 8U Bst DNA polymerase (New England Lab) とし、鋳型として 1 μ l の DNA 液 (DNA 濃度 10 ng/ μ l) を含む 25 μ l を総量とした。反応時間は 63°C, 60 分とした。

LAMP 反応の鋳型として用いる DNA 抽出をより簡便にするために、①葉切片直接添加 (5 mm 角程度の切片を直接反応液に添加)、②滅菌水磨砕法 (5 mm 角程度の切片を滅菌水 100 μ l 中で緑色に色づく程度にマイクロチップで潰し 1 μ l を鋳型として添加)、③葉切断面浸漬 (反応チューブ中の反応液に葉の切断面を 5 分浸漬) の 3 つについて、CTAB 法 DNA 抽出液 (DNA 濃度 10 ng/ μ l) との反応結果の整合性を比較した。

結果および考察

愛知 66 号の 5470M1 プライマー増幅断片は日本晴と比較して約 200 塩基の欠失があり、この欠失部分を検出

愛知 66 号 ACGTGCAATGCACGTAGCGACCAATTTGAATAAAACCAAAAAATTTGTTGCTACAATCAACANATTTTTTGTGCTATTGAAAAATAA
日本晴 ACGTGCAATGCACGTAGCGACCAATTTGAATAAAACCAAAAAATTTGTTGCTACAATCAACATATTTTTTGTGCTATCGAAAAATAA
F3-R

TCTGCCATCAGAGTACAGAGCTACTGAGAGTAAGGATGCATAGCAGACACATACAACCTCATACATA-----
TCTGCCATCAGAGTACAGAGCTACTGAGAGTAAGGATGCATAGCAGACACATACAACCTCATACATACTCCCTCCGTCTATAATAATGGGATTTTGAG
FIP-R FIP-R

TTTTGCTTGCAATGTTTGACTGCTCGTCTTATTCAATTTTTTTTGAATTTATTATTTATTTTGTGACTTACTTTATTATTACAGTATTTTAAGCAC

AACTTTTCGTTTTTATATTTGCAAAAAAATTTGAATAAGACGAGTGGTCAAACGTTGCAATAAAAAAAGCTCAAAATCTCTTATTTGTTGGGACGGAGGGA
F3-S FIP-S

-TATAGAATGACAATGCTGACCATCAACCTACAGGAATAACAGCGTCAAAACCCACAACCGCCAAGCCTACATACTCAGAATATGCATAGATCCTGCCAAGT
GTATAGAATGAGAATGCTGACCATCAACCTACAGGAATAACAGCGTCAAAACCCACAACCGCCAAGCCTACATACTCAGAATATGCATAGATCCTGCCAAGT
FIP-S BIP BIP

CACAAGCTCATGTTTATGAGCTATAATAAAAAAATCTCGGGTTATTTTTACGGAATGATCTCCTCTATATATCTAAAAATCT
CACAAGCTCATGTTTATGAGCTATAAT-AAAAAATTTTCGGGTTATTTTTACGGAATGATCTCCTCTATATATCTAAAAATCT
B3

感受性・抵抗性検出共通

感受性検出用

抵抗性検出用

BIP ACAGCGTCAAAACCCACAACCTGACTTGGCAGATGCTATGC
B3 TAGGAGGAGATCATTCGGTG
F3-S GACGAGTGGTCAAACGTTGC
FIP-S CCTGTAGGTTGATGGTCAGCATATTGTGGGACGGAGGGAG
F3-R GTGCAATGCACGTAGCGACC
FIP-R ATGTGTCGTGCTATGCATCCCTGCCATCAGAGTACAGAGC

図 2. 愛知 66 号 (抵抗性)、日本晴 (感受性) の「5470M1」増幅断片の部分塩基配列と LAMP プライマー

するように抵抗性検出用と感受性検出用に設計した各 4 種の LAMP プライマー（うち 2 プライマーは抵抗性・感受性に共通）を用いて LAMP 反応を実施した結果、それぞれが DNA 増幅の有無によって白濁し抵抗性と感受性を識別することができた。また *Grh3* (*t*) 領域のホモ・ヘテロ個体の識別が可能であった（図 3）。

LAMP 法による DNA 増幅は FIP プライマーと BIP プライマーではさまれる部分を基準にその整数倍の長さの断片が増幅される。このため、LAMP 反応終了後の反応液を電気泳動すると、基準断片長の等倍のラダー状の像が得られる。このようにラダー状の電気泳動像を示すかどうか、LAMP プライマーのアニーリング・増幅反応が正しく行われたかどうかの指標になる。図 3 に示すように CTAB 法抽出 DNA を鋳型とした場合、反応終了後の電気泳動では白濁した反応液のみでラダー状のバンドが確認され、反応が正常に起こっていることが確認された。ターゲット領域の増幅量は添加した鋳型 DNA 量に左右されるが、自己アニールによる鋳型の増幅が行われるため、いずれ増幅量は平衡に達し、概ね 1 時間の反応時間をとれば最終的な白濁程度に大きな差は出ない。逆に平衡に達するまでの時間によって鋳型 DNA が含まれる濃度を推定することも可能で、濁度計を併用し白濁度

の上昇程度を測定すればリアルタイム PCR と同様に鋳型 DNA の検量が可能である。

鋳型 DNA として葉切片の直接添加、滅菌水中磨砕液を使用した結果、抵抗性・感受性検出のいずれも白濁し、CTAB 抽出 DNA で行った結果と一致しなかった。また、これらの反応終了液を電気泳動した結果、LAMP 反応に特異的なラダーを示さず泳動レーン全体がスメアになった（図 4-A, B）。このことから、鋳型として葉切片の直接添加、滅菌水中磨砕液を用いると、誤判定となる場合があることが示された。これに対し、葉の切断面浸漬では非特異反応が起こらず、CTAB 法抽出 DNA を鋳型としたときの反応結果と一致し、抵抗性・感受性の識別が可能であった（図 4-C）。この原因は、葉の添加や水磨砕液では夾雑物が多く非特異反応が起こったため、切断面浸漬では DNA 量も少ないが夾雑物も少なくなり、非特異反応が抑えられたものと考えられる。LAMP 反応はごく微量の鋳型 DNA で十分反応が起こるため、非特異反応を抑えるためには DNA の濃度を抑えるより、夾雑物の混入を抑える方が有効と思われる。

これらのことから、イネの場合、LAMP 反応には DNA 抽出が不要で結果判定までの時間が 2 時間程度で済み、マーカーによる形質判定に必要な手間や時間が大幅に軽

図 3. LAMP 反応終了後の反応液白濁とアガロース電気泳動像

A: 感受性検出反応（プライマー FIP-S, F3-S, BIP, B3 による反応）

B: 抵抗性検出反応（プライマー FIP-R, F3-R, BIP, B3 による反応）

M: 100 bp マーカー

1: 日本晴（感受性）

2: 日本晴／愛知 66 号（感受性／抵抗性ヘテロ）

3: 愛知 66 号（抵抗性）

4: 大地の風（抵抗性）

5: Rantaj-emas2（抵抗性インディカ種）

6: コシヒカリ（感受性）

図 4. 鋳型 DNA の違いによる LAMP 反応後の白濁と反応液の電気泳動像 (感受性検出)

A: 葉切片直接浸漬 (葉切片は反応後除去), B: 水抽出, C: 葉切断面 5 分浸漬

A: 愛知 66 号 (R) N: 日本晴 (S) D: 大地の風 (R)

減されることが示された。実際に使用する場合の注意事項として、ごくわずかの試料でも反応が起きるので、反応終了後のチューブは密封しておく必要があるとともに、反応液の混合は可能な限り空気循環フード内で行うことが望ましい。また、室温でもわずかに増幅反応が進み夾雑物によって自然に白濁する場合があるので反応直後に白濁判定を行うか、80°C、10 分間の酵素失活処理またはサンプルの冷凍を行うとよい。

LAMP 法は株式会社栄研化学の特許下にあり、LAMP 反応キットが販売されている。LAMP プライマーの設計が行えるかどうかは、対象とする部分 (増幅領域 200 bp 以内) の塩基配列に依存し、プライマー設計上のポイントは同社ウェブサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/>) で詳しく説明されているが、3' 末端が極端に AT リッチにならないこと、増幅領域を 200 bp 以内とすること、ループになる部分は 40–60 bp とすること、各プライマーの Tm 値を 60–65°C とすることなどが設計上の一般的な注意事項としてあげられている。前述の同社ウェブサイトからはプライマー設計支援ソフトを利用することもできる。一塩基変異の検出も行えるが、鋳型 DNA の精製が不十分だと誤判定となることがあるため (福田私信)、ごく簡易な DNA 抽出物を鋳型とする場合、欠失や数～十数塩基の塩基配列変異を利用するのが検出精度の安定に有効と思われる。育種マーカーとして使用する上ではホモ・ヘテロの検出が必要であり、1 試料について「+/-」の 2 回

の反応を行わなくてはならないが、非常に大量の試料を検定する必要がある選抜初期世代では、劣性ホモのみを落とすために使用するだけでも、選抜の効率化に役立つと考えられる。また、マルチプレックス LAMP の方法も検討され、異なる蛍光標識プライマーを用いて一度で 2 種の断片を検出する方法も開発されつつあり (葛原ら 2003)、将来的には 1 回の反応でホモ・ヘテロの検出が可能になるであろう。

近年開発されたジェノタイピング解析法としてアシクロプライム法もあげられるが、シーケンサーやマイクロプレートリーダーなど蛍光測定装置を必要とすることから、反応にも検出にも特殊な機材を必要としない点で LAMP 法は有利である。LAMP マーカーは、既に開発された RAPD, STS などの DNA マーカーをさらに簡易な検出法に改変する場合に特に有効であると思われる。DNA マーカーによる育種選抜と従来の生物検定などによる選抜との比較は杉浦らによって詳しく述べられ (杉浦ら 2004)、生物検定に比べてコスト・労力の点で劣るものの、検定期間が限定されないこと、精度の高さでは優ると指摘されている。また、マーカー選抜を適用する形質を増やして複数形質を同時選抜することは育種の効率化に最も効果的である。これまでの PCR ベースマーカーを操作の簡便な LAMP マーカーに改変することは、労力を軽減し複数形質同時選抜にも役立つと考えられる。

謝 辞

本研究は農林水産省 21 世紀グリーンフロンティア研究「イネ・ゲノムの有用遺伝子の単離及び機能解明」の成果の一部を活用したものである。

引用文献

- 福田ら (2003a) 日植病報 69: 411–414.
- Fukuta, S. *et al.* (2003b) J. of. Virological Methods. 112: 35–40.
- Fukuta, S. *et al.* (2004) Eur. Food Res. Technol. 218: 496–500.
- Iwamoto, T. *et al.* (2003) J. of Clinical Microbol. 41(6): 2616–2622.
- 葛原ら (2003) 日本分子生物学会第 26 回年会ポスター発表. 2PC-098.
- Notomi, T. *et al.* (2000) Nucleic Acid Res. 28: e63.
- Nagamine, K. *et al.* (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 1195–1198.
- Mori, Y. *et al.* (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 150–154.
- 杉浦ら (2004) 育種学研究 6(3): 143–148.
- 辻ら (1996) 日作東海支部報 122: 29–30.
- 鵜飼保雄 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析 33–41.
- 安中ら (2003) 日本臨床微生物学雑誌 13(1): 19–25.