

# Application News

液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-2050

## シングル四重極質量分析計による5'キャップ構造付加mRNAの簡易分析

中園 純菜

### ユーザーベネフィット

- ◆ シングル四重極質量分析計LCMS-2050と解析ソフトウェアLabSolutions Insight™ Biologicsを用いて核酸の分子量確認が可能です。
- ◆ LCMS-2050はLCと同様の操作感覚で簡便に分析を行うことができます。
- ◆ 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ワクチンでその有効性が示されたmRNAが注目されています。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。

核酸の配列解析にはApplication News No.01-00733で紹介した四重極飛行時間型質量分析計が有用です。MS/MS測定できないシングル四重極質量分析計では配列解析はできませんが、LCと似た操作感覚で取扱いが容易なため、品質管理における分子量確認用途での需要が高まっています。ここではシングル四重極質量分析計LCMS-2050と解析ソフトウェアLabSolutions Insight Biologicsを用いてmRNAの5'キャップ構造の有無を簡易分析した事例を紹介いたします。

### 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-2050を使用しました。分析条件を表1に示します。LCMS-2050は、ESI法とAPCI法、両方の長を有するイオン化である加熱型DUIS™を標準搭載しています。

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-2050)	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS) negative
Interface voltage:	: -2.0 kV
Mode	: MS <i>m/z</i> 550-2000
Nebulizing Gas Flow	: 2.0 L/min
Drying gas Flow	: 5.0 L/min
Heating gas Flow	: 7.0 L/min
Desolvation Temp.	: 250 °C
DL Temp.	: 200 °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)。

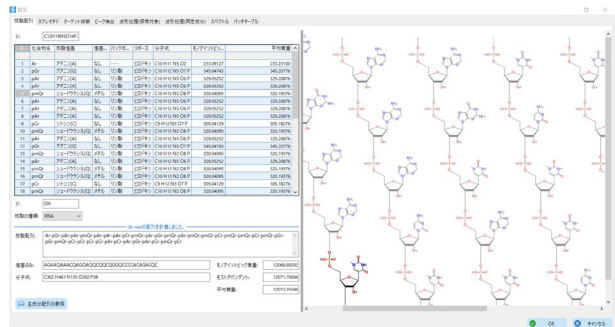


図1 パラメーター設定画面

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)。

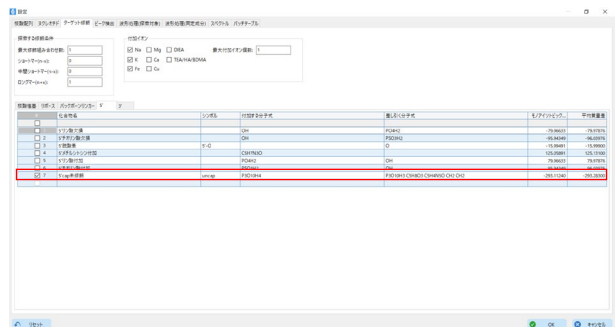


図2 ターゲット修飾の設定

## ■ Cap1体および未反応体の同定

Cap1体 (0.5 μg) に未反応体を10%(w/w)添加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。成分クロマトグラムは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クロマトグラムとして表示

されます。Cap1体の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。Cap1体、未反応体ともに理論分子量と比較して1 Da以内の質量誤差で同定可能でした。

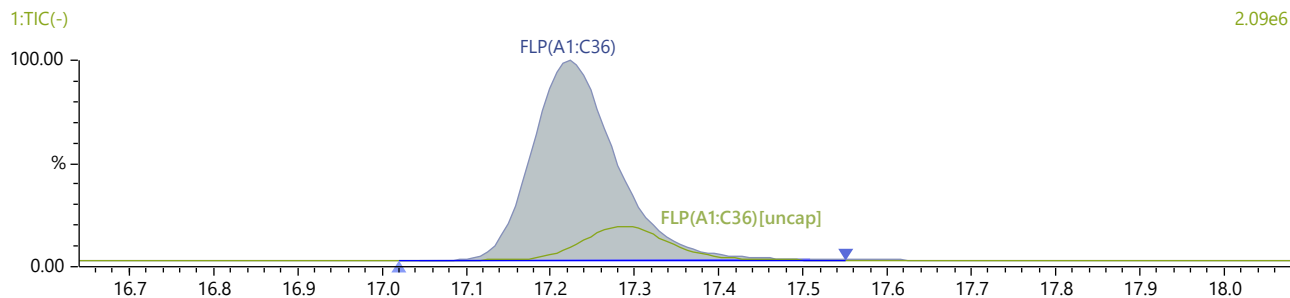


図3 Cap1体および未反応体混合液の成分クロマトグラム

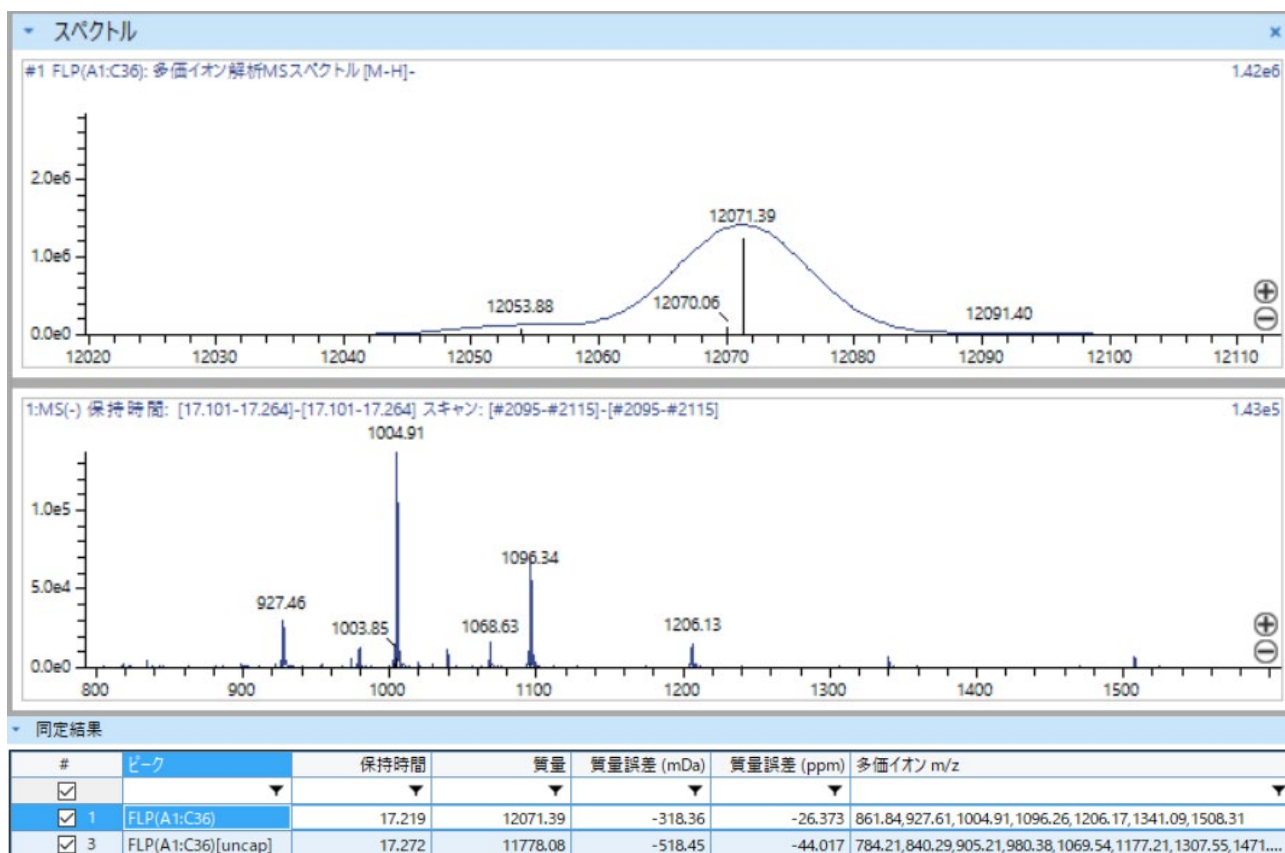


図4 多価イオン解析結果  
上段：多価イオン解析マススペクトル、中段：マススペクトル、下段：同定結果

## ■ まとめ

シングル四重極質量分析計LCMS-2050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と未反応体の分子量確認を行ったところ、どちらも理論分子量と比較して1 Da以内の質量誤差で同定できました。LCMS-2050を用いることにより、LCと同様の操作感覚で5'キャップ構造有無の簡易分析が可能です。

### <関連アプリケーション>

1. 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 [Application News No.01-00733-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、DUIS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。