

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460882

研究課題名(和文) DNAのシリカ結合能とシリカ結合性蛋白を利用した珪藻検出法

研究課題名(英文) Development of the methods for detection of diatoms utilizing silica binding abilities of DNA and proteins

研究代表者

瀬尾 泰久 (Seo, Yasuhisa)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80187830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンやIgGの一部に、ガラス質と非特異的に吸着する特性をもつものがあることを確認した。次いで、この現象を利用した珪藻被殻の染色法を開発した。実際に溺死した死体の臓器を使って壊機を行った試料について本染色法を適用した。その結果、珪藻被殻の検出が容易になり、溺死診断までの時間が大幅に短縮された。

本研究期間に溺死対照水から発見された新種珪藻について、論文投稿に至った。その後の研究により、この新種珪藻が大分県内の全く異なる水系からも確認され、生息域の拡大が判明した。現在、それぞれの水系から発見された本珪藻の遺伝的多様性について、比較検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that some kinds of peroxidase-labeled streptavidin and IgG has abilities of non-specific adsorption to glassy matter. The methods of staining for diatom frustules were established. Then this staining method was applied to diatom tests that have been actually drowned victims. As a result, detection of the diatom frustules was easier, and the time to diagnose drowning was greatly shortened.

In addition, we could submit a paper on novel species of diatom discovered from sample water obtained from a drowning site during this research. Subsequent research confirmed that this diatom was also found in a completely different water system in Oita prefecture, and expansion of the habitat was found. Currently, we are conducting comparative study on the genetic diversity of diatoms discovered from each water system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：溺死 プランクトン 珪藻 酵素染色 ストレプトアビジン

1. 研究開始当初の背景

従来、法医学における溺死診断法の一つとして、壊機法による珪藻類プランクトンの検出が行われてきた。しかし、この方法は、肺以外の臓器ではその密度の低さから検出が困難である場合が多いことに加え、炭粉や脂質などの残存夾雑物の存在や、珪藻被殻がガラス質であるため屈折率が変わらずプレパラート上での観察が難しいなど、多くの問題点が指摘されている。これらの問題を解決するためにこれまで数多くの研究が行われてきたが、その一つとして申請者らは近年、珪酸質の被殻がもつ特徴に着目した新しい珪藻検出法の開発に取り組んできた。

二酸化ケイ素 (SiO₂) を含むガラス質は、カオトロピックイオンの存在下で DNA や一部のタンパク質を非特異的に吸着する性質を有することが古くから知られている。さらに、この吸着は、水などの極性の高い環境下で容易に解離する特性をもつ。最近では、グラスファイバーを固相として使う DNA の精製法が開発され、多くの DNA 抽出キットにこの基本原理が応用されている。そこで申請者らは、ガラス質の持つこれらの基本原理は、珪酸質でできている珪藻類の被殻にもそのまま当てはまるであろうと考え、平成23年度の科学研究補助金(基盤研究)において、珪藻の DNA-binding 特性を利用する溺死診断法の改良に取り組み、大きな成果を得ることができた。具体的には、壊機した珪藻被殻をカオトロピック剤(グアニジン塩酸塩溶液)の存在下でλファージ DNA を介してシリカコートしたマグネチックビーズにトラップし、不純物を除去後、超純水中に回収するという方法を開発し報告した(Seo Y et al. J Forensic Sci, in press)。この方法は特に、肺の黒色不純物の除去に効果的であった。また、溺死体の心臓血中に存在する珪藻を自己の DNA に吸着して検出する方法を確立し、これが溺死の診断に有用であることを報告した(Seo Y et al. Forensic Sci Int, 2013)。さらに、アミノ化した PCR フラグメントをマイクロタイタープレート上に固相化し、珪藻被殻をビオチン標識 PCR フラグメントとサンドイッチしてペルオキシダーゼ染色する珪藻の染色法を初めて開発した。これら一連の珪藻検出法は、「珪藻類の検出方法」として大分大学より特許申請され、登録されている(特許第 5750796 号)。

これらのなかでも、珪藻を染色して観察するという方法は、以前から行われてきた壊機法による溺死診断法と比較して、珪藻の検出がきわめて容易であることから、解剖後溺死の診断に至るまでの時間を大幅に短縮することができるものと期待されている。

2. 研究の目的

これまでに開発されたアミノ化した PCR フラグメントをマイクロタイタープレート上に固相化し、珪藻被殻をビオチン標識 PCR フラグメントとサンドイッチしてペルオキ

シダーゼ染色する方法は、固相化する PCR フラグメントの最適鎖長、固相化に必要なフラグメントの適正濃度、長期保存の可否など、実用化、汎用化に向け未だ解決できていない問題点が多く存在するのも事実である。また、カオトロピック剤という強力な変成条件下での反応を強いられるため、実際に染色に至るまでの手順も煩雑なものとなっている。一方で、最近、珪酸質に特異的に結合する蛋白・ペプチドが一部の細菌や珪藻類に存在することが明らかとなった(Taniguchi et al. Biotec Bioengineer, 2007)。そこで、申請者らは、これらの蛋白に直接酵素を標識することができれば、より簡便で特異性の高い染色法を開発することが可能になるものと考えた。さらに、これらの蛋白・ペプチドが珪酸質に対して高い特異性を示すものであれば、競合法や非競合法を利用した酵素化学的な定量化も可能になるものと思われる。

本研究計画は、このような問題点を解決することにより珪藻の染色法を溺死の診断法として実用化、汎用化することを目的とし、DNA フラグメントを使った染色法の完成とシリカ結合性を持つ蛋白・ペプチドを利用するワンステップ染色法や定量法について検討するものである。

3. 研究の方法

(1) DNA のシリカ結合能を利用した珪藻被殻の染色法

①市販のλファージ DNA を鋳型として、5' 端をアミノ化したプライマーを使い数十 bp ~1Kbp 単位の PCR フラグメントをそれぞれ合成し、マイクロタイタープレート上に共有結合させた。

②合成したアミノ化 PCR フラグメントはエタノール沈殿として回収後定量し、もっとも回収率の良いフラグメントの鎖長と濃度を決定した。

③珪藻被殻をサンドイッチする条件、ビオチン標識 PCR フラグメントの最適鎖長、洗浄ステップの簡略化、標識酵素及び基質の種類などを検討し、操作手順の効率化について検討した。

④実際の溺死例において、通常行う壊機法による検査と平行して、本法による染色を行った (n=3)。

(2) シリカ結合性蛋白を使った珪藻被殻の検出法

①ガラス質に対する HRP 標識ストレプトアビジンの吸着性

ストレプトアビジンがガラス質に吸着する性質を有するか否かを、以下の方法により検証した。

HRP 標識ストレプトアビジンとして、Thermo Fisher Scientific 社 (Waltham, MA) の High Sensitivity Streptavidin-HRP (1 mg/ml) (以下、ST 1 と略す)、ImmunoBioScience 社 (Mukilteo, WA) の Streptavidin-HRP (1

mg/ml) (ST 2)、Antigenix America 社 (Huntington Station, NY) の Streptavidin-HRP (濃度不記載) (ST 3) の 3 種を用いた。

対照として、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) の西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (POD) をミリ Q 水で 1mg/ml に調整したもの、Santa Cruz Biotechnology 社 (Dallas, TX) の Donkey anti-goat IgG-HRP (0.4 mg/ml) (IgG) を使用した。

各 HPR 標識ストレプトアビジン及び POD を、まず、ミリ Q 水で 1000 倍に希釈した。IgG は、他の溶液と濃度を一致させるため 400 倍に希釈した。これらの希釈溶液各 100 μ l を、スライドガラス上に免疫組織化学用のダコペン (ダコ・ジャパン株式会社, Tokyo, Japan) で円形に囲った範囲にマウントし、室温で 30 min インキュベーションした。インキュベーション後、ミリ Q 水中で 15 min、振盪しながら洗浄を行った。洗浄は 3 回繰り返し行った。

洗浄後、発色基質として株式会社ニチレイ バイオサイエンス (Tokyo, Japan) の シンプルステイン AEC 溶液を滴下し、室温で 15 min 発色させた。約 10 min 振盪しながら水洗し反応を停止後、発色の程度を肉眼で観察した。次いで、各 HPR 標識ストレプトアビジン及び IgG を 1% Tween 20 を含むミリ Q 水で前記と同様に希釈し、同様の手順で染色した。

さらに、ST1-ST3 を 1% Tween 20 を含む PBS、pH 8.0 及び 10 mM リン酸バッファー、pH 6.0 を各用いて希釈し同様の手順で、染色後、それぞれの条件下における染色性について比較検討した。

②珪藻被殻の染色法

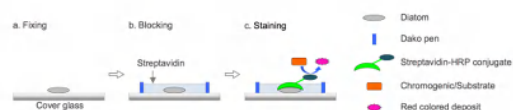
まず、10 μ l につき約 100 個になるように調整した各種珪藻の標準懸濁液を 1.5 ml のマイクロチューブに容れた後、ミリ Q 水 40 μ l を加え、総量を 50 μ l とした。次いで、1/25 量の 10 μ g/ml、BSA を加えて攪拌後、静かにカバーガラス上にマウントし、90°C に加熱したホットプレート上で完全に乾燥させた。乾燥後、ホットプレートをさらに 200°C まで加温し、30 min 加熱固定した。

加熱固定後のカバーガラスは室温まで冷やし、ダコペンを用いて試料が固定された範囲をマークした。次いで、ミリ Q 水で 10 μ g/ml に調整した非標識のストレプトアビジン (VECTOR LABORATORIES 社, Burlingame, CA) 150 μ l をマウントし、室温で 15 min ブロッキングした。

ミリ Q 水で軽く洗浄後、1% Tween 20 を含むミリ Q 水で 800 倍に希釈した ST1 を 150 μ l マウントし、室温で 15-60 min インキュベーションした。

洗浄後、シンプルステイン AEC 溶液を 2-3 滴下し、室温で 15 min 発色させた。水洗によって反応を停止させた後、水系封入剤 CC/MountTM (Diagnostic BioSystems 社, Pleasanton, CA) で封入し、最後に Permount

(Fisher Scientific 社, Fair Lawn, NJ) を使って、スライドガラス上に標本作製した。作製した標本は、株式会社ニコン (Tokyo, Japan) の顕微鏡 (ECLIPSE E600, ECLIPSE 50i) を用いて観察し、必要に応じて写真撮影を行った。



③珪藻被殻染色後の検出率

前記の方法を使い淡水珪藻、海洋珪藻標準懸濁液各 10 μ l を添加したものについて、染色した標本をそれぞれ 15 枚作製し、染色された珪藻被殻の数をそれぞれカウントした。同時に、各珪藻標準液 10 μ l を使って 1-3 で述べた方法で、通常の永久プレパラート (n=15) を作製し、検出された珪藻の数をカウントした。

染色後に検出された珪藻数の平均値と通常の方法でカウントされた珪藻数の平均値から、本法における珪藻の検出率を算出した。

④溺死例における壊機試料の染色と検出

3 例の司法解剖例の壊機試料は、いずれも 100 μ l の懸濁液とし、先に述べた染色手順のうち、加熱固定時に添加する BSA の量を倍増したのみで、その他の操作手順は同様にを行った。

(3) 溺死対照水から発見された新型珪藻について

①発見の経緯

ある溺死事例において、遺体発見現場から採取された対照水中に、これまでに観察されなかった形態を持つ珪藻が観察された。



②形態学的観察

大分県日田市を流れる三隈川水系の遺体発見現場付近において珪藻の採取を行い、形態学的な精査を東京学芸大学生物学教室真山教授に依頼した。

③分子系統学的解析

対照水中から本珪藻を収集し、植物用 DNA 抽出キット DNeasy Plant kits (キアゲン社) によってゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA は Gen とるくんエタ沈キャリア (Takara 社) を用いて濃縮した。次いで、本珪藻の s18rRNA 配列を得るために、Rowan and Powers (1991) による s18rRNA のユニバーサルプライマーを用いた PCR を行い、サイクルシーケンシング法を用いて塩基配列を解析した。

4. 研究成果

(1) DNA のシリカ結合能を利用した珪藻被殻の染色法

固相化する PCR フラグメントの濃度は 0.1 ~ 1.6nmol/ μ l の間でも回収率に大きな違いは認められなかった。しかしながら、この方

法は、検鏡に際し背景が沈着物で汚れ珪藻の検出が困難であること、手技が煩雑なことなどから実用には適していないと判断された。

(2) シリカ結合性蛋白を使った珪藻被殻の検出法

① ガラス質に対する HRP 標識ストレプトアビジンの吸着性

ミリQ水を使って3種類のHRP標識ストレプトアビジン (ST1-ST3) 及び対照 (POD、IgG) を 1 µg/ml (ST3 に関しては濃度不明であるものの、TMB による呈色反応では ST3 と同程度の濃度と推定された) に希釈し、スライドガラス上で 30 min 反応させ、免疫組織化学用の発色基質を使って、ストレプトアビジンがガラス質に吸着するかどうかを検証した。

その結果、対照とした POD を除いて全てのマウント面が赤色に染色された。

次いで、さまざまな免疫反応において非特異的反応を抑制するために汎用される Tween 20 を 1% 含んだ溶媒を使って同様の実験を行った。その結果、IgG 及び ST2 はスライドガラスへの吸着性が喪失した。しかしながら、ST1 及び ST3 は、明らかにスライドガラス上に吸着していることが示された。

通常免疫反応を始め、アビジン・ビオチン反応においては、PBS 等の弱塩基性、弱酸性の緩衝液を用いるため、弱塩基性の緩衝液として 1% Tween 20 を含む PBS pH 8.0、弱酸性の緩衝液として 10 mM リン酸バッファー、pH 6.0 を使い、前記と同様の実験を行った。

その結果、ST1-ST3 の全ての HRP 標識ストレプトアビジンにガラス質への吸着性が認められた。その吸着性は、10 mM リン酸バッファー、pH 6.0 を使った場合がもっとも良好であった。1% Tween 20 を含むミリQ水を使った実験では吸着性の認められなかった ST2 にも、弱いながらも吸着性の回復がみられた。PBS を溶媒とした場合は、ST1-ST3 のいずれにも吸着性の低下が認められた。

② 珪藻被殻の染色法

各標準懸濁液中の淡水珪藻及び海洋珪藻ともに輪郭が鮮明に染色されているばかりでなく、内部構造に至るまで良好なコントラストを示す染色性が認められた。ただし、珪藻のみが特異的に染色されているわけではなく、珪藻を固定したカバーガラス上には、顆粒状の色素沈着物が同時に観察され、また、その他の夾雑物も同時に染色される例が多くみられた。加熱固定した試料の周縁部も同様に比較的濃く染色された (図 1、2)。

本実験では、スライドガラスを用いた吸着実験でもっとも染色性に優れていると考えられた 1% Tween 20 を含むミリQ水と ST1 を組み合わせて染色用のストレプトアビジン溶液とした。ST1 の希釈倍率に関しては、1000 倍 (1 µg/ml) 以上とした場合、染色性の低下が認められた。また、300 倍以下では、顆粒状の色素沈着物が多数観察され、バックグラウンドが大幅に上昇した。したがって、

本実験では、ST1 の希釈倍率を 800 倍 (1.25 µg/ml) と設定した。

ストレプトアビジンの反応時間は、15-60 min としたが、15 min で染色したものと 60 min で染色したものととの染色性に大きな差は認められなかった。しかし、インキュベーション時間が 60 min を超えた場合、検出率の低下が認められた。



図 1

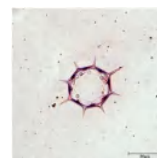


図 2

③ 珪藻被殻染色後の検出率

10 µl 当たり 50-60 cells となるように調整した淡水珪藻及び海洋珪藻の各標準懸濁液から、常法に従い永久プレパラートを作製した。永久プレパラートは各標準懸濁液に対し 15 枚作製し、それぞれ観察された珪藻をカウントした。

同様に、40 µl のミリQ水に 10 µl の各標準懸濁液を加えたものに対し、先に述べた方法で染色を施し、染色された珪藻をカウントした。各標準懸濁液に対し 15 枚のプレパラートを作製した。

(各標準懸濁液の永久プレパラートから検出された珪藻の平均数/染色後のプレパラートから検出された珪藻の平均数) を検出率とし、%表示した (表 1)。

表 1 各標準懸濁液中の珪藻染色後の検出率

	淡水珪藻		海洋珪藻	
	大分川	乙津川	大分港	別府港
Control (mean±SD)	62.6±6.3	54.1±6.8	51.9±6.0	61.4±7.0
Stained (mean±SD)	62.2±8.6	51.4±7.8	51.2±6.4	71±10.9
Recovery (%)	99.4	95.1	98.7	100

表 1 で示したとおり、各標準懸濁液から本法で染色後に観察された珪藻の平均数と、標準懸濁液中の珪藻数の間に、大きな違いは認められなかった。このなかで、別府港より採取した珪藻標準液中から検出された珪藻数は、染色後の方が多く観察された。したがって、この場合の検出率は、便宜上 100% と表示した。ただし、染色後に観察された珪藻数と標準懸濁液中の珪藻数の差は 10 cells 程度であり、他の試料と比較して特に検出率に大きな違いはないものと判断された (P=0.08)。

ミリQ水に添加した各標準懸濁液をカバーガラス上に加熱固定する際、200°C、30 min 以下の固定温度、固定時間では、染色後の検

出率に低下が認められた。また、BSA を試料溶液に添加しなかった場合には、染色後の検出率が 50~60%程度にとどまった。

④溺死例における壊機試料の染色と検出

実際の解剖例において各臓器試料から検出された珪藻の数を、従来の方法と本染色法を比較し表 2 に示した。

表 2 溺死解剖例における検出珪藻数の比較

	検出珪藻数										
		従来法					染色法				
		肺	心臓	肝臓	脾臓	腎臓	肺	心臓	肝臓	脾臓	腎臓
溺死例1	>100	1	1	13	ND	>100	3	3	1	3	
溺死例2	>100	3	3	3	3	>100	9	40	4	4	
溺死例3	>100	4	5	4	4	>100	2	3	ND	ND	

各事例で、解剖時に採取した各種臓器試料から検出された珪藻の数は、従来の方法と本染色法では、必ずしも一致しなかった。しかし、これは、二重に採取した臓器試料の部位や大きさが同一でなかったためであり、むしろ当然の結果であると考えられた。

淡水珪藻、海洋珪藻の標準懸濁液を用いて染色した場合と同様に、壊機試料中に含まれる珪藻も良好な染色性と高いコントラストで検出することが可能であった。

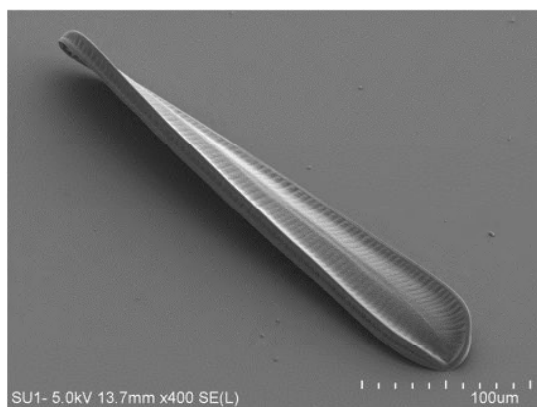
通常の方法では検鏡に時間がかかる上、その検出も困難であるような事例においても、珪藻が染色されたことによって、検出がきわめて容易となった。また、検鏡に要する時間も大幅に短縮された。

ただし、壊機処理において分解消化されない脂肪や炭粉、その他の夾雑物が多く含まれるものについては、バックグランドの上昇や、夾雑物に対する染色性などが認められた。

(3) 溺死対照水から発見された新型珪藻について

①形態学的特長

東京学芸大学の協力によって、本珪藻がストラメノパイル界不等毛植物門珪藻綱羽状目コバンケイソウ科スリレラ属の一種であり、形態的に珍しい種で新種あるいは外来種である可能性が指摘された。



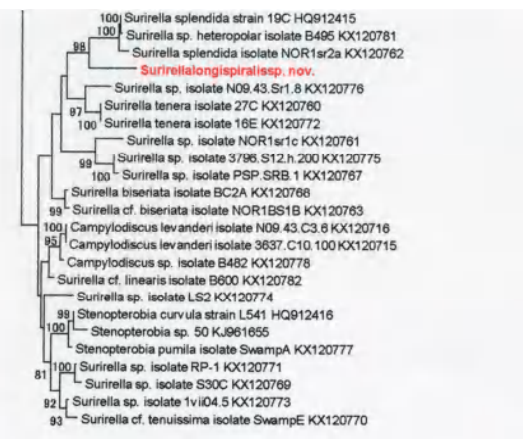
その後の文献的検索により、本珪藻に関する報告は未だなされていないことが明らか

となった。

②分子系統学的解析

s18rRNA 配列を認識するユニバーサルプライマーを用いたシーケンス解析を行った結果、1712bp の全塩基配列を得ることができた。得られた塩基配列に対して DDBJ により相同性検索を行ったところ、最も近い塩基配列をもつ *Surirella splendida* においても 95%程度の相同性しかなく、本珪藻が未だ報告されていない種であることがわかった。

これらの結果から、本珪藻を *Surirella longispiralis* と命名し、新種の珪藻として登録申請するに至った。



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

①山口 翔、岸田 哲子、瀬尾 泰久、黒木 浩二、大分川で発見された新種珪藻の分子系統学的解析、日本法医学会九州地方会、2017 年 11 月 24~25 日、琉球大学 (沖縄)

②長野 友樹、岸田 哲子、瀬尾 泰久、黒木 浩二、壊機法における珪藻検出率低下の原因探求、日本法医学会九州地方会、2016 年 10 月 14~15 日、久留米大学 (福岡)

③宗像 剛史、岸田 哲子、瀬尾 泰久、黒木 浩二、細井 利男、真山 茂樹、ある溺死体揚収現場から発見された新型珪藻について、日本法医学会九州地方会、2015 年 10 月 16~17 日、宮崎大学 (宮崎)

④青木 泰佑、岸田 哲子、瀬尾 泰久、黒木 浩二、珪藻の染色法—第 2 報—、2014 年 10 月 10~11 日、鹿児島大学 (鹿児島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 泰久 (SEO, Yasuhisa)
大分大学・医学部法医学講座・助教
研究者番号：80187830

(2) 研究分担者

岸田 哲子 (KISHIDA, Tetsuko)
大分大学・医学部法医学講座・教授
研究者番号：50136793

(3) 研究分担者

内田 智久 (UCHIDA、Tomohisa)
大分大学・医学部法医学講座・助教
研究者番号：70381035