

低吸着 LC 流路での CRISPR-Cas9 遺伝子編集ツールの HILIC 分析

Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムと
ウルトラライナートカラムハードウェアを使用

著者

Helena Vanluchene,
Jelle De Vos, Kris Morreel,
Pat Sandra, and Koen Sandra
RIC group,
President Kennedypark 6,
8500 Kortrijk, Belgium
Sonja Schneider and
Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.

概要

5 年前に、初の mRNA ベースの医薬品が異例の速さで市場に投入されました。mRNA ベースの医薬品はさまざまな治療分野で重要な役割を果たすため、詳細な特性解析を可能にする高度な分析手法が今すぐに必要です。HILIC は、従来の IP-RPLC メソッドの代わりにオリゴヌクレオチドの分離に使用できる、持続可能な新しい手法です。ただし、オリゴヌクレオチドはアニオン性が高く、特に HILIC 条件下では LC 流路の鉄表面に吸着しやすいため、分析対象物の回収率とピーク形状に悪影響を与えます。本アプリケーションノートでは、従来のステンレス製 HILIC カラムと不活性化したステンレス製 HILIC カラムを使用して sgRNA 分解物と Cas9 mRNA 分解物を分析し、その性能を比較します。

はじめに

2020 年は、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）技術にとって記念すべき年でした。COVID-19 用の mRNA ワクチンが迅速に開発され、世界的に展開されたのです。その成功によってこのプラットフォームの効能、安全性、拡張性が証明され、他の mRNA ベース医薬品の開発促進につながっています。以来 mRNA は、がん免疫療法、タンパク質交換、遺伝子編集など、ワクチン以外のさまざまなアプリケーションで注目度が増えています。¹ 遺伝子編集において、mRNA は重要な役割を果たします。mRNA により、広く使用されている遺伝子編集酵素である CRISPR-関連タンパク質 9（Cas9）を、過渡的に的を絞って送達できるためです。mRNA によりコードされた Cas9 はシングルガイド RNA（sgRNA）と結合しやすいため、1 つの脂質ナノ粒子内で編集が必要なゲノム部位を特定できます。

これに伴い、mRNA の迅速な開発には、重要品質特性（配列、キャッピング効率、ポリ（A）テールの長さ、修飾、配列変異体など）を特性解析するための分析ツールが必要です。これらの特性はすべて、液体クロマトグラフィーと質量分析の組み合わせ（LC/MS）を用いた RNA マッピングという方法で包括的に分析できます。² 例えば、リボヌクレアーゼ（RNase）による RNA の酵素分解の後にオリゴヌクレオチド混合物の LC/MS 分析を実行するなどの方法があります。現在、オリゴヌクレオチド分離の標準的な方法はイオンペアリング-逆相 LC（IP-RPLC）です。ただし、オリゴヌクレオチド分離用の代替方法として、よりクリーンで持続可能性が高く、IP-RPLC に相補的選択性を付与する親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）が注目されつつあります。^{3~5}

HILIC 分離の仕組みは、極性の低い移動相（一般的な成分はアセトニトリル）と水和層を有する極性固定相との間のオリゴヌクレオチドの分離です。オリゴヌクレオチドと固定相の間の吸着（水素結合など）や静電相互作用など、その他の相互作用が全体的なリテンションプロセスに影響します。⁶ オリゴヌクレオチドの分離に関して、HILIC には IP-RPLC と比べて特定の利点がありますが、固有の課題もあります。例えば MS 感度の低下や、LC 流路（チューブ、ニードル、カラムハウジング、フリット）の金属表面へのオリゴヌクレオチドの非特異的吸着などにより、回収率や再現性が低下したり、ピーク形状が悪化したりする可能性があります。オリゴヌクレオチドにはリン酸基があるため負電荷が強く、ステンレス表面に吸着しやすいという特性があります。実際、オリゴヌクレオチドのリン酸基

は、ステンレス表面の正電荷の薄金属酸化被膜に吸着しやすく、固定相によって保持されている浸出金属イオンに付着する可能性があります。この解決策としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）やメドロン酸などの金属キレート剤を移動相に添加して、浸出金属イオンへの吸着を回避できます。同時に、ステンレス表面への吸着を最小化する必要があります。これには移動相にクエン酸またはリン酸を添加するか、オリゴヌクレオチドを繰り返し注入してカラムをコンディショニングする方法があります。ただし移動相添加物は MS レスポンスの低下を招く可能性があるため、お勧めしません。吸着の抑制方法としてカラムの不動態化も考えられますが、ステンレス表面のすべての活性点を完全にカバーできる確実で長期的な解決策ではありません。効果が経時的に低下して、分析対象物が一部の活性点と接触する可能性があるためです。代わりに、LC ハードウェアの製造材料としてステンレス以外、例えばニッケルコバルト MP35N 合金やポリエーテルエーテルケトン（PEEK）などを使用するという方法があります。カラムの製造中に、カラムのステンレス表面を不活性コーティングすることもできます。PEEK ライナ付きカラムはオリゴヌクレオチドの分離に使用できる可能性があります。固有の制限があります。PEEK ライナ付きカラムは従来のステンレス製カラムと比べて一貫した内径で製造することが難しく、カラム取り付け用のコネクタには特に注意が必要です。また、PEEK は特定の溶媒に対応しておらず、疎水性があるため、疎水性成分との間で望ましくない二次相互作用が発生する可能性があります。一方、MP35N からはニッケルとコバルトが浸出する可能性があります。本アプリケーションノートでは、バイオコンパチブルな Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムで従来のステンレス製両性イオン HILIC（HILIC-Z）カラムと不活性化した同じカラムを使用して、sgRNA 分解物および Cas9 mRNA 分解物由来のオリゴヌクレオチドの HILIC ベースの分離を検証します。さらに、3' リン酸残留物の線状化や除去の影響も調査します。

実験方法

試料調製

酢酸アンモニウム (LC/MS グレード) は、Merck から入手しました。タイプ I の水は、Arium pro のラボ用超純水システムで生成しました (Sartorius)。アセトニトリル (HPLC-S グレード) は、Biosolve から調達しました。Agilent RNA 分解能標準 (部品番号 5190-9028) はアジレントが提供しました。エンドリボヌクレアーゼ、RNase T1 と RNase 4、および 1x NEBuffer r1.1 は、New England Biolabs から入手しました。DEPC 処理水は Thermo Fisher Scientific から入手しました。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス) pH 7.5 緩衝液とエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は Sigma-Aldrich から入手しました。酵素として使用する 2',3'-環状ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼ (CNP) は Sanbio、子牛小腸アルカリフォスファターゼ (CIP) は New England Biolabs から入手しました。長さが 50 ヌクレオチド (nt) の RNA サンプルと 104 nt の sgRNA を社内で設計し、Integrated DNA Technologies で製造しました。CleanCap Cas9 mRNA (4522 nt) は TriLink BioTechnologies から入手しました。

サンプル前処理

RNA 分解能標準を 1 mL の DEPC 処理水で溶解しました。RNA サンプル (50 nt の RNA、sgRNA、Cas9 mRNA) を、RNase T1 または RNase 4 を用いて酵素分解しました。RNase T1 分解物を生成するため、sgRNA 1 マイクログラムあたり 5 ユニットの RNase T1 と、Cas9 mRNA 1 マイクログラムあたり 50 ユニットの RNase T1 を、EDTA を含む 37 °C のトリス緩衝液で 30 分間培養しました。50 nt の RNA の RNase 4 分解のため、RNA 1 マイクログラムあたり 0.5 ユニットの RNase 4 を 1x NEBuffer r1.1 に添加し、37 °C で 1 時間培養しました。その後、RNase T1 分解物と RNase 4 分解物を CNP で処理しました。具体的には RNA 1 マイクログラムあたり 2 ng の CNP を添加し、37 °C で 1 時間培養しました。さらに CIP 処理として、RNA 1 マイクログラムあたり 0.085 ユニットの CIP を分解混合物に添加し、37 °C で 1 時間培養しました。

使用機器

サンプルは Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムで分析しました。このシステムの構成は、Agilent 1290 Infinity III Bio ハイスピードポンプ (G7132A)、Agilent 1290 Infinity III Bio マルチサンプル (G7137A) と一体型サンプルサーモスタット、Agilent 1290 Infinity III マルチカラムサーモスタット (G7116B) と Agilent InfinityLab クイックコネク特熱交換器 1290 Bio 標準フロー (G711660071)、Agilent 1290 Infinity III DAD (G7117B) と Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル、10 mm (G4212-60008) です。メソッドパラメータを表 1 に示します。データは Agilent OpenLab CDS、バージョン 2.7 で取り込んで処理しました。

表 1. LC メソッドパラメータ

パラメータ	設定値	
カラム	– Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z、2.1 × 150 mm、2.7 μm (部品番号 683775-924) – Agilent Altura Poroshell HILIC-Z、ウルトライナートテクノロジーを採用、2.1 × 150 mm、2.7 μm (部品番号 227215-924)	
流量	0.35 mL/min	
移動相	A) 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル 20:80 (v/v) B) 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル 80:20 (v/v)	
グラジエント (LC メソッド 1) (RNA 分解能標準と sgRNA)	時間 (分)	%B
	0	10
	17	55
	20	90
	23	90
	25	10
グラジエント (LC メソッド 2) (Cas9 mRNA)	時間 (分)	%B
	0	10
	60	65
	63	90
	66	90
	68	10
検出 DAD	260/4 nm、リファレンス 360/40 nm ピーク幅 > 0.013 分 (20 Hz)	

結果と考察

オリゴヌクレオチドは LC ハードウェアのステンレス表面に吸着しやすいため、回収率が低下し、ピークテーリングが顕著になります。^{3~6} この現象を評価するため、従来のステンレス製 HILIC-Z カラムと不活性化した同等製品 (Altura Poroshell HILIC-Z) で、オリゴヌクレオチドの吸着程度を比較しました。初回のサンプル注入前に、80 カラム容量の初期移動相で両方のカラムを平衡化し、固定相の表面に水性層が形成されるようにしました。図 1 のとおり、4 種類のオリゴヌクレオチド (14 mer、17 mer、20 mer、21 mer) で構成される Agilent RNA 分解能標準を繰り返し注入して、金属吸着を評価しました。従来のステンレス製 HILIC-Z カラム (図 1A) の場合、UV レスポンスを安定化させてカラムを効果的に

コンディショニングするには 25 回の注入 (250 pmol の RNA の注入に相当) が必要でした。これに対して不活性化したカラムでは、初回注入時に UV レスポンスがすぐに安定しました。これは、LC カラムへのオリゴヌクレオチドの吸着が非常に少ないことを示しています (図 1B)。ただし、カラムのコンディショニング後も、従来のステンレス製 HILIC-Z カラムは不活性化したカラムと比べてピーク高が低く、ピーク面積が小さく、ピークテーリングがより顕著でした。さらに、従来のステンレス製 HILIC-Z カラムは保管後と使用前に再コンディショニングが必要です。これはコンディショニングによる不活性化効果が一時的であることを示しています。

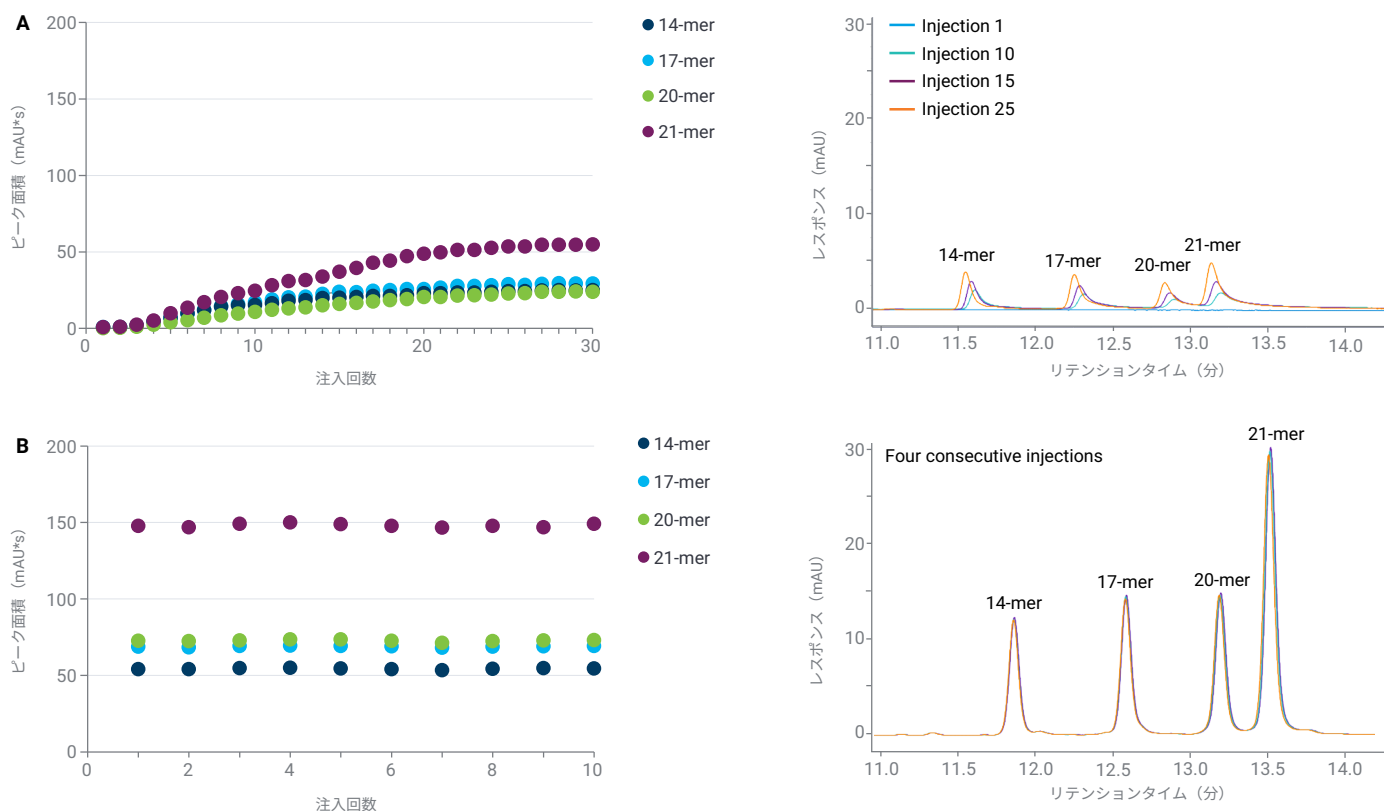


図 1. RNA 分解能標準を繰り返し注入しコンディショニングを行った従来のステンレス製 HILIC-Z カラム (A) と不活性化したステンレス製 Altura Poroshell HILIC-Z カラム (B) の HILIC-UV クロマトグラム (260 nm)

高品質なオリゴヌクレオチド分離は、RNA マッピングで重要な役割を果たします。LC のピークキャパシティの限界により共溶出が発生し、MS のオーバーロードによって複雑で読み取れないスペクトルが生成される可能性があります。² 最近、HILIC は RNA マッピングにおけるオリゴヌクレオチド分離に適した手法として注目されつつあります。^{7, 8} LC 分離の前に、RNA は RNase で酵素分解されます。このアプリケーションノートでは、分解用にエンドリボヌクレアーゼ RNase T1 および RNase 4 を選択しました。RNase T1 は 1 本鎖 RNA (ssRNA) をグアノシン (G) 残留物の 3'-末端で切断します。RNase 4 は ssRNA をウリジン-プリン配列 (U/A および U/G) の 3'-末端で切断します。RNase T1 と RNase 4 の分解物は 2',3'-環状リン酸化種と 3'-リン酸化種の混合物で構成されていますが (図 2)、相対アバンダンスは異なります。2',3'-環状中間体から 3'-

リン酸化型への加水分解ステップは、RNase 4 より RNase T1 のほうがずっと速く進みます。このため、RNase T1 分解からは主に線状 3'-リン酸化種が生成され、RNase 4 からはほぼ同一の (オリゴヌクレオチドに環状と線状のリン酸末端の付いた) オリゴヌクレオチドの混合物が生成されます。^{7, 9} 分解混合物を簡素化するため、RNase 分解の後にさらなる酵素処理を検討することもできます。例えば、2',3'-環状リン酸末端を線状 3'-リン酸末端に変換する CNP を適用できます。さらに、CIP を使用して線状リン酸基を除去し、3'-ヒドロキシル末端を生成できます。ここでは、ステンレス表面へのオリゴヌクレオチドの非特異的吸着をより深く理解するために、これらの酵素を適用しました。

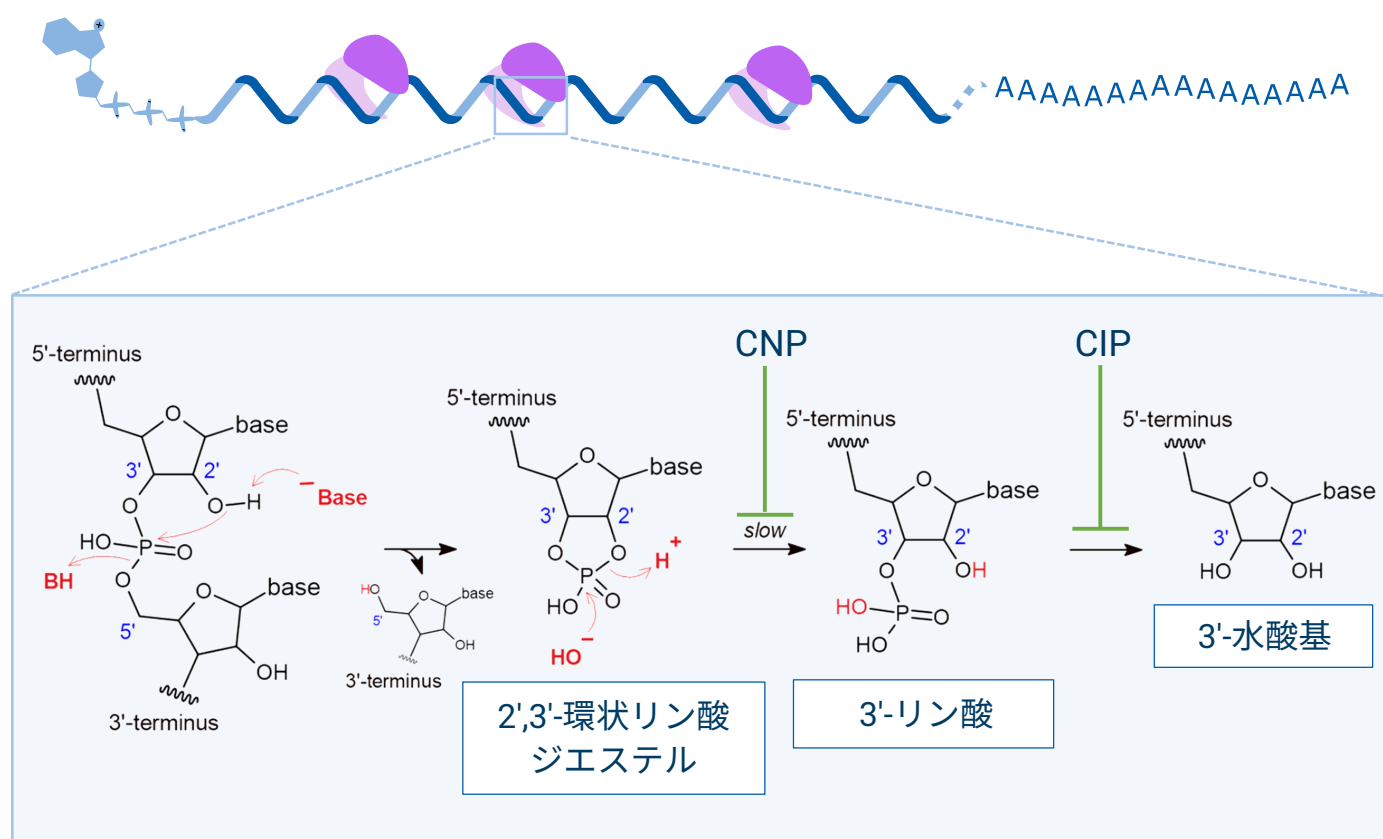


図 2. RNase T1、RNase 4、CNP、CIP の反応メカニズム。mRNA は RNase T1 または RNase 4 で分解されて 2',3'-環状リン酸を持つ最初のオリゴヌクレオチドが生成されます。これをさらに (低速で) 加水分解して 3'-リン酸末端を生成できます。CNP はこの加水分解反応の触媒として機能します。CIP は線状リン酸末端を 3'-ヒドロキシル末端に加水分解します。

シンプルなモデルとして、カスタム設計の 50 nt の RNA を RNase 4 で分解し、CNP と CIP で後処理したものとし、ないものを用意しました。この分解物の HILIC-UV 分析を、完全にコンディショニングした従来のステンレス製 Poroshell HILIC-Z カラムと、不活性化したステンレス製 Altura Poroshell HILIC-Z カラムの両方で実行しました (図 3)。いずれのカラムでも、RNase 4 分解物と RNase 4-CNP-CIP 分解物のクロマトグラフィープロファイルは同等でしたが、ピークテーリングは従来のステンレス製カラムのほうが少し大きくなりました。これに対し、線状 3'-リン酸末端付きのオリゴヌクレオチドフラグメントのみを含む RNase 4-CNP 分解物については、2 種類のカラムで顕著な違いが見られました。完全に

コンディショニングした従来のステンレス製 HILIC-Z カラムでは、この分解物のピークテーリングが非常に大きくなり、ピーク強度が低下しました。これは、ステンレス表面の残留活性点にオリゴヌクレオチドが吸着したことを示しています。これに対し、不活性化した Altura Poroshell HILIC-Z カラムでは、非特異的吸着が少ないためピークがシャープになり、強度が高くなりました。

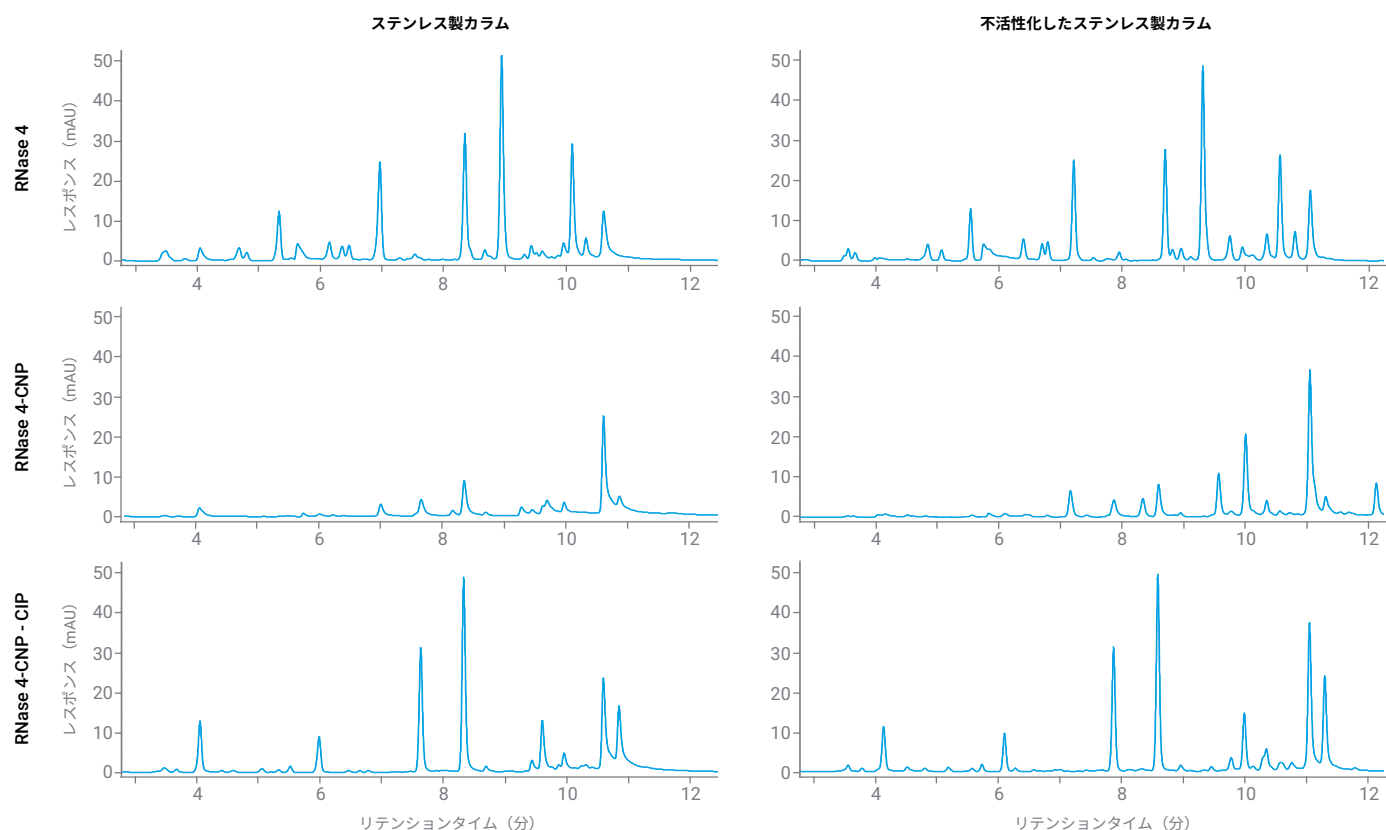


図 3. 50 nt の RNA を RNase 4 で分解してから CNP と CIP で処理し、完全にコンディショニングした従来のステンレス製 HILIC-Z カラムと不活性化したステンレス製 Altura Poroshell HILIC-Z カラムに注入した HILIC-UV クロマトグラム (260 nm) (LC メソッド 1)

同様の構成で別の2種類の治療的関連性の高い種（sgRNAとCas9 mRNA）を評価しました。いずれの分子もRNase T1で分解してから、サンプルの一部をCNPとCIPで酵素処理しました。すべてのサンプルを、完全にコンディショニングした従来のステンレス製HILIC-Zカラムと不活性化したカラムに注入しました（図4と図5）。sgRNAとCas9 mRNAのいずれの場合も、RNase T1分解物とRNase T1-CNP分解物のクロマトグラムは、同じカラムで分析した場合は基本的に同じです。その理由はおそらく、RNase T1が主に線状3'-リン酸基でRNAフラグメントを生成するためです。このため、HILIC-UVクロマトグラムに基づいた場合、CNPでさらに処理しても分解混合物は大きく変わりません。ただし、少数のフラグメントには、CNPにより加水分解されやすい2',3'-環状リン酸末端が含まれている可能性があります。このような低アバundant種を検出するには、より高感度なMSなどの手法が必要です。コンディショニングした従来のステンレス製カラムでは、不活性化したステンレス製カラムと比べて、RNase T1分解物とRNase T1-CNP分解物のピークテーリングが顕著になり、ピーク強度が低くなりました。これは、従来のステンレス製カラムの表面に多くのオリゴヌクレオチドが非特

異的に吸着したことを示しています。ただしその後、CIPで後処理して線状3'-リン酸末端を除去すると、従来のステンレス製カラムのクロマトグラフィー性能が大幅に向上し、ピークテーリングが減少してピーク強度が上がりました。興味深いことに、CIP処理の後、両カラムのHILIC-UVクロマトグラムは同等でしたが、ピーク形状とピーク強度は引き続き不活性化したカラムのほうが少し良好でした。これは、線状3'-リン酸末端を除去しても、従来のステンレス製カラムに少量のオリゴヌクレオチドが引き続き吸着していることを示しています。全体として、分析結果から、ステンレスへのオリゴヌクレオチドの吸着は、末端リン酸基の性質により影響を受けることがわかります。末端に線状リン酸基があるフラグメントは吸着しやすく、環状リン酸基やヒドロキシル基があるフラグメントは相互作用が少なくなります。また、オリゴヌクレオチド鎖ではリン酸ジエステル結合によりヌクレオチドが結合することも重要です。これもある程度、吸着の原因となります。

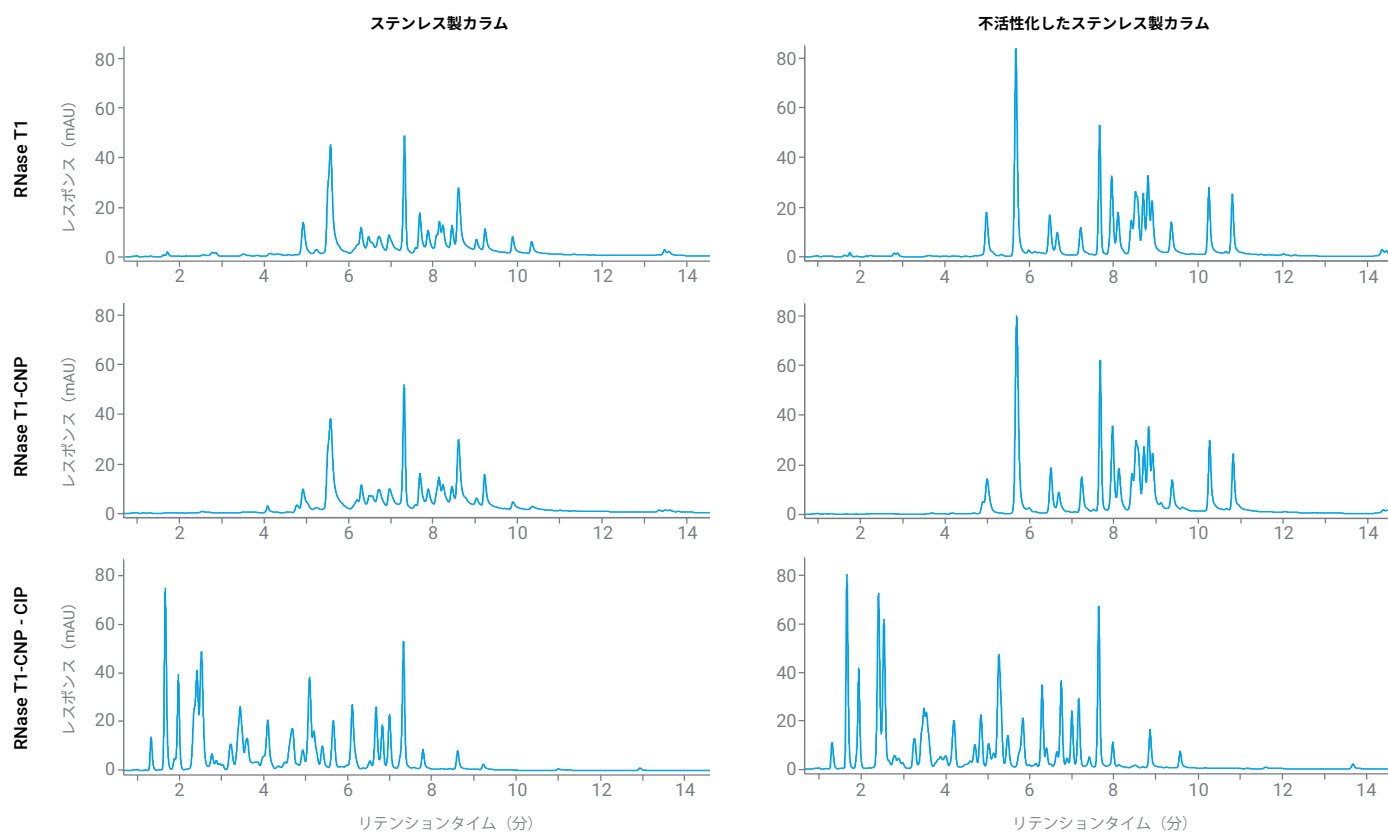


図4. sgRNAをRNase T1で分解してからCNPとCIPで順次処理し、完全にコンディショニングした従来のステンレス製HILIC-Zカラムと不活性化したAltura Poroshell HILIC-Zカラムで分析したHILIC-UVクロマトグラム（260 nm）（LCメソッド1）

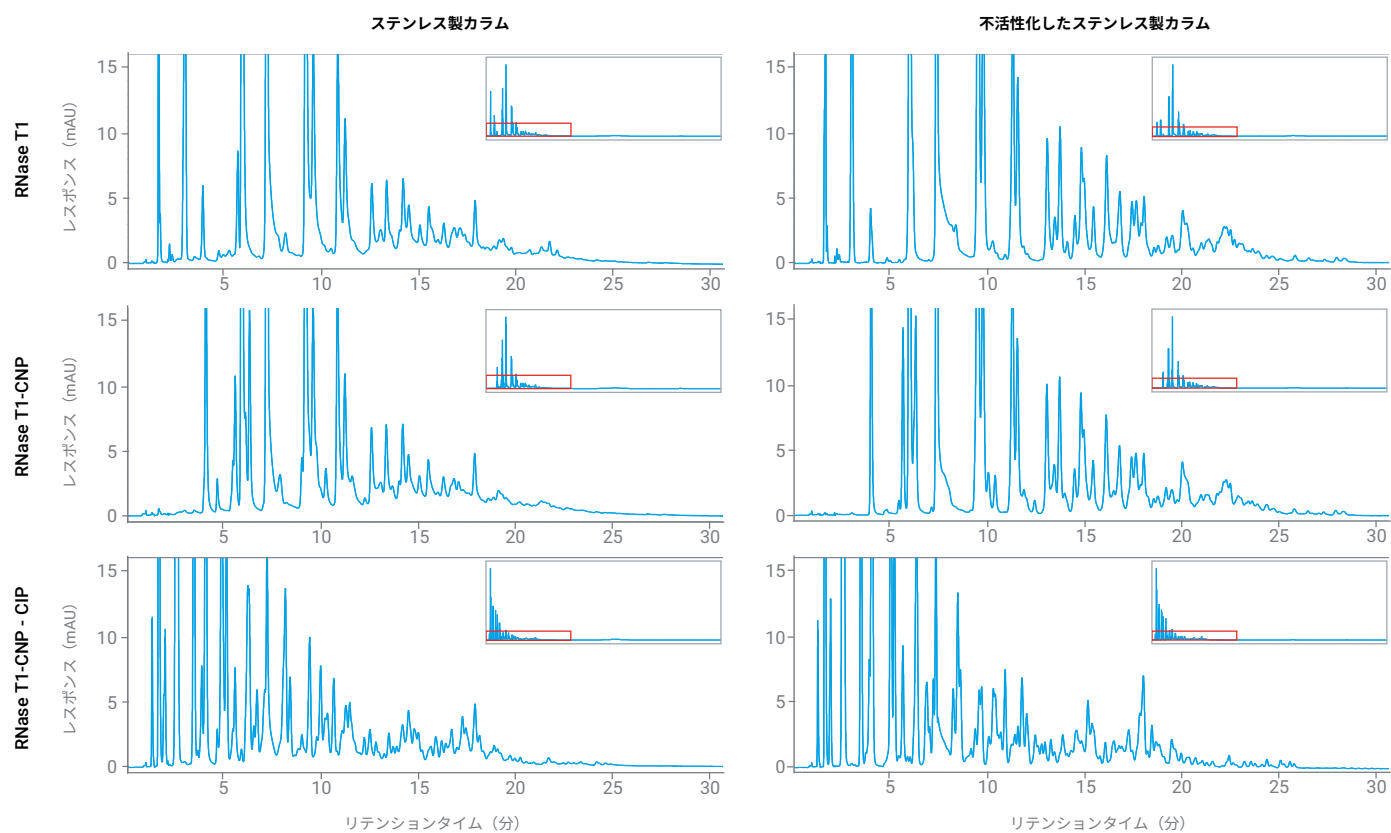


図 5. Cas9 mRNA を RNase T1、CNP、CIP で順次分解してから、完全にコンディショニングした従来のステンレス製 HILIC-Z カラムと不活性化した Altura Poroshell HILIC-Z カラムで分析した HILIC-UV クロマトグラム (260 nm) (LC メソッド 2)

結論

HILIC は従来の IP-RPLC メソッドの代わりとして、オリゴヌクレオチドの分離に使用できることが実証されました。このアプリケーションノートの結果が示すとおり、従来のステンレス製カラムの鉄表面へのオリゴヌクレオチドの非特異的吸着は、検出感度の低下や顕著なピークテーリングの原因となる重大な課題です。従来のステンレス製 HILIC-Z カラムでは、再現性の高い性能を確保するために多くのコンディショニングが必要ですが、非活性化したステンレス製 Altura Poroshell HILIC-Z カラムでは初回の注入から高い性能を得られることがわかりました。ステンレス製カラムをコンディショニングしても、分析対象物の回収率とピーク形状について、不活性化したステンレス製カラムと完全に同等の性能を得ることはできませんでした。また、ステンレス製カラムにおけるピークテーリングの主な原因は 5' RNA フラグメントの線状 3'-リン酸末端であり、2',3'-環状リン酸末端は非特異的吸着にほとんど影響しないことも判明しました。これらの結果から、RNA マッピングワークフローでオリゴヌクレオチドの分離に HILIC を使用する場合、適切な LC ハードウェアを選択して末端リン酸基の性質を慎重に検討することが重要であることがわかりました。

参考文献

1. Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-Based Therapeutics—Developing a New Class of Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*(10), 759–780. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.
2. Maurer, J.; Vanluchene, H.; Tsalmipouris, A.; Morreel, K.; Camperi, J.; Sandra, K.; Guilleme, D. Exploring the Potential of Oligonucleotide Mapping with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry to Study the Primary Structure of mRNA. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2025**, *191*, 118309. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118309>.
3. Lardeux, H.; D'Atri, V.; Guilleme, D. Recent Advances and Current Challenges in Hydrophilic Interaction Chromatography for the Analysis of Therapeutic Oligonucleotides. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2024**, *176*, 117758. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117758>.
4. Vanhoenacker, G.; Morreel, K.; Jonckheere, S.; Sandra, P.; Sandra, K.; Schneider, S.; Huber, U. Determining mRNA Capping with HILIC-MS on a Low-Adsorption Flow Path. *Agilent Technologies application note*, publication number **5994-7118EN**, **2024**.
5. Vanluchene, H.; Morreel, K.; De Vos, J.; Sandra, P.; Sandra, K.; Schneider, S.; Huber, U. 低吸着性の流路での IP-RPLC-MS による mRNA マッピング. アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、資料番号 **5994-8055JAJP**, **2025**.
6. Bartlett, M. G. Current State of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography of Oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* **2024**, *1736*, 465378. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465378>.
7. Goyon, A.; Scott, B.; Kurita, K.; Crittenden, C. M.; Shaw, D.; Lin, A.; Yehl, P.; Zhang, K. Full Sequencing of CRISPR/Cas9 Single Guide RNA (sgRNA) via Parallel Ribonuclease Digestions and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry Analysis. *Anal. Chem.* **2021**, *93*(44), 14792–14801. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03533>.
8. Goyon, A.; Scott, B.; Yehl, P.; Zhang, K. Online Nucleotide Mapping of mRNAs. *Anal. Chem.* **2024**, *96*(21), 8674–8681. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c00873>.
9. Wolf, E. J.; Grünberg, S.; Dai, N.; Chen, T. H.; Roy, B.; Yigit, E.; Corrêa, I. R., Jr. Human RNase 4 Improves mRNA Sequence Characterization by LC–MS/MS. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*(18), e106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac632>.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE-010994

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, December 10, 2025

5994-8834JAJP