

●LC/MS を用いたダイレクト配列マッピング法による mRNA の塩基配列確認

TN535

Sequence Confirmation of mRNA by Direct Sequence Mapping Using LC/MS

[概 要]

メッセンジャーRNA (mRNA) 医薬品の塩基配列は生体内での翻訳効率や安定性に影響を与えるため、その配列解析は重要な品質評価項目のひとつとなっています。当社は、核酸やペプチド、タンパク質などの吸着を抑制するバイオイナート型 HPLC と高分解能質量分析計を用いて mRNA の特性解析を行い、より正確で精度の高いデータを提供いたします。

本稿では、mRNA モデル試料をヌクレアーゼ消化した後、LC/MS を用いたダイレクト配列マッピング法による塩基配列確認を行った事例をご紹介します。なお、本分析サービスは、信頼性基準および GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠して実施可能です。

Keywords: 受託分析、mRNA ワクチン、mRNA mapping、mRNA base sequence、RNase

[背 景]

mRNA 医薬品は、標的タンパク質の情報をコードした通常数百から数千塩基長の一本鎖 RNA を有効成分とし、人に投与し、細胞質に標的タンパク質を産生させることで疾患の治療や予防に使用する医薬品です。mRNA 原薬は翻訳領域のみならず、5'キャップ、3'ポリ A、その他の非翻訳領域を含めて mRNA としての完全な構造を保持することが目的タンパク質の発現に必要です。このため、全長 mRNA の塩基配列やその有効成分の含有量、そして不純物の特定と量の管理が求められています。特に、サンガーシーケンサーや次世代シーケンサーなどの核酸配列分析技術は、mRNA の塩基配列の重要な解析手法となっています。しかしながら、これらの方法は逆転写酵素を用いて mRNA を DNA に変換し、DNA を増幅して塩基配列を決定するため、mRNA の修飾部分や不純物に関する情報が失われ、評価できないという欠点があります。一方、質量分析と連結した液体クロマトグラフィー (LC/MS) に基づく配列分析は、mRNA を酵素消化することによって得られた断片を直接検出できるため、逆転写による RNA 配列で確認できなかったヌクレオチド不純物の評価や修飾位置の特定など、重要な構造特性の識別ができます。

[事 例]

mRNA のモデル試料 (CleanCap® Flu mRNA (5moU)、1922 nt) を種々のヌクレアーゼで消化した後、アルキルアミンおよびヘキサフルオロ-2-プロパノール (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 LC/MS 測定を行い、断片を解析しました。HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に示します。

LC/MS の解析結果より mRNA の配列をマッピングし、mRNA 配列内の複数の位置に当てはまる短い断片を使用せずに、ユニークな配列のマッチングのみに基づいて配列カバー率を算出しました。その結果を比較すると、ヌクレアーゼ A を用いて mRNA を消化した場合、複数の配列位置にあてはまる短いオリゴボヌクレオチド断片が多く生成し、ユニークな配列断片を用いて配列を解析した場合は、ポリ A 鎖を含まない塩基配列カバー率が 34% と低い結果でした。一方、ヌクレアーゼ B を用いて mRNA を消化したところ、解析に適切な長さのオリゴボヌクレオチド断片が多く生成され、ポリ A 鎖を含まない塩基配列はカバー率 95% で確認できました。ヌクレアーゼ A および B による 5'末端から 1000 塩基までのカバレッジマップを Fig. 2 に示します。

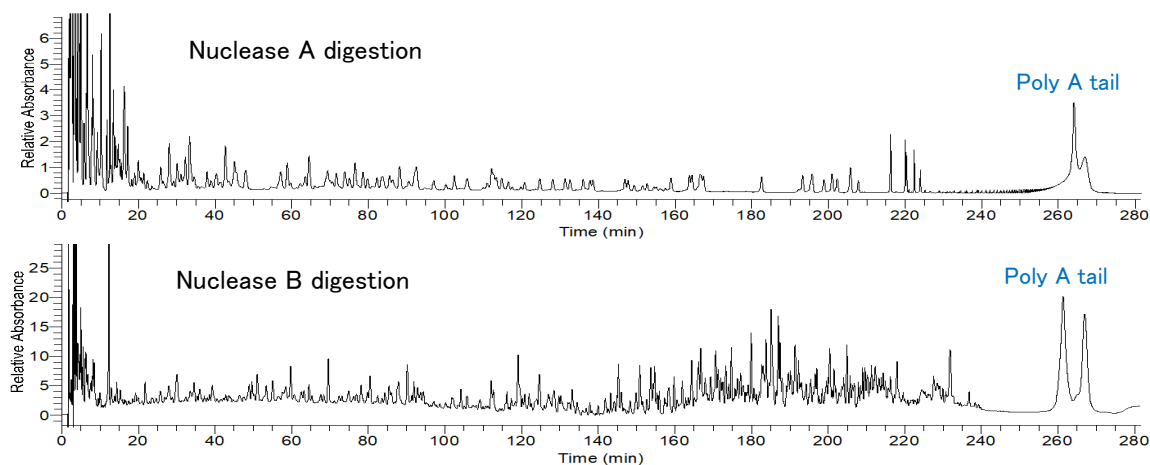


Fig. 1 HPLC chromatogram of mRNA nuclease digests (UV 260 nm)

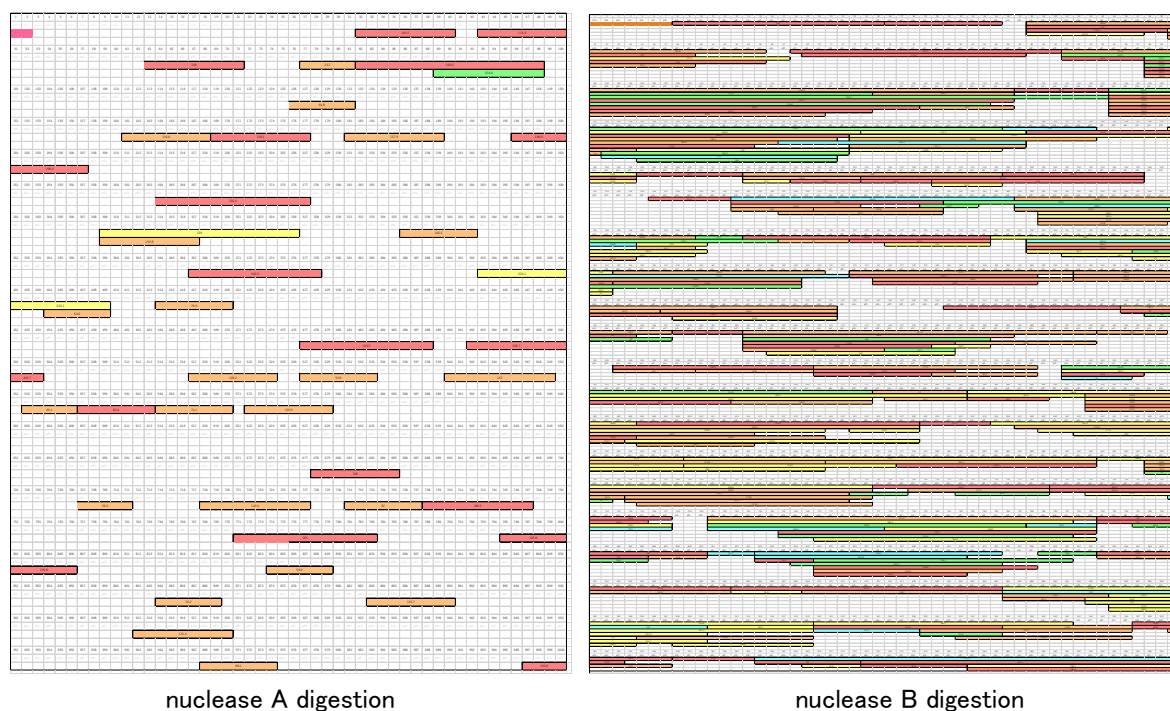


Fig. 2 mRNA oligonucleotide sequence coverage map from 1 to 1000 bases from the 5' end
(unique sequence fragments were indicated with color bars)

[まとめ]

以上のように、適切な消化酵素を選択し、LC/MS 分析条件を最適化したダイレクト配列マッピング法を用いることで、単一の酵素処理でも高いカバー率で mRNA を確認することができました。本研究実績により、適切な酵素を組み合わせることで、あらゆる mRNA の全塩基配列を確認することが可能です。LC/MS を用いると mRNA の配列解析だけでなく、不純物分析やポリ A 鎖長や 5'末端の構造解析およびキャップ化率の評価等の特性解析も実施できます。当社では、複数の要素技術を組み合わせて mRNA を総合的に評価し、お客様の医薬品開発における様々な課題を解決、支援します。

[関連技術]

LC/MS による mRNA ポリ A 鎖長の分析 (TN530)

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn530.pdf>

LC/UV/MS を用いた mRNA 5' 末端の構造解析およびキャップ化率の評価 (TN533)

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn533.pdf>