

MALDI-8030とLCMS™-9030を用いた オリゴ核酸の分析

山崎 雄三、加藤 紀子

ユーザーベネフィット

- ◆ 信頼性の高いオリゴ核酸のキャラクタリゼーションが可能です。
- ◆ ESI-QTOFにより元素組成を得ることが可能です。
- ◆ MALDI-ISDにより配列情報を得ることができます。

■はじめに

核酸医薬品は生体反応の作用機序の上流において比較的小さい副作用で機能するとされ、いくつかの疾患を治療するための有望な薬剤とされており、現在、質量分析を用いた核酸のキャラクタリゼーションに関心が高まっています。しかし、高分解能かつ高精度なESI質量分析計が核酸の精密質量測定を可能にする一方で、これらESI-MSを用いたルーチンの核酸配列分析は依然として難しいのが現状で、これらの汎用的なESI-MS/MS技術を用いても完全な内部オリゴ配列が得られることはまれです。一方、MALDI-TOFMSを用いたIn Source decay (ISD) は、装置としては高性能ESI-MSのような精密質量測定のための十分な仕様を有していないにもかかわらず、核酸のシーケンス解析を行う有用な方法として報告されています¹⁾。本稿では、ESI-QTOFであるLCMS-9030および正負イオンモードを搭載した卓上型リニアモードMALDI-TOFMSであるMALDI-8030を用いた核酸のキャラクタリゼーションの例について報告します。

■測定条件と分析試料

● 合成核酸

糖成分の構造が異なるホスホロチオエート化した核酸2種類(LNA-Oligo, S-Oligo)をジーンデザイン(日本)から購入しました。これらの配列を図1に示します。すべての核酸は、ミリQ水で10 pmol/mLに調製しました。

● MALDI-TOFMS

3-HPA (3-hydroxypicolinic acid) とクエン酸アンモニウムをマトリックス及び添加剤としてISD測定に適用しました。マトリックス溶液と試料をステンレス製のMALDIプレート上に積層しました。負イオン検出によるISDは、卓上型両極性リニアモードMALDI-TOFMSであるMALDI-8030で実施されました。

● ESI-QTOF

LCMS-9030を用いて負イオンモードで精密質量測定を行いました。ESIには50 mmol/LのHFIP, 10 mmol/LのDIPEAおよびアセトニトリルからなる溶媒を、0.2 mL/minの流速で適用しました。QTOFの測定質量範囲はm/z 500から3000に設定しました。ESIスペクトルのデコンボリューションをLabSolutions Insight™のReSpectで行いました。

■結果

図1に示す2種類のオリゴ核酸を、LCMS-9030を用いた負イオンモードの精密質量測定に供しました。[M-4H]⁴⁻から[M-6H]⁶⁻に分布したオリゴ核酸の多価イオンが観測されました(図2および図3の挿入図)。ESIスペクトルのデコンボリューションにより、これらオリゴ核酸の正確な質量が成功裏に得られました。その結果を図2および図3に示します。LNA-oligoのESI-MSから質量として6711.6733が、S-Oligoからは6431.7241が得られました。図4に示すようにLNA-およびS-Oligoの理論質量はそれぞれ6711.6731および6431.7240なので、観測された質量と理論値との差はそれぞれ0.03 ppmおよび0.02 ppmであり、この結果から2つのオリゴ核酸の組成式を確認することが可能でした。

次に、MALDI-8030を適用して2種類のオリゴ核酸の負イオンモードISD測定を行いました。本装置でMS測定からISDへ移行する操作は、レーザー照射を強くするのみであり、非常に迅速かつ容易です。ISDにより得られた配列を示すラダー状のシグナルを図5と図6に示しました。図中のaおよびwと表記されるフラグメントイオンは、平均分子量として帰属されました。2つの試料において、ほぼ全てのオリゴ配列から生じたwイオンをスペクトル中に見出すことができました。3'末端からの1つ目または2つ目のユニットに該当するwイオンのみが、マトリックス由来の夾雑信号との重複により帰属できませんでした。一方、aイオンは、S-Oligoの場合、2つの5'末端ユニットを除いて、ほぼ完全な一連のシリーズとして検出されました。しかし、LNA-オリゴの場合、検出されたaイオンは内部配列のみに由来しており、この場合、これらaイオンはwイオンによる配列情報を補う役割として用いられることを示しています。

■結論

LCMS-9030を用いた精密質量測定により観測された質量は、理論的質量と高い精度で疑いなく一致しました。MALDI-8030を用いたISDは主にオリゴ核酸の内部配列情報をもたらしましたが、このような情報をルーティンとして得ることは他のどのMS/MS技術でも困難です。MALDI-ISDおよびESI-QTOFは、オリゴ核酸のキャラクタリゼーションのために有用な組合せと考えられます。

■参考文献

1) Shimizu H, Jinno F, Morohashi A, Yamazaki Y, Yamada M, Kondo T, Asahi S.
J Mass Spectrom. 2012 Aug;47(8):1015-22.



MALDI-8030



LCMS™-9030

LNA-Oligo	G(L)^5(L)^5(L)^T(L)^5(L)^a^g^t^5(x)^t^g^5(x)^t^t^5(x)^G(L)^5(L)^A(L)^5(L)^5(L)	
S-Oligo	g^5(x)^5(x)^t^5(x)^a^g^t^5(x)^t^g^5(x)^t^t^5(x)^g^5(x)^a^5(x)^5(x)	
Legend	N(L): LNA [*] (A, T, G) 5(L): LNA [*] (5-mC DNA) [*] LNA: Locked Nucleic Acid	(small character): DNA 5(x): 5-methyl dC ^ : Phosphorothioated

図1. オリゴ核酸の配列

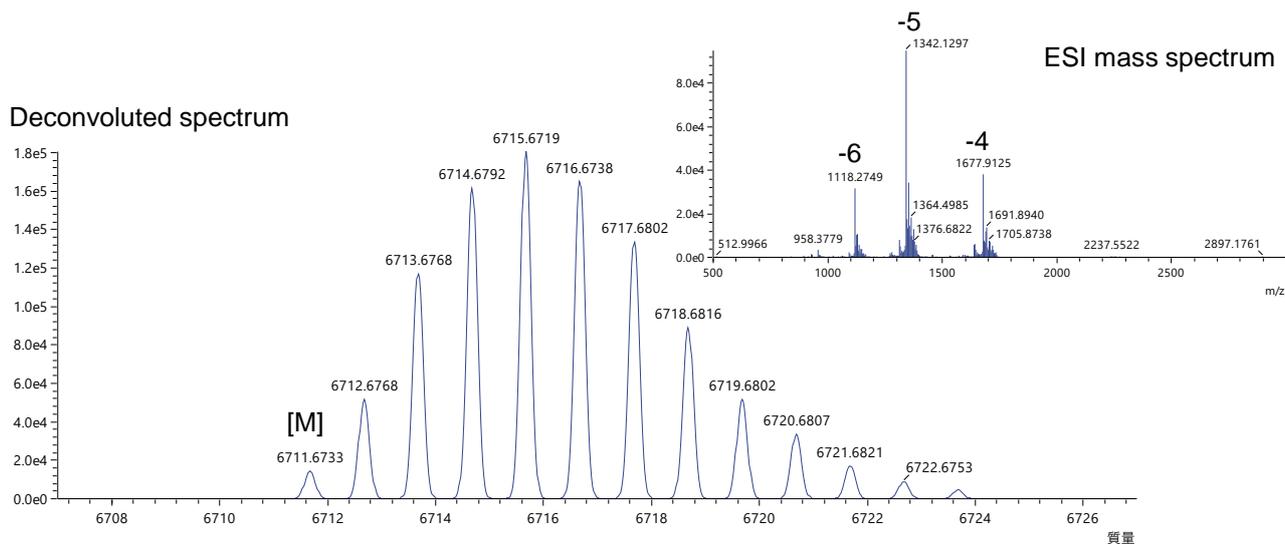


図2. LNA-Oligoの精密質量測定

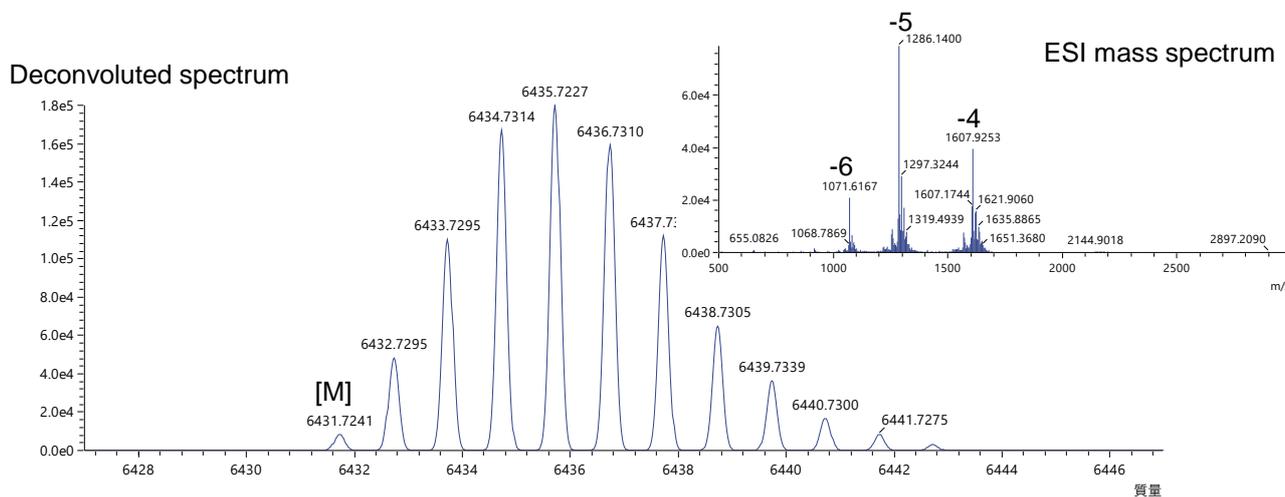


図3. S-Oligoの精密質量測定

LNA-Oligo	$C_{210}H_{264}N_{67}O_{112}P_{19}S_{19}$	S-Oligo	$C_{200}H_{264}N_{67}O_{102}P_{19}S_{19}$
calc.[M]	6711.6731	calc.[M]	6431.7240
Obs.[M]	6711.6733	Obs.[M]	6431.7241
diff./ppm	0.03	diff./ppm	0.02

図4. 精密質量測定の精度

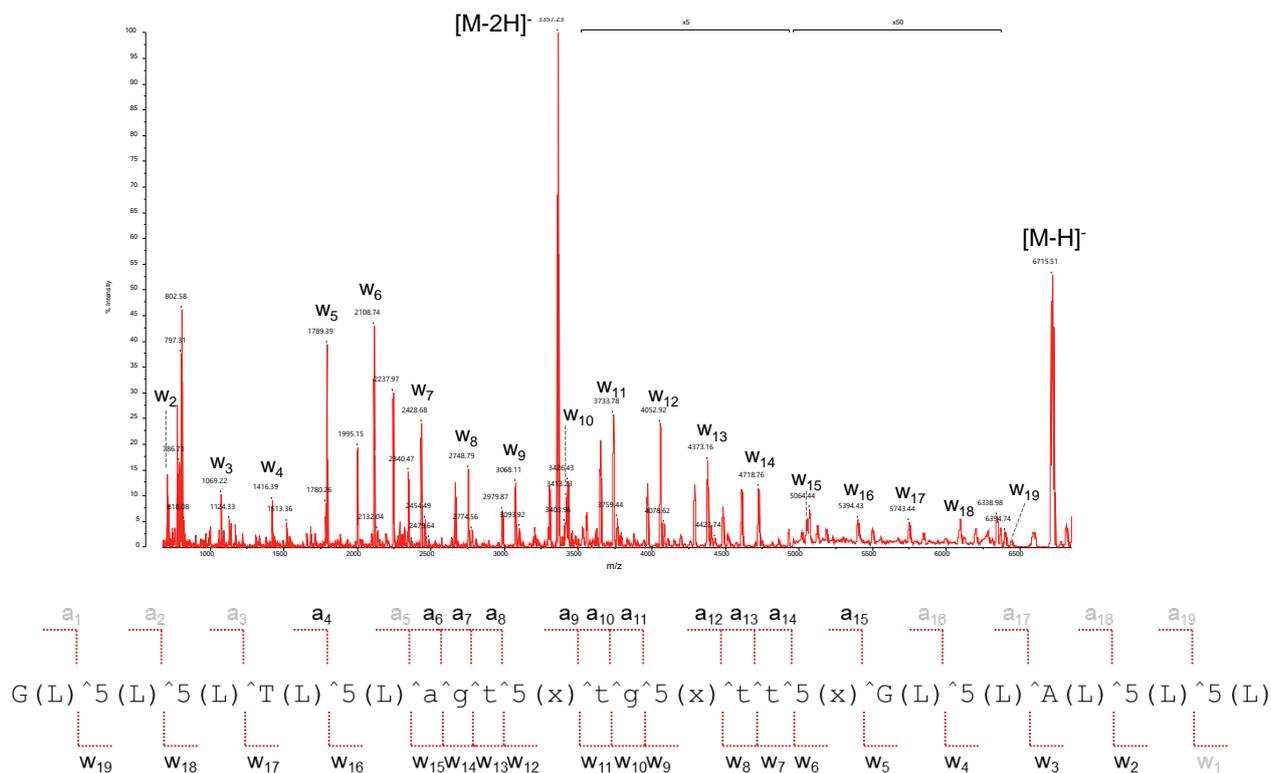


図5. LNA-OligoのISD,およびa、wイオンの帰属

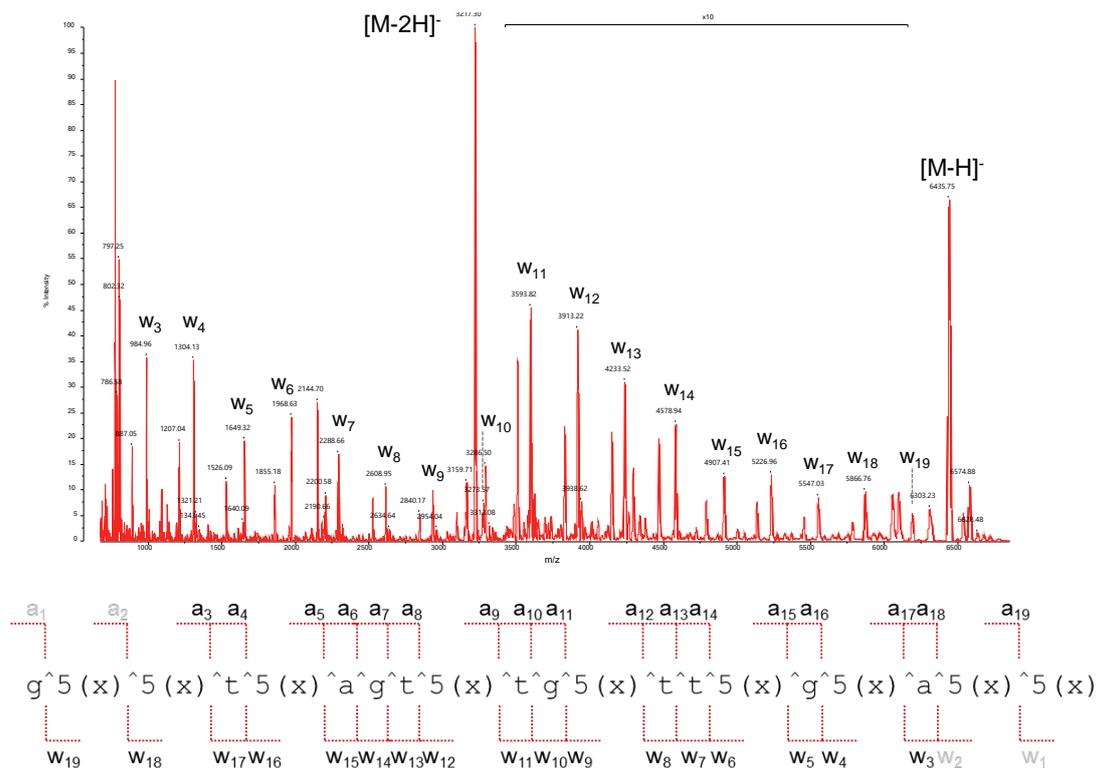


図6. S-OligoのISD,およびa、wイオンの帰属

LCMSおよびLabSolutions Insightは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00245-JP 初版発行：2022年 2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022