

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究」
令和4年度 分担研究報告書

核酸等温増幅反応技術に関する文献調査および RPA の実験的検討

研究分担者 曾我慶介 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

研究要旨：近年の食品種の多様化、世界各国からの食品の輸入量及びその安全性確保需要増加に伴い、食品遺伝子検査の需要も増すものと考えられる。現在の食品遺伝子検査はリアルタイム PCR がゴールドスタンダードになっているが、機械が高価かつ時間がかかることが問題視されていた。一方で、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は等温でかつ数十分で反応が完了することから、定性検査法として医療分野では普及してきている。しかし、国内の食品遺伝子検査としては検討が進んでいないのが実情である。そこで本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応の現状の情報収集を行い、その中から実用的な方法を選択して、サンプリングから結果の解析までの流れを鑑みて食品行政に係る遺伝子試験としての適用性を評価し、試験法として開発することを目的とする。

そこで、本研究では、等温核酸増幅反応の文献調査を実施し、食品遺伝子検査として利用可能な情報収集を行った。近年の論文数は LAMP が一番多く、次に RPA と続いた。RPA について 5 年間の論文を調査したところ、臨床で使われることが多かったが、日本以外の国では動植物や食品の検査への応用例も見られた。反応温度帯は 37~39°C で、30 分以内で終わるラテラルフローアッセイで利用され、簡便検査法として実績が多く有用な技術であると考えられた。

RPA による検出法開発を検討するために、遺伝子組換えとうもろこし MON863 系統をモデルに、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (SSIIB) 及び多くの遺伝子組換え作物に導入されているカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列 (P35S) を標的とした方法を検証した。検討した RPA-SSIIB に関しては、特異性は良好であるが、検出限界値が 260~2,600 コピーとリアルタイム PCR と比べて不良であった。RPA-P35S に関してはバックグラウンドが高く、検査法の開発にはさらに検討が必要であった。しかし、各反応は 37°C、15 分間以内に完了することから、簡易的に検査求められる場合の時間短縮やオンサイト利用には有用な技術と考えられた。よって、今後、RPA の食品遺伝子検査への応用を検討する際は、その需要調査を行うことも重要と考えられる。

A. 研究目的

世界の食品安全性検査市場は 2022 年に 211 億米ドルと推定され、2027 年には 311 億米ドルに達し、8.1%の年次成長率になると予測されている (MarketsandMarkets 社、2022)。近年では、「培養肉」等の新規技術で開発された食品種が増えるとともに、世界の食品取引及び規制遵守を満たす

ための安全性確保需要も増加することから、結果的に食中毒等のリスクを低減し、かつ食品表示不正を防止するために世界各国で食品検査の需要が増すと考えられる。

食品行政にかかる遺伝子検査（遺伝子組換え食品、アレルゲン、微生物）はリアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) がゴールドスタンダードになっている。その理由として、特異性

が高いことおよび高感度なことが挙げられる。しかし、PCRはサーマルサイクラーを用いて一定温度の多段階ステップを複数サイクル繰り返す必要があるため、高価な機械が必要なこと及び結果を得るまでに数時間がかかることが課題であった。従って、今後はリアルタイム PCR と同等の特異性・感度・精度を有しつつ、より簡便で検査速度を向上させた試験法の開発が求められている。

近年、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、60-65°Cの等温反応であり、インキュベーション時間も数十分と短時間で済むことから、世界的にも近年のCovid-19 検査などの感染症診断の分野で適用され始めており、我々も LAMP 法を用いた DNA 粗抽出法やラテラルフロー法の検討を進めている (Takabatake et al, 2018., Narushima et al, 2020)。

Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 20-45°Cの反応温度でインキュベーション時間が最短 10 分未満という利便性を備えた核酸増幅であり、蛍光プローブで検出する方法に加え、CRISPR-Cas システムを応用した DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter (DETECTR) (Chen et al, 2018) 等は感染症診断分野での高感度検査法として特に注目されている。一般に等温核酸増幅反応では、用いる酵素類が夾雑物に強いという特徴もあることから、DNA 抽出も簡便な方法に代替できうる。しかしながら、食品行政に関わる公定検査法としての検討はあまり進んでいないのが実情である。

本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応を用いた遺伝子検査についての情報収集を行い、その中から実用的な方法を選択して、サンプリングから結果の解析までの流れを鑑みて食品行政に係る遺伝子試験としての適用性を評価し、試験法として開発することを目的とする。

B. 研究方法

文献調査

文献調査では論文情報検索エンジン PubMed を用い、直近 5 年分 (2022 年 4 月まで) の報告に関して核酸等温増幅反応に関するキーワード検索を行った。各反応の検出法に関するデータを抽出するため、キーワードはその反応の正式名称、略語及び検出の 3 語を用いた。例えば、RPA 反応では #Recombinase Polymerase Amplification, #RPA, #detection の 3 種類の単語を含む論文を検索した。出版年が 2017 年以降でヒットした論文から無関係の論文や Review を除き、論文の Abstract・本文から検査対象、検出に用いた手法、温度、時間、感度、国名等を抽出し、集計を行った。

Recombinase Polymerase Amplification

RPA のモデルとして遺伝子組換え (GM) とうもろこしを標的とするため、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (SSIIB) 及び多くの遺伝子組換え作物に導入されているカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列 (P35S) を標的とした RPA 用プライマー及びプローブを、FASMAC 社から購入した。TwistDx 社の RPA 説明書を参考に、各標的プローブを 1 種類設計し、その周辺の領域でプライマーを複数設計して、プライマーセットの性能を検証した。SSIIB はフォワード (Fw) プライマー 10 種、リバース (Rv) プライマー 10 種を設計した (表 1)。P35S のプライマーはフォワード (Fw) プライマー 10 種、リバース (Rv) プライマー 3 種を設計した (表 1)。

測定試料は GM とうもろこし MON863 系統の認証標準物質 (ERM-BF416d MON863 MAIZE nominal 10% GMO) から抽出したゲノム DNA を用いた。特異性評価では、ナス、ジャガイモ、レモン、インゲンマメ、玉ねぎ、キャベツ、ライ麦、カブ、真鯛、サケ、ブタ及びウシのゲノム DNA を用いた。

プライマー及びプローブの最良なペアを検討するために、10%MON863 (1 ng/μL) を標的とし、加水

分解 Probe を用いてリアルタイム蛍光検出を行った。試薬は TwistAmp exo (TwistDx 社) を用いた。

Rehydration Buffer	29.6 μ L
Primer-F (10 μ M)	2.0 μ L (400 nM)
Primer-R (10 μ M)	2.0 μ L (400 nM)
Exo probe (10 μ M)	0.8 μ L (250 nM)

上記組成で PCR チューブ内に調製・混和し、2 個の PCR チューブにそれぞれ 17.2 μ L ずつ分注した。分注した各チューブにテンプレート DNA (0.01~10 ng/ μ L) またはネガティブコントロールサンプルを 6.6 μ L 加えた後、蓋に MgOAc (280 mM) 1.2 μ L を滴下し、遠心で落とすことで混合し、反応を開始した。サンプルの保温及び蛍光検出は LightCycler 480 (Roche Diagnostics 社) を用いた。反応中は 37°C で 30 分間保温した。プライマー評価時は 37°C、20 秒を 1 サイクルとし、45 サイクル時 (15 分後) の蛍光強度の時の蛍光強度を指標に性能を評価した。陽性の閾値は 15 分後の蛍光強度が 2 を超えるかどうかで判定した。

RPA の確認を電気泳動で行う場合は TwistAmp Basic (TwistDx 社) を用いた。

Rehydration Buffer	29.6 μ L
Primer-F (10 μ M)	2.4 μ L (500 nM)
Primer-R (10 μ M)	2.4 μ L (500 nM)
超純水	11.2 μ L (up to 45.6 μ L)

上記組成で PCR チューブ内に調製・混和し、2 個の PCR チューブにそれぞれ 22.8 μ L ずつ分注した。分注した各チューブにテンプレート DNA (10 ng/ μ L) またはネガティブコントロールサンプルを 1.0 μ L 加えた後、蓋に MgOAc (280 mM) 1.2 μ L を滴下し、遠心で落とすことで混合し、反応を開始した。反応は Verti pro サーマルサイクラー (Thermo fisher Scientific 社) を用いて 37°C で 30 分間保温した。電気泳動にはアガロースゲル (2%) を用い、核酸の染色には GelRed™ を用いた。

C. 研究結果 情報調査 (全体)

現在知られている核酸等温増幅技術の一覧を総説 (Bodulev OL et al, 2020) の情報を基に表 2 に示した。これら核酸等温増幅技術の研究頻度を評価するために、2022 年の時点で発表されている論文数の推移を調べた。PubMed を用いてキーワードは技術の名称のみで検索したところ、リアルタイム PCR は 2001 年から 2011 年にかけて顕著に増加し、2012 年以降年間 6000 報以上の論文が発表され、累計論文数は 90000 報以上に上った (図 1)。LAMP は 2001 年から論文数が増え、2021 年には年間 600 報、累計論文数も 4000 報以上に上った。その他に増加傾向にあるのは RPA で、2013 年から論文数が増え始め、2021 年には年間 200 報を越えた。RCA は徐々増えており、2001 年から緩やかに増加しており、2022 年もまだ増加している傾向が見て取れ、総数も 1600 報以上に上った。SDA 等も論文数は伸びてきているが、年間多くて数十報で、LAMP や RPA 等より数は少なかった。各方法の概要を図 2 に示した。

PCR について (図 2A)

PCR は 1983 年以降核酸を増幅する技術として最も利用された技術と言える。DNA 二本鎖を高熱で解離させた後に温度を徐々に下げ、標的特異的なオリゴ DNA がプライマーとしてアニールリングしたところで 5' \rightarrow 3' 方向に DNA ポリメラーゼが作用し、伸長する。一定の温度昇降サイクルを繰り返すことによるサイクル数依存的な増幅が見込めるため、標的遺伝子の検出から定量まで幅広く応用されている。しかし、DNA 二本鎖に寄与する水素結合を切るため、95°C 付近まで上げる必要があり、DNA ポリメラーゼも熱耐性菌から単離されたもの以外は使用できないなどの問題点もある。TaqMan の加水分解プローブを用いる TaqMan リアルタイム PCR は耐熱性 DNA ポリメラーゼが有する 5' \rightarrow 3' エキソヌクレアーゼ活性を利用して

LAMP について (図 2B)

国内で開発された核酸等温増幅反応で、現在世界的にも最も普及しているといえる。プライマーは4~6種類を用いるのが一般的であり、DNAポリメラーゼは *Bacillus stearothermophilus* 由来の *Bst* DNA Polymerase を利用する。このポリメラーゼの特徴は鎖置換増幅活性を有し、65°C付近が至適温度となる点である。また、夾雑物の影響もPCRで用いるポリメラーゼより受けにくいとされる。プライマーデザインのソフトウェアも栄研化学社の PrimerExplorer や New England Biolabs 社の NEB LAMP Primer Design Tool 等いくらか開発されており、一般利用の敷居が低くなってきている。アプリケーションとしては、定性検査がメインで、ラテラルフローアッセイや濁度による目視検出法等に応用されている。これまでLAMPで用いる *Bst* DNA Polymerase は Large Fragment というポリメラーゼの一部のドメインが利用されており、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有さないため、TaqManプローブのような加水分解プローブは利用することができなかった。しかし、*Bst* 5.1 という5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼでも、遺伝子検査でうまくワークすることが確認された (Yu et al. 2021)。今後このような TaqMan-LAMP のような系の開発も増える可能性もある。

RPA について (図 2C)

2006年に報告されたRPAは比較的新しい技術で、リコンビナーゼ、一本鎖DNA結合タンパク質、鎖置換型DNAポリメラーゼといった複数の酵素を1ポットで作用させることで、迅速な反応を実現することができる。また、これらの反応は体温付近で完結することができる。さらに、牛乳、糞便などから直接反応にアプライできるなど夾雑物に強いことも知られる。問題点として、試薬が Twist 社からしか販売が無い点である。また、プライマーの設計をサポートする利用可能なソフトウェアがまだ開発されていない。バックグラウンド反応が多いことも指摘されている。現在知られて

いる核酸増幅反応の中で最も速い反応と言われる (Lobato IM et al, 2018)。

Strand displacement amplification (SDA) について (図 2D)

4種類のプライマー、鎖置換型DNAポリメラーゼ *Bst* DNA Polymerase 及びニックナーゼを組み合わせた反応系で、100塩基以下の短い標的を対象とし、60-65°Cの定温で進行する。Klenow fragment という5'→3' exonuclease 活性の除かれたDNAポリメラーゼを用いた系では37°C付近で反応可能だが、迅速化需要に伴いあまり使われなくなった。プライマー設計はPCRやLAMP用のプライマーデザインツールが利用できる。増幅産物はインターカレーターやプローブを利用してリアルタイムで検出される。

SDAに似た反応系として、Nicking Enzyme Amplification Reaction (NEAR)、別名 Nicking Enzyme Assisted Amplification (NEAA)も開発されている (Qian et al, 2019)。

Helicase-dependent amplification (HDA) について (図 2E)

HDAはプライマー、DNAヘリカーゼ及び鎖置換型ポリメラーゼを利用して、60-65°Cの一定温度で標的を増幅する。標的長さは技術開発の原著論文 (Vincent M et al, 2004) によると400bpまでは効率的に増幅されたとあるが、開発メーカー (New England Biolabs 社) 説明書によると、標的長さは150塩基未満と短い標的が推奨されている。検出はラテラルフローアッセイ等が使われている。

Rolling circle amplification (RCA) について (図 2F)

当初はプラスミドを増幅する方法として利用されていたが、Padlockプローブが開発されてから分子検出法として利用されるようになった。リガーゼでプローブの間の塩基を補完後、*Bacillus subtilis* ファージ phi29 由来 *Phi* 29 DNA ポリメラーゼを作用させることで30°C付近の温度帯で反応が開始することができる。反応は糸のボビンをほどくか

のように直線的に進む。特筆すべき点は、増幅の開始に関わる核酸の 3' 末端の分子数が変化しない事で、他の反応系と異なり、反応チューブ内にキャリーオーバーコンタミネーションがあったとしても、次の増幅結果に与える影響は小さいと考えられている。近年は主に miRNA の検出に用いられてる傾向にある。

Exponential amplification reaction (EXPAR) について (図 2G)

EXPAR は 2 つの短い既知標的配列を、ニックアーゼ配列を境にタンデムで繋いだプローブを利用する。プローブの 3' にハイブリダイズした標的は伸長しないが、5' にハイブリダイズした標的は DNA ポリメラーゼによって伸長し新たな基質を合成するため、ニックアーゼが作用した後、連続的に反応する。ポリメラーゼは *Phi 29* DNA ポリメラーゼなら約 60°C、*Klenow fragment* を用いれば 37°C でも反応は進む。プローブが二量体を形成しやすいため、非特異的増幅が起こりやすい。

Cross-priming amplification (CPA) について (図 2H)

LAMP のように鎖置換型ポリメラーゼ及び複数のプライマーのみで反応が進行する反応で、ヘリカーゼやニックアーゼ不要でかつ初期の熱変性を必要としない点で簡便に実行可能である。

NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) について (図 2I)

NASBA は、Transcription Mediated Amplification (TMA) と呼ばれ、現在は主に RNA の検出に利用されている技術である。5' 末端に RNA ポリメラーゼプロモーター配列を含むプライマーを用いて逆転写を行い、鋳型鎖を RNase H で分解後、残った DNA を鋳型に二本鎖 DNA を合成する。それをもとに RNA ポリメラーゼによって大量に RNA に転写し、新たな標的として利用される。

試薬は逆転写酵素、RNase H、RNA ポリメラーゼ及び標的的特異的プライマーが必要である。反応

は約 40°C の一定温度で行われる。酵素類が耐熱性でないため、特異性がやや低いと言われる。

RPA に関する文献調査

2020 年以降論文数が約 2 倍に増えた RPA に着目して、RPA を用いた検出法に関する論文調査を行った (図 3)。用途は臨床診断が 200 報以上で、その次に動物検査、作物検査、食品検査、環境検査と続いた (図 3A)。検査対象はウイルスが 200 報以上、バクテリアが 150 報以上と多く、寄生虫、その他微生物の報告数が多かった (図 3B)。他にもわずかながら GM 作物検査の報告も数件あった。反応温度は 37~39°C 帯での報告が多かった (図 3C)。RPA のアッセイ系はラテラルフローアッセイが最も多く、約 200 報に上った (図 3D)。その他に CRISPR/Cas 技術やリアルタイムの検出も報告が 50 報以上あった。アガロースゲル電気泳動で確認する報告は数報であった。発表国は中国が一番多く 250 報以上、続いて米国の 50 報以上と続いた。日本は僅かに 5 報であった (図 3D)。検出限界値は、コピー数標記の場合、1 反応 20 コピー未満と評価されているものも多かった。

CPA に関する文献調査

CPA で検出法に関わる論文は 2017~2022 年の間 28 本で、75% 以上が中国からの報告であった (図 4A)。検査対象はウイルス、バクテリアの他に GM コメなどの検査例があった (図 4B)。検出法はラテラルフローアッセイや蛍光色素を用いたリアルタイム検出が使われていた。反応温度は 63~64°C、検出限界は 10~50 コピーであった。反応時間は 40~120 分であった。

RPA の検証

GM とうもろこしの検出をモデルとして RPA を新たにデザインした。RPA 試薬を販売している TwistDx 社の説明書 (TwistDx 社ホームページより) によると、下記の通り指示及び提案がなされている。

- ・プライマー長について

迅速な増幅するには、プライマーのデザインには、PCR で利用される長さ（18～23 塩基）より長めの 30～35 塩基が推奨されているが、配列と性能に関する規則性が分かっていないため、いくらかのオリゴ DNA ペアを試す必要がある。現在挙げられている注意点としては、1) 長いポリマー配列、2) 反復配列、3) 二次構造を取りうる配列、4) GC 含量 70%以上の配列、5) プライマーペア間で相互作用がある配列は避けるべきである。また、5'末端は G の連続を避け、3'末端に G または C を 3 連続以上配置し、GC 含量は 30～70%とする。

・各試薬濃度について

試薬濃度幅は、酢酸マグネシウムは 12～20 mM、プライマーは 150～600 nM、プローブは 50～150 nM で検討する。メーカー推奨プロトコールは、短い標的核酸の高速増幅を意図しているため、プライマー濃度 500 nM、プローブ濃度 120 nM と高濃度に設定されている。プライマー濃度を下げると得られるアンプリコンの最終産物量は低下するが長いものが増える。

・増幅塩基長について

増幅塩基長は 1,500 塩基対以上を増幅可能だが、TwistDx 社の試薬では迅速な増幅を目的としているため、100～200 塩基対の合成に最適化している。短いアンプリコンほど短時間で合成可能なため、結果的に、他の増幅される配列との差別化に寄与し、特異性が高くなる。

・反応温度について

37～42℃で最適化され、これ以上高温の場合は酵素が最高活性から徐々に失活するため、望ましくない。一方で、37℃以下で反応させると、反応速度は下がるが、反応は継続される。よって、一定時間当たりの変化をより高い解像度で解析したい場合は、反応温度を下げることも選択肢の一つになる。

・蛍光プローブについて

RPA で使用される DNA ポリメラーゼは 5'⇒3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いた鎖置換型なため、TaqMan プローブは適用不可で、メーカーからは別の加水分解プローブの系 (RPA-exo) が開発されている (図 5)。RPA-exo では 46-52 塩基というリアルタイム PCR より長めのプローブが使われ、そのプローブ内にエキソヌクレアーゼの認識配列として脱塩基ヌクレオチドアナログ (テトラヒドロフラン残基や d スペーサー) が導入されており、標的配列にアニーリングした際に鎖置換とともに、エキソヌクレアーゼでクエンチャから分断された蛍光色素が蛍光を発するようになる (図 5B)。この RPA-exo プローブは、クエンチングの効率を考慮して、脱塩基部位を蛍光色素及びクエンチャで 6 塩基間に挟む必要がある。すなわち、蛍光色素を標識可能なチミジンが 6 塩基間に認められる部位に設計するという制限がある。しかし、このプローブは増幅プライマーの 1 つと一部重ねることが可能である。その場合、プライマーの伸長する 3'側下流に脱塩基ヌクレオチドアナログがあり、その下流にさらに 15 塩基の相同配列をもつプローブとして設計する必要がある。

SSIIb 用 RPA の検討

GM とうもろこしをモデルに RPA を検討するため、とうもろこしの内在性遺伝子 SSIIb のプライマーの検討及びその性能評価を行った。迅速法開発が目的なため、反応開始から 15 分後時点での核酸増幅進行程度を、蛍光強度を指標に評価した。図 6A の通り、SSIIb 用のプライマー及びプローブを設計した。SSIIb-Rv1、Rv2、Rv7 及び Rv10 と SSIIb-Fw1～10 の組み合わせを検討したところ、用いた 4 種類全ての SSIIb-Rv プライマーと SSIIb-Fw9 の各ペアで蛍光強度 5～13 と増幅曲線の立ち上がりが他の Fw プライマーより速かった (表 3)。次に、Rv プライマーと相性の良かった SSIIb-Fw9 と SSIIb-Rv1～10 の組み合わせを検討したところ、SSIIb-Fw9&Rv8 (蛍光強度 10～18)、Fw9&Rv9 (蛍光強度 7～17) 及び Fw9&Rv10 (蛍光強度 7～13)

の組み合わせは再現性良く増幅曲線の立ち上がりが速かった(表3)。今回は3回実施したRPAで平均的に蛍光強度が高かったFw9&Rv8(増幅領域長:183bp)を採用することとした。RPAで増幅する塩基長を確認するために、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、目的の大きさ付近にバンドが確認できた(図7A)。

検出限界値を評価するために、とうもろこしゲノムDNA 1ng/μL、0.1ng/μL、0.01ng/μLを用いて検出限界を評価した。リアルタイムPCRの定性検査の場合は、国際的にハーモナイズされたガイドラインが無いが、ドイツ連邦消費者保護・食品安全庁(BVL)が発刊するガイドラインには、検出限界値評価の一つの方法としてLOD12(12回の繰り返し試験で全て検出される最低濃度)を挙げている。今回の12回繰り返し試験で、全て検出される最低濃度は1ng/μLであった(表4)。この時のSSIIbコピー数をアボガドロ数 $6.02 \times 10^{23}/\text{mol}$ 、トウモロコシ一倍体のゲノムサイズ 2.3×10^9 塩基対として計算すると、約2,600コピーである。よって、検出限界値は260~2,600コピーの間と推定される。参考のため、12回繰り返し試験の蛍光強度平均値を図7Bに示した。供与したDNA濃度が高いほど、15分間反応時の蛍光強度が高い傾向があった。

特異性を評価するために、とうもろこしの他に12種類の作物および動物のゲノムDNAを用いてRPAを行ったところ、とうもろこしにのみ特異的な増幅が確認された(図7C,D)。

P35S用RPAの検討

GMとうもろこしの共通配列として標的とされるP35SのRPAのプライマーの検討及びその性能評価を行った。

図6Bの通り、P35S用のプライマー及びプローブを設計した。P35S-Rv1プライマーとP35S-Fw1~10それぞれとのプライマーでRPAを行ったところ、P35S-Fw2&Rv1が蛍光強度12~13、P35S-Fw5&Rv1が蛍光強度11~16と良好であった。その

結果に基づき、P35S-Fw2及びFw5と相性の良いP35S-Rv1プライマーを同様に探索したところ、P35S-Fw5&Rv1の蛍光強度13、P35S-Fw5&Rv2の蛍光強度10~17と良好であった(表5)。しかし、これらのプライマーペアで行うRPAはテンプレート無し(NTC)の場合でも15分以上経過すると、蛍光強度10以上の増幅曲線が立ち上がることもあり、バックグラウンドが高いことも確認された(図8A)。エンドポイントアッセイでは、このような非特異的な増幅がみられる場合は、結果解釈が困難となるため、別のプライマー場所で検討を行う必要がある。Liuらは遺伝子組換えとうもろこしのRPAを開発しているため(Liu et al, 2021)、同様にRPAを実施し、電気泳動で増幅産物を確認したところ、今回新たに設計したプライマーと似た泳動パターンであった(図8B)。

D. 考察

文献調査

2020年以降LAMP及びRPAの論文数が顕著に増加していることが確認できたが、これは新型コロナウイルス検査需要が高まり、迅速な検査法が開発された例が多かったためと考えられる。各核酸等温増幅反応は開発されているものは検出限界値、即ち感度も良好であることから、いかに標的に最適なプライマーを設計し、特異性の高いものを作れるかが適用性を検討するうえでは肝になると考えられる。

各核酸等温増幅反応の中で食品の遺伝子検査で簡便なオンサイト利用を考慮すると反応温度は体温付近で実施可能な酵素反応が望ましい。よって、選択肢として挙げられるのはKlenow fragmentやPhi29 DNAポリメラーゼを利用するRCA、HDA、SDAやRPAである。一般試験室で恒温インキュベーターがあれば、LAMPやCPAも視野に入る。核酸増幅の確認には、蛍光色素によるリアルタイム検出等も利用可能だが、最も近年診断で利用されているのは、オンサイトで即時目視確認可能な

ラテラルフローアッセイである。その他には CRISPR/Cas を用いた増感法 (DETECTR) 等も近年利用されている。この技術は Cas12a という Cas ファミリーのヌクレアーゼを利用するが、この Cas12a は標的核酸にガイド RNA 依存的に結合することで一本鎖 DNA を非選択的に分解するヌクレアーゼ活性 (コラテラル活性) が活性化する。そのため、核酸増幅で標的を増やした後、その標的にハイブリダイズするようなガイド RNA と Cas12a 及び加水分解されて蛍光を発するような一本鎖核酸プローブを添加しておくことで、より高感度に反応を検出できる。しかしこの系では使用試薬数が増え、さらに時間もかかることから食品検査の簡便化の観点では検討を要する。反応速度を考慮すると、RPA または LAMP が数分で反応を終えることから、有用である。以上を鑑みて、本研究では、国内で技術が浸透しておらず、体温付近で反応可能でかつ、迅速に反応が進む RPA に関して、食品遺伝子検査への適用性について検討することにした。

RPA の検証

RPA は PCR 同様、最初にプライマーを設計する必要があるが、適切なプライマーを設計する確かなアルゴリズムがまだ存在しないため、いくつかのプライマーを試作し、その適切な組み合わせを試す必要がある。その理由の一つとして、PCR は温度変化によってプライマーと鋳型鎖の結合・解離が行われるが、一方の RPA では全て定温の酵素反応の一環として行われるため、 T_m 値での性能評価が難しいと考えられる。よって、PCR や LAMP と比べた場合、実験的検証が必要な点が難点である。

今回の結果では RPA-SSIIb の特異性は良好であったが、検出限界値は従来のリアルタイム PCR (数コピー) と比べて一桁以上のオーダーで悪かった。各ガイドラインでは、リアルタイム PCR による定性検査の検出限界値は 20 コピー未満が推奨されているが (Broaders S et al, 2014; BVL, 2016)、こ

れには満たなかった。調査した論文では検出限界値が 20 コピー未満と報告されているものが多かったことから実験手技やデザインしたプライマー改良で改善される可能性もある。RPA は比較的マイルドな温度で反応を進めるため、分子の熱運動による酵素-基質接触確率が悪いことが原因とも考えられる。一部プロトコールでは、加温 4 分後にマニュアルで混和するものもあり (Xu et al, TwistDx 社)、今後低濃度域ではこのような混合操作の追加適用を検討し、感度の改善の余地があるか検討すべきと考えている。また、溶液中のコピー数が少なくなると、蛍光ピークトップが小さくなる傾向が見られた (図 7B)。加えて、反応時間が長くなればなるほどバックグラウンドが徐々に上がることも確認された (図 7C)。以上より、反応時間や増幅有と判断する明確な指標の検討は必要と考えられる。

RPA-P35S に関しては、良好な組み合わせのプライマーの選定までは進んだが、バックグラウンドが高く、非特異的な増幅が検出される頻度が高いため、検出限界評価まで至らなかった。既に論文として発表されているプライマーペアを用いて検証した場合も電気泳動ではスメアのような増幅が確認されたため (図 8B)、使用試薬の見直し等根本的な見直しが必要かもしれない。

本検討では、ある特定遺伝子の RPA 法の開発までの流れをデモンストレーションし、実験手技や開発に係る難点を把握することができた。実際に 37°C で反応可能な RPA 法は、検査者の体温で反応が完結する利便性があり、食品の現場検査等是有用と考えられる。例えば、道の駅での食品売り場での簡易確認や、猛毒キノコの現場鑑定などには持ち帰って検査する手間を省けるためメリットは大きいと考えられる。今後 RPA の検査システムを構築する場合は現場検査法として成り立つ方法として開発するのが有用である。よって、次年度は各官公庁及び検査機関等にヒアリングを実施し、

現場検査の需要について調査することも開発前段階として重要と考えられた。

E. 結論

等温核酸増幅反応は世界各国の遺伝子検査に使われ、時間短縮やオンサイト利用など幅広くメリットが見出されている。今回は特に RPA に関して検討したところ、その開発には偽陽性などの確認を精密に行う必要があり、開発にはそれなりの時間を要すると考えられた。しかし、37°C で反応可能な点はオンサイトでの利便性が考えられ、植物性自然毒等への現場検査での需要はあるものと考えられる。本研究においても検査需要調査を行うことを検討する。今後も引き続き、等温核酸増幅反応について調査するとともに、RPA の粗抽出 DNA への適用性や多項目一斉処理を成せるマルチプレックス化、低コスト・検査簡便化を図るラテラルフロー法への応用性等を評価する予定である。

F. 参考文献

Bodulev OL, Sakharov IY. Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques and Their Use in Bioanalysis. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 ;85(2):147-166.

Broaders S, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, Roosens N, Morisset D. *Trends Food Sci. Technol*, 2014, 37, 115–126.

BVL, *Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods*. 2016.

Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018; 360(6387):436-439.

Liu H, Wang J, Zeng H, Liu X, Jiang W, Wang Y, Ouyang W, Tang X. RPA-Cas12a-FS: A frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase

polymerase amplification. *Food Chem*. 2021, 334, 127608.

Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt Chem*. 2018 ;98:19-35.

MarketsandMarkets, *Food Safety Testing Market, Forecast to 2027*. 2022.

Narushima J, Kimata S, Soga K, Sugano Y, Kishine M, Takabatake R, Mano J, Kitta K, Kanamaru S, Shirakawa N, Kondo K, Nakamura K. Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of rice genes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2020; 84(4):670-677.

Qian C, Wang R, Wu H, Ji F, Wu J. Nicking enzyme-assisted amplification (NEAA) technology and its applications: A review. *Anal Chim Acta*. 2019; 1050:1-15.

Takabatake R, Kagiya Y, Minegishi Y, Futo S, Soga K, Nakamura K, Kondo K, Mano J, Kitta K. Rapid Screening Detection of Genetically Modified Crops by Loop-Mediated Isothermal Amplification with a Lateral Flow Dipstick. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(29):7839-7845.

TwistDx 社、RPA プライマーとプローブに関するガイドライン

TwistDx 社、TwistAmp® シリーズマニュアル補足資料

Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep*. 2004 ;5(8):795-800.

Xu C, Li L, Jin W, Wan Y. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops. *Int J Mol Sci*. 2014, 15(10):18197-205.

Yu Y, Li R, Ma Z, Han M, Zhang S, Zhang M, Qiu Y. Development and evaluation of a novel loop mediated isothermal amplification coupled with TaqMan probe

assay for detection of genetically modified organism with NOS terminator. *Food Chem.* 2021; 356:129684.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

F. 研究発表・業績
該当なし

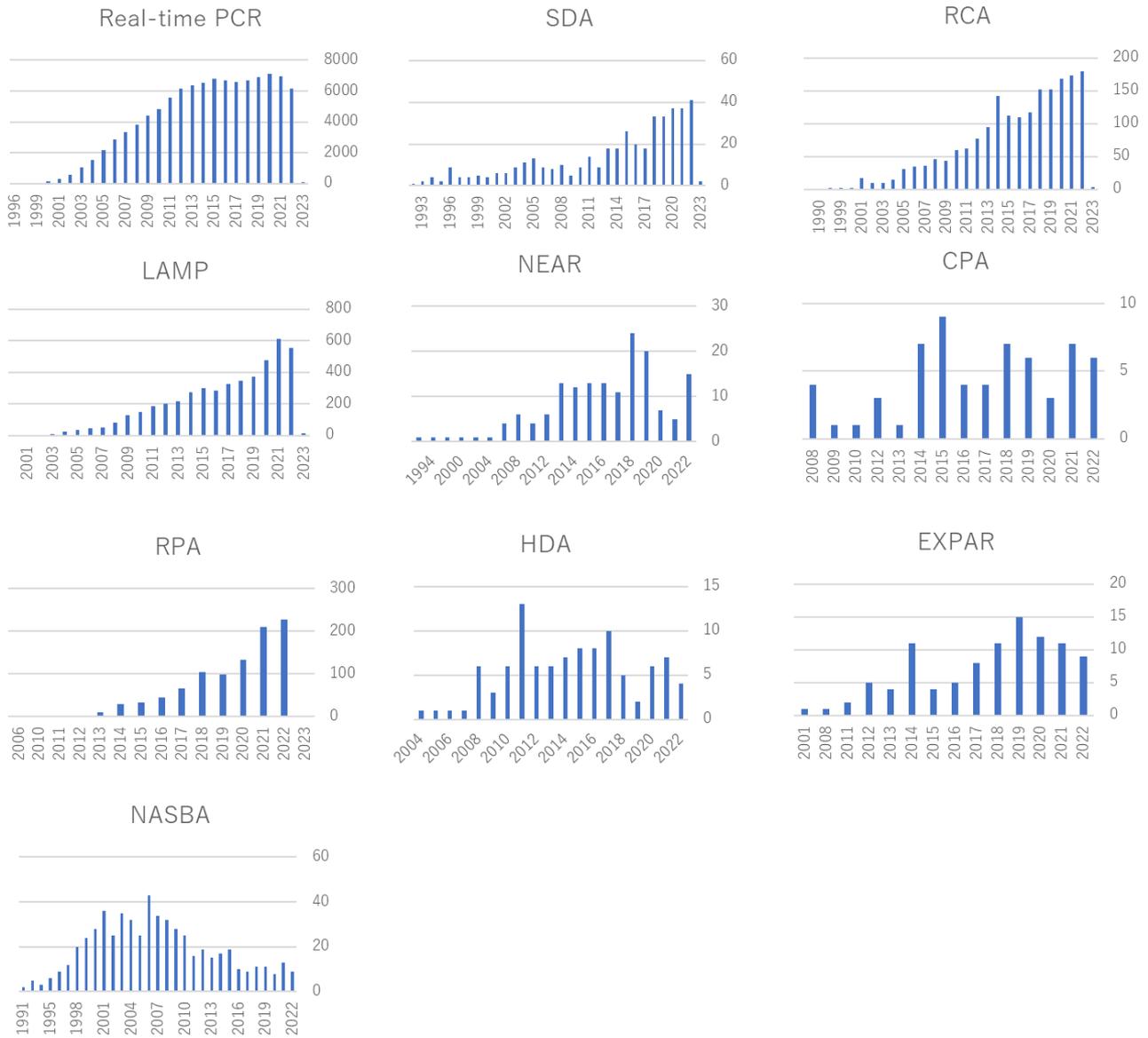


図1. 各等温核酸増幅反応論文数推移

論文検索エンジン PubMed を用いて、キーワード検索による各年に発刊された論文数を技術ごとに集計した。

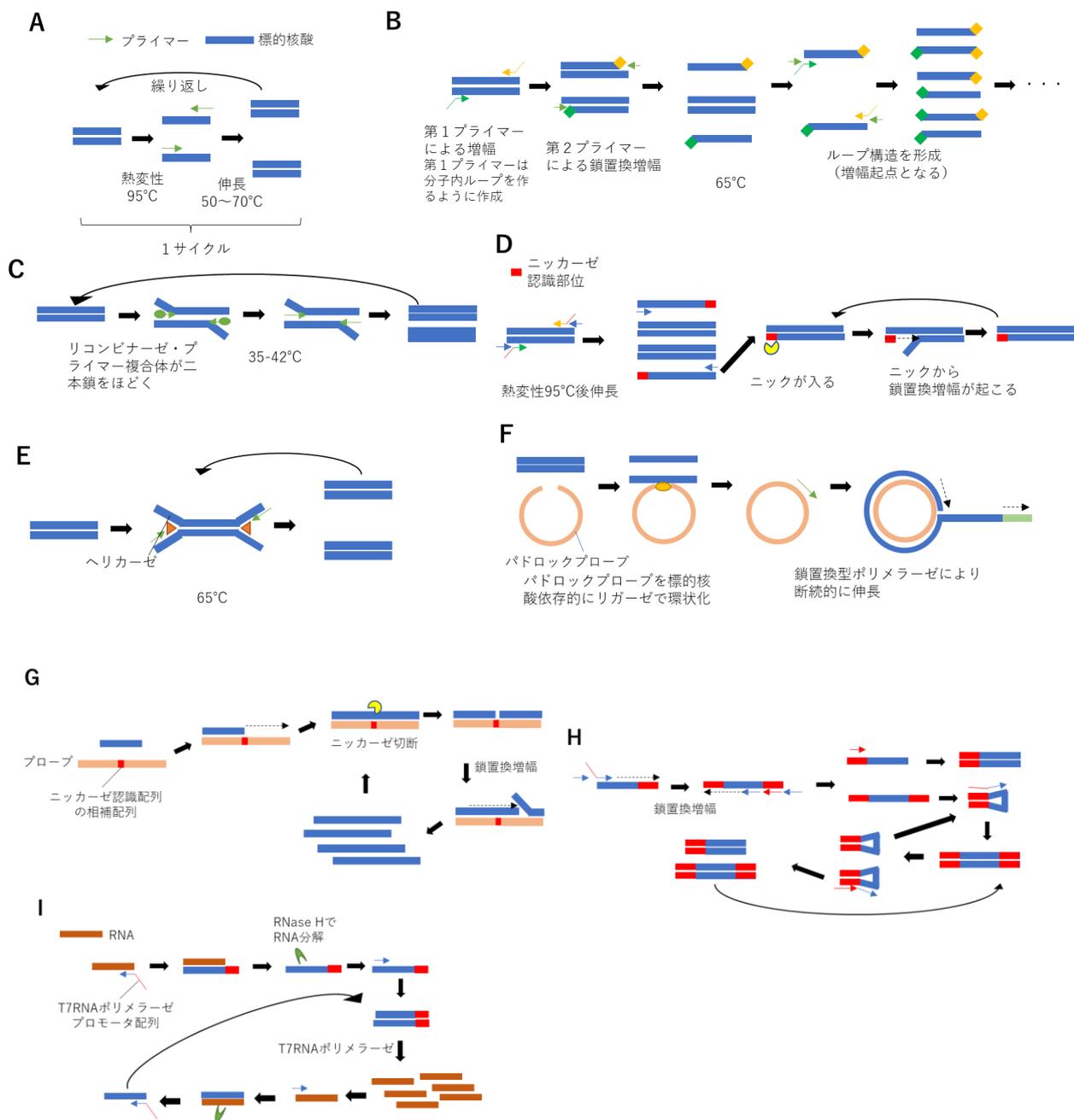


図2. 各核酸増幅反応概略図

A) PCR: 熱変性して解離した一本鎖 DNA にプライマーがアニーリングし、熱耐性 DNA ポリメラーゼが鋳型鎖に沿って DNA を合成する。一連のステップを数サイクル繰り返すことで指数関数的に DNA が増幅される。B) LAMP: 分子内ループを作るように設計された第一プライマーによって DNA が合成された後、その合成鎖を解きながら第二プライマーが同様に DNA を合成する (鎖置換)。プライマーによって分子内ループが付加された標的配列が起点となり、指数関数的に DNA が増幅される。C) RPA: プライマー・リコンビナーゼ複合体が二本鎖を解離させ、その隙間で標的にプライマーがアニーリングするため、鎖置換型 DNA ポリメラーゼにより DNA が合成される。結果的に基質となる DNA が合成され続けるため、指数関数的に DNA が増幅される。D) SDA: 反応開始時に 95°C で二本鎖 DNA を解離させ、ニッカーゼ認識配列を有するプライマー及び鎖置換型 DNA ポリメラーゼによって DNA を合成する。(次ページへ)

(前ページから続き) 合成した DNA はニッカーゼによって切断され、そこを起点に新たな DNA が増幅され続ける。E) HDA : ヘリカーゼによって解離した DNA に一本鎖結合タンパク質とプライマー、DNA ポリメラーゼが作用し DNA が合成される。F) RCA : 両側が標的にハイブリダイズするような Padlock プローブを作成し、標的にハイブリダイズした後にリガーゼで環状化する。標的にハイブリダイズするプライマーと鎖置換型 DNA ポリメラーゼによってその環上で継続的に DNA を合成する。G) EXPAR : 標的配列 2 つをタンデムでニッカーゼ認識配列の相補配列で繋いだプローブを作成する。プローブの 3' 末端側にハイブリダイズした標的のみポリメラーゼによって伸長し、ニッカーゼによってニックが入ることで新たに合成開始点になる。H) CPA : 標的配列の 5' 側配列の一部を付加したプライマーを用いて合成された配列がループ構造を取るようになる。合成された配列は鎖置換型ポリメラーゼによって単離され、ループ配列を形成し、各プライマーによって多段階反応に使われ、DNA が指数関数的に増幅する。I) NASBA : 標的 RNA について、プロモーター配列を付加したプライマーを用いて逆転写を行う。標的 RNA を RNase H で分解し、残った DNA を鋳型に DNA を合成する。この DNA から RNA ポリメラーゼによって RNA に転写され、連続的に、逆転写、分解という多段階反応が起こる。

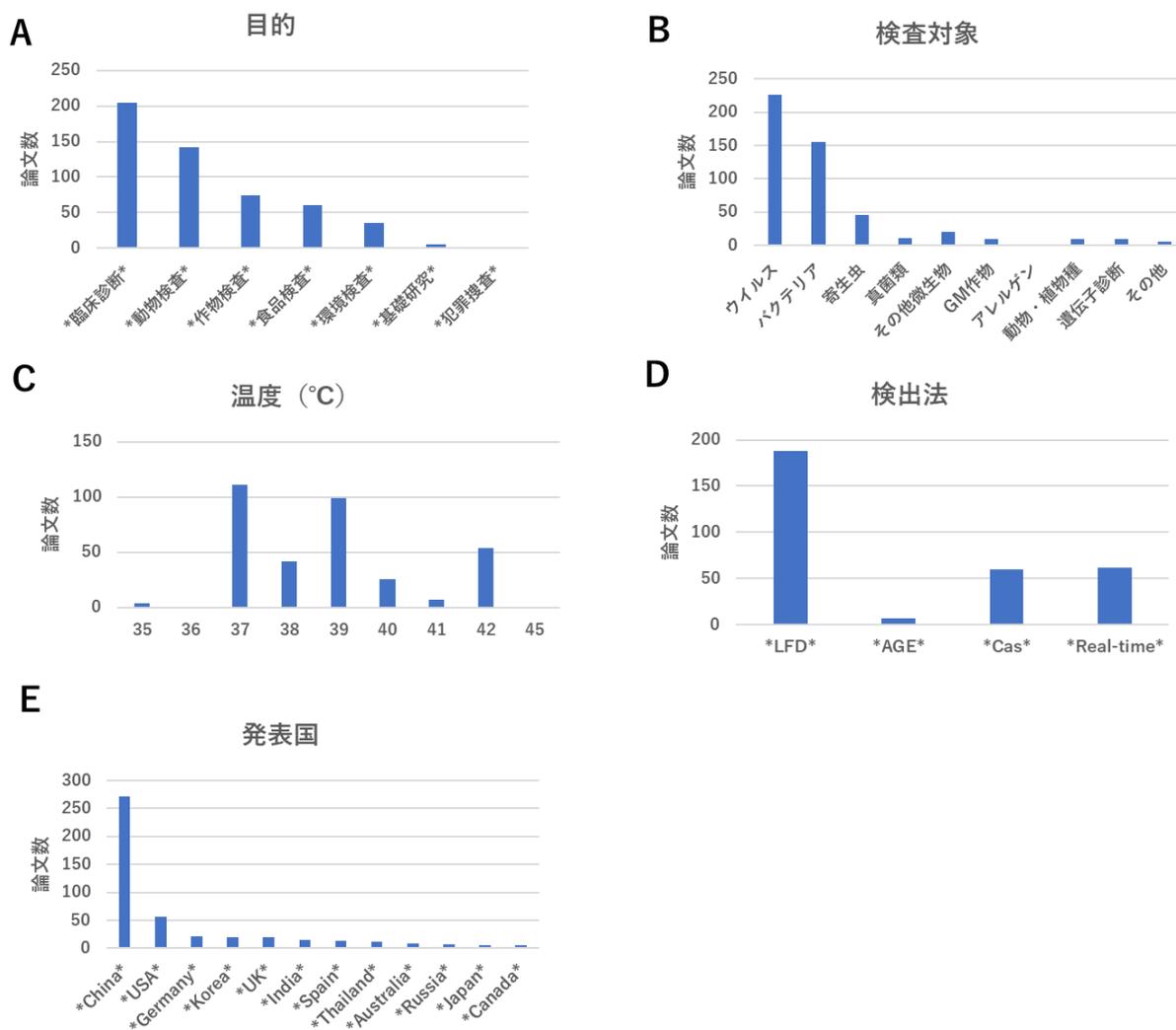


図3. RPA 開発に関する論文数調査

A) 研究目的別集計、B) 検査対象別集計、C) 反応温度別集計、D) 検出法別集計、E) 発表国別集計、LFD は Lateral flow dipsticks、AGE は Agarose gel electrophoresis、Cas は CRISPR/Cas システムを用いた系を指す。Cas も Real-time も蛍光を検出している。

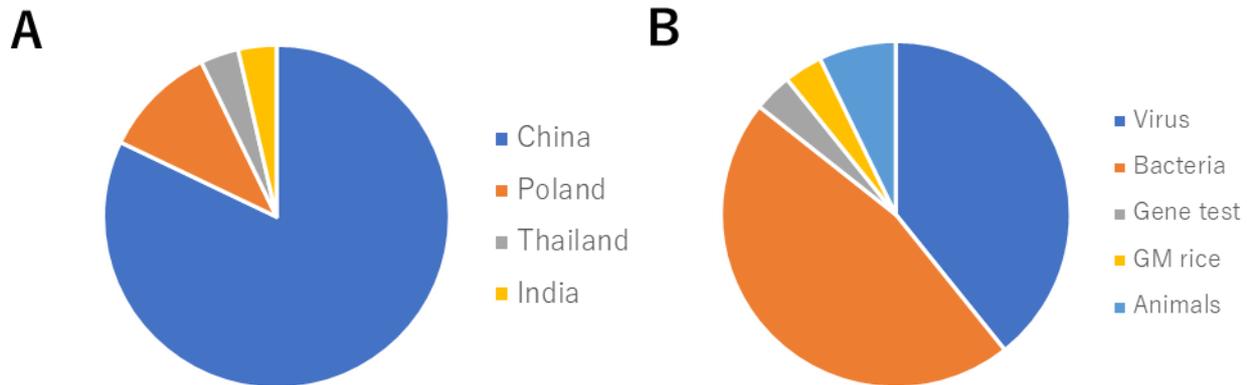


図4. CPA 検査開発に関する論文調査

調査対象は総説を除いた 28 本（2017～2022 年発刊分）. A) 報告している国、B) 検査対象の分布

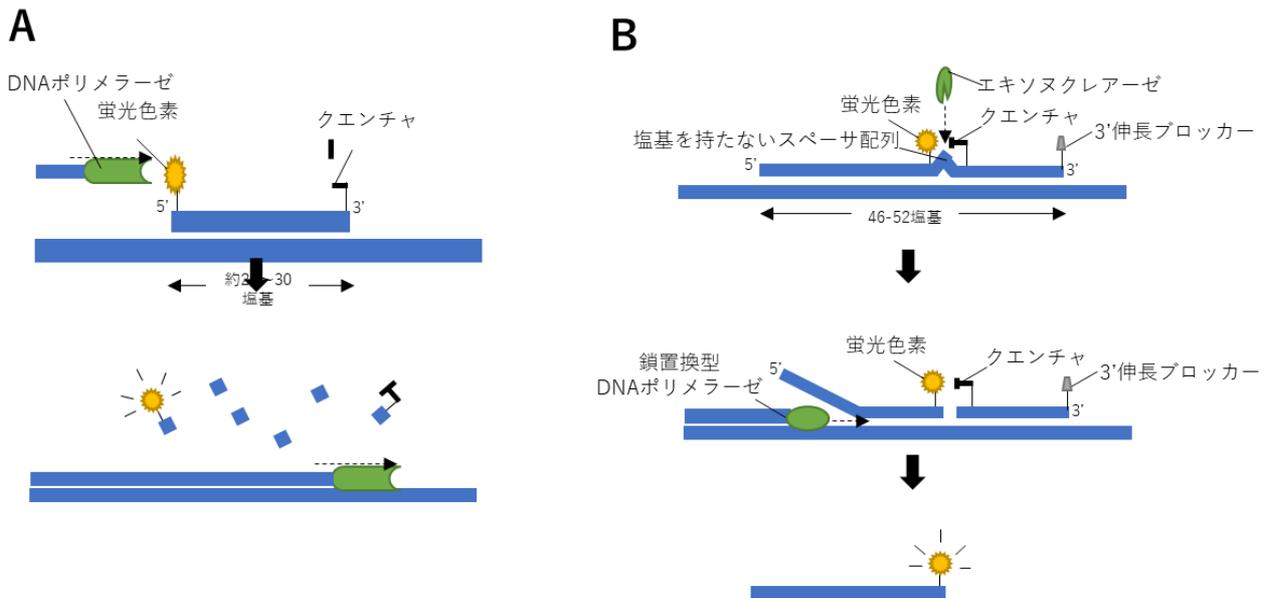
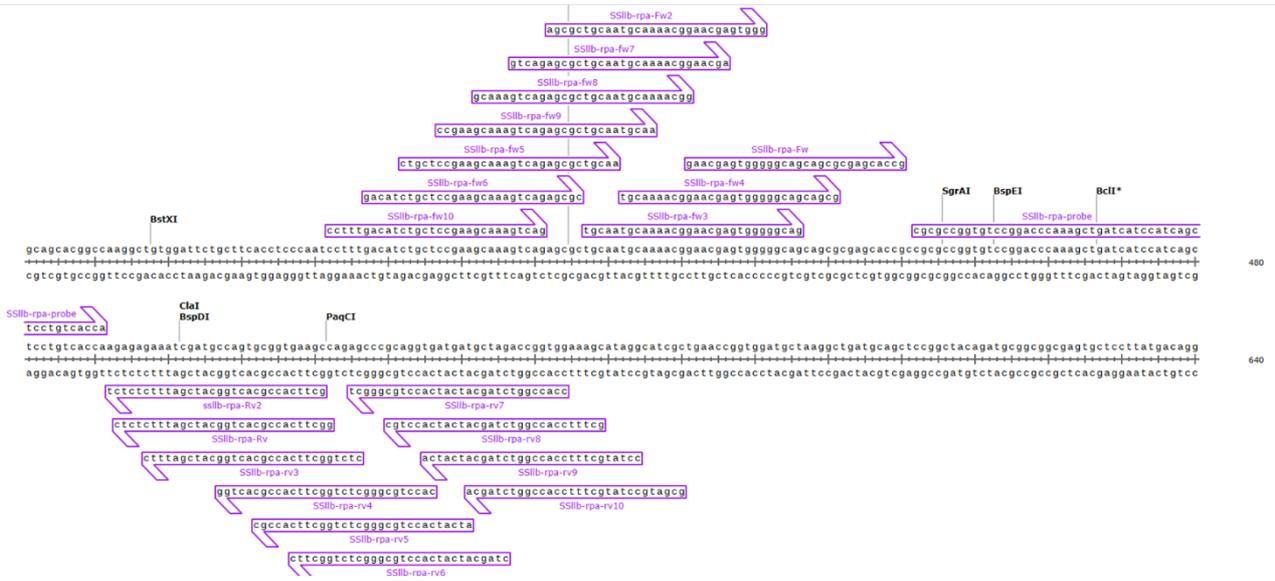


図5. リアルタイムPCRとRPAの加水分解プローブの違い

A) リアルタイムPCRのTaqManプローブの蛍光検出。リアルタイムPCR用のDNAポリメラーゼは5'⇒3'エキソヌクレアーゼ活性を有するため、標的にハイブリダイズしたプローブがPCR中に加水分解され、蛍光を発するようになる。B) RPAのexoプローブの蛍光検出。RPA用の鎖置換型ポリメラーゼは二本鎖DNAを解きながら伸長するが、5'⇒3'エキソヌクレアーゼ活性を持たない。そこで、プローブ内の認識配列にエキソヌクレアーゼを外部から作用させることで蛍光色素をクエンチャから分離し、鎖置換と同時に蛍光を検出する。

A



B

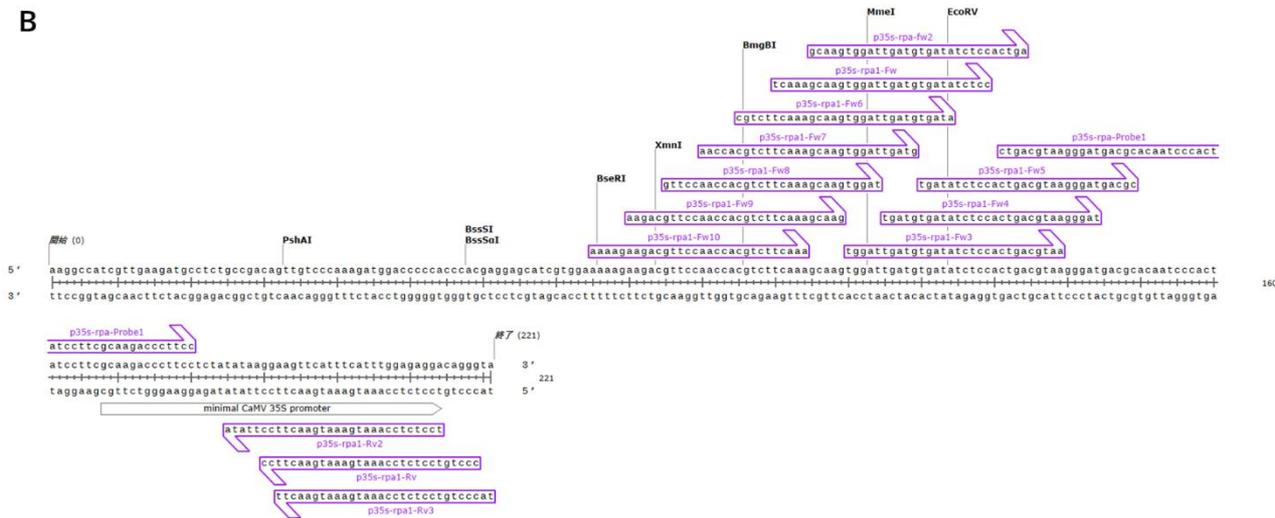


図6. RPA プライマーの設計部位

プライマー及びプローブ配列を5'⇒3'方向向きで矢印で囲った。A) SSIIb 配列、B) P35S 配列

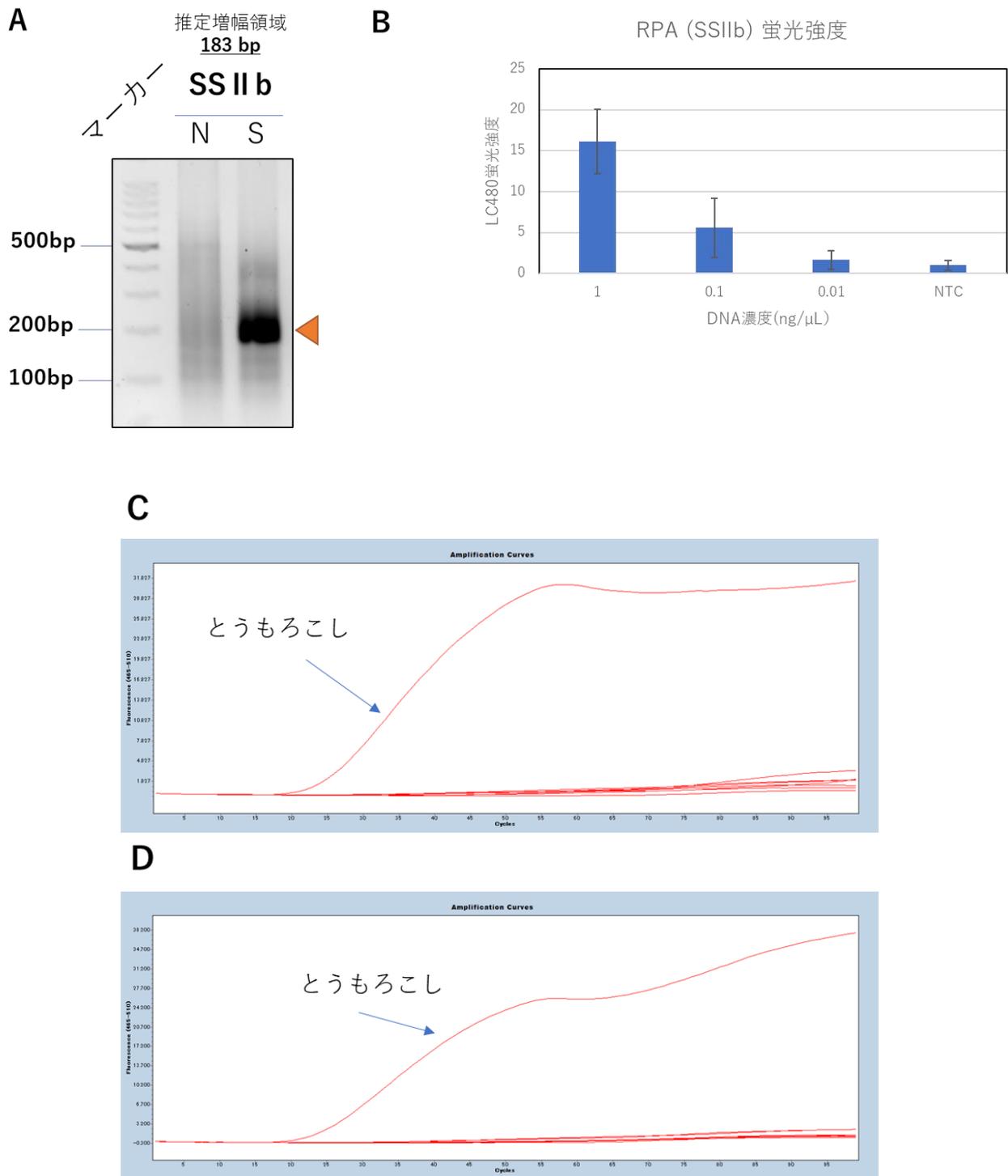


図7. RPA-SS II b プライマー性能評価

SS II b の RPA の性能評価 A) 電気泳動による増幅産物の確認。SS II b 配列で増幅される長さは 183bp。B) 検出限界値評価時の各 DNA 濃度時の蛍光強度。NTC は水のみ。C-D) とうもろこし以外の gDNA (1 ng/μL) を用いたリアルタイム RPA による特異性評価。C) NTC、とうもろこし、ナス、ジャガイモ、レモン、インゲン豆、銀鮭、豚肉。D) NTC、とうもろこし、玉ねぎ、キャベツ、カブ、ライ麦、真鯛、牛肉

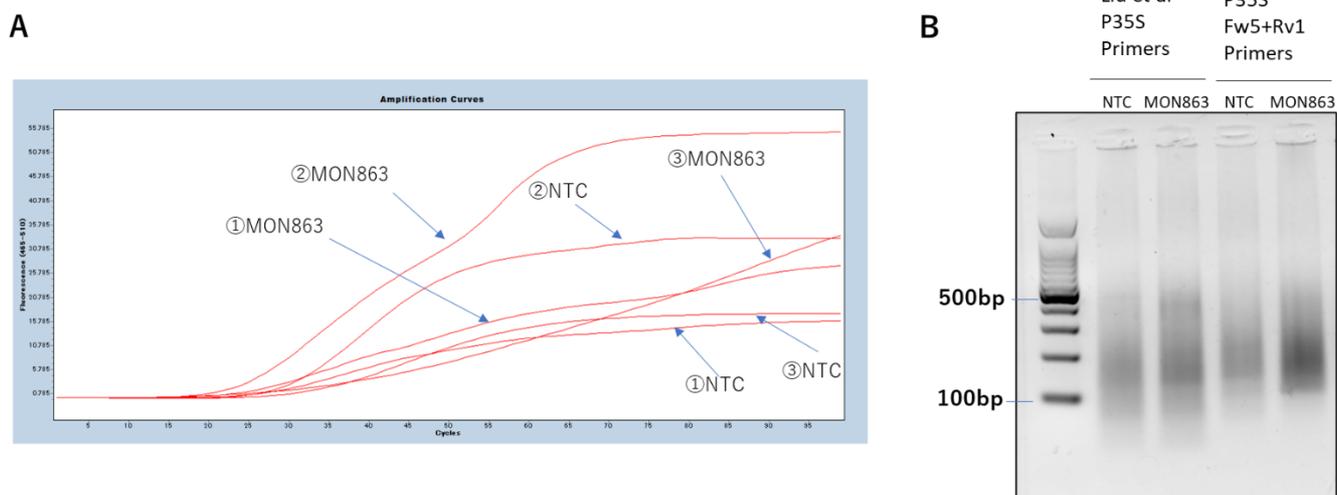


図 8. RPA-P35S プライマー性能評価

A) ①P35S-Fw5-Rv1、②P35S-Fw5-Rv2、③P35S-Fw2-Rv3 それぞれのプライマーについてリアルタイム RPA を実施した。NTC は純水、MON863 は GM とうもろこし 10% (w/w) gDNA。B) P35S-Fw5-Rv1 及び Liu らの開発した RPA プライマーを用いてそれぞれ RPA を実施し、アガロース電気泳動で増幅産物を確認した。

表 1. プライマー・プローブ一覧

標的	プライマー名	オリゴ DNA 配列 (5'-3')	GC (%)	長さ (塩基数)
P35S	p35S-rpa1-Fw1	tcaagcaagtgattgatgtgatatctcc	40	30
	p35S-rpa1-Fw2	gcaagtgattgatgtgatatctccactga	43	30
	p35S-rpa1-Fw3	tggattgatgtgatatctccactgacgtaa	40	30
	p35S-rpa1-Fw4	tgatgtgatatctccactgacgtaagggat	43	30
	p35S-rpa1-Fw5	tgatatctccactgacgtaagggatgacgc	50	30
	p35S-rpa1-Fw6	cgtcttcaaagcaagtgattgatgtgata	40	30
	p35S-rpa1-Fw7	aaccacgtcttcaaagcaagtgattgatg	43	30
	p35S-rpa1-Fw8	gttccaaccacgtcttcaaagcaagtgattg	47	30
	p35S-rpa1-Fw9	aagacgttccaaccacgtcttcaaagcaag	47	30
	p35S-rpa1-Fw10	aaaagaagcgttccaaccacgtcttcaaa	40	30
	p35S-rpa1-Rv1	ccctgtcctctccaaatgaaatgaacttcc	47	30
	p35S-rpa1-Rv2	tcctctccaaatgaaatgaacttctata	33	30
	p35S-rpa1-Rv3	taccctgtcctctccaaatgaaatgaactt	40	30
	p35S-rpa1-Probe	ctgacgtaagggatgacgcacaatcccactaTxcXtcgcaagacccttcc	54	50
SSIIb	SSIIb-rpa1-Fw1	gaacgagtgggggcagcagcgcgagcaccg	73	30
	SSIIb-rpa1-Fw2	agcgtgcaatgcaaaacggaacgagtgagg	57	30
	SSIIb-rpa1-Fw3	tgcaatgcaaaacggaacgagtgggggcag	57	30
	SSIIb-rpa1-Fw4	tgcaaaacggaacgagtgggggcagcagcg	63	30
	SSIIb-rpa1-Fw5	ctgctccgaagcaaaagtcagagcgtgcaa	57	30
	SSIIb-rpa1-Fw6	gacatctgctccgaagcaaaagtcagagcgc	57	30
	SSIIb-rpa1-Fw7	gtcagagcgtgcaatgcaaaacggaacga	53	30
	SSIIb-rpa1-Fw8	gcaaaagtcagagcgtgcaatgcaaaacgg	53	30
	SSIIb-rpa1-Fw9	ccgaagcaaaagtcagagcgtgcaatgcaa	53	30
	SSIIb-rpa1-Fw10	cctttgacatctgctccgaagcaaaagtcag	50	30
	SSIIb-rpa1-Rv1	ggcttcaccgactggcatcgatttctctc	57	30
	SSIIb-rpa1-Rv2	gcttcaccgactggcatcgatttctctct	53	30
	SSIIb-rpa1-Rv3	ctctggcttcaccgactggcatcgatttc	57	30
	SSIIb-rpa1-Rv4	cacctgcgggctctggcttcaccgactgg	70	30
	SSIIb-rpa1-Rv5	atcatcacctgcgggctctggcttcaccgc	63	30
	SSIIb-rpa1-Rv6	ctagcatcatcacctgcgggctctggcttc	60	30
	SSIIb-rpa1-Rv7	ccaccggtctagcatcatcacctgcgggct	63	30
	SSIIb-rpa1-Rv8	gctttcaccggtctagcatcatcacctgc	57	30
	SSIIb-rpa1-Rv9	cctatgctttcaccggtctagcatcatca	50	30
	SSIIb-rpa1-Rv10	gcgatgcctatgctttcaccggtctagca	57	30
SSIIb-rpa1-Probe	cgcgccggtgtccggaccctgacatcaTxcXcagctcctgtcacca	62	50	

Probe に関して、T は t に Fluorescein (FAM) が修飾、x は 1',2'-Dideoxyribose (dSpacer) が導入、X は t に Black Hole Quencher®-1 (BHQ1) が修飾されており、3'末端にはポリメラーゼ伸長防止のためアルキルリンカー (C3Spacer) が導入されている。

表2. 調査情報に基づいた核酸等温増幅反応技術一覧

名称	略式	温度 (°C)	時間 (分)	標的サイズ (bp)	増幅数	検出	対象	酵素	感度	since	PubMed 論文総数
Real-time Polymerase Reaction	Chain Real-time PCR	50-95	60-180	60-1000	10 ⁹	ゲル、蛍光検出器等	RNA, DNA	DNA ポリメラーゼ	1 コピー	1983	90,915
Loop-mediated isothermal amplification	LAMP	60-65	15-60	<250	10 ⁹	ゲル、ラテラルフロー、濁度等	DNA	Bst DNA ポリメラーゼ	5 コピー	2000	4,121
Recombinase Polymerase Amplification	RPA	37 (20-45)	10-60	<1000	10 ⁷ -10 ⁸	蛍光、ラテラルフロー	DNA	リコンビナーゼ、一本鎖 DNA 結合タンパク質、鎖置換型 DNA ポリメラーゼ	1 コピー	2006	863
Strand displacement amplification/ Nicking Endonuclease Amplification Reaction	SDA/NEAR	37-60	<60	<100	10 ⁷ -10 ⁹	蛍光	DNA	Bst DNA ポリメラーゼ または Klenow、ニックアーゼ	10 コピー	1992	512
Helicase-dependent amplification	HDA	37-65	<60	<150	10 ⁷	ラテラルフロー、ゲル	DNA	ヘリカーゼ、DNA ポリメラーゼ	1-10 コピー	2004	91
Rolling amplification	circle RCA	37	60-180		10 ⁹	蛍光	DNA RNA	リガーゼ、DNA ポリメラーゼ (Phi29)	10 コピー	1995	1,648
Exponential amplification reaction	EXPAR	-60	<30		10 ⁶ -10 ⁸	蛍光、ラテラルフロー	DNA	ニックアーゼ、DNA ポリメラーゼ (Bst or phi29)	1-10 コピー	2003	89
Cross-priming amplification	CPA	61-64	40-120			蛍光、ラテラルフロー	DNA	Bst DNA ポリメラーゼ	10 コピー	2008	56
Nucleic acid sequence-based amplification	NASBA/TMA	40-55	90-120	<150	10 ⁶ -10 ⁹	ラテラルフロー、ゲル、濁度	RNA (DNA)	RNA ポリメラーゼ、逆転写酵素、RNaseH	1 コピー	1991	535

表 3. 各 SSIib プライマーペアを用いた RPA の 15 分後の LC480 の蛍光強度

スクリーニング		Rv1	Rv2	Rv3	Rv4	Rv5	Rv6	Rv7	Rv8	Rv9	Rv10
一次スクリーニング	Fw1	2	3	-	-	-	-	1	-	-	1
	Fw2	2	2	-	-	-	-	1	-	-	2
	Fw3	4	1	-	-	-	-	3	-	-	8
	Fw4	3	1	-	-	-	-	2	-	-	6
	Fw5	1	2	-	-	-	-	1	-	-	0
	Fw6	0	1	-	-	-	-	0	-	-	1
	Fw7	4	6	-	-	-	-	2	-	-	0
	Fw8	5	6	-	-	-	-	3	-	-	0
	Fw9	13	6	-	-	-	-	5	-	-	10
	Fw10	4	1	-	-	-	-	6	-	-	9
二次スクリーニング	Fw9	5	3	7	1	4	3	5	10	7	7
三次スクリーニング	Fw9	-	-	11	-	-	-	-	18	17	17
	Fw9	-	-	9	-	-	-	-	12	14	13

表 4. SSIIB-RPA の検出限界評価

	NTC	0.01 ng/μL	0.1 ng/μL	1 ng/μL
コピー数 (理論値)	0	26	260	2,600
検出率	0/12	2/12	11/12	12/12

表 5. 各 P35S プライマーペアを用いた RPA の 15 分後の LC480 の蛍光強度

	一次スクリーニング			二次スクリーニング				
	Rv1	Rv1	Rv1	Rv1	Rv2	Rv2	Rv3	Rv3
Fw1	1	-	-	-	-	-	-	-
Fw2	12	13	3	4	11	6	6.5	9
Fw3	9	10	-	-	-	-	-	-
Fw4	1	-	-	-	-	-	-	-
Fw5	11	16	13	13	17	10	6	7
Fw6	13	7	-	-	-	-	-	-
Fw7	3	-	-	-	-	-	-	-
Fw8	3	-	-	-	-	-	-	-
Fw9	6	6	-	-	-	-	-	-
Fw10	8	7	-	-	-	-	-	-