

●LC/MS による mRNA ポリ A 鎖長の分析

TN530

Measurement of mRNA Poly(A) Tail Length by LC/MS

[概要]

メッセンジャーRNA (mRNA) 医薬品は通常数百から数千塩基長の一本鎖 RNA であり、mRNA を通して発現する目的タンパク質により治療を行う医薬品です。その品質管理においては、塩基配列やキャップ効率、ポリ A 鎖長など特有の評価項目があります。一般的に、mRNA 医薬品の 3'末端にはポリ A 鎖（アデニル酸の繰り返し配列）が付加されています。ポリ A 鎖はヌクレアーゼによる切断から mRNA を保護することで安定化させるとともに、翻訳効率を高めることが知られており、医薬品の有効性・安全性に影響すると考えられます。そのため、ポリ A 鎖長を正確に評価することは重要です。本稿では mRNA モデル試料のポリ A 鎖長を、LC/MS を用いて評価した事例をご紹介します。

Keywords: 特性解析、受託分析、mRNA ワクチン、リボヌクレアーゼ

[事例]

mRNA のモデル試料を酵素で消化、精製した後、LC/MS 測定を実施しました。アルキルアミンおよび HFIP を移動相に用いた逆相イオンペアクロマトグラフィーにより、ポリ A 鎖由来のピークが検出されました。HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に示します。

<分析条件>

- ・モデル試料：Beta galactosidase mRNA (5-methoxyuridine)
- ・酵素：RNase T1
- ・液体クロマトグラフ：1290 Infinity II Bio 2D UHPLC System (Agilent Technologies, Inc.)
- ・質量分析計：Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- ・カラム：ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C18, 130Å, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm (Waters Corporation)
- ・移動相 A：N,N-ジイソプロピルエチルアミン/1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)/水
- ・移動相 B：N,N-ジイソプロピルエチルアミン/HFIP/アセトニトリル/水
- ・測定波長：260 nm (UV)

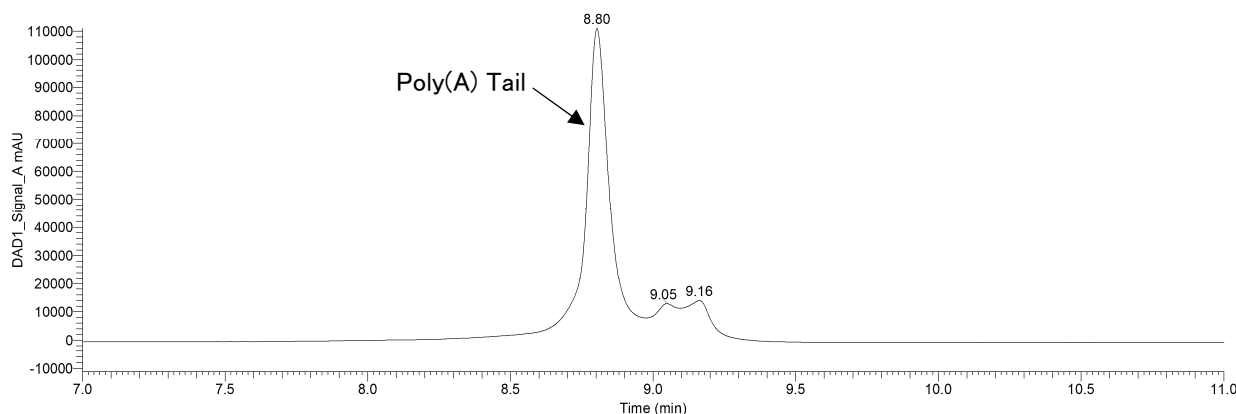


Fig. 1 HPLC Chromatogram of mRNA sample

次に、質量分析計にて当該ポリ A 鎖由来ピークを、BioPharma Finder (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてデコンボリューション解析を行い、ポリ A 鎖の分子量を算出しました。デコンボリューション解析後のマススペクトルを Fig. 2 に示します。横軸は分子量、縦軸は相対イオン強度(%)を表しています。複数のイオンが約 329 Da 毎に検出されており、アデニル酸が繰り返し付加した配列を有していることが示唆されました。また、算出された分子量から、123 塩基長を主として 117 から 131 塩基長のポリ A 鎖が存在することが確認でき、理論上の分子量と実測値の差が 1.0 Da 以下の精度で、ポリ A 鎖を同定することができました (Table. 1)。

このように当社では、消化精製した mRNA を高分解能 LC/MS で測定・解析する手法を用いて、ポリ A 鎖長を評価可能です。ポリ A 鎖長の他にも、複数の要素技術を組み合わせて mRNA を総合的に評価し、お客様の課題解決を支援します。

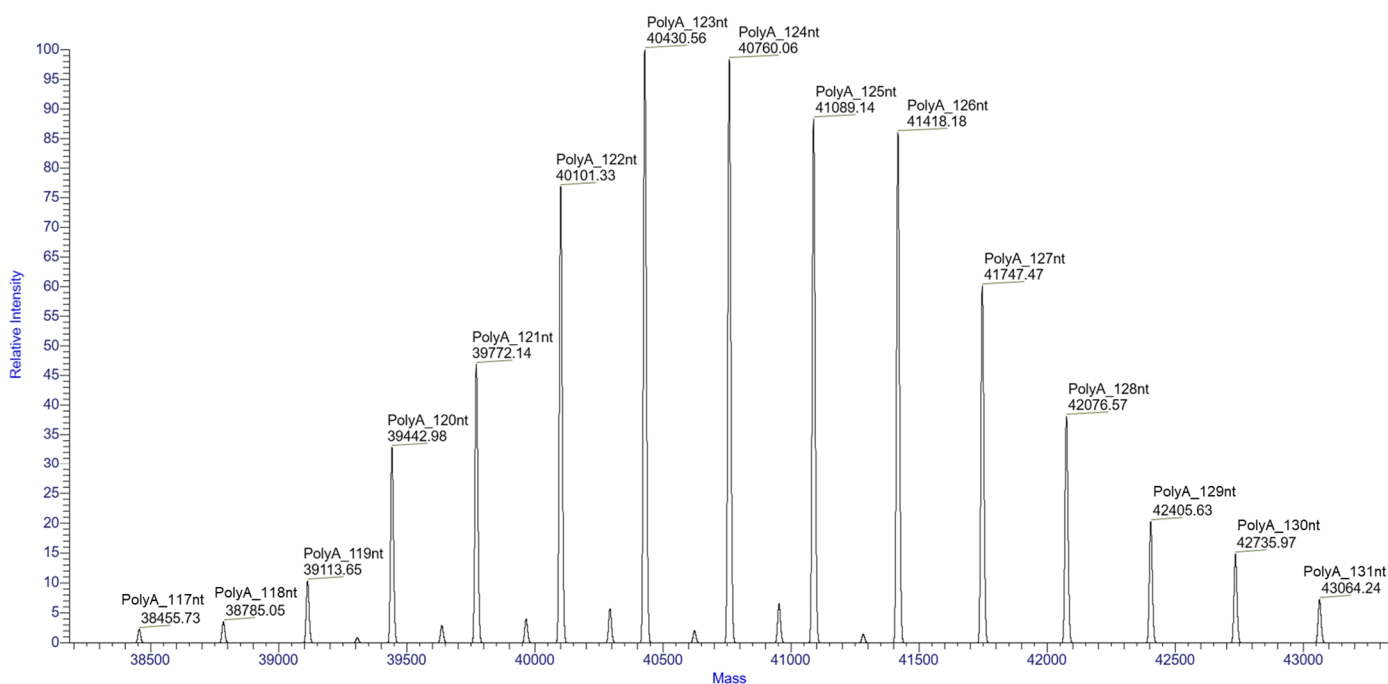


Fig. 2 Deconvoluted Mass Spectrum of Poly(A) Tail

Table 1 Evaluation of Poly(A) Tail Length

Poly(A) Tail Length (nt)	Observed Mass (Da)	Theoretical Mass (Da)	Mass Difference (Da)	Relative Intensity (%)
117	38455.73	38455.25	0.5	2.3
118	38785.05	38784.45	0.6	3.6
119	39113.65	39113.66	0.0	10.4
120	39442.98	39442.87	0.1	32.9
121	39772.14	39772.07	0.1	47.0
122	40101.33	40101.28	0.1	76.9
123	40430.56	40430.49	0.1	100.0
124	40760.06	40759.69	0.4	98.4
125	41089.14	41088.90	0.2	88.3
126	41418.18	41418.11	0.1	86.1
127	41747.47	41747.31	0.2	60.2
128	42076.57	42076.52	0.1	38.1
129	42405.63	42405.73	-0.1	20.3
130	42735.97	42734.94	1.0	14.8
131	43064.24	43064.14	0.1	7.3