

COSMOSIL RNA-RP1

短鎖・中鎖・長鎖核酸の逆相 HPLC 分析

Technical Note
32

■ はじめに

核酸の分析においては、短鎖(オリゴヌクレオチド)もしくは長鎖のどちらかに焦点を当てて分析条件を検討している研究が多く、短鎖から長鎖までの幅広い核酸の分析条件を網羅的に論じた報告例はありませんでした。この度、数十 nt の短鎖から、数百～数千 nt の中・長鎖にわたる幅広い鎖長の分析条件について検討しましたので、紹介します。なお、本研究成は、Analytical Methods に掲載され、Front Cover にも選ばれています^[1]。

■ 本テクニカルノート全体の実験概要

核酸は、10 nt で約 3.4 nm という巨大な分子であるため、通常の細孔径(ノーマルポア、8～13 nm 程度)を持つ充填剤では、鎖長の大きな核酸は細孔内部に入りづらく、良好な分離が得られません。この課題を解決するために、弊社では細孔径 > 30 nm のスーパーワイドポアを有する充填剤を充填したコスモシル RNA-RP1 カラムを開発しました。本カラムでは、長鎖の核酸も細孔に入ることができるため、COVID-19 ワクチンにも使用されているような数千 nt の長鎖 ssRNA も分析できることが弊社の先行研究で示されています^[2]。本カラムとノーマルポアおよびワイドポア(30 nm 程度)カラムを用いて、さまざまな鎖長の核酸を分析し、分離パターンを比較しました。また、最適化した分析条件をもとに、*in vitro* 転写によって合成した数百 nt の中鎖および数千 nt の長鎖核酸中の不純物分離ならびに分取精製を行いました。

■ 核酸の鎖長とそれに適した充填剤および移動相

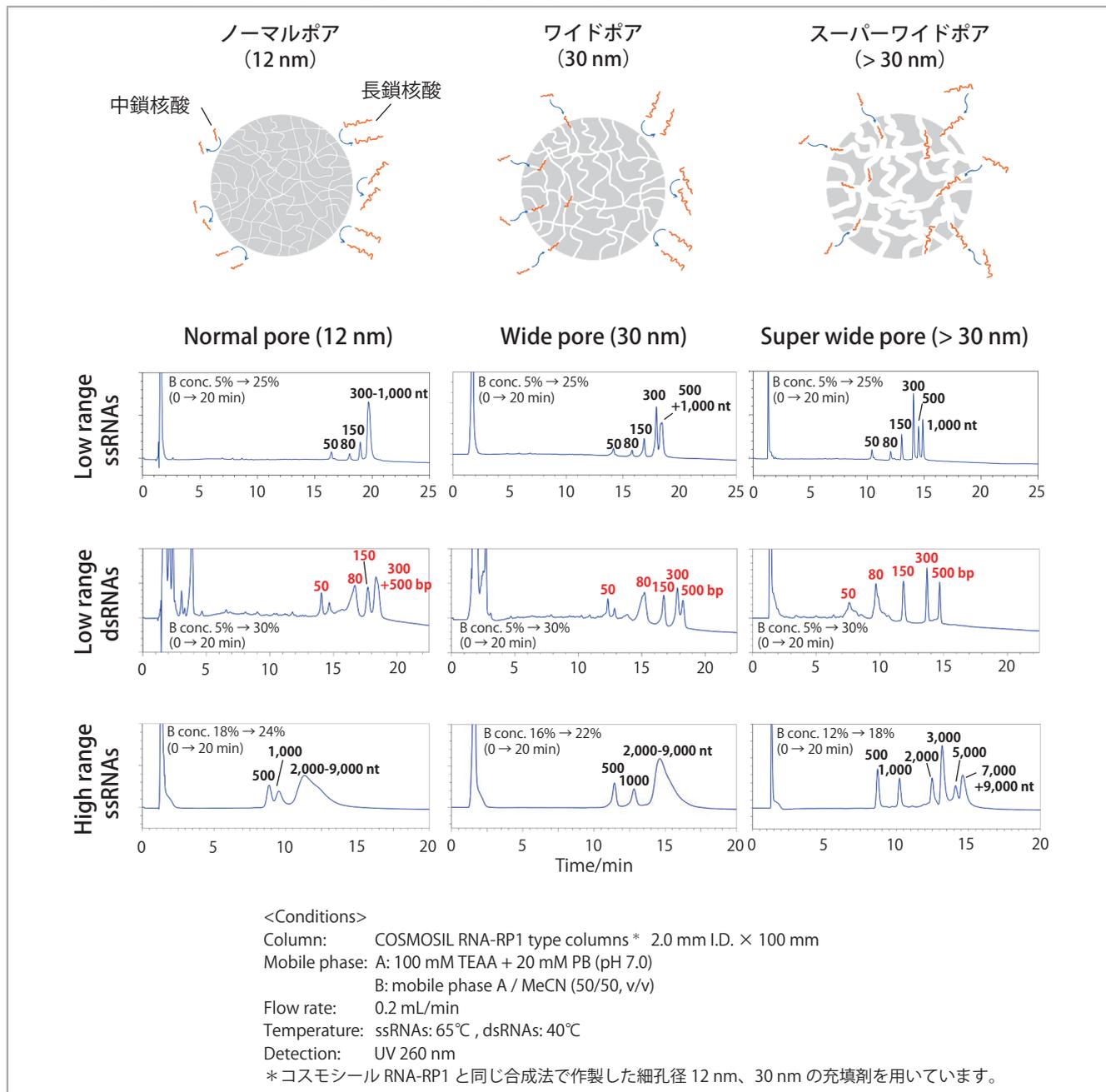
ポリアデニル鎖(アデニン数 10 個～50 個)および ssRNA Ladder にて一本鎖核酸の分析を行った結果、短鎖核酸(オリゴヌクレオチド)は移動相 A: HFIP + TEA、移動相 B: MeOH、充填剤: ノーマルポア or ワイドポア C₁₈ 充填剤で、また、中鎖・長鎖核酸は移動相 A: TEAA + PB、移動相 B: MeCN or MeCN/MeOH(1/1, v/v)、充填剤: スーパーワイドポア C₁₈ 充填剤で、分析すると好ましい結果が得られています。

核酸の種類	核酸の鎖長	充填剤の最適な細孔径	充填剤の模式図	弊社対応カラム	最適な移動相
短鎖	～100 nt (～約30 nm)	ノーマルポア (8～13 nm程度)	 (コアシェル型)	COSMOCORE 2.6C ₁₈	HFIP + TEA / MeOH
			 (フルポーラス型)	COSMOSIL 3C ₁₈ -MS-II	
中鎖	100～500 nt (約30～170 nm)	スーパーワイドポア (> 30 nm)		COSMOSIL RNA-RP1	TEAA + PB / MeCN
	500～1,000 nt (約170～350 nm)				TEAA + PB / MeCN + MeOH
長鎖	1,000～7,000 nt (約350～2,500 nm)				

HFIP: 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール、TEA: トリエチルアミン、TEAA: トリエチルアミン酢酸、PB: リン酸緩衝液、MeCN: アセトニトリル、MeOH: メタノール

■ 中鎖・長鎖核酸とそれに適応する充填剤の模式図およびクロマトグラム

ノーマルポアとワイドポア、スーパーワイドポアを有する3種類の充填剤を用いて、さまざまな鎖長の ssRNA および dsRNA を分析し、核酸の鎖長とそれに適応する充填剤の細孔径を調べました。



- Low Range ssRNAs において、ノーマルポアでは 50 ~ 150 nt が分離しましたが、300 ~ 1,000 nt のピークが完全に重なりました。ワイドポアでは 50 ~ 300 nt は分離しましたが、500 nt と 1,000 nt は分離できませんでした。一方、スーパーワイドポアでは 50 ~ 1,000 nt の全ての ssRNAs を分離することができました。
- Low Range dsRNAs において、ノーマルポアでは 150 bp 以上のフラグメントが分離しませんでした。ワイドポアでは 300 bp と 500 bp が分離しませんでした。一方、スーパーワイドポアでは 50 ~ 500 bp の全てのピークが分離しました。
- High Range ssRNAs において、ノーマルポアでは 500 nt と 1,000 nt の分離が悪く、2,000 nt 以上は分離しませんでした。ワイドポアでは 500 nt と 1,000 nt は分離しましたが、2,000 nt 以上では分離しませんでした。スーパーワイドポアでは 5,000 nt までの ssRNAs を良好に分離することができました。

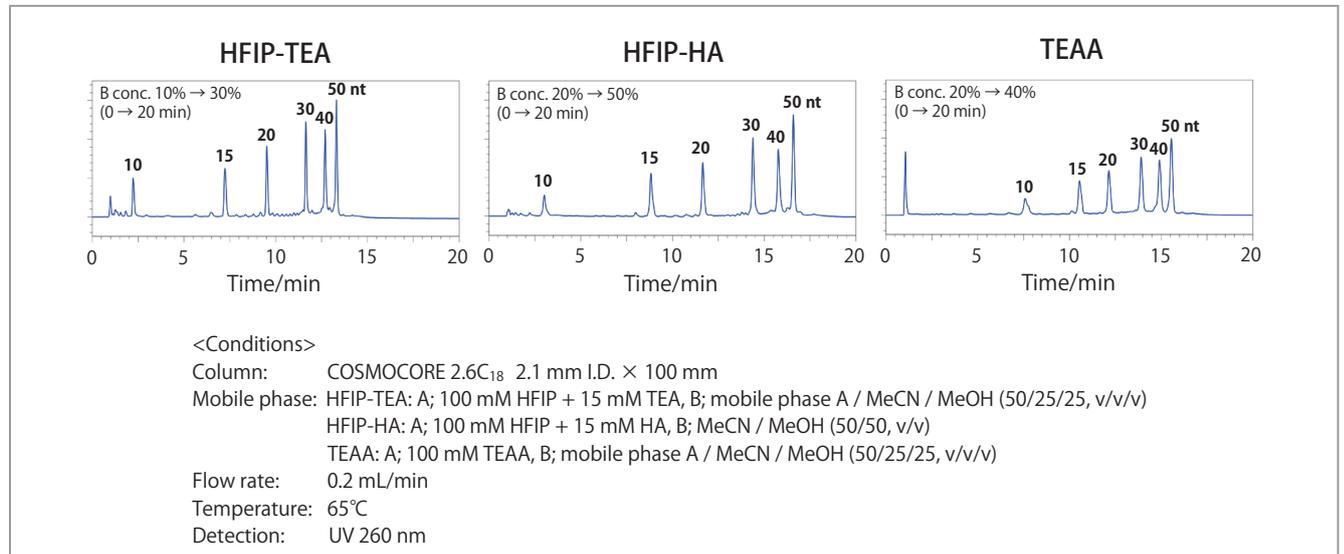
スーパーワイドポアの充填剤を用いたコスモシル RNA-RP1 カラムを使用することで、数百 ~ 数千 nt の ssRNA および数百 bp の dsRNA を良好に分離することができました。

■ ノーマルポアカラムを用いた短鎖核酸の分析結果

短鎖核酸の分離には、細孔径 8 ~ 13 nm 程度のノーマルポアカラムが汎用されています。そこで、ノーマルポアカラムを用いて短鎖核酸の分離における最適な移動相を検討しました。

● ポリアデニル鎖ラダー (10 ~ 50 nt)

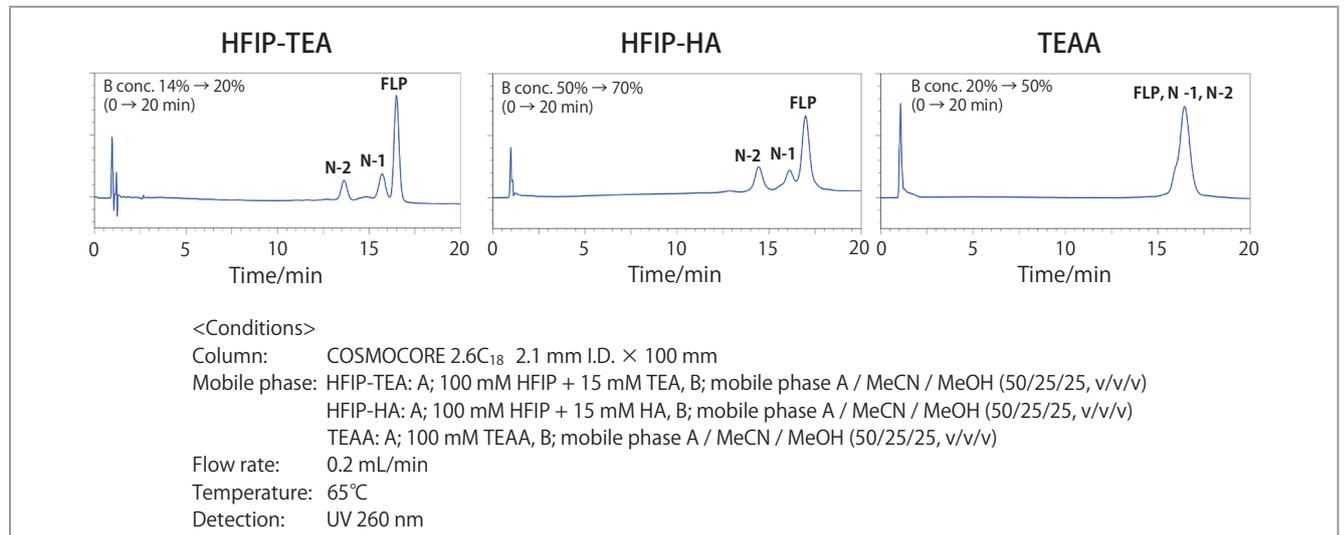
ノーマルポアをもつコスモコア 2.6C₁₈ カラムにおけるポリアデニル鎖 (poly d(A)) ラダーの分析を、3 種類の移動相を用いて検討しました。



HFIP を含有する移動相では TEAA よりも良好な分離パターンを示すことが分かりました。また、アミンの種類において、トリエチルアミン (TEA) と *n*-ヘキシルアミン (HA) で分離パターンは大きく変わりませんでした。TEA の方がわずかに良い分離を示しました。なお、グラジエント勾配は各移動相条件で分離パターンが同程度になるように調整しています。

● S 化オリゴヌクレオチド (18 ~ 20 nt)

アンピシリン耐性遺伝子 (*Amp^r*) を基に設計した 18 mer (N-2)、19 mer (N-1)、20 mer (FLP) のオリゴヌクレオチドの全てのホスホジエステル結合をホスホロチオアート結合に変更して合成しました。これらの核酸をコスモコア 2.6C₁₈ カラムで分析し、最適な移動相を調べました。なお、サンプルの配列情報は論文 [1] をご参照ください。



各移動相条件において、得られるピーク幅が同程度になるようにグラジエント条件を調節して分析したところ、HFIP に TEA を混合した移動相 (HFIP-TEA) で最も良い分離が得られました。HFIP に HA を混合した移動相 (HFIP-HA) では、ピークトップはよく分離しましたが、ピークがブロードになっていることが分かりました。また、TEAA では全てのピークが重なり、分離しませんでした。

短鎖核酸の分離において、移動相 A は TEAA よりも HFIP がよく、また S 化オリゴについては HFIP-HA よりも HFIP-TEA の方が分離が良いことが分かりました。

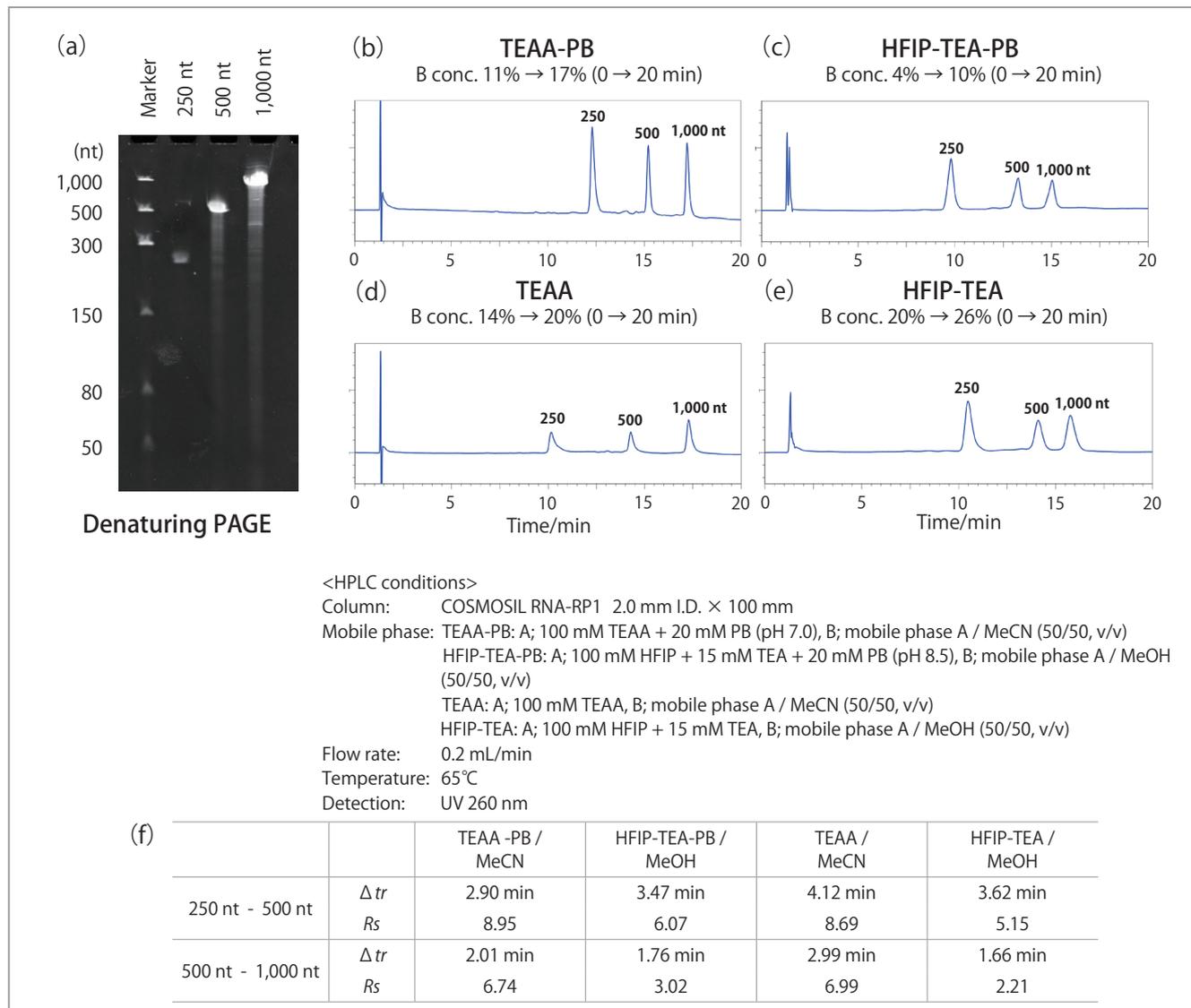
※サンプルによってはほかのアミンを使用した方が良い結果を示すことがあります。

■ スーパーワイドポアカラムを用いた中鎖核酸の分析結果

核酸の鎖長が長くなると、分子サイズが大きくなり、ノーマルポアカラムの細孔には核酸が入りづらくなります。この問題を解決するために、細孔径 30 nm を超えるスーパーワイドポアを持つ C₁₈ カラムであるコスモシル RNA-RP1 カラムを用いて、中鎖核酸を分析しました。

● *in vitro* 転写で合成した ssRNA

λ DNA の配列を基に設計したコンストラクトを用いて、*in vitro* 転写により、250 nt と 500 nt、1,000 nt の 3 種類の ssRNA を合成しました。それぞれの ssRNA をコスモシル RNA-RP1 カラムで分析し、最適な移動相を調べました。



in vitro 転写で合成したそれぞれの ssRNA を尿素変性 PAGE で分析したところ、鎖長 250 nt、500 nt、1,000 nt のいずれにおいても高い純度で合成できていることが確認されました [(a)]。クロマトグラムの溶出時間の差 (Δtr) と分離度 (R_s) の数値より、中鎖核酸の分離における移動相は HFIP よりも TEAA の方が好ましく、また中でもリン酸を含む TEAA (TEAA-PB / MeCN) で最も良いピーク形状を示すことが分かりました [(b) ~ (f)]。

RNA を取り扱う際の注意点

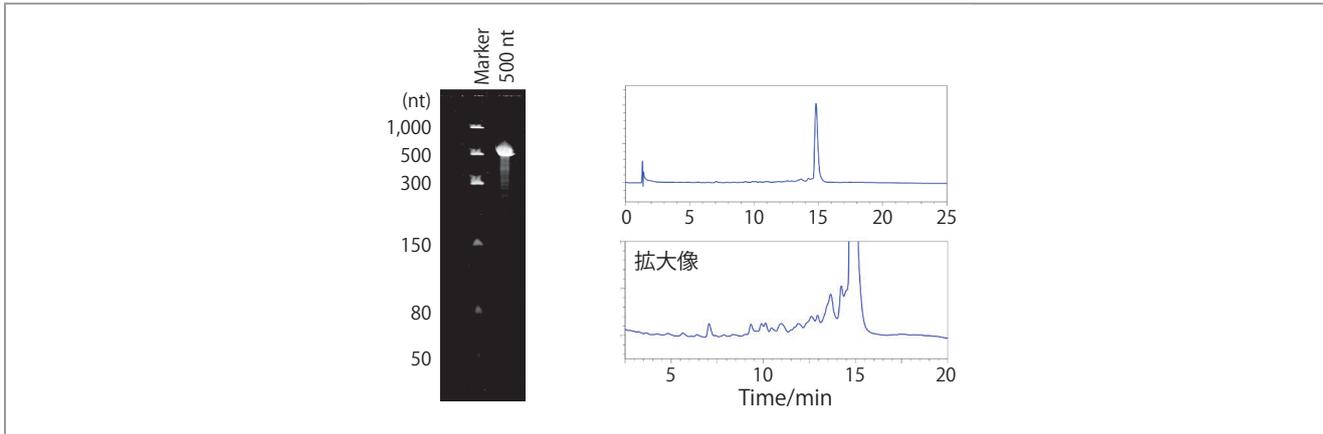
- ☞ RNA は RNase や熱への耐性が低いため、取り扱う際は手袋を着用し、氷上で操作を行ってください。サンプルの希釈や HPLC 装置へのセットの際も同様です。
- ☞ RNA はガラスに吸着しやすいため、サンプル溶液はガラス製のバイアルではなく、プラスチック製のチューブなどに保存することを推奨します。
- ☞ RNA は機械的強度が低いため、過度なピペティングは避けてください。

分析時の注意点

- ☞ 購入した新しいカラムを使用される際は、RNA の吸着を防ぐために、リン酸緩衝液をカラムに十分に通液してください。その後、標準サンプルを分析し、分離パターンやピーク形状が安定していることを確認してから、実サンプルを分析してください。

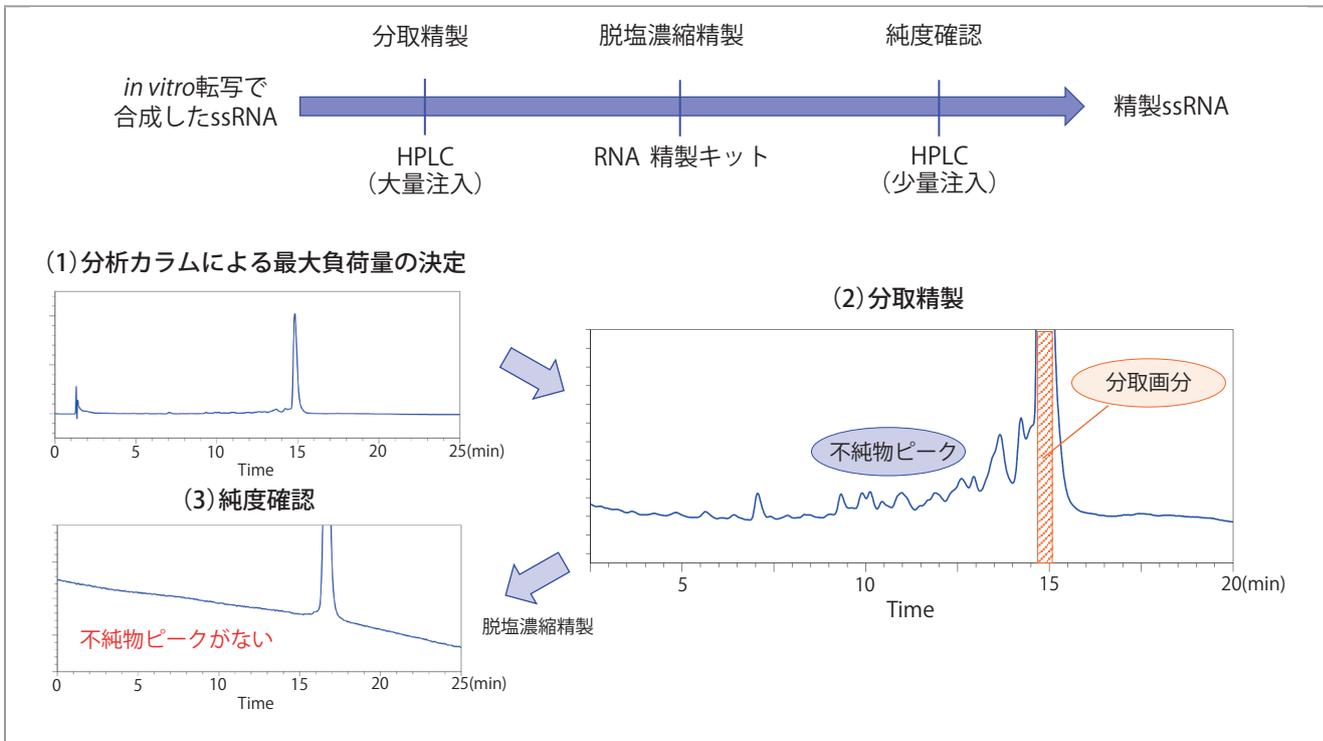
● *in vitro* 転写で合成した核酸の不純物分離と分取精製時の注意点

in vitro 転写で合成した 500 nt の ssRNA を尿素変性 PAGE で分析したところ、不純物と思われるバンドは確認されませんでした。一方、同サンプルを HPLC で分析したところ、不純物に由来すると考えられるいくつかのピークが確認されました。



合成した核酸を生体内投与する場合など、分取精製により、不純物成分を可能な限り除去することが好ましいと考えられます。

◆ 分取精製の概要図



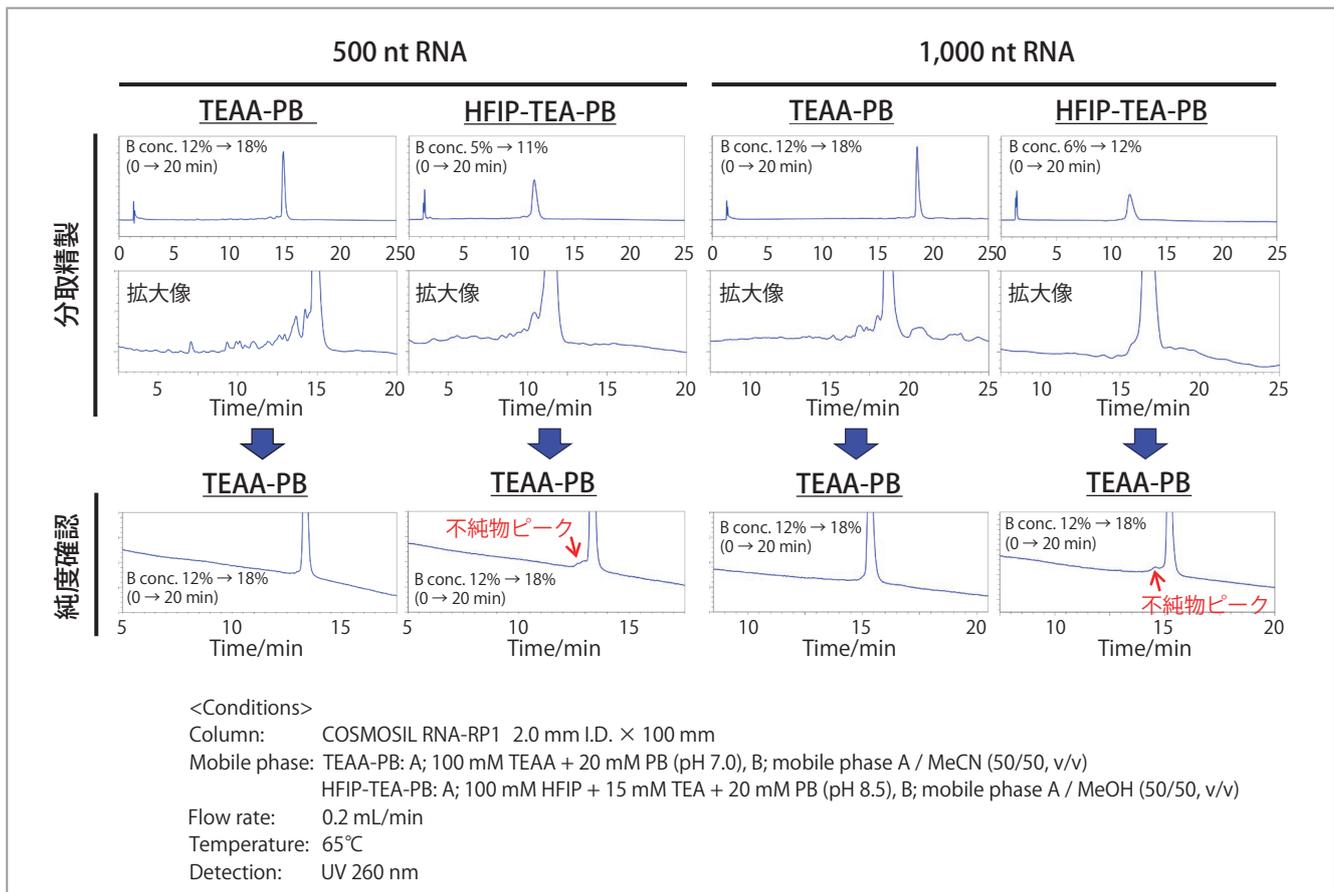
◆ 分取のポイント

- (1) 分取精製する際は、まず分析カラムでサンプルを徐々に増やして分析し、安定してピークが溶出するか確認して最大負荷量を決定します。目的物と不純物の分離ができ、かつ安定したピーク形状を示す精製条件を確立してください。
- (2) 決定した精製条件で分取を行います。このとき、不純物ピークまで分取してしまうと純度が低下するため、なるべく不純物ピークを混入させないように分取します。また、ピークの両裾を分取すると、ピークとして分離していない不純物を分取する可能性がありますので、両裾も取らないようにしてください。
- (3) 分取したサンプルは、不純物が除去できているか純度確認を行ってください。

分取精製時の注意点

- ☞ 分取精製の前に、少量のサンプルを用いて目的物と不純物の溶出位置およびピーク形状が安定していることを確認してください。
- ☞ 平衡化時間が短いと、分析ごとに溶出時間が変化してしまうため、平衡化時間はカラム長 100 mm のカラムで 15 分程度取るようにし、短縮しないでください。(なお、装置のミキサー容量によって、平衡化時間は変化します。)
- ☞ 負荷量はサンプルによって異なるため、注入量の検討を行ってから精製を実施してください。
- ☞ 核酸がガラスに吸着するのを防ぐため、プラスチック製のチューブなどを使用して分取してください。

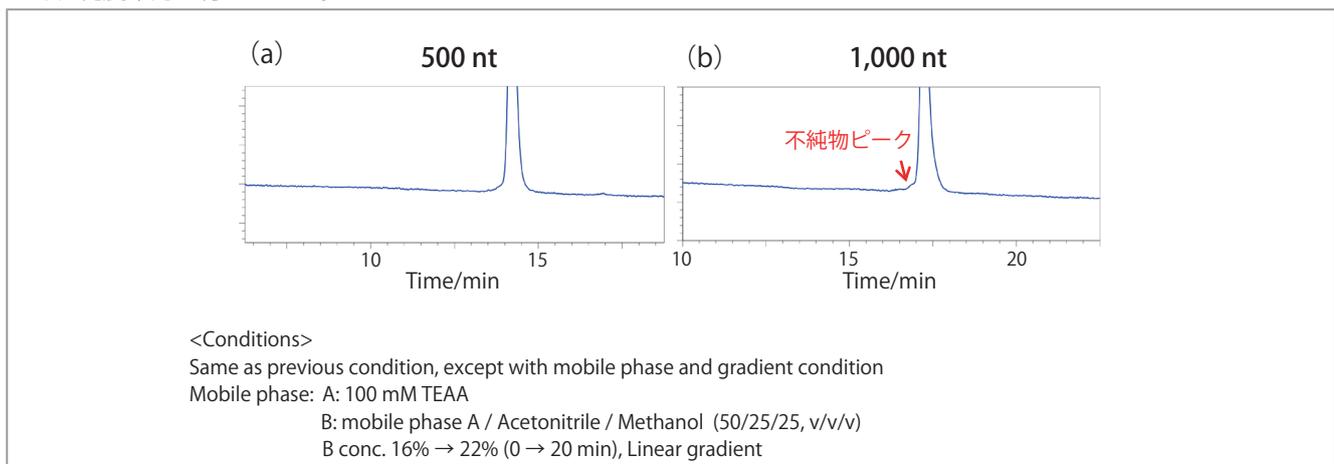
● *in vitro* 転写で合成した中鎖 ssRNA 中の不純物分離と分取精製



500 ng の 500 nt と 1,000 nt の ssRNA を TEAA-PB および HFIP-TEA-PB を用いて分取精製したところ、TEAA-PB では目的物由来のピークがシャープであり、また不純物だと考えられるピークが多数確認されました。一方、HFIP-TEA-PB ではピーク形状がブロードであり、TEA-PB と比較すると不純物由来と考えられるピークがほとんど確認されませんでした。以上の結果から、中鎖核酸中の不純物の分離において、移動相 A は HFIP-TEA-PB よりも TEAA-PB の方が適していることが示唆されました。

● *in vitro* 転写で合成した ssRNA の分析に適した有機溶媒種の検討

数千 nt 以上の長鎖核酸においては、アセトニトリルとメタノールの混合溶液を有機溶媒に用いると分離が良くなることが示されています^[2]。移動相 A に TEAA-PB、移動相 B にアセトニトリルを用いて分取精製した 500 nt と 1,000 nt の ssRNA を RNA 精製キットで脱塩濃縮精製した後、有機溶媒種をアセトニトリルからアセトニトリルとメタノールの混合溶液に変更して、純度確認を行いました。



500 nt の ssRNA は純度よく精製できていましたが [(a)], 1,000 nt の ssRNA では、有機溶媒種がアセトニトリルのときには検出されなかった不純物由来と考えられるピークが確認されました [(b)]。このことから、中鎖核酸においても 1,000 nt 程度まで鎖長が長くなると、有機溶媒にはアセトニトリルとメタノールの混合溶液を使用の方が良いことが分かりました。

1,000 nt 程度以上の鎖長の ssRNA においては移動相の有機溶媒にアセトニトリルとメタノールの混合溶液を使用する必要があることが示されました。

● 中鎖核酸の分析に適した移動相のまとめ

以上の実験より、中鎖核酸は長さによって、分離に最適な有機溶媒が異なることが分かりました。

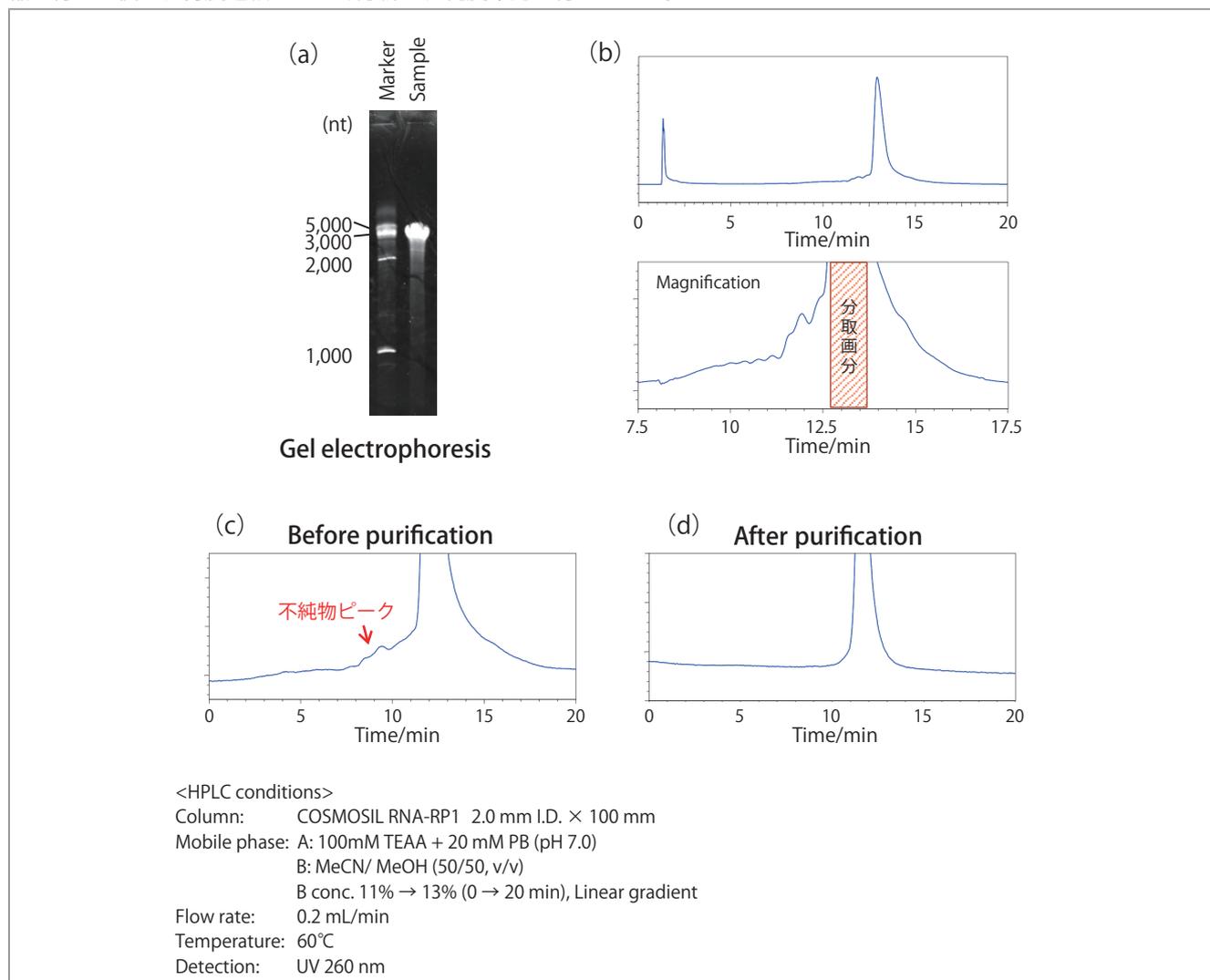
核酸鎖長	水系移動相	有機溶媒系移動相
100 nt ~ 500 nt程度	TEAA-PB	MeCN
500 nt ~ 1,000 nt程度		MeCN + MeOH 混合溶液

■ スーパーワイドポアカラムを用いた長鎖核酸の分析結果

長鎖核酸の分析方法については、Technical Note 27 に詳細がありますので、ご参照ください。本資料では、Technical Note 27 では説明されていない分取精製のデータを掲載しています。

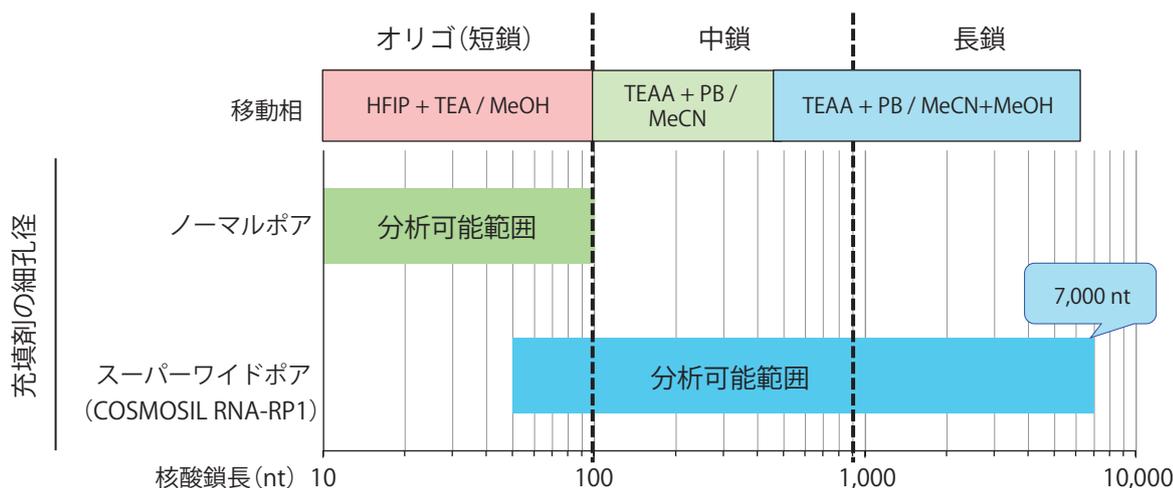
● *in vitro* 転写で合成した ssRNA の分取精製と純度確認

pQBI-T7-GFP ベクターの塩基配列を基に、*in vitro* 転写で 4.8 knt の ssRNA を合成しました。この ssRNA を尿素変性 PAGE および逆相 HPLC で分析し、純度確認を行いました。その後、逆相 HPLC でメインピークを分取、RNA 精製キットで脱塩濃縮を行った後に、再度逆相 HPLC で分析し、純度確認を行いました。



in vitro 転写で合成した 4.8 knt の ssRNA を尿素変性 PAGE で分析したところ、不純物は確認されませんでした [(a)]。同サンプルを HPLC で分析したところ、メインピークのほかに不純物由来と考えられる複数のピークが確認されました [(c)]。メインピークを分取 [(b)]、脱塩精製したサンプルを再度 HPLC で分析したところ、不純物由来と考えられるピークは消失していました [(d)]。以上の結果から、尿素変性 PAGE では分離が難しい不純物を HPLC では分離可能であることが示されました。

■ 核酸の鎖長と適した充填剤の細孔径および移動相



本研究における ssRNA の分析結果より、短鎖・中鎖・長鎖の各核酸鎖長に適した移動相と細孔径は上図のようになりました。

■ 参考文献

- [1] Ozaki M, Kuwayama T, Shimotsuma M, Hirose T. Anal. Methods. 2024;16:1948-1956. <https://doi.org/10.1039/D4AY00114A>
※ Featured on Front Cover
- [2] Kuwayama T, Ozaki M, Shimotsuma M, Hirose T. Anal. Sci. 2023;39:417-425. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00253-w>
※ Selected as Hot Articles 2023
- [3] 尾崎 誠, 桑山 知美, 下間 志士, 廣瀬 恒久, Medical Science Digest, Vol.49, 12 月臨時増刊号 核酸医薬が飛躍する時



Analytical Methods 誌の Front Cover に掲載されたカバーアートと Analytical Sciences 誌に選定された Hot Articles 2023 の賞状

■ 本研究の関連製品情報

製品名	規格	製品番号	容量 / サイズ 内径 × 長さ (mm)	価格	
コスモコア 2.6C ₁₈ パックドカラム	SP (高速液体クロマトグラフ用)	12614-71	2.1 mm I.D. × 100 mm *	93,000	
		12598-01	4.6 mm I.D. × 100 mm	95,000	
コスモシール 3C ₁₈ -MS-II パックドカラム		34367-41	2.0 mm I.D. × 100 mm	50,000	
		38067-51	4.6 mm I.D. × 100 mm	50,000	
コスモシール RNA-RP1 パックドカラム		21078-31	2.0 mm I.D. × 100 mm *	160,000	
		21079-21	4.6 mm I.D. × 100 mm	160,000	
		21080-81	10 mm I.D. × 100 mm	300,000	
1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール		SP (核酸分析用)	22298-34	50 mL	40,000
トリエチルアミン		GR	34805-75	500 mL	2,400
n-ヘキシルアミン		EP	18018-82	25 mL	2,300
酢酸	SP (高速液体クロマトグラフ用)	08963-02	25 mL	3,200	
アセトニトリル 劇		00430-83	3 L	19,000	
メタノール 劇		21929-23	3 L	4,700	
りん酸水素二ナトリウム	JIS 試薬特級 GR	31801-05	500 g	2,500	
りん酸二水素ナトリウム (無水)	GR	31720-65	500 g	2,700	

*本研究で使用したカラム

COSMOSIL COSMOCORE は、ナカライテスク株式会社の登録商標です。
コスモシール、コスモコア

ご注意ください 試験・研究用以外には使用しないでください。

※掲載内容は予告なく変更になる場合があります。

※掲載価格は 2024 年 7 月現在のものです (消費税は含まれていません)。

nacalai tesque
The quality for certainty.

● URL
<https://www.nacalai.co.jp/cosmosil/>

■ 販売取扱店

● 価格・納期のご照会
試薬は 5 日
0120-489-552

ナカライテスク株式会社

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町498

● 製品に関する技術的なご照会
<https://www.e-nacalai.jp/URL/?P=Contact>
TEL:075-211-2703