アプリケーションノート
製薬・バイオ医薬品

AQXeNA ソフトウェアを使用した LC/QTOF-MS による合成オリゴ核酸の MS/MS 配列自動マッチング

Authors

林 明生

瀬崎 浩史

澤田 浩和

郡 明雄

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

天然型オリゴヌクレオチド及び化学修飾型オリゴヌクレオチドを骨格とする核酸医薬は、その高い特異性と化学合成できる特徴により、癌や遺伝子疾患、ウィルス感染症に対する次世代の医薬品・ワクチンとして注目されています。核酸医薬品は低分子医薬品と異なり、分子量が数千～数万と大きいため、LC/MS で分析するためには測定マスレンジが広く質量分解能の高い TOF 型の装置が使用されます。オリゴ核酸の配列を確認するには MS/MS スペクトルの解釈によるマッチングが必要となりますが、ペプチドマッピングを行うソフトウェアに比べ、オリゴ核酸の MS/MS マッチングを行うソフトウェアの開発は遅れていました。

本アプリケーションノートでは鎖長の異なるオリゴ核酸の混合物をイオンペア逆相 HPLC で分離、QTOF-MS で検出し、AQXeNA ソフトウェア(三井情報株式会社)を用いて断片イオンの自動アサインを行いました。

Key words: オリゴ核酸、AQXeNA ソフトウェア、LC/QTOF-MS

システム

Agilent 1290 Infinity Ⅱ UHPLCシステム

1290 Infinity Ⅱ ハイスピードポンプ (G7120A)
1290 Infinity Ⅱ マルチサンプラ (G7167B)
1290 Infinity Ⅱ カラムコンパートメント (G7116B)
1290 Infinity Ⅱ ダイオードアレイ検出器 (G7117A)

Agilent 6545 Accurate-Mass QTOF MS (G6545BA)
Agilent MassHunter workstation 10.0

MassHunter BioConfirm B10.0
AQXeNA ver.1.2.3 (三井情報株式会社)

表 1. HPLC のパラメーター

パラメーター	
カラム	InfinityLab Poroshell120, HPH-C18, 2.1*50 mm, 1.9 µm (Parts#. 699675-702)
移動相A	400 mM HFIP / 16 mM TEA
移動相B	200 mM HFIP / 8 mM TEA / 50% メタノール
流速	0.6 mL/min
グラジエント	t(min): 0 5
	%B: 30 60
カラム温度	50 ℃
注入量	10 µL
UV検出波長	260 nm

表 2. MS のパラメーター

パラメーター	
イオン源	Agilent Dual JetStream ESI
極性	Negative
乾燥ガス	300 ℃, 10 L/min
シースガス	350 ℃, 12 L/min
ネブライザーガス圧力	60 psi
キャピラリー電圧	4000 V
ノズル電圧	1000 V
フラグメンター電圧	200 V
m/z測定レンジ	600-3200 (MS), 40-3200 (MS/MS)
スペクトル取込速度	3 spectra/sec
コリジョンエネルギー	45-65 V
プリカーサーイオン	1464.20 (-3, 14 mer), 1777.58 (-3, 17 mer), 2090.94 (-3, 20 mer), 2205.97 (-3, 21 mer)
ADC	4 GHz, Hi-Resolution mode
Quad isolation width	Medium (4 *m/z*)

試料調製と配列情報

Oligonucleotide Resolution Standard (Parts#. 5190-9028)をそれぞれMilli-Qで2 nmol/mlに調製して分析に使用しました。また、配列は表 3 に示す通りです。

表 3. Oligonucleotide Resolution Standard の配列と分子量

鎖長	配列	平均分子量 (Da)
14 mer	rCprAprCprUprGprAprAprUprAprCprCprAprAprUp	4398.0
17 mer	rUprCprAprCprAprCprUprGprAprAprUprAprCprCprAprAprUp	5338.6
20 mer	rUprCprAprUprCprAprCprAprCprUprGprAprAprUprAprCprCprAprAprUp	6278.9
21 mer	rGprUprCprAprUprCprAprCprAprCprUprGprAprAprUprAprCprCprAprAprUp	6624.4

結果

MaxEntropyデコンボリューションによる分子量確認

Oligonucleotide Resolution Standardを分析した結果を図1に示します。トータルイオンクロマトグラム(TIC)とUVクロマトグラムを並べると、14 merから21 merまで良好に分離出来ました。21 merを例にし、得られた多価イオンスペクトルに対してMaxEntropyデコンボリューションを行い、分子量の確認を行ったところ平均分子量と一致する結果が得られました。(図2b. 参照)

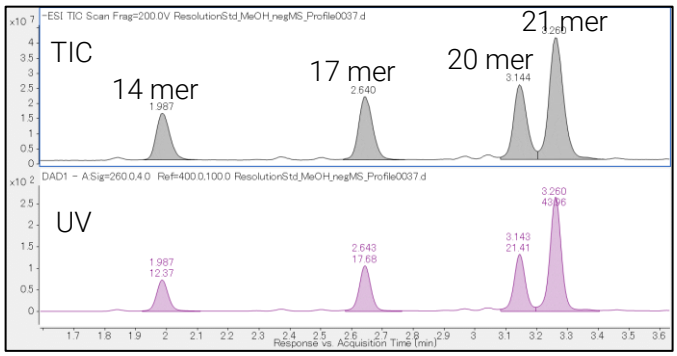


図 1. Oligonucleotide Resolution Standard の TIC 及び UV クロマトグラム

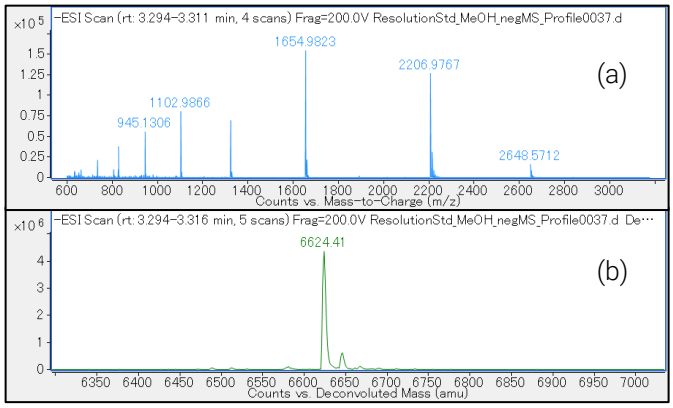


図 2. (a) 21 mer の MS スペクトル, (b) 21 mer のデコンボリューションスペクトル

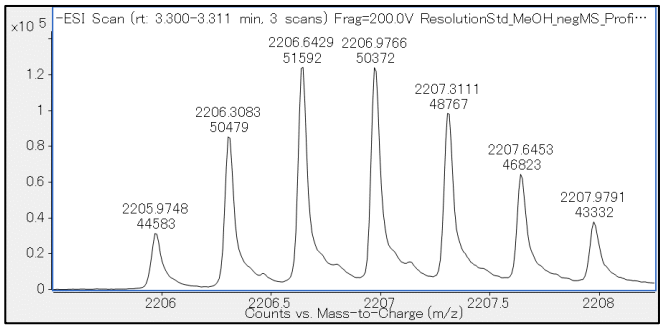


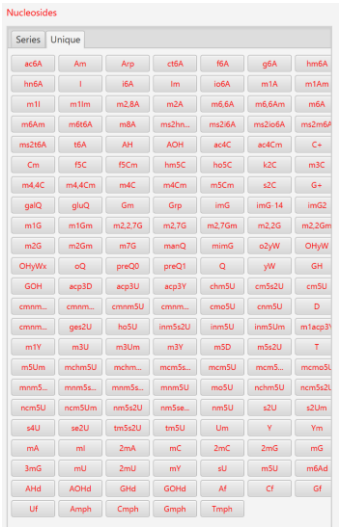
図 3. 21 mer の MS スペクトル, 3 価イオンの拡大

21 merの$[M-3H]^{3-}$イオンのスペクトルを図3に示します。*m/z*の下に分解能を表示しましたが、6545 QTOF MSは約50,000の高い分解能を示す事がわかります。

AQXeNAソフトウェアによるMS/MSマッチング

AQXeNAソフトウェアによるオリゴ核酸のMS/MSスペクトルの自動アサインのワークフローについて説明します。AQXeNAはユーザーが入力した配列と生データである実測のスペクトル(.dファイル)を比較してMS及びMS/MSのレベルでアサインを行います。MSによる分子量のみによる確認とするか、MS/MSによる配列の確認まで行うかはユーザーによって選択が可能です。

核酸医薬は核酸分解酵素によって速やかに分解されるため、耐性を持たせるためにリン酸基の酸素原子をS化(硫黄化)したホスホロチオエート結合による修飾がなされる事もあります。AQXeNAではNucleosidesとLinker, Terminusをそれぞれ独立して登録・編集できるため、(図4参照)様々な修飾オリゴ核酸のMS/MSアサインにも柔軟に対応します。



(a)

(b)

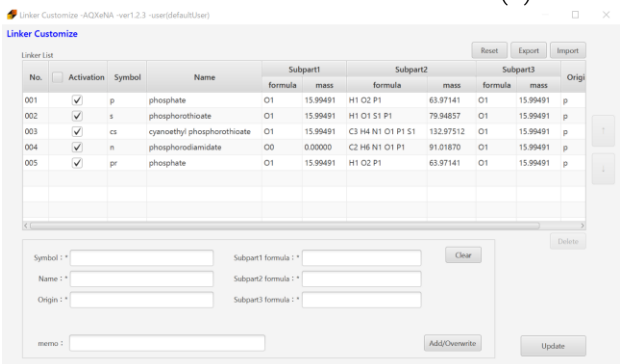


図 4. AQXeNA のヌクレオシド(a)、リンカー(b)の設定

オリゴ核酸のMS/MSフラグメンテーションのイオン命名法はMcLuckey [1]らによって提唱されましたが（図5)、5'側のa, b, c, dイオンと3'側のw, x, y, zイオンに大別され、他にa-Bのフラグメントイオンも存在します。AQXeNAはこれらのイオンに対応し解析が可能です。
本アプリケーションノートで使用したOligonucleotide resolution standardは、3'側の配列が共通した、鎖長の異なる4つのオリゴ核酸であるため、w, x, y, zイオンが共通して観測されるかということと、a, b, c, dイオンが共通しないということが重要な結果となります。

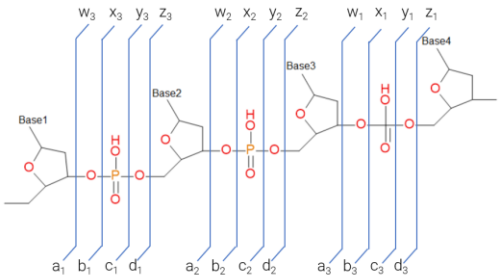


図 5. オリゴ核酸の断片イオンの命名法

AQXeNAによる同定はMSによる同位体イオンの評価に加え、MS/MSによる配列に対する評価を含めるため、精度の高い同定結果を得る事が可能です。ここでは14 merと21 merに対してMS、及びMS/MSのマッチング結果を比較し、配列が確認できるか検証を行いました。

図6. 14 merのMS評価結果

図7. 21 merのMS評価結果

図8. 14 merのMS/MS配列検証結果

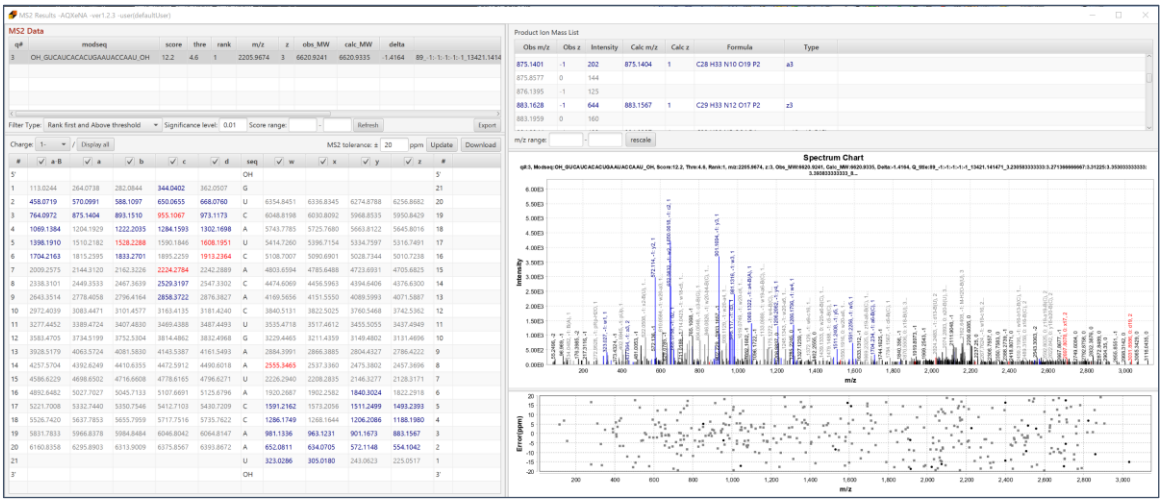


図9. 21 merのMS/MS配列検証結果

14 merと21 merの$[M-3H]^{3-}$をプリカーサーイオンとした、MS/MSスペクトルとAQXeNAによるアサインの結果を図8, 9に示します。w2, w3, w4, x2, x3, y2, y3, y4, z2, z3, z4, z5などの3'側で共通配列となる領域の断片イオンが共通して観測された一方、5'側となるa, b, c, dイオンは配列が異なるために同じ*m/z*のシグナルは観測されませんでした。AQXeNAはオリゴ核酸のMS/MSによる配列の自動アサインを可能にし、分子量確認だけでなく高精度な配列情報も核酸医薬品の品質管理に提供します。

引用文献

1) S. McLuckey et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 1992, **3**, 60-70.

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, July 15, 2021

DE44391.7584259259

LC-MS-202107HA-001

Agilent
Trusted Answers