

SEC-MALS 法による mRNA の生物物理学的特性解析

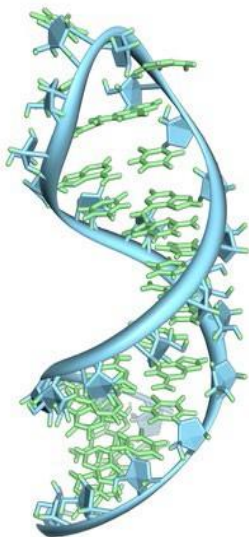
Pam Wang, Ph.D., Rama Akula, Moderna Therapeutics
 Michelle Chen, Ph.D., Kristine Legaspi - Wyatt Technology

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

概要

mRNA のいくつかの生物物理学的な特性を定量化するために [DAWN 多角度光散乱検出器](#) と [Optilab 示差屈折率検出器](#) を取り込んだ SEC-MALS 法を開発した例を紹介します。特性としては分子量、凝集体の割合、Rg, Rh, および Rg/Rh が含まれます。この方法は、これらの特性が、mRNA の調製法、精製法や保存条件によってどのように影響されるかを簡便に調べるために利用することができます。

はじめに



RNA hairpin loop
 (Wikipedia)

RNA 治療薬は生物学的に注目される広範な分子に関わる急速に発展している分野です。メッセンジャーリボ核酸 (mRNA) は DNA に蓄えられている遺伝情報を、機能を持つ蛋白質に変換する過渡的な生体分子です¹。過去 10 年以上にわたって mRNA は蛋白質を基礎とする治療薬に代わってますます望ましい代替法として出現してきました；即ち、適当な配列を持ち、合成の過程で修飾され、デリバリー

体を付した mRNA 分子の方が、体内で正しく折りたたまれ、翻訳後修飾される蛋白質の生産に結び付くと考えられます。DNA をベースとする遺伝子治療とは異なり、mRNA 製剤はゲノムに取り込まれてしまう危険がごく小さく、長期にわたる安全性の問題を軽減させます。これらの利点を考えると、mRNA は、ワクチンの開発、がんの免疫療法および

蛋白質置換療法のための汎用性のあるプラットフォームを提供する生物製剤工業に革命を起こす可能性を持っています²。このような明らかな利点にもかかわらず mRNA 治療薬の開発はまだ始まったばかりで、医学的な成功は、mRNA の特性を高度な解析ツールを用いて明らかにすることに強く依存すると考えられています。RNA 分子固有の動力学のため、特に 3 次元の構造情報を得ることは困難です。従って、分子の大きさ、オリゴマー状態やコンフォメーションの情報を与える相補的な技術が mRNA の生化学的、生物物理学的特性を理解するために重要になると考えられます。高性能のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、精製や分子量 (Mw) の推定や凝集の定量化への応用として蛋白質の研究や蛋白質製剤の開発において広く用いられてきました。SEC の応用は、さらに光散乱 (LS) 検出器、即ち多角度光散乱 (MALS) やオンライン動的光散乱 (DLS) を加えた時に正確な分子量の決定や形状の推定にも拡張されています³。

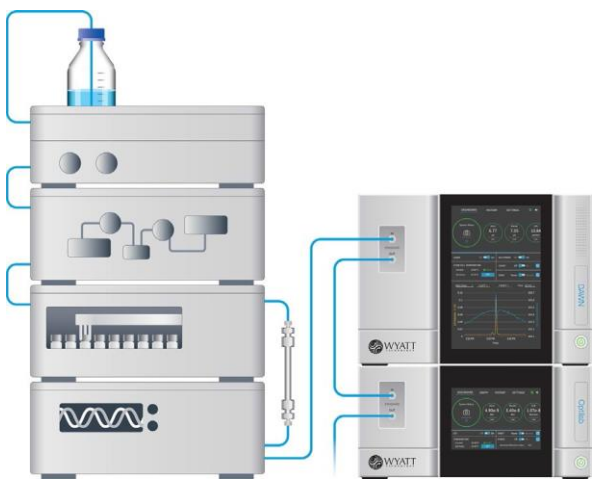


内部に WyattQELS DLS モジュールを装備した DAWN 多角度光散乱検出器

蛋白質の分析で一般に用いられている SEC-MALS による性状解析は、RNA 分子の解析、特に mRNA のような大きな RNA 分子の解析に重要です。SEC-MALS 法は RNA のように特に大きなサイズや高密度の電荷をもつような分子について、それ以外の方法では得ることが難しい生物物理学および構造的な情報を与えることができます。mRNA 分子を薬剤として開発するためには Mw や大きさやコンフォメーションのような性質について調製過程全体にわたって十分解析し、モニターしなければなりません。本ノートでは mRNA について広範に解析する方法として、2 つの一般に用いられている機器構成を用いて SEC-MALS 法の利用について検討しています。材料としては蛋白質の発現レベルを容易に定量化できる、赤血球の産生において重要な役割を演じるホルモンであるエリスロポイエチン (EPO) と、蛍のルシフェラーゼ (fLuc) を用いています⁴。

材料と方法

EPO と fLuc の mRNA は in vitro の転写系によって合成しました。精製した mRNA 標品は UV 吸収によって定量化しました。SEC システムに SEC カラムを接続し、移動相には PBS (50 mM リン酸、50 mM NaCl、250 ppm の NaN_3 、pH 6.8) を用いました。やや速い流速 0.8 mL/min を用いて時間を短縮し、アッセイのスループットを上昇させました。



フル装備の SEC-MALS システムは、UV 検出器、SEC カラム、MALS および RI 検出器を備えた HPLC からなります。系の制御、データ取得および解析は ASTRA を用いて行いました。

溶出は 260 nm の UV 吸収系で mRNA 分子を、280 nm で蛋白質を検出し、続いて DLS モジュールを組み込んだ WyattQELS を装備した DAWN MALS 検出器、および Optilab 示差屈折率 (RI) 検出器での測定を行いました。HPLC の制御には ASTRA ソフトウェア用いました。dn/dc の値として、mRNA は 0.172 mL/g、蛋白質は 0.185 mL/g を用いました。

結果と考察

EPO および fLuc いずれの試料にも少量の巨大分子種が見られたましたが、図 1 の UV および光散乱 (LS) のクロマトグラム見られるようにメインピークから十分離れたピークとなりました。LS の強度は濃度と Mw の積に比例するので、UV や屈折率 (RI) に比べて LS シグナルは特に少量の巨大分子を検出するのに有用です。

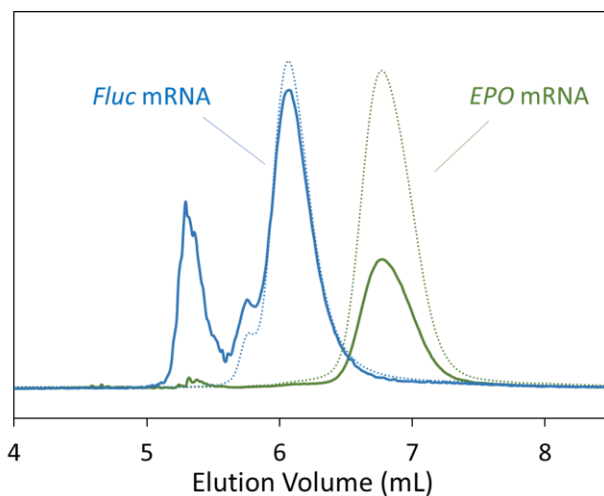


図 1. 90° LS(実線)および 260 nm の UV 吸収 (点線) から得られた fLuc(青)と EPO(緑) mRNA のクロマトグラム

材料と方法の項に詳細を記してあるハードウェア配置を用いると、Mw と 2 種の半径：

- ・ MALS 検出器から回転半径 (Rg)
 - ・ オンライン DLS 検出器から流体力学的半径 (Rh)
- が同時に求められます。Mw, Rg, Rh, Rg/Rh, および凝集の割合と 260 nm の吸収を含む特性を表 1 にまとめています。この方法は再現性が非常によいこと、また、SEC-MALS で求められる特性はすべて 15 分以内に測定できることも注目すべき点です。

各 mRNA の主ピークについて MALS-RI 解析で求めた Mw の値は EPO と fLuc mRNA の分子量の理論値（それぞれ 273 kDa と 619 kDa）とほぼ完全に一致しました。この結果は本研究で用いられた mRNA が産生、保管、輸送を通じて完全に保存されていることを保証しています。

表 1. EPO と fLuc mRNA の測定結果のまとめ

	MW [kDa]	Agg ^a [%]	R _g [nm]	R _h [nm]	R _g /R _h	ε ^b
EPO	272 ± 1	4.8	15 ± 1	12+/-1	1.2	22.8
fLuc	622 ± 1	2.6	20 ± 1	17+/-1	1.2	22.4

^a Agg 凝集体の重量分率

^b ε_{260 nm} における吸光係数 (mL·mg⁻¹·cm⁻¹)

このような SEC-MALS による詳細な情報は、カラム較正による伝統的な SEC-UV 法では得ることはできません。球状蛋白質のカラム較正を用いて測定される RNA 分子の分子量は通常、球状蛋白質と mRNA 分子の充填度の大きな違いのために実際より数倍大きな分子量で過大評価されます。種々の長さのポリヌクレオチドを較正標準に用いたとしても SEC による分離が十分ではないので低分解能のおおよその分子量しか得られません。

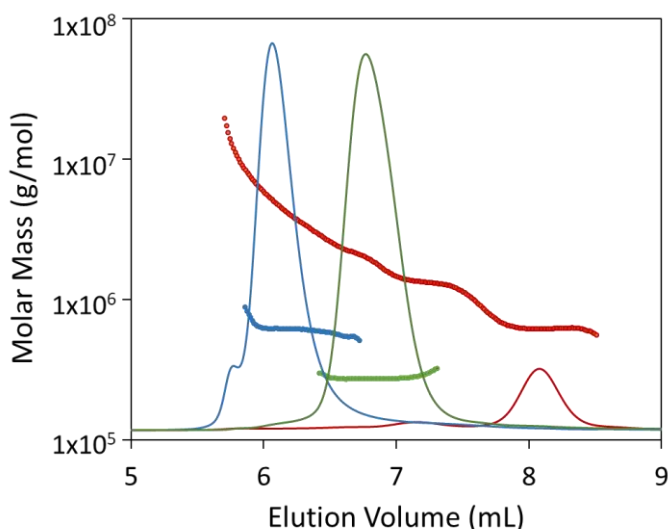


図 2. fLuc mRNA (青), EPO mRNA (緑) および チログロブリン (赤) の分子量に UV による 260 nm のクロマトグラムを重ね書きしてあります。

他方、オンライン MALS 検出器は、分子の充填度や、あり得るカラムとの非理想的な相互作用に依存せず、正確な分子量を与えます。図 2 は、本実験で用いられた 2 つの mRNA と 1 種類の蛋白質チログロブリンおよびそれらすべての凝集体のクロマトグラムと分子量をプロットしています。fLuc の mRNA はチログロブリンと似た分子量を持っていますが、充填度が小さいためにそれよりもずっと大きな溶出体積のところに溶出されています。図 2 からもう一つ見て取れることは、mRNA の主ピークはピーク内で分子量が一定であり、この標品が純粋なモノマーであることを示唆しています。分子量と同時に、オンライン LS 検出器はデリバリー戦略に重要なサイズやコンフォメーションのような他の生物物理学的な特性も測定することができます。2 つの mRNA とチログロブリンの流体力学的半径を溶出体積に対してプロットしたものを図 3 に示します。

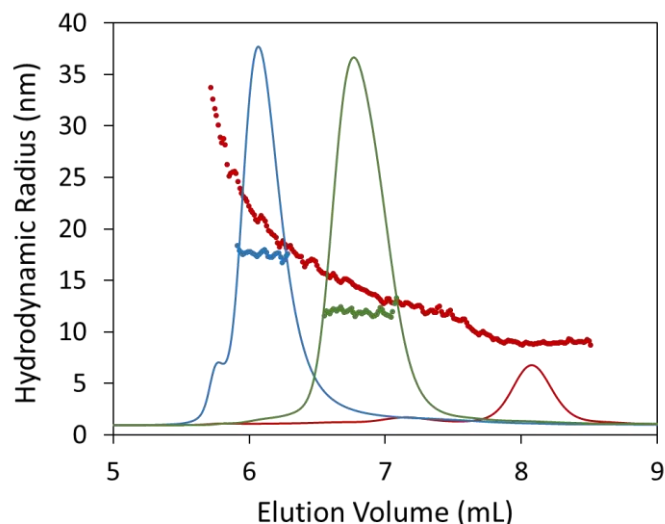


図 3. オンライン DLS から得られた fLuc mRNA (青), EPO mRNA (緑) およびチログロブリン (赤) の流体力学的半径を溶出体積に対してプロットし、260 nm で測定したクロマトグラムを重ね書きしてあります。

R_g と R_h はその比が高分子のコンフォメーションと関連しているので重要です。EPO と fLuc の mRNA モノマーの R_g : R_h 比は約 1.2 (表 1 参照)であり、ランダムコイルコンフォメーションの場合と一致しています。ランダムコイル構造は R_g : R_h 比が 0.77 の典型的な球状蛋白質よりも充填度がはるかに低いです。

結論

本ノートで紹介した SEC-MALS 法は mRNA 分子の生物物理学的特性を測定するための便利で迅速、しかも強力なツールであることを証明しています。この方法は mRNA の生物物理学的性質と安定性に関して、異なるイオン、イオン強度、pH や他の緩衝液条件下で研究するために用いることもできます。特に測定される特性が巨大な RNA、特にそれを治療薬として開発する場合には必須なツールです。

文献

1. Cross, Ryan. "Can mRNA disrupt the drug industry?" *Chemical & Engineering News* 96, 35 (2018).
2. Jain, R., Frederick, J. P., Huang, E. Y., Burke, K. E., Mau-ger, D. M., Andrianova, E. A., Farlow, S. J., Siddiqui, S., Pimentel, J., Cheung-Ong, K., McKinney, K. M., Köhrer, C., Moore, M. J., Chakraborty, T. "MicroRNAs Enable mRNA Therapeutics to Selectively Program Cancer Cells to Self-Destruct." *Nucleic Acid Therapeutics* 28(5) (2018): 285-296.
3. Wyatt, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal Chim Acta* 272 (1993).
4. Thess, A., Grund, S., Mui, B. L., Hope, M. J., Baumhof, P., Fotin-Mleczek, M., Schlake, T. "Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals." *Mol Ther* 23(9) (2015): 1456-1464.
5. Kim, Insil, Sean A. McKenna, Elisabetta Viani Puglisi, and Joseph D. Puglisi. "Rapid purification of RNAs using fast performance liquid chromatography (FPLC)." *RNA* 13(2) (2007): 289-294.



© Wyatt Technology Corporation. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of Wyatt Technology Corporation.

One or more of Wyatt Technology Corporation's trademarks or service marks may appear in this publication. For a list of Wyatt Technology Corporation's trademarks and service marks, please see <https://www.wyatt.com/about/trademarks>.