

●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

Structure Analysis of mRNA 5' Terminal and Evaluation of Capping Efficiency by LC/UV/MS

[概要]

mRNA の 5' キャップ構造は翻訳効率や安定性に影響する重要な品質特性であり、適切な特性解析が必要です。当社では mRNA の特性解析を実施しており、中・高分子の装置への吸着が抑制されるバイオイナート型 HPLC と高分解能質量分析計を組み合わせることにより信頼性の高いデータを提供いたします。

本稿では、mRNA モデル試料について LC/MS を用いて 5' キャップ構造の解析を行った後、LC/UV によりキャップ化率を評価し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) 規制下でも実施可能です。

Keywords: 受託分析、mRNA ワクチン、キャップ効率、RNase

[背景]

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、患者に投与後、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。mRNA はタンパク質に翻訳されるコーディング領域と、これを挟む形で非翻訳領域を有し、5' 末端には 7-メチルグアニル酸 (m7G) の化学構造 (Fig. 1) が結合しています。これを 5' キャップ構造と呼びます。5' キャップ構造は mRNA の翻訳効率を促進する役割を果たし、また、mRNA を患者体内のエクソヌクレアーゼによる分解から保護することで mRNA の安定性の向上にも寄与します。

[事例]

①高分解能 LC/MS を用いた構造解析

mRNA のモデル試料 (Beta galactosidase mRNA) とビオチン修飾された相補的オリゴヌクレオチドプローブを混合し二本鎖を形成させた後、リボヌクレアーゼを添加して mRNA の 5' 末端の塩基から 25 番目と 26 番目の塩基の間を特異的に切断しました。その後プローブにストレプトアビジン結合磁気ビーズを結合させ、プローブと二本鎖を形成している断片を精製しました。

精製後の試料を高分解能 LC/MS を用いて測定したところ、キャップ化された断片 (No. 1, Cap-1) およびキャップ化されていない断片 (No. 3, non-capped) の他、複数の類縁体を検出しました。これら類縁体を詳細に解析した結果、キャップ化された断片としては G ヌクレオチド付加体 (No. 2, Cap-1 + G)、キャップ化されていない断片としてメチル付加体 (No. 4, non-capped + CH₂)、G ヌクレオチド付加体 (No. 5, non-capped + G) および A ヌクレオチド欠失体 (No. 6, non-capped - A) が認められました。No. 1 および No. 3 の構造を Fig. 1 に、LC/MS の解析結果を Table 1 に示します。

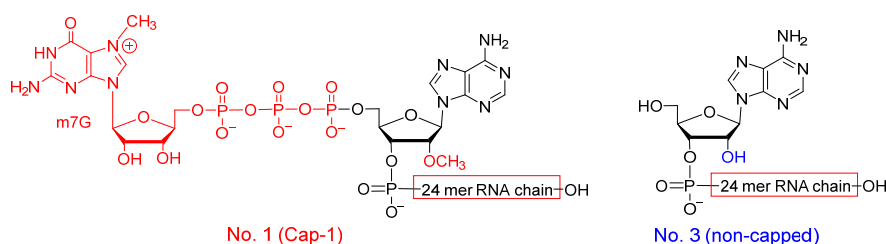


Fig. 1 Structure of capped (No. 1, Cap-1) and uncapped (No. 3, non-capped) fragments of mRNA 5' terminal

②LC/UV を用いたキャップ化率の評価

LC/MS 測定と同時に取得した UV (260 nm) のピーク面積をもとに各成分の面積%を算出し、全ての成分のうちキャップ化された断片の含量をキャップ化率としました。その結果、キャップ化率は 87.3% でした。

クロマトグラムを Fig. 2 に、検出成分の一覧を Table 1 に示します。参考として、LC/MS のイオン強度からもキャップ化断片の含量を算出したところ、その値は 87.1% であり、LC/UV により得られたキャップ化率とほぼ同じでした。UV の強度が小さく定量が困難な場合には MS での評価も可能であることが示唆されました。

[まとめ]

上述のように、高分解能 LC/MS を用いた構造解析によりピークを帰属した後、キャップ化率を LC/UV で評価することができました。

当社では、mRNA のキャップ化率の測定や LC/MS を用いたポリ A 鎖長などの特性解析に加え、mRNA 医薬品の品質評価においても多くの受託実績があります。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。

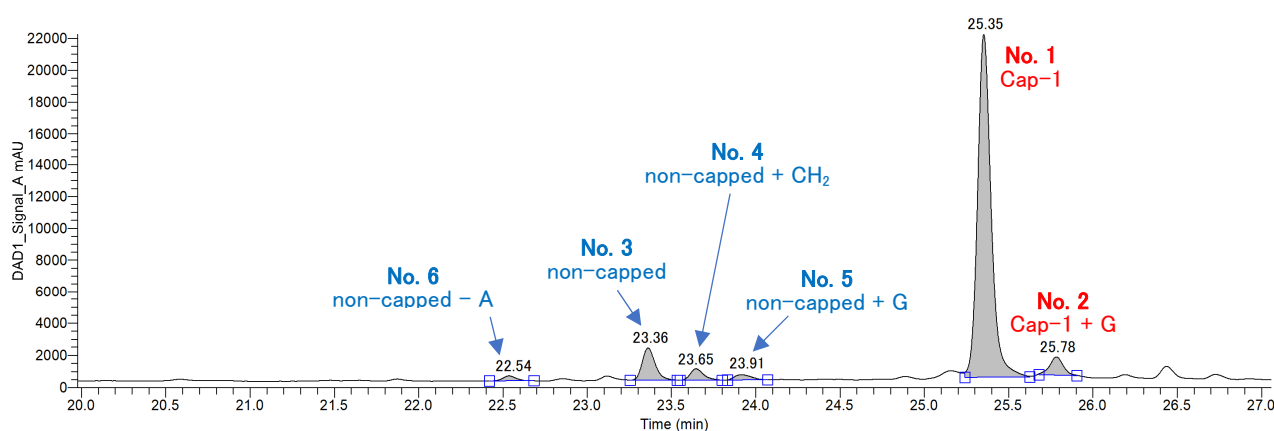


Fig. 2 HPLC chromatogram of digested mRNA sample (UV 260 nm)

Table 1 LC/UV and LC/MS results of 5' terminal fragments

No.	5' Terminal Fragment	LC/UV		LC/MS				
		RT (min)	Area Percentage (%)	Observed Mass (Da)	Theoretical Mass (Da)	Mass Error (ppm)	Sum Ion Intensity	Relative Abundance (%)
Capped Fragments			87.3					87.1
1	Cap-1	25.35	83.0	8779.279	8779.274	0.6	3.54E+08	83.2
2	Cap-1 + G	25.78	4.3	9124.320	9124.321	-0.1	1.67E+07	3.9
Uncapped Fragments			12.7					12.9
3	non-capped	23.36	7.4	8246.259	8246.262	-0.4	3.12E+07	7.3
4	non-capped + CH ₂	23.65	2.7	8260.272	8260.278	-0.7	1.12E+07	2.7
5	non-capped + G	23.91	1.5	8591.305	8591.310	-0.5	4.92E+06	1.2
6	non-capped - A	22.54	1.1	7917.201	7917.210	-1.1	7.30E+06	1.7

[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/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)

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn535.pdf>



お問い合わせ先 : <https://www.scas.co.jp/contact/> (株式会社住化分析センター)
技術事例 : <https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/>