

Application News

液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-9050

四重極飛行時間型質量分析計による 5'キャップ構造付加mRNAの分析

中園 純菜

ユーザーベネフィット

- ◆ 四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9050と解析ソフトウェアLabSolutions Insight™ Biologicsを用いて5'キャップ構造付加mRNAの特性解析が可能です。
- ◆ LabSolutions Insight Biologicsでは核酸およびその不純物のフラグメントカバレッジをわかりやすく確認できます。
- ◆ LabSolutions Insight Biologicsではユーザーが任意に設定した修飾や不純物の探索が可能です。

■はじめに

近年、新しい創薬モダリティとして新型コロナウイルスワクチンでその有効性が示されたmRNAが注目されており、今後もワクチンや医薬品への適用が広がることが期待されています。現在承認されているmRNAワクチンは*in vitro*転写により合成され、5'末端にCap1構造 (m7GpppRm-) が付加されています。この修飾は細胞内でのmRNA認識や翻訳効率の増加、安定性などに寄与するため、5'キャップ構造の解析はmRNAの品質管理において重要です。

ここでは四重極飛行時間型質量分析計であるLCMS-9050と核酸解析ソフトウェアLabSolutions Insight Biologicsを用いた5'キャップ構造付加mRNAの分析例を紹介します。

■サンプル

mRNAは高分子であるためLC/MS分析では切断酵素を反応させて生じた断片を分析する手法が一般的です。モデルサンプルとして、プラスミドDNAを鋳型とする*in vitro*転写により得たCap1構造を有する36塩基長のmRNA (以下Cap1体とする) を用いました。また、不純物に相当する5'キャップ修飾未反応体 (pppR-) も測定に供しました。

■分析条件

測定機器はNexera™ XS inertとLCMS-9050を使用し、Data Dependent Acquisition (DDA) モードで測定しました。分析条件を表1に示します。

表1 分析条件

UHPLC (Nexera XS inert)	
Column	: Shim-pack Scepter™ Claris C18-120*1 (150 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Mobile Phase A	: 95 mM HFIP, 5 mM DIPEA - water
Mobile Phase B	: 70 mM HFIP, 5 mM DIPEA, 65% acetonitrile - water
Gradient Program	: B Conc. 5% (0-2 min) - 25% (22 min) - 90% (23-24 min) - 5% (24.1 -30 min)
Flowrate	: 0.3 mL/min
Column Temp.	: 60 °C
Injection Volume	: 5 μL
MS (LCMS-9050)	
Ionization	: ESI negative
Mode	: MS <i>m/z</i> 550-2500, MS/MS(DDA) <i>m/z</i> 100-2500
Nebulizing Gas Flow	: 3.0 L/min
Drying gas Flow	: 10.0 L/min
Heating gas Flow	: 10.0 L/min
Interface Temp.	: 250 °C
DL Temp.	: 250 °C
Block Heater Temp.	: 400 °C

■解析パラメーター設定

LabSolutions Insight Biologicsは核酸およびその不純物の解析ソフトウェアです。まずパラメーター設定画面であらかじめ登録された核酸塩基やリンカー、リボース、修飾などを選択し配列を作成します。これらの核酸塩基、リンカー、リボースや塩基修飾は自由に追加、編集ができます。配列を入力すると分子式やモノアイソトピック質量、右側には構造式が表示されます (図1)。

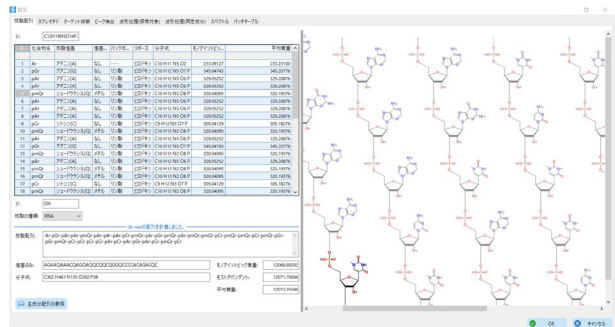


図1 パラメーター設定画面

ターゲット修飾のタブでは、想定される不純物を選択します。鎖長違い、核酸塩基欠損、脱プリン・ピリミジン化、脱アミノ化、保護残基等の不純物や付加イオン、未知修飾体の他、ユーザーが追加した修飾に対する探索設定も可能です。今回は5'キャップ修飾未反応体を不純物として検出するために「5'キャップ未修飾」をターゲット修飾に追加しました (図2赤枠)。

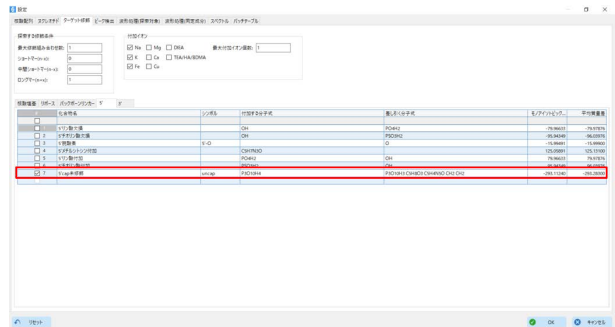


図2 ターゲット修飾の設定

*1: P/N 227-31210-03

■ Cap1体および未反応体の同定

Cap1体、未反応体をそれぞれ0.5 μgずつ混合した試料を測定した際の成分クロマトグラムを図3に示します。マスククロマトグラムはMS1スペクトルを元に、価数違いや同位体スペクトルをすべて合算した成分クロマトグラムとして表示されます。マススペクトルと多価イオン解析スペクトル

を図4に示します。金属付加体の検出も確認されました。また、Cap1体、未反応体ともにシチジン (C) が1つ付加したロングマー（以下N+1体とする）も検出され、存在比率はそれぞれ6.6%、7.9%と算出されました（図5）。これらは*in vitro* 転写により生じた副反応物と推測されます。

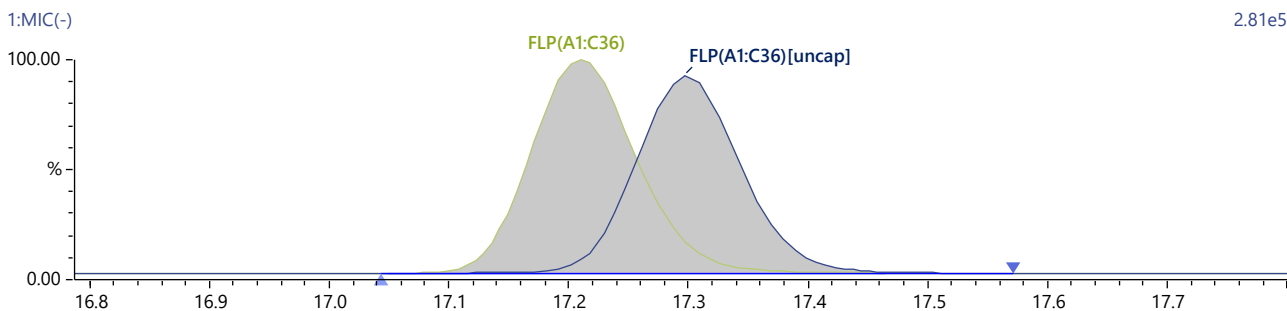


図3 Cap1体および未反応体混合液の成分クロマトグラム
FLP(A1:C36)はCap1体、FLP(A1:C36)[uncap]は未反応体を示す

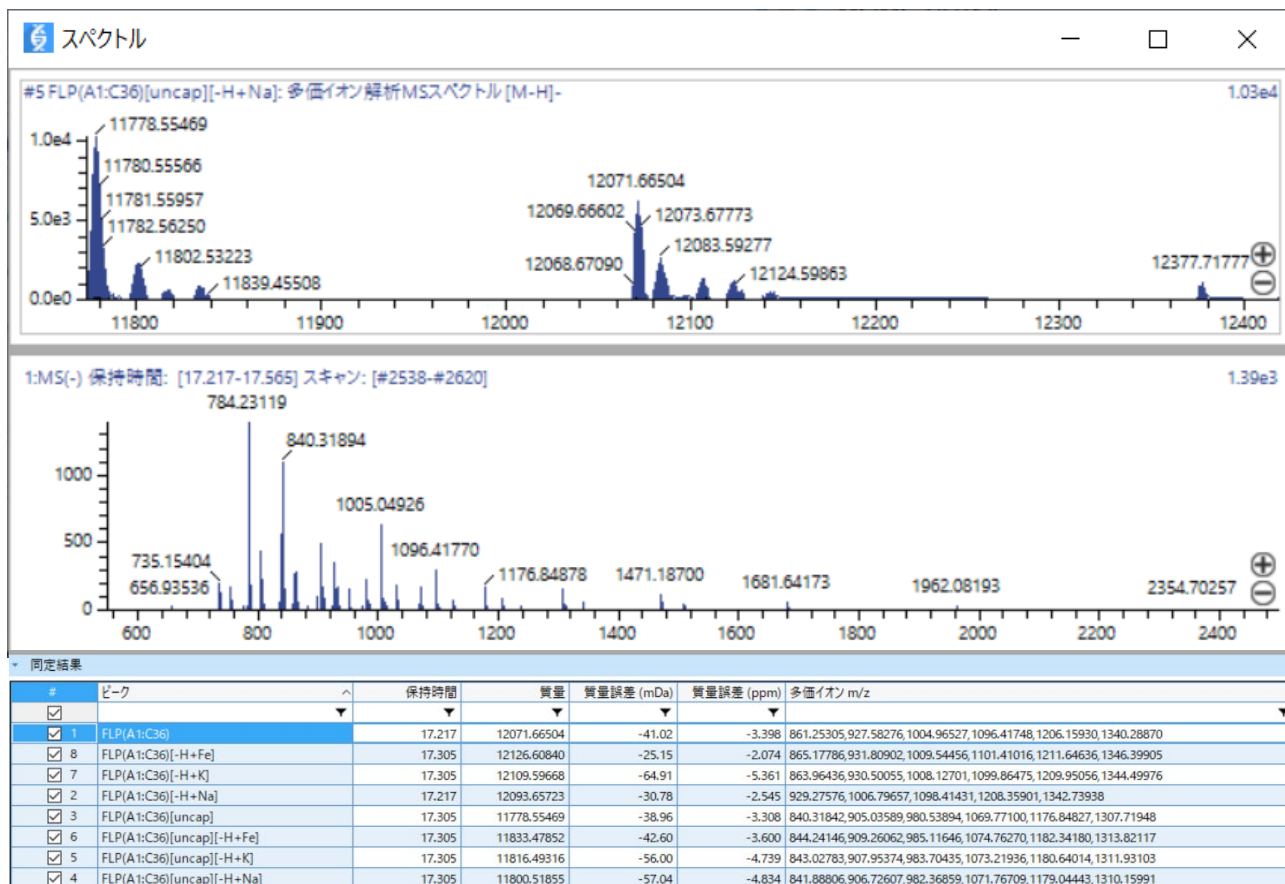


図4 多価イオン解析結果
上段：多価イオン解析マススペクトル、中段：マススペクトル、下段：同定結果

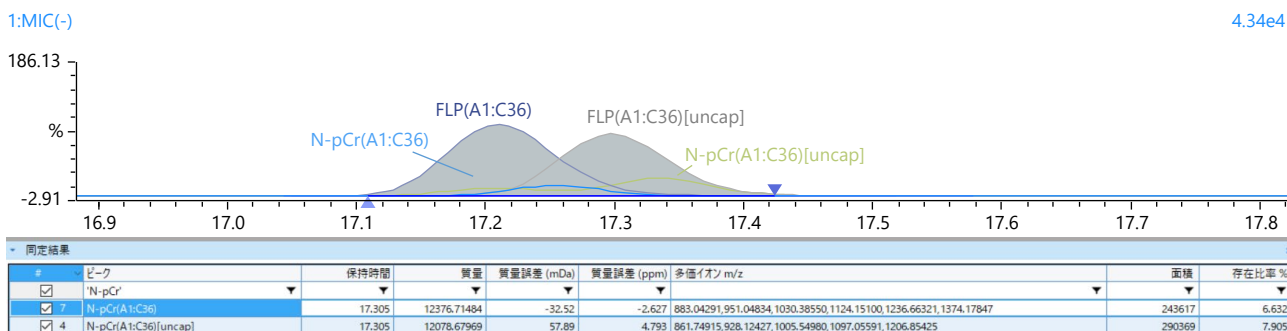


図5 Cap1体および未反応体に対するN+1体の同定結果
N-pCr(A1:C36)、N-pCr(A1:C36)[uncap]はそれぞれCap1体、未反応体のN+1体を示す

■ 配列確認

MS/MSスペクトルのフラグメントイオン情報から未反応体の配列カバレッジを確認した結果を図6に示します。設定したターゲット修飾が同定されると修飾位置に赤色で表示されます。

未反応体のN+1体についても確認すると、3'側C付加部分を含む特徴的なフラグメントイオンの検出が確認できました(図7)。鎖長違いの検出は赤い逆三角マークが上部に表示されます。

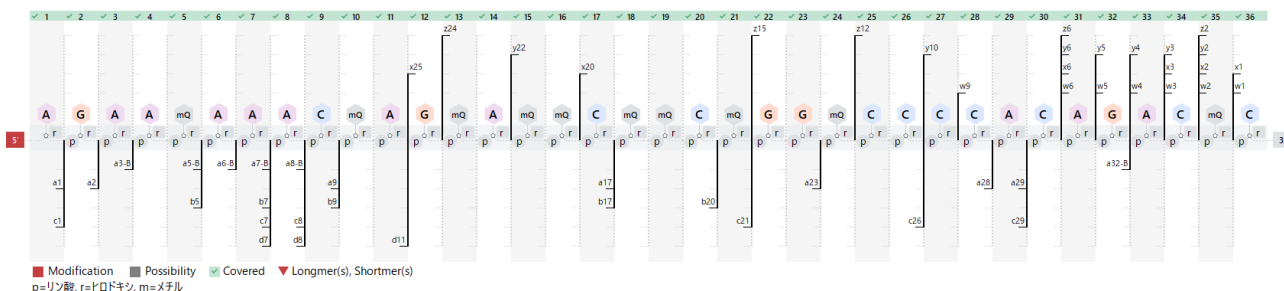


図6 未反応体の配列カバレッジ

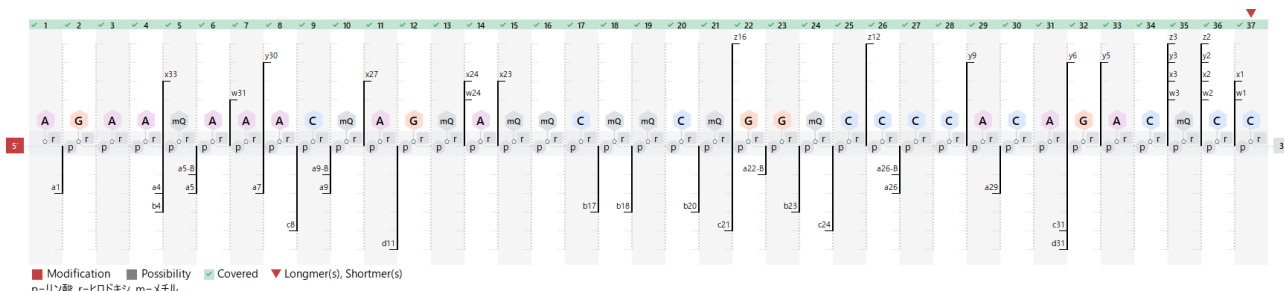


図7 未反応体に対するN+1体の配列カバレッジ

■ 不純物の定量

Cap1体に未反応体を不純物として0, 5および10%(w/w)添加した試料を測定したところ、Insight Biologicsにより算出される面積値について良好な直線性 ($R^2 > 0.99$) が得られました(図8)。

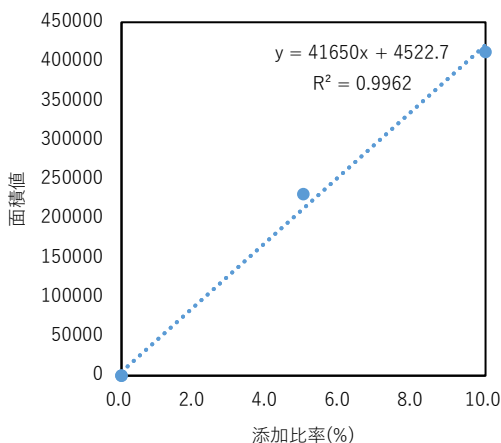


図8 未反応体(不純物)の面積値の直線性

■ まとめ

高分解能質量分析計LCMS-9050とLabSolutions Insight Biologicsソフトウェアを用いて5'キャップ修飾mRNAの分子量確認と配列解析を行いました。Cap1構造の有無(Cap1体と未反応体)に加え、不純物(N+1体)の検出と配列確認も可能でした。Insight Biologicsでは配列カバレッジ画面で修飾や鎖長違いの欠損/付加の位置をわかりやすく確認できます。

また、不純物としてCap1体に0, 5および10%添加した未反応体について得られた面積値は良好な直線性を示しました。

<関連アプリケーション>

1. LabSolutions Insight™ Biologicsを用いたオリゴヌクレオチド不純物解析ワークフロー [Application News No.01-00595A-JP](#)
2. シングル四重極質量分析計を用いた核酸医薬品の簡易的な不純物分析 [Application News No.01-00656-JP](#)

LCMS、LabSolutions Insight、NexeraおよびShim-pack Scepter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。