

アッセイ法基質特異性評価のための 環状型・鎖状型 oxytocin の分離・精製法の確立

中川 敬介 (指導教員 川井 恵一 水谷 明日香)

[はじめに]

Oxytocin (Oxt) は下垂体後葉から分泌される、環状構造を持ったペプチドホルモンである。生理作用として、子宮体平滑筋収縮作用や射乳励起作用が知られており、現在は産科領域において分娩の誘発、促進並びに子宮出血の治療目的で注射剤のみが認可されている。また、中枢神経系への作用もあり、社会性行動との関係から自閉症や統合失調症の臨床試験の対象にもなっている¹⁾。

臨床や研究において Oxt を定量する際には、唾液や末梢血を検体とするが、末梢での Oxt 量は成人健常者の末梢血 1 mL あたりに 10 pg 以下と極微量しか存在しない²⁾。さらに、生理活性を示すのは環状構造をもつ環状型 Oxt のみであり、体内に混在する、ジスルフィド結合が外れた鎖状型 Oxt は活性を示さない (Fig. 1)。このため、生体内の Oxt を定量する際には、微量な Oxt を高精度かつ特異的に定量する分析方法が必要となる。

現在 Oxt の定量法として、radioimmunoassay (RIA) や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) などが挙げられる。簡便に利用できる RIA や ELISA においては、高精度かつバソプレシンなど Oxt に類似したホルモンを識別する基質特異性を持つアッセイキットが販売されているが、生体内で活性を示す環状型 Oxt と活性を示さない鎖状型 Oxt を識別する基質特異性については厳密な検証が行われておらず³⁾、アッセイキットが鎖状型 Oxt にも反応する場合、環状型 Oxt 定量法としての測定値は過大評価されることになる。この基質特異性の検証には、純粋な環状型 Oxt と鎖状型 Oxt をアッセイキットへ反応させる必要がある。

本研究ではこの基質特異性の検証に必要な高純度鎖状型 Oxt を得るために、市販されている環状型 Oxt から鎖状型 Oxt を合成し、さらに分離・精製する方法を確立することを目的とした。

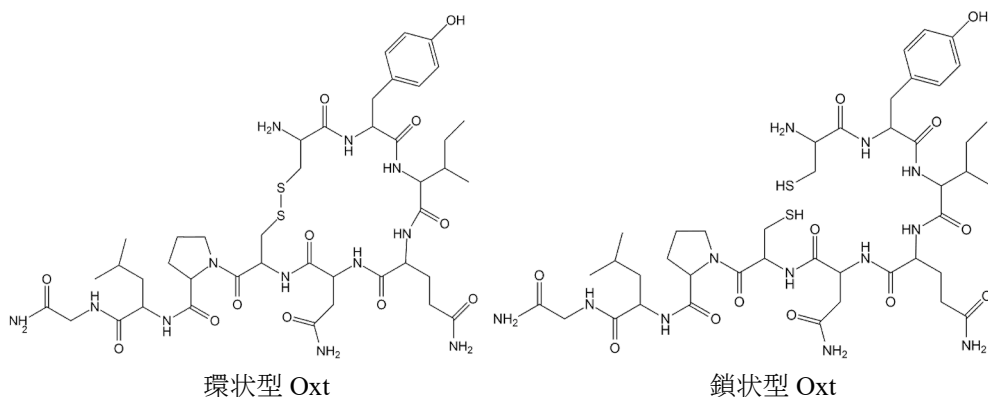


Fig. 1 Oxytocin の構造

[方法・結果]

1. 鎖状型 Oxt の合成

まず市販の Oxt 標品 (Peptide institute) を還元反応させ、鎖状型 Oxt を合成した。鎖状型 Oxt の合成は、Collins らの方法³⁾に従った。18 μg の Oxt と 7.8 μg の tris (2-carboxyethyl)

phosphine hydrochloride (TCEP-HCl) (Nacalai tesque) をそれぞれ 1 mL の精製水に溶解し、Oxt 溶液 1 mL に還元剤である TCEP-HCl 溶液 1 mL を添加することで反応を開始した。混合したチューブ内は窒素で満たし、5 時間室温で震盪混和後、triethylamine (Nacalai tesque) を添加することで反応を停止させた。

この還元反応によって鎖状型 Oxt が合成されていることを確認するために、作成から 2 週間冷凍保存した sample を LC-MS で分析した。また、市販の Oxt 標品の純度もあわせて確認した。

1. 結果

LC-MS 分析の結果、市販の Oxt 標品からは環状型 Oxt のみが検出され、鎖状型 Oxt は検出されなかった。還元反応後の sample からは環状型 Oxt 以外の生成物が 2 つ確認された。主要生成物は、ジスルフィド結合が外れ、水素原子が 2 つ付加したことによって分子量が 2 増加した鎖状型 Oxt であることが確認された。環状型 Oxt 及び鎖状型 Oxt でない副生成物が含まれたことは、反応後 2 週間冷凍保存したことが影響したと考えられる。

2. 鎖状型 Oxt の精製

環状型・鎖状型 Oxt を識別する RIA や ELISA 等のアッセイキットの基質特異性を検証するには、純粋な鎖状型 Oxt を用いることが望ましい。そこで、還元反応の時間や high performance liquid chromatography (HPLC) による精製方法、並びに精製後の保存方法の最適化を検討した。

2-1. 鎖状型 Oxt の分離条件の検討

はじめに、還元反応させた sample で環状型 Oxt と鎖状型 Oxt を分離可能かどうか検討した。分離には HPLC の低圧グラジエントシステムを使用し、クロマトグラムを確認した。また、確認された peak の同定を試みた。HPLC の条件は table 1 に示すとおりである。

Table 1 HPLC での分離条件^{a)}

Column	Kinetex EVO C18 (Phenomenex)
Solvent system	liner gradient 0 min : 15% acetonitrile in 0.1% aqueous trifluoroacetic acid 20 min : 35% acetonitrile in 0.1% aqueous trifluoroacetic acid
Solvent flow rate	1.0 mL/min
UV	230 nm

2-1. 結果

5 時間還元反応させた sample での HPLC 分析の結果を Fig. 2 に示した。Retention time 11.8 分と 12.5 分にそれぞれ peak 1 及び 2 が確認された。このうち peak 1 は環状型 Oxt のみを分析した時の retention time と一致したため、peak 1 は環状型 Oxt であることが確認できた。また、peak 2 は、面積が環状型 Oxt である peak 1 に比べて明らかに大きく、retention time が peak 1 に近い。これらのことから、peak 2 は環状型 Oxt と構造や質量数が類似した還元反応の主要生成物である鎖状型 Oxt と推察された。

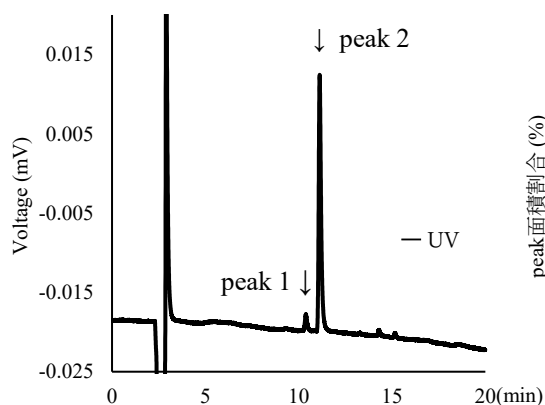


Fig. 2 5時間還元反応後の溶液のクロマトグラム

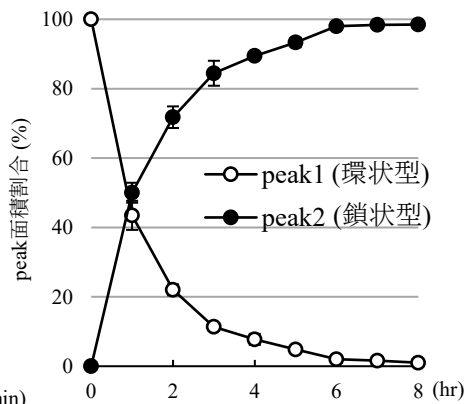


Fig. 3 反応時間と各peakの面積割合の変化

2-2. 還元反応時間の検討

鎖状型 Oxt の収率を向上させるために、最適な還元反応の時間を検討した。環状型 Oxt に還元剤である TCEP-HCl を添加した反応開始から 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 時間経過後に反応を停止させ、各 sample の HPLC クロマトグラムから peak 面積割合の変化を確認した。

2-2. 結果

各反応時間における sample の全 peak の総面積を 100% とした peak 1 及び peak 2 の面積割合の変化を Fig. 3 に示した。反応時間の経過とともに環状型 Oxt である peak 1 が減少し、peak 2 が増加することを確認できた。このことから、peak 2 が還元反応によって合成された鎖状型 Oxt であることが強く推察された。また、反応時間 6 時間において鎖状型 Oxt を約 98% の高い収率で得ることができたため、以降の検討では還元反応の時間は 6 時間とした。

2-3. 分取した鎖状型 Oxt の安定性検討

RIA や ELISA 等のアッセイキットへの影響が未知である溶媒や反応試薬を除去し、より純粋な鎖状型 Oxt を得ることを目的として、鎖状型 Oxt である peak 2 を前述の HPLC 条件で分取した。分取後の sample を再度 HPLC で分析した結果、鎖状型 Oxt と同一の retention time に単一の peak が確認されたことから、鎖状型 Oxt の分取を確認できた。この分取した鎖状型 Oxt の安定性を向上させるために、保存条件の検討を行った。

今回分取時に HPLC で用いた移動相の pH は 2.5 程度であるため、peak 2 の分取後に 0.1 M NaOH (Nacalai tesque) を用いて pH 2.5, 5.0, 7.0, 9.0 に調整し 4°C で保存することで、pH が安定性に与える影響を検証した。また、最適な pH 条件下での鎖状型 Oxt の安定性を、4°C と 30°C の 2 つの保存条件において経時的に分析した。

2-3. 結果

分取し pH を調節した後の経過時間と全 peak の総面積を 100% とした未変化鎖状型 Oxt の割合を Fig. 4 に示す。pH 9.0 では 1 日後の時点で鎖状型 Oxt が約 3% となり、非常に不安定であるため保存条件として不適切であることが確認された。pH 2.5-7.0 では 3 日後までは同程度に安定であり、7 日後の時点でも pH 2.5 において約 94% の高い安定性を維持できることが確かめられた。

また、最も安定であった pH 2.5 に調整した sample における 4°C、-30°C 保存での鎖状型 Oxt の割合を Fig. 5 に示す。分取後に-30°C で保存することによって 7 日後でも約 96%の純度を維持できることが確認された。

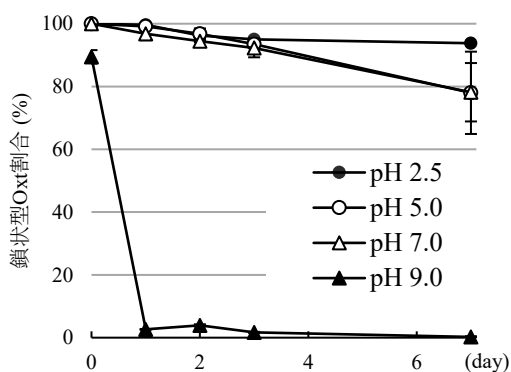


Fig. 4 分取後のpHと鎖状型Oxtの面積割合の変化

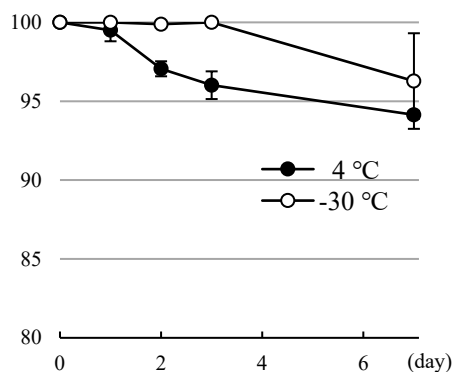


Fig. 5 分取後の保存温度と鎖状型Oxtの面積割合の変化

[結論・展望]

以上の結果より、還元反応によって環状型 Oxt から鎖状型 Oxt を高い収率で得られた。また、Oxt アッセイキットの基質特異性検証に必要な鎖状型 Oxt を環状型 Oxt から分離し、精製することができた。さらに、分取後に pH 2.5 かつ-30°C で保存することによって、高純度の鎖状型 Oxt を維持できることが明らかになった。

今回確立した方法で合成・分離・精製した鎖状型 Oxt と環状型 Oxt をアッセイキットに反応させ定量することで、アッセイキットの基質特異性を評価できると考える。

[謝辞]

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、助言してくださいました金沢大学 川井恵一教授、小林正和准教授、水谷明日香助教、並びにご協力いただきました 学際科学実験センター 遺伝子研究施設 西内巧先生に深く感謝申し上げます。

[参考文献]

- 1) Yamasue H, Yee JR, Hurlmann R, et al. Integrative approaches utilizing oxytocin to enhance prosocial behavior: from animal and human social behavior to autistic social dysfunction. *J Neurosci*, 2012; 32(41): 14109-14117.
- 2) McCullough ME, Churchland PS, Mendez AJ. Problems with measuring peripheral oxytocin: Can the data on oxytocin and human behavior be trusted? *Neurosci Biobehav Rev*, 2013; 37(8): 1485-1492.
- 3) Collins J, Tanaka J, Wilson P, et al. In situ conjugation of dithiophenol maleimide polymers and oxytocin for stable and reversible polymer-peptide conjugates. *Bioconjug Chem*, 2015; 26(4): 633-638.
- 4) Taguchi A, Kobayashi K, Kotani A, et al. 3-Nitro-2-pyridinesulfenates as efficient solution- and solid-phase disulfide bond forming agents. *Chemistry*, 2017; 23(34): 8262-8267.