SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 MALDI-8030
オリゴ核酸配列解析用ソフトウェア LabSolutions Insight™ Biologics

卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8030”を用いたアンチセンス核酸の配列確認

西風 隆司

ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI-ISDによりシンプルかつ明確にオリゴ核酸配列を読むことができます。
- ◆ 複雑なMS/MSスペクトルを解析する必要がないため、省力化を実現できます。
- ◆ シンプルかつ安価な装置で核酸医薬品の合成確認が行えます。

■はじめに

核酸医薬は比較的新しい医薬品モダリティーのひとつとして近年特に注目されています。抗体医薬品などのバイオ医薬品と異なり化学合成が可能であるため、製造コストを抑えられるなどのメリットがある一方で、品質担保のための分析法開発やその標準化は発展途上であり、産学連携の取り組みも進められています。

質量分析（MS）は様々なソフトイオン化法の発展と装置そのものの性能向上により、核酸やタンパク質、糖鎖などの生体高分子の分析法として定着してきています。一般的に、核酸の配列解析にはタンデム質量分析技術（MS/MS）が用いられますが、通常のイオン開裂技術として汎用されるcollision-induced dissociation (CID) では、特に内部配列を示唆するフラグメントが出にくいということが課題でした。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法は、核酸のみならず様々な生体高分子をイオン化する技術として用いられています。基本的にMALDI法は試料のフラグメント化を起こさずソフトにイオン化することのできる技術ですが、特殊なマトリックスを用いたり、レーザー強度を上げることでイオン化と同時にフラグメント化するインソース分解（in-source decay; ISD）を起こし、構造解析に利用することもできます。このISDを核酸の配列解析に用いた場合、単純開裂に基づく解釈が容易なマススペクトルが得られるため、配列解析に有用であることが知られています。

本アプリケーションニュースでは、合成アンチセンス核酸を卓上リニア型MALDI-TOF MS “MALDI-8030” でISD測定を行い、得られたマススペクトルをオリゴ核酸配列解析ソフトウェア “LabSolutions Insight Biologics“ を用いて配列解析を行った例をご紹介します。

■モデル核酸医薬品サンプル

本アプリケーションニュースでは、合成アンチセンス核酸として各核酸医薬品（mipomersen, nusinersen 及び inotersen）をモデル配列として用いました（表1）。それぞれ0.1 mg/mL（約13~14 pmol/µL）になるように水に溶解し、このうち0.5 µLを測定に用いました。

表 1　三種のモデル核酸医薬品の構造

Name	Chemical formula	Mw	Note
Mipomersen	C230H324N67O122P19S19	7177.2	ASO, PS (full), 2'-MOE, 20 mer
5'-G*-mC*-mC*-mU*-mC*-dA-dG-dT-dmC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G*-mC*-A*-mC*-mC*-3'			
Nusinersen	C234H340N61O128P17S17	7127.2	ASO, PS (full), 2'-MOE, 18 mer
5'-T*-mC*-A*-mC*-T*-T*-T*-mC*-A*-T*-A*-A*-T*-G*-mC*-T*-G*-G*-3'			
Inotersen	C230H318N69O121P19S19	7183.1	ASO, PS (full), 2'-MOE, 20 mer
5'-T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dmC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*-3'			

* = 2'-O-(2-methoxyethyl)　m = 5-methyl　d = 2'-deoxy

■質量分析

0.5 µLのサンプル溶液をMALDIターゲットプレートに搭載し、そこに0.5 µLのマトリックス溶液を重層し風乾させた後、MALDI-8030（図1）で測定を行いました。マトリックス溶液としては、50%アセトニトリルに40 mg/mLで溶解させたTHAP（2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate）またはHPA（2-hydroxypicolinic acid）を用い、どちらも添加剤として40 mMのクエン酸アンモニウムを用いました。マススペクトルの解析、特にISDフラグメントのアサインにはLabSolutions Insight Biologicsを用いました。

図 1　MALDI-TOF 質量分析計 “MALDI-8030”本体外観（左）およびLabSolutions Insight™ Biologics （右）

■モデル核酸医薬品のマススペクトル

核酸のMALDI測定ではマトリックスとしてHPAやTHAPがよく用いられます。今回のモデル核酸医薬品にもこれらを検討したところ、負イオンモードにおいて脱プロトン化体[M-H]⁻としてイオン化できました。クエン酸アンモニウムを添加することで、不要なカチオン付加を抑制することが可能でした（図2）。

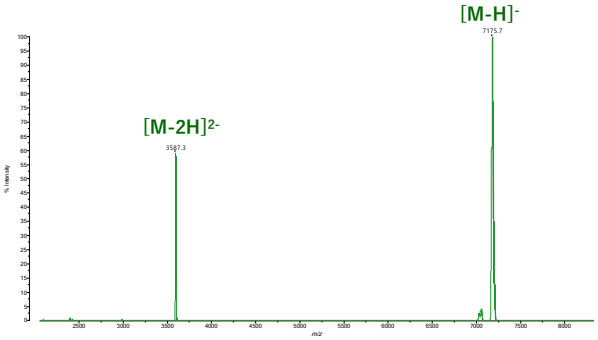

図 2　THAPマトリックスを用いて取得したmipomersenの負イオンMALDIマススペクトル

■オリゴ核酸のMALDI-ISDの特徴

オリゴ核酸のMALDI-ISDでは、ホスホジエステル結合の一か所で切断されたイオンの5′側であるa-seriesと3′側であるw-seriesが特異的に観測されます（図3）。一方、CIDでは様々なタイプの開裂イオンが観測される傾向にあり、さらにプリカーサーとするオリゴ核酸イオンの価数によっても生成されるフラグメントが異なるため、解析が複雑になることや、内部配列を示唆するフラグメントが出にくいことが指摘されています。MALDI-ISDで観測されるシンプルかつ連続的なシグナルは内部配列のみならずオリゴ核酸の配列解析に大変有効です。

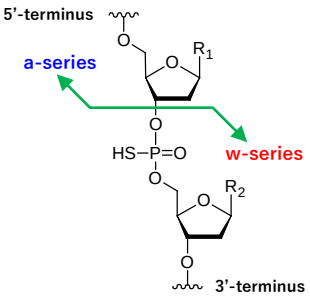

図 3　MALDI-ISDで観測されるオリゴ核酸フラグメントイオンの命名法

■モデル核酸医薬品のMALDI-ISD

MALDI-8030を用い、負イオンモードで取得したモデル核酸医薬品（mipomersen, nusinersen 及び inotersen）のMALDI-ISDマススペクトル図4に示します。ISDを起こすには、通常よりもレーザーパワーを上げて測定するだけですが、マトリックスとしてTHAPよりもHPAを用いる方が効率的でした。ホスホロチオエート修飾をはじめ、様々な修飾が施された核酸医薬品であっても、連続的なISDピークを生じることが分かりました。この一価イオンからなるマススペクトルはシンプルなためマニュアル解析も可能ですが、LabSolutions Insight Biologicsを用い自動で解析する事も可能です。マススペクトルをmzMLファイルで出力し、LabSolutions Insight Biologicsに配列情報を入力したうえで解析を実行すると速やかにアサインの結果が表示されます。

図5にLabSolutions Insight Biologicsを用いて解析したモデル核酸医薬の解析結果の一例を示します。

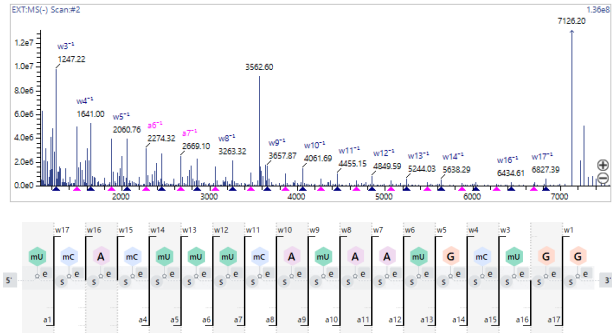

図 5　LabSolutions Insight Biologicsによるモデル核酸医薬品の解析例

MALDI-8030はリニアモード専用機であるためMS/MS能力は有しませんが、ISDを行うことで配列解析に応用することができます。合成物の配列確認はもとより、HPLCで単離分取したような構造不明な不純物の配列確認などにも応用可能であると考えています。

■まとめ

MALDIは一価のイオンを優先的に生じることから、複雑なマススペクトルを解釈することなく、合成アンチセンス核酸の質量確認が容易に行えます。また、MALDI-ISD測定はMS/MS能力のないリニア型TOF MSでも実施可能なので、卓上型のようなシンプルな構造のMALDI-TOF MSでも活用できます。化学修飾を多く含む核酸医薬品の場合においても、通常のオリゴ核酸同様、MALDI-ISDにおいて単純開裂に基づくシンプルな一連のフラグメントイオンが生じるので、内部配列の解析に有効でした。

■謝辞

本アプリケーションニュースは AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：小比賀聡）による支援の成果によるものです。

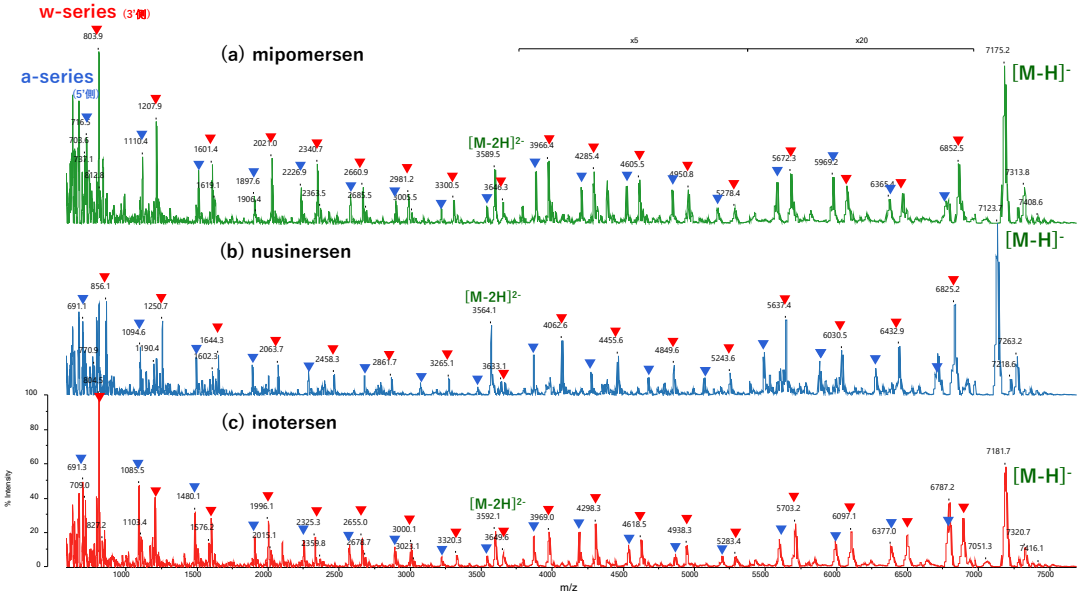

図 4　HPAマトリックスを用いて取得したモデル核酸医薬品の負イオンMALDI-ISDマススペクトル
(a) mipomersen, (b) nusinersen, and (c) inotersen

LabSolutions Insightは、株式会社島津製作所またはその関係会社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
https://www.an.shimadzu.co.jp/
初版発行：2022年 12月
01-00480A-JP　A改定発行：2025年 3月
島津コールセンター　0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証等を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、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。

© Shimadzu Corporation, 2022

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

MALDI-8030
マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計

関連分野

- 医薬・バイオ医薬品
- 核酸・mRNA医薬品
- 核酸医薬品
- 分子量測定・配列確認

- 価格お問い合わせ
- 製品お問い合わせ
- 技術お問い合わせ
- その他お問い合わせ