

# 小型MALDIデジタルイオントラップ型質量分析計MALDImini™-1を用いたオリゴ核酸分析

福山 裕子、西風 隆司

## ユーザーベネフィット

- ◆ 核酸医薬品など合成核酸の分子量分析と修飾部位を含む配列解析が行えます。
- ◆ MS<sup>n</sup>により、確実な末端配列解析が可能です。
- ◆ 小型の卓上型装置のため、場所を取りません。

## はじめに

近年、核酸医薬品の実用化が急速に進み、核酸および核酸医薬品の分析技術のニーズが増えています。核酸医薬品分析への質量分析法 (MS) の適用は既に始まっており、高精度で迅速な分析技術が求められています。

承認されている核酸医薬品は、2023年4月時点で17種あり、そのほとんどが数十塩基長 (分子量 6000~15000 Da程度) の一本鎖あるいは二本鎖の合成オリゴヌクレオチドです。このオリゴヌクレオチドは、目的に応じて様々な化学修飾を含みます。

Matrix-assisted laser desorption/ionization-digital ion trap-mass spectrometer (MALDI-DIT-MS), "MALDImini-1" (図1) は、小型の卓上型装置で、正イオンモードによる  $m/z$  70,000までのMS分析と、 $m/z$  5,000以下のMS<sup>n</sup>分析が可能です。

本稿では、核酸医薬品であるミポメルセンと同じ配列をもつ合成オリゴ核酸を用いてMALDImini-1を用いた分子量分析および配列解析を行った例をご紹介します。

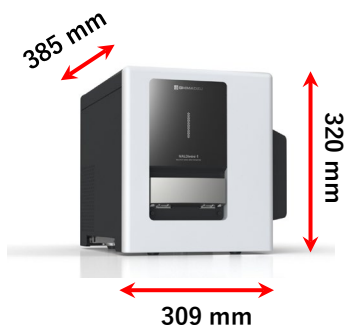


図1. MALDImini™-1 (MALDI-DIT-MS)

## 合成オリゴ核酸サンプル

核酸医薬品のモデルとして用いた合成オリゴ核酸の配列情報を表1に示します。この配列はミポメルセンと同じです。

表1. 本アプリケーションニュースで用いた合成核酸の配列情報\*1

MW	Sequence (20 bases)
7177	5'-MG-MC-MC-MU-MC-dA-dG-dT-dC-dT-dG-dC-dT-dT-dC-MG-MC-MA-MC-MC-3'

\*1 M: 2'-O-(2-methoxyethyl) nucleoside; d: 2'-deoxynucleoside; cytosineとuracilの5位はメチル基で置換されています。全てのヌクレオチド間のホスホジエステル結合は、ホスホロチオエート結合で置換されています。

## 試料調製と測定条件

試料溶液として、合成オリゴ核酸の20 pmol/ $\mu$ Lの水溶液を作製しました。マトリックス溶液として、3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) と2,4-dihydroxyacetophenone (2,4-DHAP) を、それぞれ70 mM クエン酸水素二アンモニウムを含むアセトニトリル/水 (50/50, v/v) に溶解し、40 mg/mLの各溶液を作製しました。これらの3-HPA溶液と2,4-DHAP溶液を1:1 (v/v)で混合した混合マトリックス3-HPA/2,4-DHAP溶液を作製しました。このマトリックスは、従来法に対し、同装置において感度とマススペクトルの質を向上させます (特許出願中)。試料溶液とマトリックス溶液を1:1 (v/v)で混合後、1 $\mu$ L、サンプルプレート上に滴下し、乾燥後、測定を行いました。

測定は、MALDImini-1によるラスター走査で行いました。表2に、今回用いた分子量分析および配列解析用の設定条件を示します。このうち配列解析用の設定条件を用いると、MALDI-DIT-MS特有の分解による、オリゴ核酸試料由来のフラグメントイオンを多数検出できます (詳細後述)。

表2. MALDImini-1の分子量分析および配列解析用の設定条件\*2

目的	LP	DV-1 (V)	DV-2 (V)	RF delay ( $\mu$ s)
分子量分析	60-65	1300	7000	25
配列解析	65-75	1600	8000	15-17

\*2 LP: laser power; DV-1: detector voltage; DV-2: dynode voltage. Scan Range  $m/z$  650-5000 と  $m/z$  2000-18000 で同条件を使用できます。表中の値はあくまで一例で、装置使用状況によって値が異なります。配列解析用のDV-1の値は、分子量分析用の値より300V程高めを目安に設定してください。

## 合成核酸の分子量分析

図2に、MALDImini-1により、表2の分子量分析用の設定条件を用い、3-HPA/2,4-DHAP混合マトリックスを用いて得られた合成オリゴ核酸のマススペクトルを示します。結果、[M+H]<sup>+</sup>が感度高く検出されました。

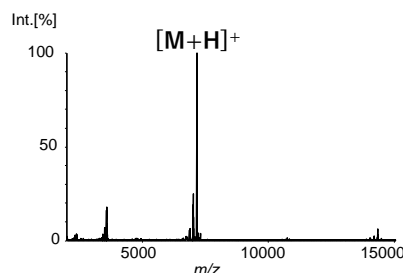


図2. 合成オリゴ核酸のマススペクトル

## ■ 合成核酸の配列解析

図3に核酸のフラグメントイオンの定義を示します<sup>1)</sup>。図4に、表2の配列解析用の条件に設定されたMALDImini-1を用い、得られた合成オリゴ核酸のマススペクトルを示します。この条件では、*a/w*-イオンを中心としたフラグメントイオンを多数検出しました。*a/w*-イオンはラダー状に得られるため、配列解析を容易に行うことができます。結果、修飾部位を含む全塩基配列を確認できました。

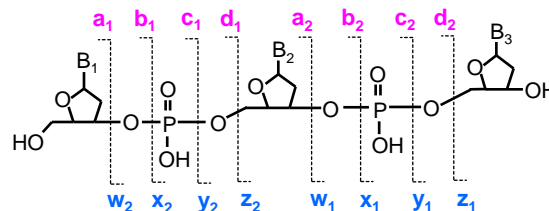


図3. 核酸のフラグメントイオンの定義<sup>1)</sup>

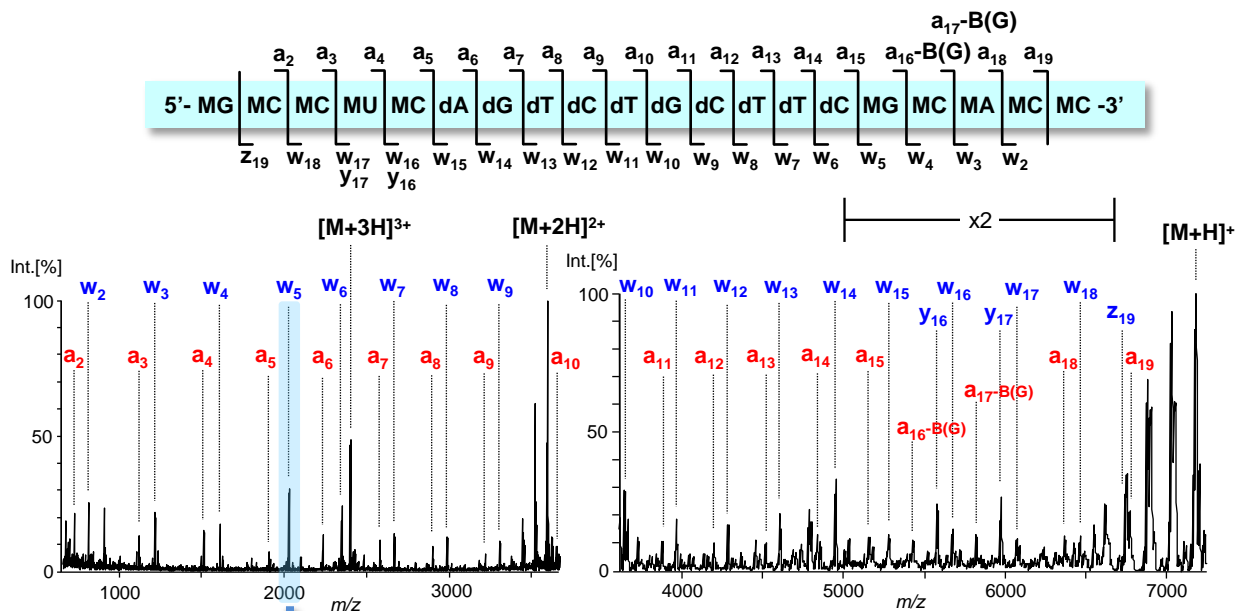


図4. 配列解析用の設定条件による合成オリゴ核酸のマススペクトル

図4の[M+H]<sup>+</sup>付近には複数のフラグメントイオンが重複し、核酸の末端部分の配列解析に用いるフラグメントイオンの帰属が難しいことがあります。図5は、図4に示したフラグメントイオンのひとつw<sub>5</sub>-イオンをブリーカーサイオンとして得られたMS<sup>2</sup>スペクトル（疑似MS<sup>3</sup>スペクトル）を示します。MS<sup>2</sup>スペクトルでは、末端配列情報を含むフラグメントイオンを簡単に帰属することができました。図4のマススペクトルと図5のMS<sup>2</sup>スペクトルを組み合わせることで、より精度の高い配列解析を行うことができました。

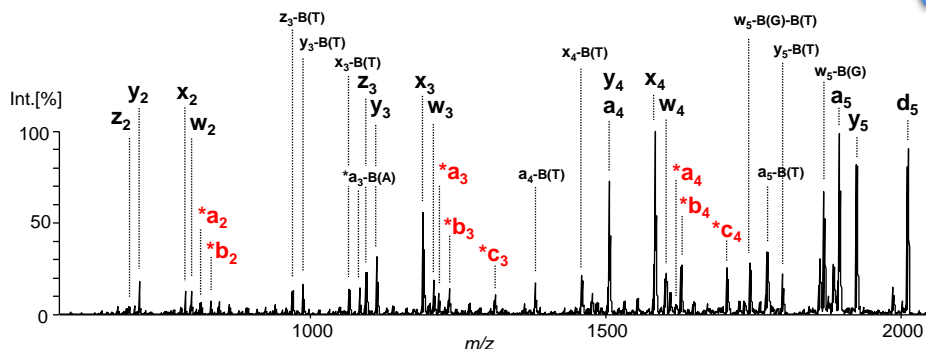
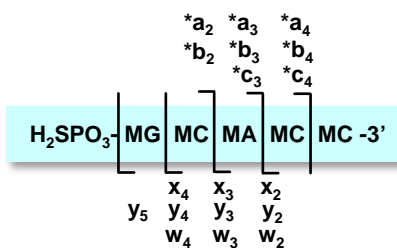


図5. 図4のw<sub>5</sub>-イオンのMS<sup>2</sup>スペクトル

## ■ まとめ

MALDI-DIT-MSを用い、設定条件を調整することにより、合成核酸の分子量情報と修飾部位含む全塩基配列情報が、容易にかつ迅速に得られることを確認しました。

小型の卓上型装置という利点も活かしながら、研究現場

の簡易分析用装置として、核酸分析分野への応用が期待されます。

<参考文献>

1) McLuckey SA, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 1992, 3, 60-70.

MALDImini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/>

01-00594-JP 初版発行：2023年 8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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」、「®」を明記していません。