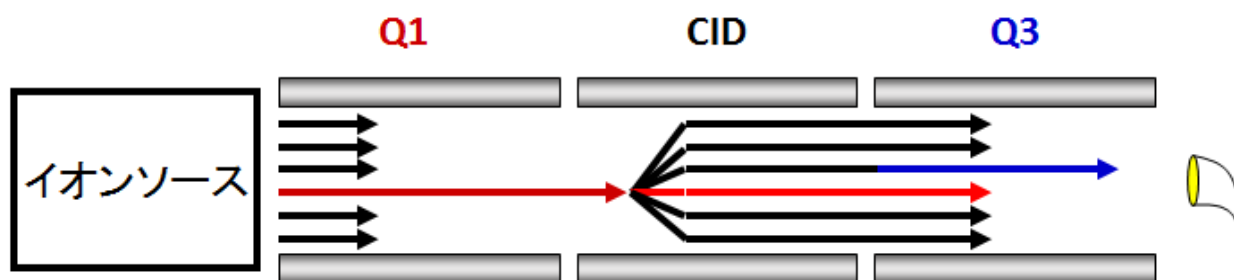


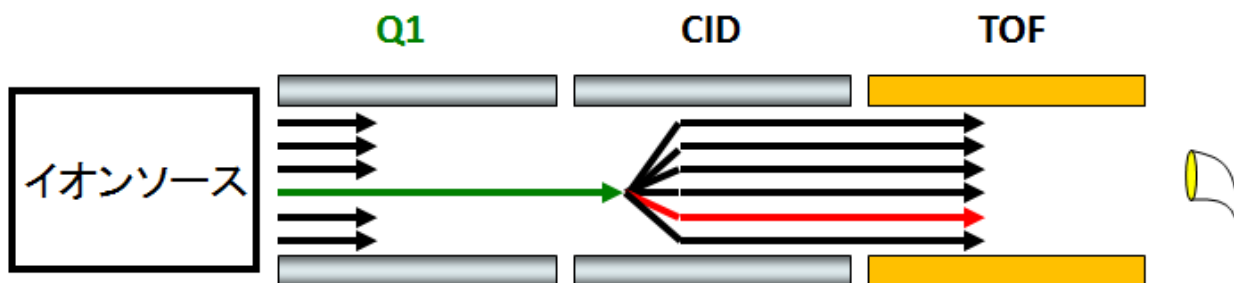
Skyline 並列反応モニタリング

Skyline では、イオントラップや Orbitrap、Q-TOF といったフルスキャンが可能な質量分析計の生データファイルから、クロマトグラフィーに基づく定量測定を抽出する複数の方法をサポートしています。Skyline は、質量分析計ベンダーである主要 6 社（Agilent、Bruker、SCIEX、島津製作所、Thermo-Scientific、Water）の装置の分析メソッドをサポートしており、高分解能分析でも低分解能分析でも十分に対応可能なアプローチ方法を採用しています。

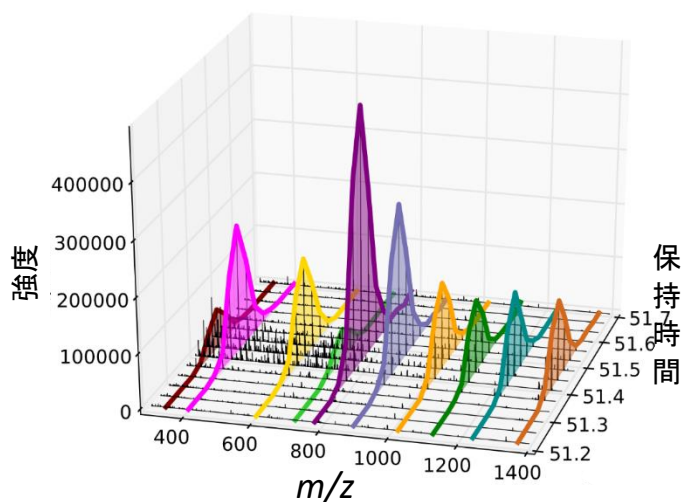
本チュートリアルでは Skyline を使用して、並列反応モニタリング（PRM）と呼ばれるターゲットアプローチで取得した MS/MS スペクトルを分析する方法を習得します。この方法は pseudo-SRM や MRM-HR™とも呼ばれます。これらの別名が示唆するとおり、PRM は Skyline が使用し始めた三連四重極質量分析計での SRM に最も類似しているフルスキャンメソッドです。



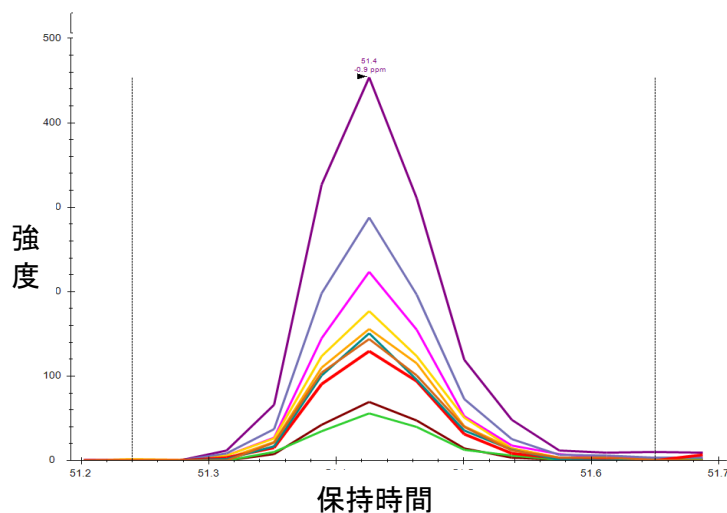
SRM がプリカーサーイオンとプロダクトイオンの複数のペアをスキャンして、経時的にサイクル内のそれぞれに対する単一強度の測定を収集していくのに対し、PRM はプリカーサーイオンのデータ非依存リストをスキャンして、経時的にサイクル内のそれぞれに対するすべての MS/MS スペクトルを収集していきます。



Skyline により、この分析法で取得されたフルスキャンデータから時間強度クロマトグラムが抽出されます。



結果として抽出されたクロマトグラムは、今ではすっかり慣れ親しまれている Skyline のユーザーインターフェイスで、三連四重極質量分析計から得られた SRM データに類似した定量的データを提供します。



PRM は、三連四重極質量分析計で時間がないときに代替法として使用できます。一方で、高分解能 MS/MS でのフィルタリングは、従来の SRM よりも選択性に優れていることがあり、収集されたスキャンデータをペプチド検索で処理すると積分されたクロマトグラムのピークを検証できます。また PRM は、主にペプチドスペクトルマッチングパイプラインのための MS/MS スペクトルの data dependent acquisition (DDA) に利用されていますが、様々なフルスキャン型装置でのシステム適合性試験にも使用できます。ただし、ID を使用しない品質管理方法については、別のチュートリアルで説明します。本チュートリアルでは、低分解能 Thermo LTQ および高分解能 Agilent Q-TOF におけるターゲット定量分析を目的とした PRM の使用について説明していきます。

はじめに

本チュートリアルを始める前に、次の zip ファイルをダウンロードしてください。

https://skyline.ms/tutorials/TargetedMSMS_2.zip

この中のファイルを、次のようにコンピュータ上のフォルダで解凍します。

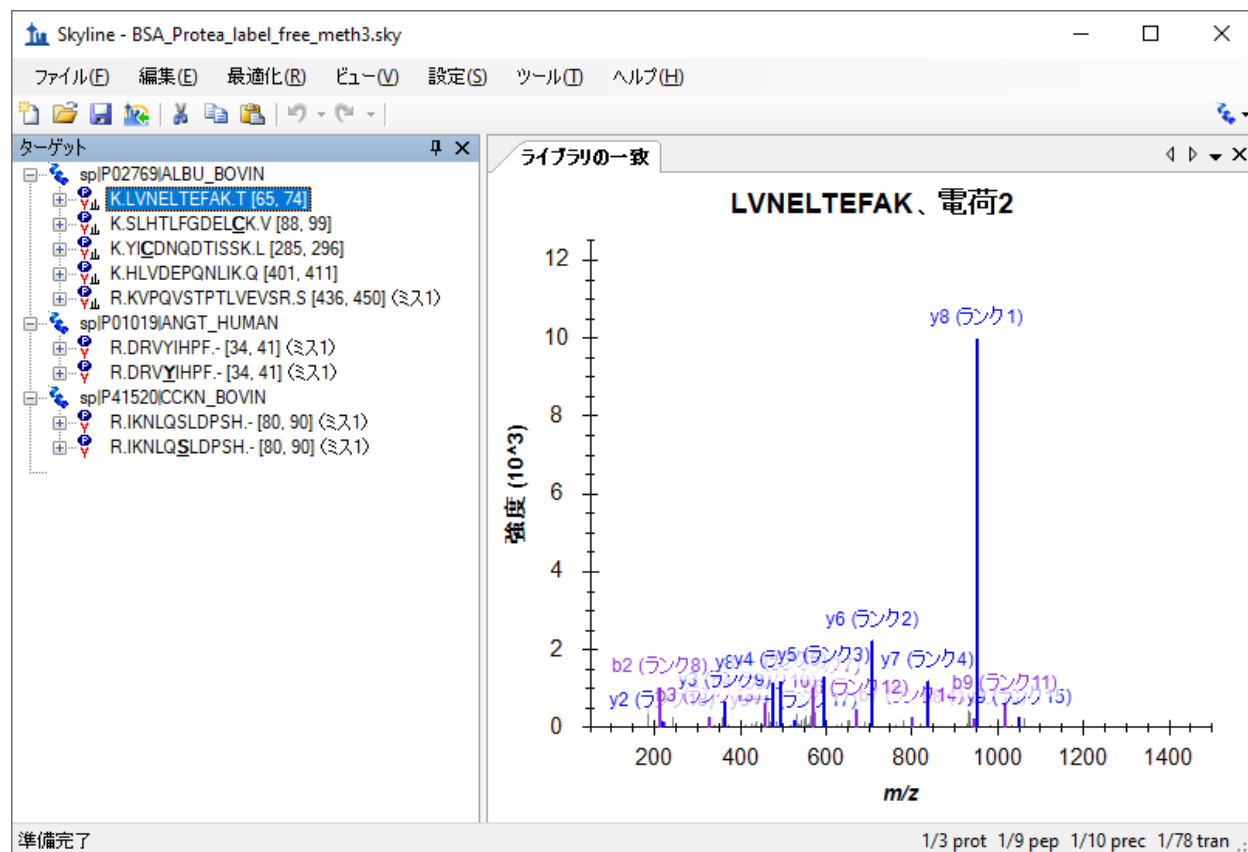
C:\Users\brendanx\Documents

これにより次の新しいフォルダが作成されます。

C:\Users\brendanx\Documents\TargetedMSMS

このフォルダには本チュートリアルに必要なすべてのファイルが含まれています。Windows Explorer で新しい「TargetedMSMS」フォルダに移動し、さらに「Low Res」というサブフォルダに移動します。低分解能 Thermo LTQ の PRM データの分析に使用する Skyline プロジェクトを開くには、「BSA_Protea_label_free_meth3.sky」ファイルをダブルクリックします。

ドキュメント内の最初のペプチドを選択すると、Skyline は以下ようになります。



これは比較的小きなドキュメントです。ステータスバー上の右下隅にあるインジケーターには、合計 78 個のプロダクトイオンまたはターゲットトランジションを有する 10 個のペプチドのプ

リカーサーイオンが含まれていることが示されています。このプリカーサーイオンの中には、ウシ血清アルブミン（BSA）について公開されている NST ライブラリの MS/MS ライブラリスpekトルと関連付けられているものもあります。また、他の 2 つのペプチド（ヒトとウシと 1 つずつ）では MS/MS ライブラリスpekトルにはない非修飾体とリン酸化修飾体として観測されています。

Skyline 内でこういった Skyline ドキュメントを作成することに慣れていない場合には、入門チュートリアルおよび取扱説明ビデオなどで Skyline のメソッド編集機能などを取り上げています。本チュートリアルでは、ターゲットプロテオミクスメソッドの編集を Skyline ですることに慣れているのを前提として、既存の Skyline ドキュメントから説明を始めていきます。

PRM 用の Skyline ドキュメントの設定

Windows Explorer で、この Skyline ドキュメントが入っていたのと同じ「Low Res」フォルダに 2 つの Thermo 生ファイルがあるのを確認します。これらのファイルには、下記のメソッドを使った上述の PRM アプローチで、低分解能の LTQ 装置で取得した一連の MS1 および MS/MS スペクトルが含まれています。

1. MS1 スキャン
2. MS/MS スキャン – parent m/z 582.32
3. MS/MS スキャン – parent m/z 473.90
4. MS/MS スキャン – parent m/z 722.34
5. MS/MS スキャン – parent m/z 653.36
6. MS/MS スキャン – parent m/z 820.47
7. MS/MS スキャン – parent m/z 547.32
8. MS/MS スキャン – parent m/z 523.77
9. MS/MS スキャン – parent m/z 563.76
10. MS/MS スキャン – parent m/z 417.89
11. MS/MS スキャン – parent m/z 444.55

Skyline では、Thermo-Scientific、Bruker、および SCIEX の装置用にこのような PRM メソッドをエクスポートすることが可能です。Agilent および Waters の装置や Thermo Q Exactive の場合は、Skyline が SRM トランジションリストの PRM 版のような単離リストをエクスポートできます。フルスキャン装置用のメソッドをエクスポートする前に、まずフルスキャンデータ分析用のドキュメントを設定しておく必要があります。

現在のドキュメントを本チュートリアルで提供されている Thermo の生ファイルの分析用に設定するには、以下の手順を実施します。

- [設定]メニューで[トランジション設定]をクリックします。
- [フルスキャン]タブをクリックします。

本ドキュメントは、まだフルスキャンデータからのクロマトグラム抽出用に設定されていません。このままでも SRM データを問題なく分析できますが、フルスキャンデータのファイルをインポートするには、少し設定変更が必要です。[フルスキャン] タブは以下のようになります。

The image shows a software dialog box titled "トランジションの設定" (Transition Settings) with a close button (X) in the top right corner. The dialog has several tabs: "予測" (Prediction), "フィルタ" (Filter), "ライブラリ" (Library), "装置" (Instrument), and "フルスキャン" (Full Scan), with "フルスキャン" currently selected. The "MS1フィルタ(M)" section contains: "含まれる同位体ピーク(I):" (Included isotope peaks) with a dropdown menu showing "なし" (None); "プリカーサー質量アナライザー(P):" (Precursor mass analyzer) with a dropdown menu; "ピーク(K):" (Peak) with an input field; "分解能(Q):" (Resolution) with an input field and "m/z" label; and "同位体標識濃縮(B):" (Isotope labeling enrichment) with a dropdown menu. The "MS/MSフィルタ(S)" section contains: "取得メソッド(C):" (Acquisition method) with a dropdown menu showing "None"; "プロダクト質量分析(M):" (Product mass analysis) with a dropdown menu; "単離スキーム(L):" (Isolation scheme) with a dropdown menu; and "分解能(Q):" (Resolution) with an input field and "m/z" label. Below these sections is a checkbox labeled "高選択性の抽出を使用します" (Use high selectivity extraction), which is currently unchecked. The "保持時間のフィルタ" (Retention time filter) section has three radio button options: "のスキャンのみを使用します 5" (Use only the scan 5), "のスキャンのみを使用します 5" (Use only the scan 5), and "一致する全てのスキャンを含める" (Include all matching scans). At the bottom of the dialog are "OK" and "キャンセル" (Cancel) buttons.

フルスキャンデータからクロマトグラムを抽出するには、Skyline にさらに情報を入力する必要があります。

- MS1 フィルタの場合は、[含まれる同位体ピーク] ドロップリストから「数」を選択します。
- [プリカーサー質量アナライザー] ドロップリストから「QIT」を選択します。
- MS/MS フィルタでは、[取得メソッド] ドロップリストから「Targeted」を選択します。

[フルスキャン] タブは以下のようになります。

トランジションの設定

予測 フィルタ ライブラリ 装置 フルスキャン

MS1フィルタ(M)

含まれる同位体ピーク(I): 数
プリカーサー質量アナライザ(P): QIT

ピーク(K): 1
分解能(Q): 0.7 m/z

同位体標識濃縮(B):

MS/MSフィルタ(S)

取得メソッド(C): Targeted
プロダクト質量分析(M): QIT

単離スキーム(L):
分解能(Q): 0.7 m/z

高選択性の抽出を使用します

保持時間のフィルタ

のスキャンのみを使用します 5
 のスキャンのみを使用します 5
 一致する全てのスキャンを含める

OK キャンセル

MS1 と MS/MS フィルタの両方が有効化されている場合、すべてのプリカーサーイオンのクロマトグラムは MS1 スペクトルからのみ抽出され、すべてのフラグメントイオンのクロマトグラムは MS/MS スペクトルからのみ抽出されます。MS/MS スキャン内でプリカーサーイオンがどのように表示されるかを見るには、MS1 フィルタが無効になっているドキュメントを使用する必要があります。

Skyline では、デフォルトで [保持時間のフィルタ] の設定が [予測された保持時間 (分) のスキャンのみを使用します] となっていますが、この設定は赤でハイライト表示されています。赤字のテキストにマウスカーソルを合わせると、「このドキュメントのスペクトルライブラリには、このドキュメント内のペプチドの保持時間情報が含まれていません。」というヒントが表示

示されます。この設定はクロマトグラムを抽出する時間範囲を狭めるためのものですが、関連する保持時間を持つ MS/MS ID がないため、スペクトルライブラリの設定を変更しない限り、Skyline は一致するすべての MS/MS スペクトルからクロマトグラムを抽出しなければならないということを警告しています。ただし、本実験では、ターゲット MS/MS スペクトルの検索に由来するペプチドデータをインポートします。以下の操作を行って、クロマトグラムの抽出範囲をもう少し狭めます。

- 抽出範囲を「5」分から「2」分に変更します。

これによって Skyline のファイルサイズが大幅に縮小し、インポート時間が加速してクロマトグラムのピーク選択を改善できます。

MS/MS ライブラリのスペクトルとのマッチングが、Skyline が抽出するクロマトグラムに正しく対応するようにするには、フルスキャン設定の MS/MS 分解能がライブラリのイオン許容誤差と一致するかを確認する必要があります。このデータセットについては、以下の手順を実施します。

- [ライブラリ] タブをクリックします。
- [イオン許容誤差] フィールドに、「0.7」と入力します。

[ライブラリ] タブは以下のようになります。

トランジションの設定

予測 フィルタ ライブラリ 装置 フルスキャン

イオン許容誤差 (I):
0.7 m/z

ライブラリスpekトルが利用可能な場合、最も強度の高いイオンを選択 (S)

選択 (P):
6 プロダクトイオン
最小プロダクトイオン数

フィルタされたイオンの電荷数とイオンのタイプから (C)
 フィルタされたイオン電荷とタイプ、およびフィルタされたプロダクトイオン (L)
 フィルタされたプロダクトイオンから (D)

OK キャンセル

これでライブラリイオン一致ウィンドウはクロマトグラム抽出ウィンドウと同じになります。クロマトグラム抽出ウィンドウは m/z で変化するため、高分解能データではこれがもう少し複雑になることがあります。今後はチェックボックスを追加してこれら 2 つの設定を一致させていくことを検討中ですが、現時点では 0.05~0.01 の間の値が高分解能データに最も適しています (MS/MS 質量アナライザーの分解能設定による)。

MS1 フルスキャン設定は、モノアイソトピックのプリカーサーピークを結果ファイルの MS1 スキャンから抽出することを示しているため、ドキュメント内ではそのプリカーサーイオンのトランジションが含まれていることを確認するとよいでしょう。Skyline は [フィルタ] タブの [イ

オンタイプ]フィールドですでに「p」（プリカーサーを意味する）を追加していますが、念のため確認します。

- [フィルタ]タブをクリックします。

[フィルタ]タブは以下のようになります。

トランジションの設定

予測 フィルタ ライブラリ 装置 フルスキャン

ペプチド

プリカーサーイオンの電荷 (P): 電荷 (Q): イオンタイプ (I):
2, 3 1, 2, 3 y, b, p

プロダクトイオンの選択

開始点 (E): 終了点 (Q):
m/z > プリカーサー 6個のイオン

特別なイオン (S):

- N-terminal to Proline
- C-terminal to Glu or Asp
- iTRAQ-114
- iTRAQ-115
- iTRAQ-116
- iTRAQ-117

リストを編集 (E)...

プリカーサーm/z/exclusionウィンドウ (X):
 m/z

OK キャンセル

- [OK] ボタンをクリックします。

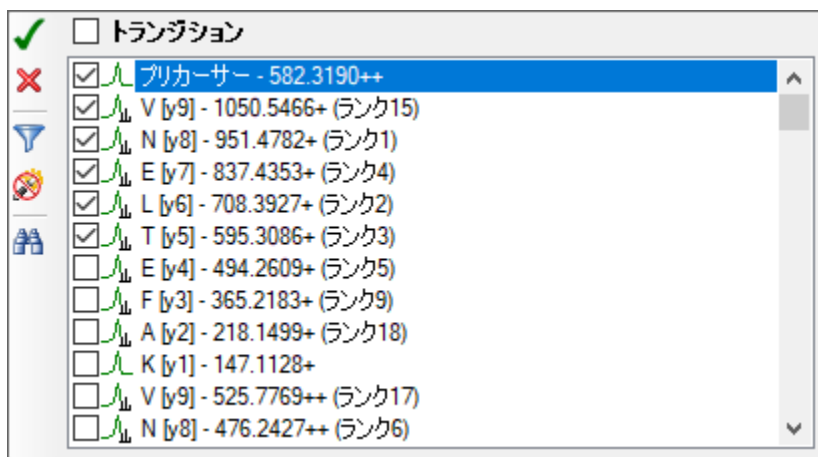
各ペプチドプリカーサー項目にプリカーサートランジションが含まれていることを確認するには、以下の操作を行います。

- [編集]メニューで[すべて展開]を選択し、[プリカーサー] (Ctrl+W) をクリックします。

残念ながら、本ドキュメントではすべてのプリカーサーが手動で編集されているため、Skylineは[フィルタ]タブの変更に応じたトランジションの変更をしません。そこで、以下のようにプリカーサートランジションを手動で追加する必要があります。

- 最初のプリカーサー「582.3190++」にマウスカーソルを合わせ、右側のドロップ矢印をクリックします。
- 表示されるポップアップ選択リスト上部にあるプリカーサートランジションのチェックボックスをオンにします。

フォームは以下ようになります。



- 緑のチェックボタン (Enter) をクリックします。

ドキュメント内のその他の9つのプリカーサーそれぞれについてこの手順を繰り返します。これらの変更が完了したら、最初のペプチドを再度選択します。

これでドキュメントは、PRM データで作業できるよう設定されました。また、これを使用してLTQ装置のPRMメソッドをエクスポートすることもできます。

PRM メソッドのエクスポート

Skyline ドキュメントからのメソッドのエクスポートは、そのメソッドを実行する装置制御用コンピュータで行うのが最適です。何故かという、ほとんどの装置ベンダーがメソッド編集ソフトウェアの設計時点で、その他の設定がされている状態でもソフトウェアが動作するように考慮していないからです。Skyline はこれらのベンダーのライブラリを使用しなければならず、このために使用予定のテンプレートメソッドを変更する必要があります。一部のケースでは、個人コンピュータ上でベンダーソフトウェアを装置制御コンピュータ環境と同じように設定することも可能ですが、推奨はしません。Skyline ドキュメントはご利用の個人コンピュータで編

集し、その後で装置制御用コンピュータに転送して最終的なメソッドのエクスポートを行う方がよいでしょう。

したがって、現在のドキュメント用の Thermo LTQ メソッドをエクスポートするには、まず Thermo LTQ 用の装置制御コンピュータにドキュメントを転送し、その後以下の手順を実施します。

- [ファイル]メニューで[エクスポート]を選択し、[メソッド]をクリックします。
- [装置タイプ] ドロップリストでは、デフォルトで「Thermo LTQ」に設定されています。
- [シングルメソッド]を選択します。
- [メソッドタイプ]ドロップリストで「標準」を選択します。
- [テンプレートファイル]フィールド横の[参照]ボタンをクリックします。
- これを LTQ 上で行っている場合は、シングル MS1 スキャンを含む装置のテンプレートメソッドが含まれているフォルダに移動します。
そうでない場合は、本チュートリアル用に作成した「TargetedMSMS」フォルダにある「Low Res」サブフォルダに移動します。
- これを LTQ 上で行っている場合は、テンプレートメソッドをダブルクリックします。
そうでない場合は、本チュートリアルと共に提供されている「TargetedMSMS_template.meth」ファイルをダブルクリックします。

[メソッドをエクスポート] フォームは以下ようになります。

メソッドをエクスポート

装置タイプ(U): Thermo LTQ

OK

キャンセル

シングルメソッド(S)

タンパク質毎に1つのメソッド(O) m/zの順に並べる

複数メソッド(M) タンパク質を無視(R)

試料インジェクション毎の最大プリカーサー数(X):

メソッド: 1

最適化(Z): なし

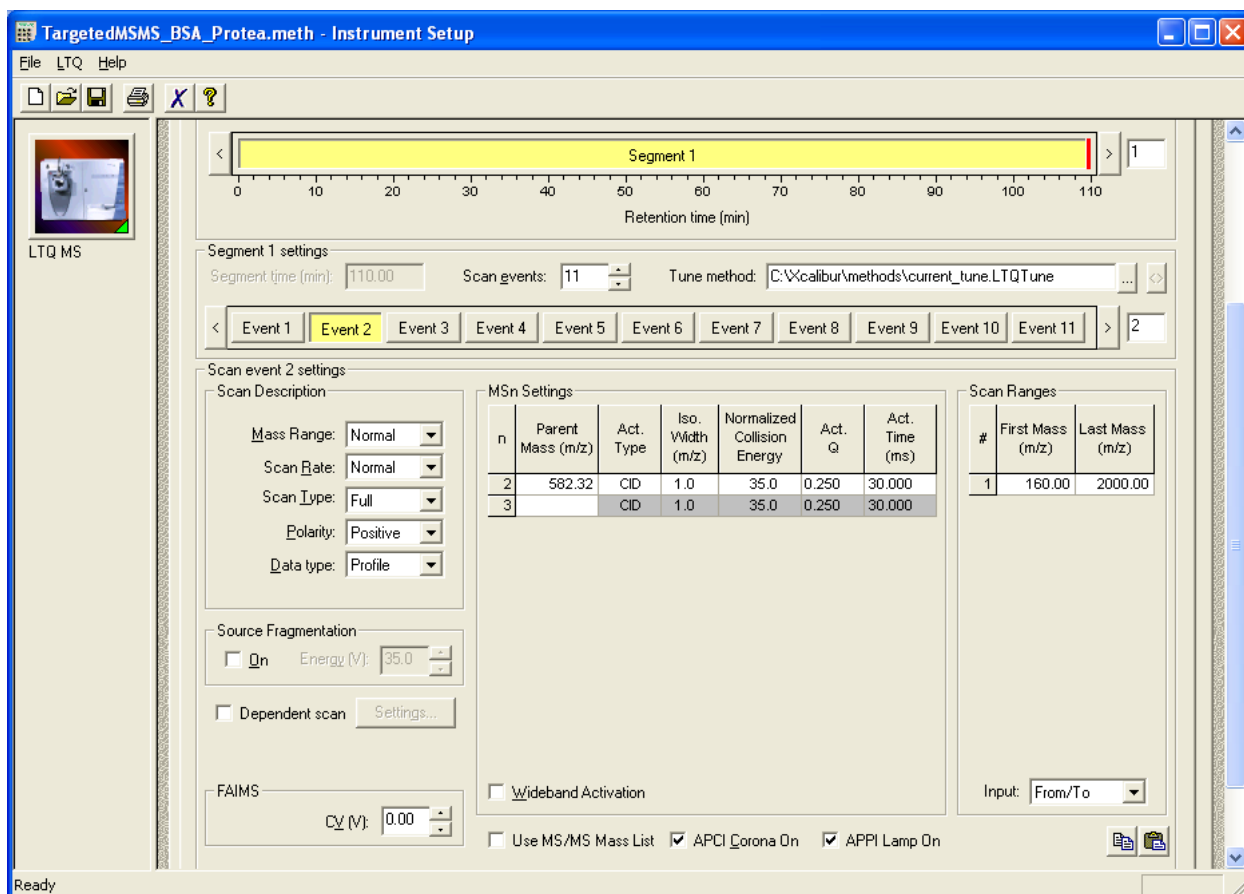
メソッドタイプ(T): 標準

テンプレートファイル(E): .ow Res\TargetedMSMS_template.meth 参照(B)...

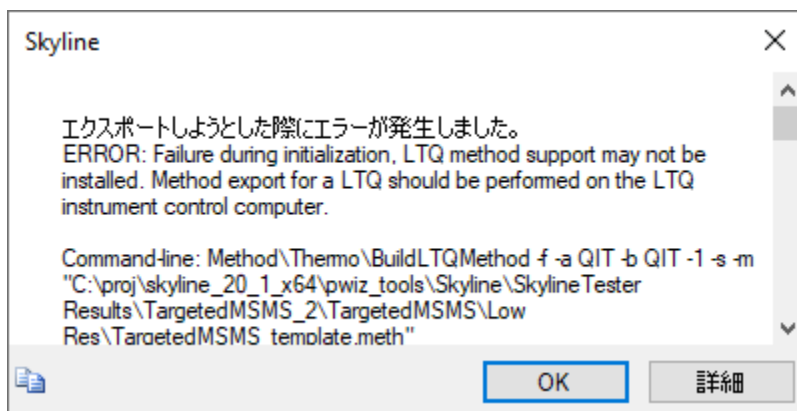
- [OK] ボタンをクリックします。
- 表示される [Thermo LTQ メソッドをエクスポート] フォームで、メソッドを保存するフォルダに移動します。
- [ファイル名] フィールドに、「TargetedMSMS_BSA_Protea.meth」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

実際にこの手順を Thermo LTQ 上で行った場合、この操作で指定した新しい

「TargetedMSMS_BSA_Protea.meth」ファイルが作成されます。当該ファイルをダブルクリックすると、その後、LTQ 装置の設定ソフト上では以下のような画面が表示されます。



または、Skyline によって以下のエラーメッセージが表示されます。



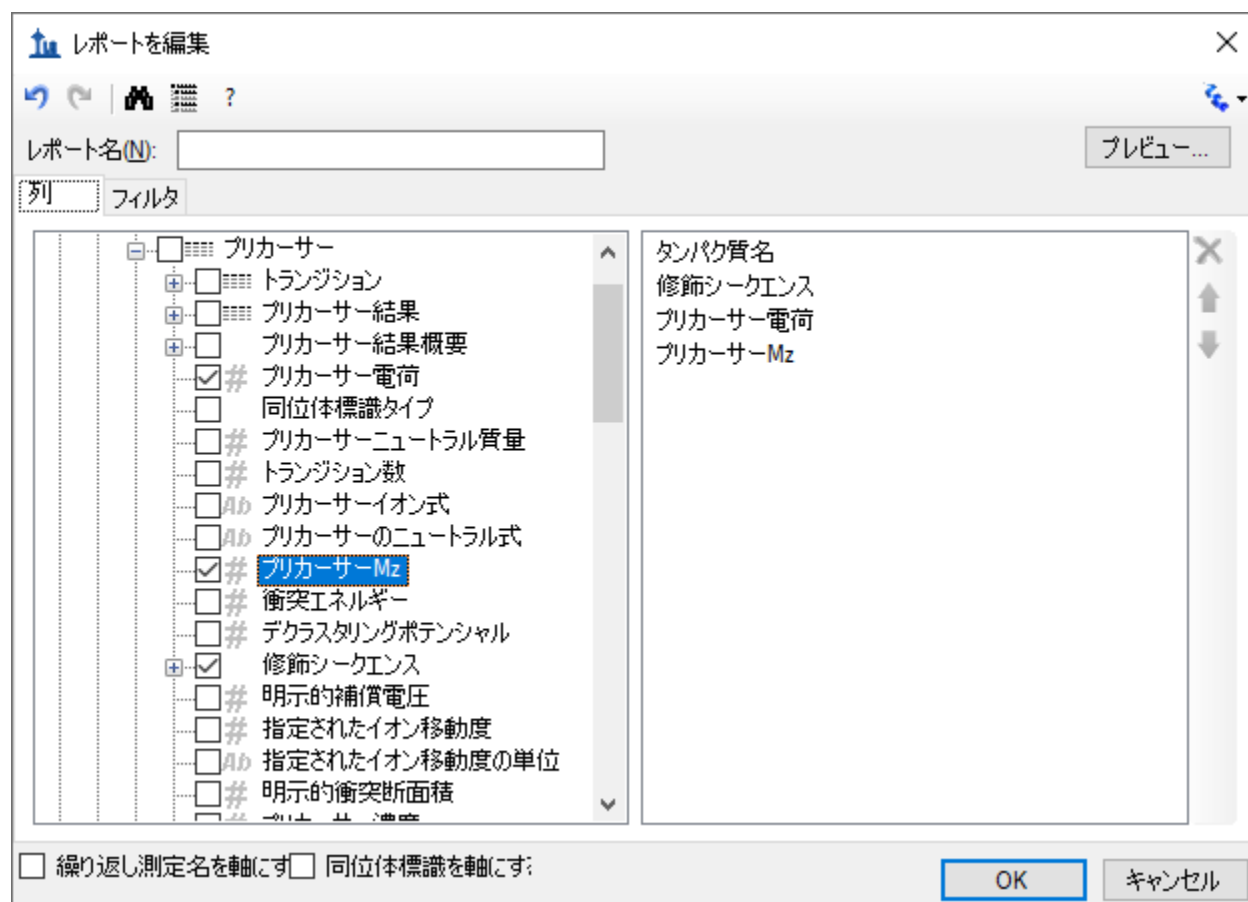
[OK] ボタンをクリックしてチュートリアルに残りの操作を続けます。Thermo Ion Trap and Fusion、Bruker QTOF および SCIEX QTOF の装置制御用コンピュータでも同様の手順が動作します。[ファイル]>[エキスポート]>[Agilent TOF および Thermo Q Exactive 装置の単離リスト]からも行えます。

このような小さなドキュメントでは、ドキュメント内の特定のプリカーサー m/z 値について MS1 スキャンを 1 回および MS/MS スキャンを 10 回設定する必要があるだけなので、上記のよ

うなメソッドを手動で作成できます。この目的のためのプリカーサー m/z を含むレポート作成には、以下の手順を実施します。

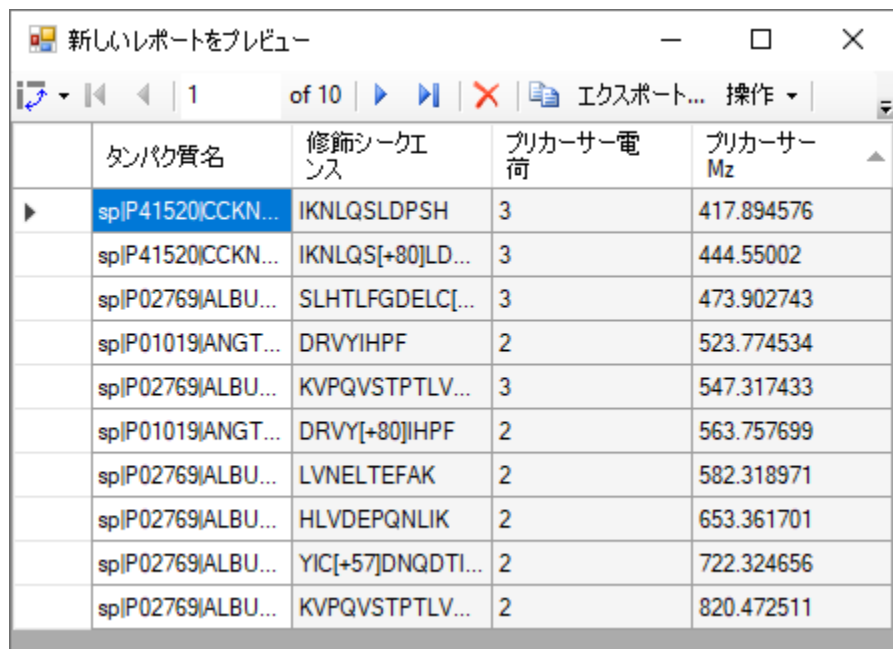
- [ファイル]メニューで[エクスポート]を選択し、[レポート]をクリックします。
- [レポートをエクスポート]フォームで[リストを編集]ボタンをクリックします。
- [レポートを編集]フォームの[追加]ボタンをクリックします。
- [レポートを編集]フォームで以下の項目を追加します。
 - タンパク質名
 - 修飾シーケンス
 - プリカーサー電荷
 - プリカーサーMz

[レポートを編集]フォームは以下のようになります。



- [プレビュー]ボタンをクリックします。
- [新しいレポートをプレビュー]フォームで、「プリカーサーMz」列ヘッダーをクリックします。

[レポートをプレビュー] フォームは以下ようになります。



| タンパク質名 | 修飾シーケンス | プリカーサー電荷 | プリカーサーMz |
|-------------------|-------------------|----------|------------|
| sp P41520 CCKN... | IKNLQSLDPSH | 3 | 417.894576 |
| sp P41520 CCKN... | IKNLQS[+80]LD... | 3 | 444.55002 |
| sp P02769 ALBU... | SLHTLFGDELIC... | 3 | 473.902743 |
| sp P01019 ANGT... | DRVYIHPF | 2 | 523.774534 |
| sp P02769 ALBU... | KVPQVSTPTLV... | 3 | 547.317433 |
| sp P01019 ANGT... | DRVY[+80]IHPF | 2 | 563.757699 |
| sp P02769 ALBU... | LVNELTEFAK | 2 | 582.318971 |
| sp P02769 ALBU... | HLVDEPQNLIK | 2 | 653.361701 |
| sp P02769 ALBU... | YIC[+57]DNQDTI... | 2 | 722.324656 |
| sp P02769 ALBU... | KVPQVSTPTLV... | 2 | 820.472511 |

このフォームにはプリカーサー m/z が表示されており、現在、直接メソッドエクスポートをサポートしていない装置であっても、このドキュメントの PRM メソッドの設定に時間はかからないはずですが。実際に、これから調べようとしているデータの元のメソッドはこの方法で作成されています。多くの PRM 実験は、Skyline においてもスケジューリングアルゴリズムが急速に重要となった SRM と同様、スケジュール化されたデータ取得に依存するようになってきていることに注意してください。

フルスキャンデータのインポートと確認

本ドキュメント用のペプチド検索結果と Thermo LTQ で収集した 2 つの生データファイルの両方をインポートするには、以下の手順を実施します。

- 開いているすべてのフォームが閉じたら、Skyline のメインウィンドウのみが残るまで Esc キーを押します。
- [ファイル] メニューで [インポート] を選択し、[ペプチド検索] をクリックします。

Skyline には以下のようなウィザードが表示されます。

ペプチド検索のインポート

スペクトルライブラリ

構築(B) 既存を使用する(U)

カットオフスコア(C):
0.95

開始(M):
検索結果(ライブラリを直接構築)

結果ファイル:
[空欄] ファイルを追加(A)...
[空欄] ファイルを削除(O)

iRT標準ペプチド(I):
なし

曖昧な一致を含める(I)
 ドキュメント内のペプチドをフィルタリング(E)

ワークフロー
 MS1フィルタを用いたDDA
 DIA
 PRM

完了(F) 次へ(N) > キャンセル

このフォームの最初のページは、Skyline ドキュメントのスペクトルライブラリの構築に使用可能です。これを行うには、以下の手順を実施します。

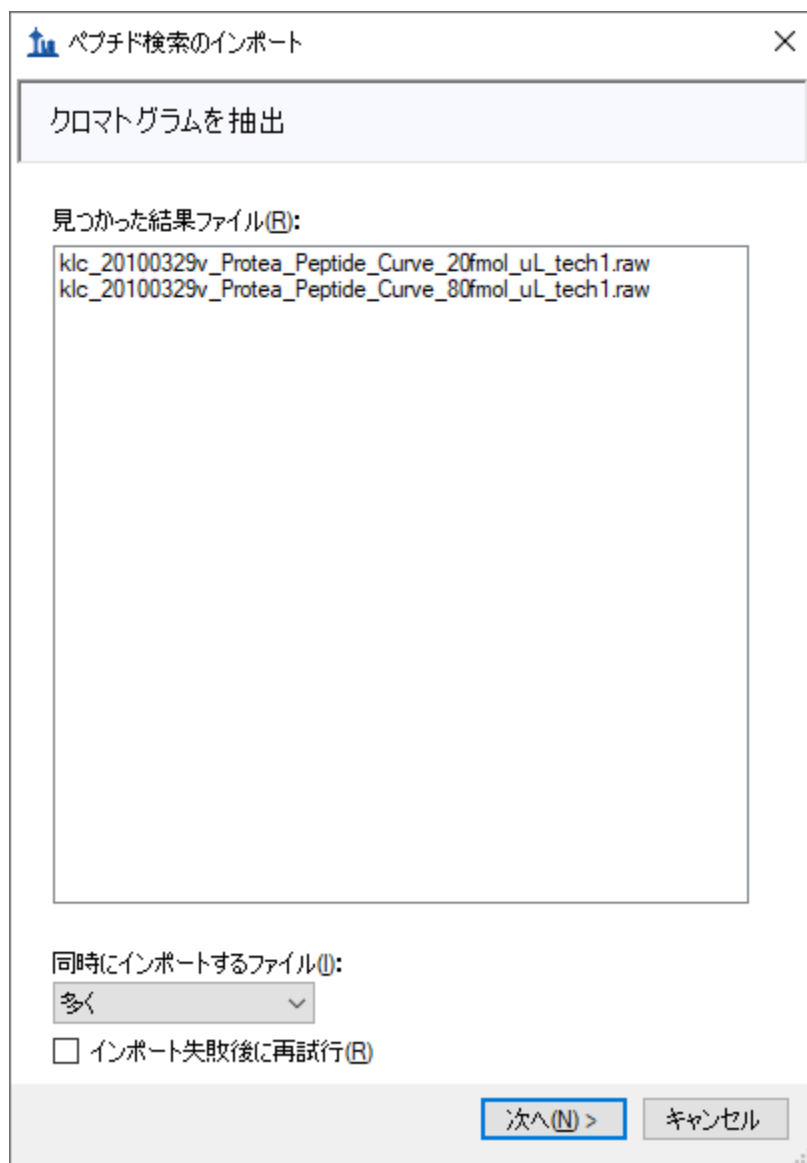
- [カットオフスコア] フィールドに「0.99」と入力します。
- [ドキュメント内のペプチドをフィルタリング] チェックボックスをオンにして、ドキュメント内のペプチドを同定するスペクトルのみを残すようにします。
- [ペプチド検索のインポート] フォームの [ファイルを追加] ボタンをクリックします。
- 「Low Res」フォルダの「search」サブフォルダに移動します。
- [ファイル名] フィールドに「*.xml」と入力します。
- Ctrl キーを押したまま、このフォルダ内の.perc.xml で終わる 2 つのファイルをクリックします。
- [入力ファイルを追加] フォームで [開く] ボタンをクリックします。

フォームは以下のようになります。

- [次へ] ボタンをクリックします。

Skyline は本実験用の PRM データで実行された Sequest/Percolator ペプチド検索の結果からスペクトルライブラリを構築し始め、同時に進行状況フォームを表示します。このステップを完了すると、Skyline はペプチド検索スペクトルソースファイルまたは Skyline ドキュメントに生データファイルがないか検索します。ここでは、一致する Thermo の生ファイルが 2 つ見つかります。一致するデータファイルが見つからなかった場合は、ファイルを検索するよう求められます。

ウィザードフォームは以下のようになり、Skyline がクロマトグラム抽出に使用するファイルが表示されます。



- [次へ] ボタンをクリックします。

Skyline はこれらの長いファイル名に共通のプレフィックスやサフィックスがあることを検知し、それを削除するように提案して以下のようなフォームを表示します。

結果をインポート

選択したファイルには共通のプレフィックスとサフィックスがあります。プレフィックスまたはサフィックスの一部または全部を削除して、Skylineで使用する名前を短くしますか？

削除しない

削除(R)

共通プレフィックス(C):
klc_20100329v_Protea_Peptide_Curve_

共通サフィックス(S):
_uL_tech1

繰り返し測定名(N):
20fmol
80fmol

OK キャンセル

Skyline はこのような繰り返し測定名をグラフィカルやその他の UI 要素で表示するため、このように短い名前にしてしまう方が良いでしょう。ここでは短くなった名前で続けます。

- [OK] ボタンをクリックします。

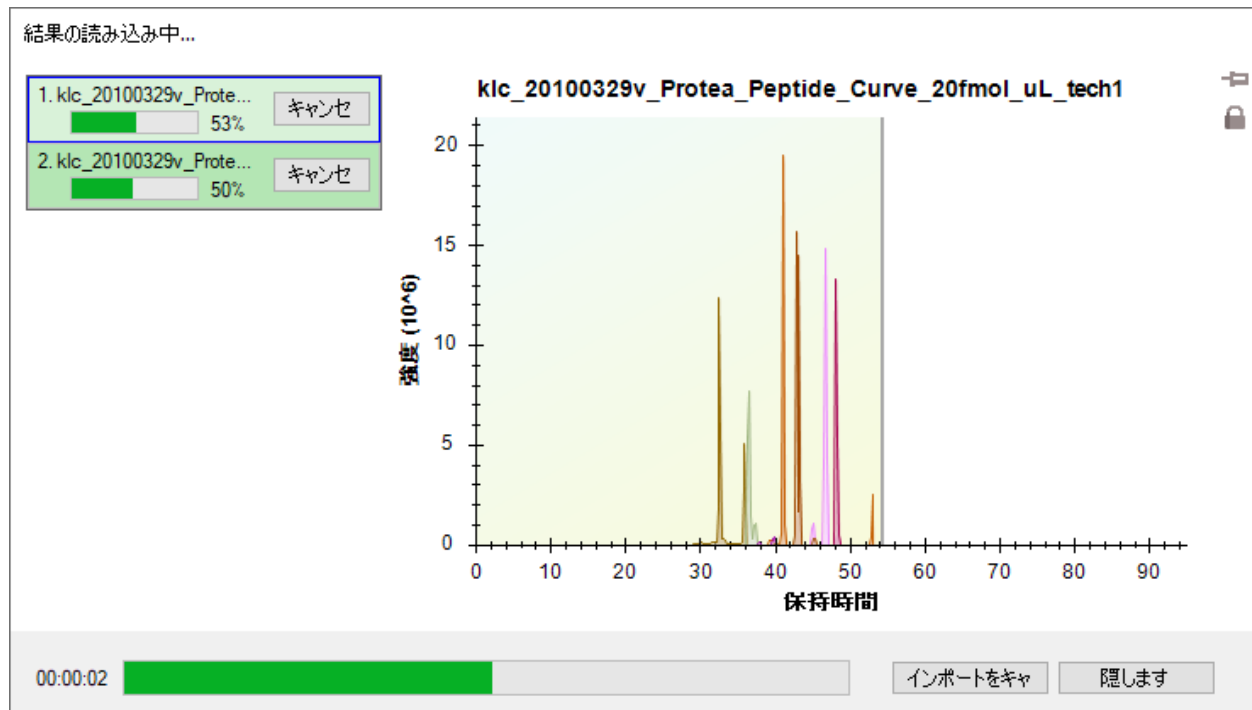
Skyline はすでに調整された複数のトランジション設定を表示します。これらの設定は、[MS1 フルスキャンフィルタチュートリアル](#)のように白紙状態から始めるときに有用となりますが、ここでは変更する必要はありません。

- ウィザードフォームで[次へ]ボタンをクリックします。

これで Skyline にフルスキャン設定が表示されるようになります。ここでもこのデータセットに対してはすでに調整が済んでいます。

- [完了] ボタンをクリックします。

ファイルのインポートが開始され、Skyline ウィンドウおよび[クロマトグラムの読み込み] フォームの下部にあるステータスバーに進行状況が表示されます。

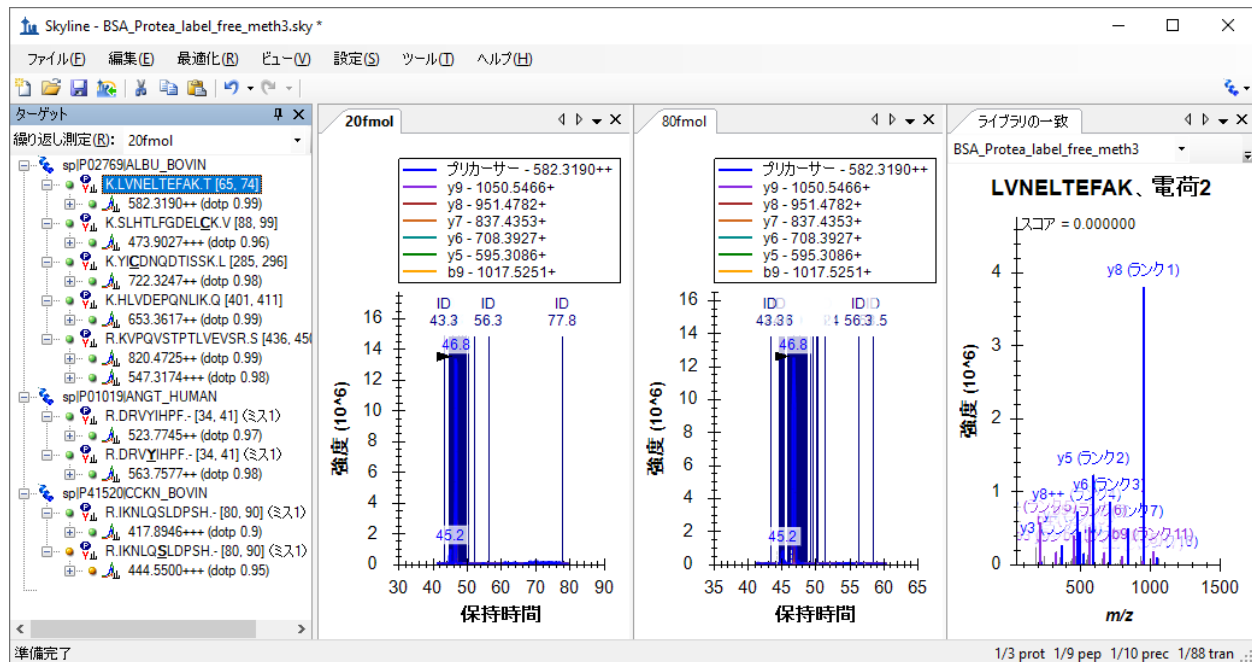


データの確認

ターゲットクロマトグラムがピークから抽出・分析されている間に、以下の操作を行って抽出されたクロマトグラムの表示を準備できます。

- [ビュー]メニューで[グラフを配置]を選択し、[タイトル] (Ctrl+T) をクリックします。
- [編集]メニューで[すべて折り畳む]を選択し、[プリカーサー] (Ctrl+Shift+W) をクリックします。

インポートが完了すると、Skyline ウィンドウは以下ようになります。



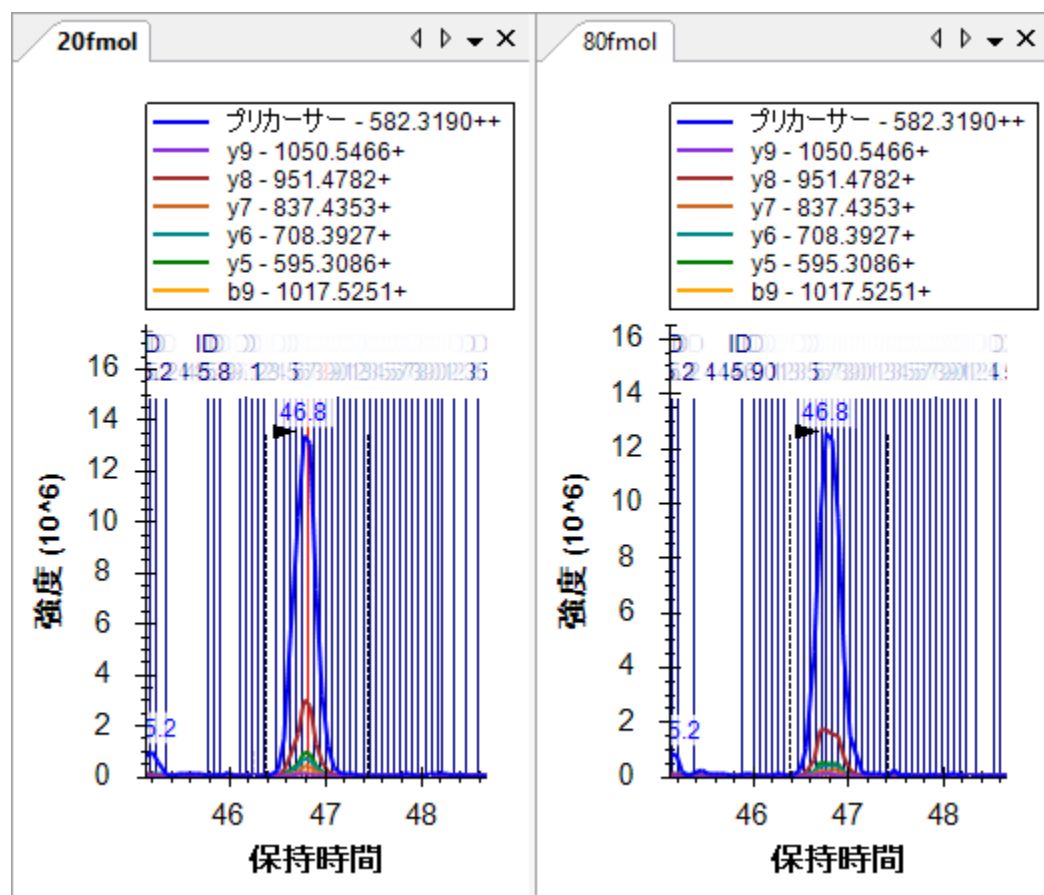
この表示には濃い青の縦線、「ID」の文字および同定されたスペクトルの分単位の時間が注釈付けられたスペクトルIDが多数あるため、クロマトグラムを確認しづらいことがあります。選択したクロマトグラムピークが、その頂点を示す黒の矢印ポイント付きで、これらのIDの真ん中に表示されます。

ここでクロマトグラムのピーク強度 (1.4×10^7) が、4:1 で希釈したものよりもかなり似ているということに気付かれるかもしれません。これは、ドキュメント内のその他の2つのタンパク質の希釈において、BSA タンパク質断片概要を常在するバックグラウンド物質として使用したためです。

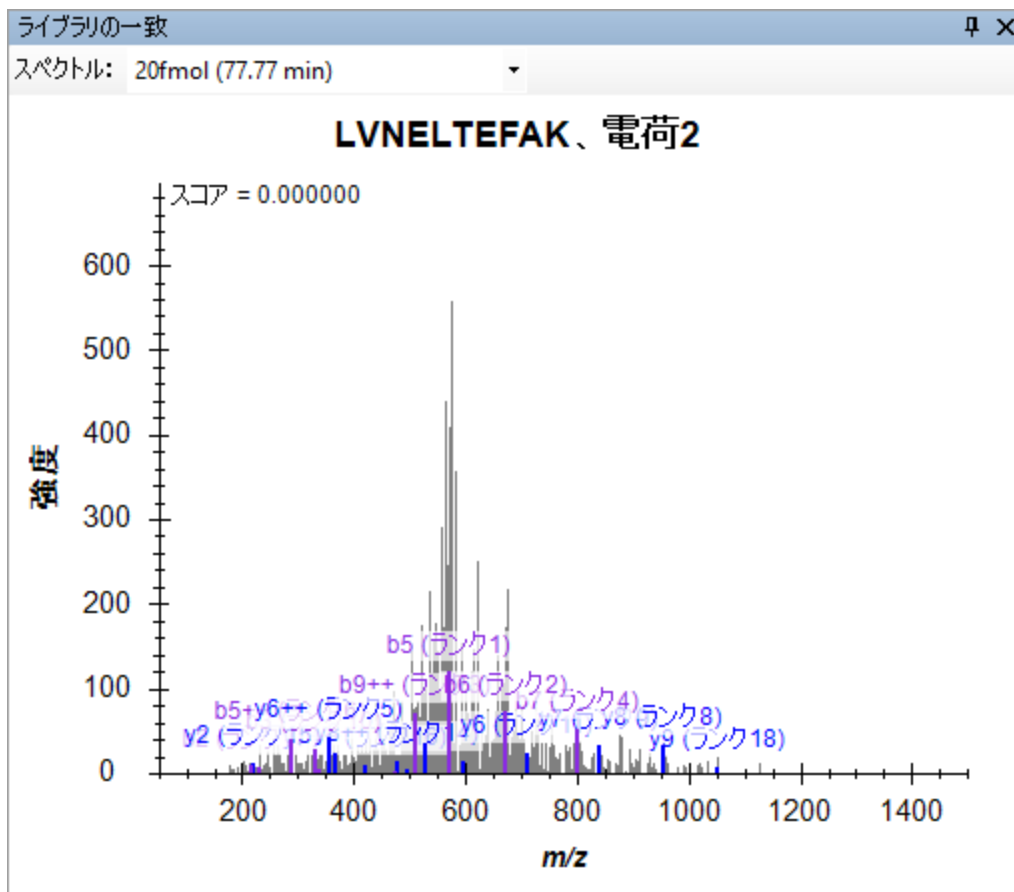
Skyline でこのフルクロマトグラム表示が表示されている場合は、以下の操作を行ってクロマトグラムの積分ピークにズームインします。

- [ビュー] メニューで [自動ズーム] を選択し、[最適ピーク] (F11) をクリックします。

クロマトグラムグラフは以下のようになります。



これでターゲットペプチドとして同定されたスペクトルの個々の線が見えるようになりました。よく見てみると、20fmol 試料のクロマトグラムピークの真ん中に赤い線が見えます。これは、[ライブラリの一致] 表示で現在示されているスペクトルであり、BiblioSpec ライブラリ構築ツールが「最良スペクトル」として選択したものです。クロマトグラムプロット内の線をクリックするか、[ライブラリの一致] 表示の上部にあるドロップダウンリストをクリックしてスペクトル時間のリストから選択すると、[ライブラリの一致] 表示にある他のスペクトルも見ることができます。ペプチド検索エンジンが、明確なクロマトグラムピークからこの存在量のペプチドを含むスペクトルとしてここまで同定できることに少し驚かれるかもしれません。ピーク積分境界外のスペクトルを見てみると、シグナルノイズ比が非常に低いことがわかります。




それでもなお、すべての Uniprot FASTA を反転させた後、3つの予想タンパク質を含む FASTA ファイルに対して未指定開裂での検索が行われました。

- [ライブラリの一致] 表示の右上隅の「X」をクリックして、表示を閉じます。

また、ペプチドIDの注釈が多すぎるとクロマトグラムを確認しづらいことがあるため、以下の操作を行います。

- クロマトグラムを右クリックし、[ペプチドが同定された回数]を選択して[一致]チェックボックスがオンになっている場合は、クリックしてオフにします。

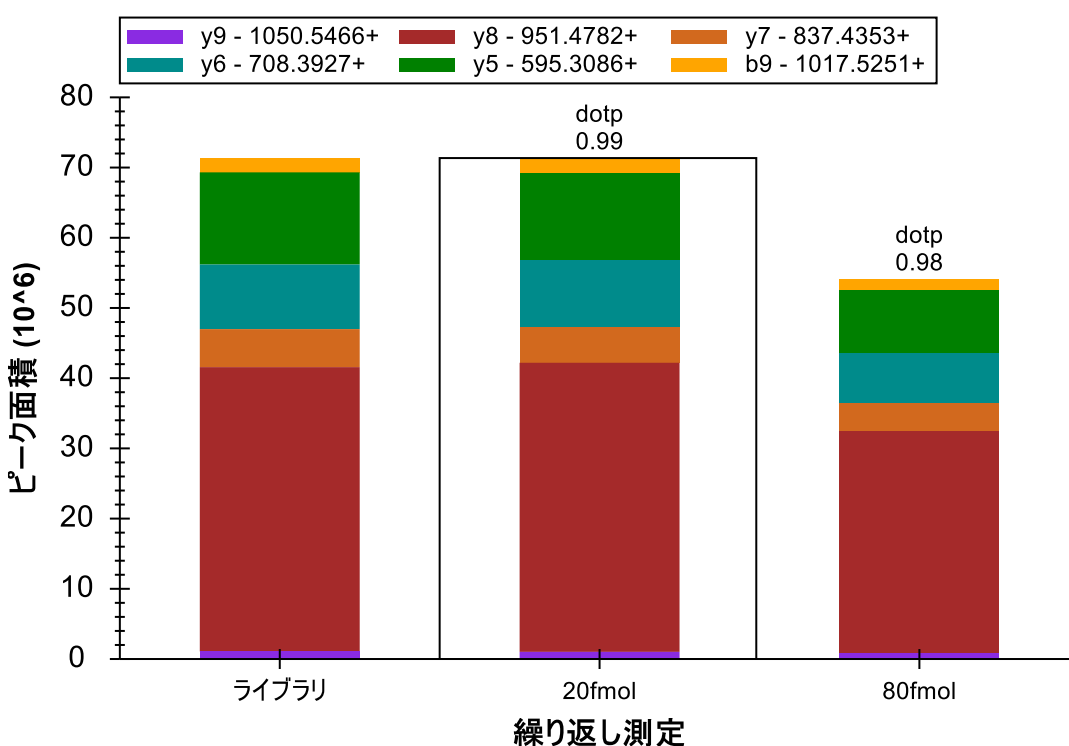
[ターゲット] 表示に注目してみると、すべてのターゲットペプチドに一致する MS/MS スペクトルがあり、小さなスペクトル付きのアイコン  が右下隅に表示されます。ここでは最低内積スコア（「dotp」という標識）が0.84であることがわかります。これにより、プリカーサー「417.8946+++ (dotp 0.84)」に対する観測されたプロダクトイオンピーク面積とライブラリスペクトル内のフラグメントイオン強度間の相関度スコアが出ます。[ターゲット] 表示には有効な繰り返し測定である「20fmol」の内積スコアのみが表示されています。有効な繰り返し測定は、タブテキストが太字になっており、[ターゲット] 表示上部のドロップリスト内で選択されてい

ることからわかります。「80fmol」繰り返し測定の内積スコアは、そのクロマトグラムをクリックするか、ドロップリスト内で選択すると見ることができます。

すべての繰り返し測定について同時にこの情報を再確認するには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで[ピーク面積]を選択し、[繰り返し測定の比較](F7)をクリックします。
- [ビュー]メニューで[トランジション]を選択し、[プロダクト](Ctrl+Alt+F10)をクリックします。

[ピーク面積]グラフは以下のようになります。

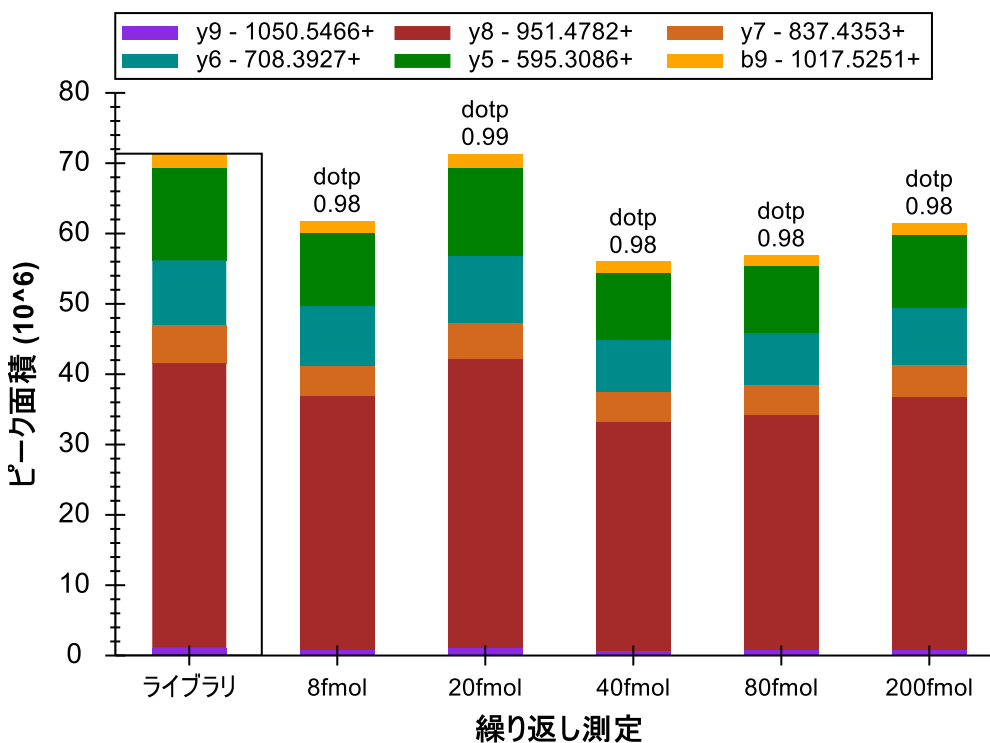


そのように表示されない場合は、以下の手順のうち複数を実施する必要があります。

- [ピーク面積]グラフを右クリックして[正規化]を選択し、[なし]をクリックします。
- [ピーク面積]グラフを右クリックし、[ライブラリを表示]をクリックします。
- [ピーク面積]グラフを右クリックし、[内積を表示]をクリックします。

これらの設定を有するすべてのターゲットペプチドを確認すると、すべてが検索スペクトルに良好に一致していること、およびBSAペプチドの濃度がこれらの試料間で比較的安定していることがわかります。BSAペプチドの一部は20fmolの試料でより高いピーク面積を示しており、80fmolの試料に対して高くなっているものもありますが、これは単に測定値のばらつきによる

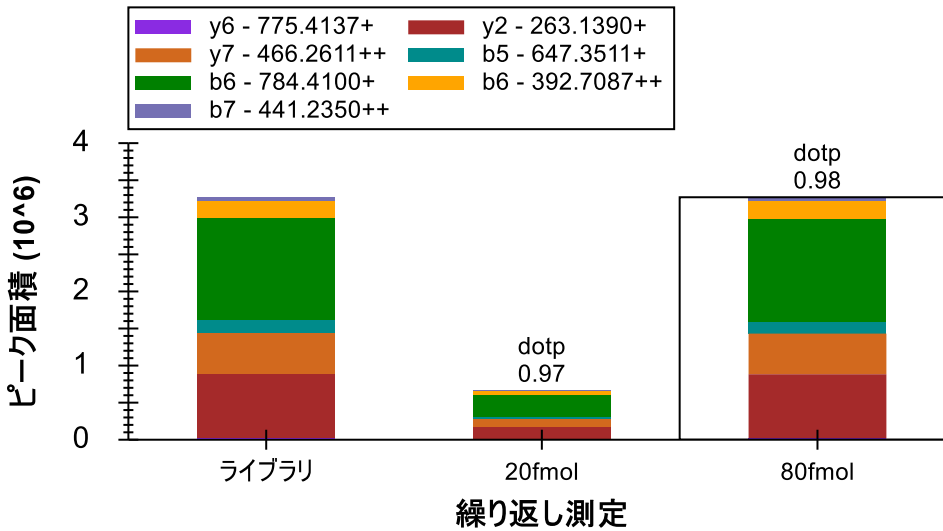
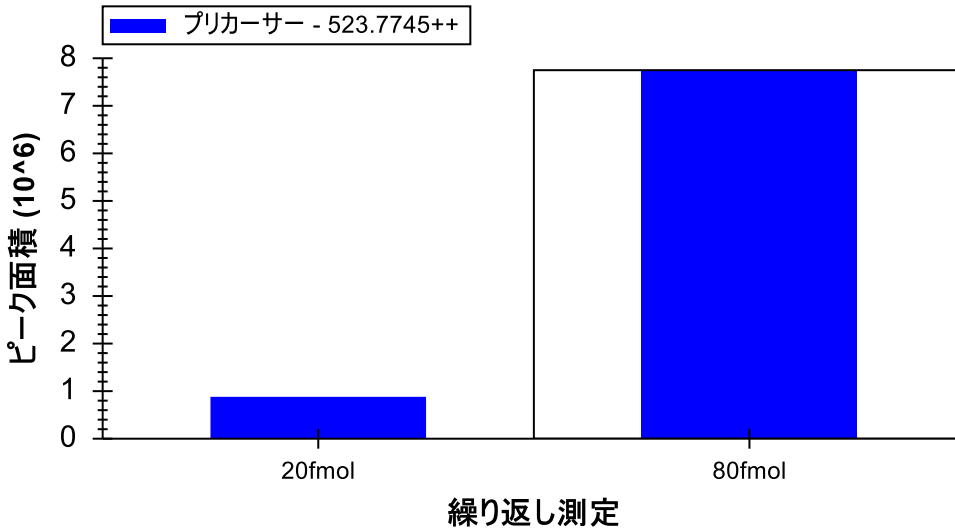
ものです。全5ポイント希釈曲線については、上記 LVNELTEFAK ペプチドのピーク面積グラフは以下ようになります。



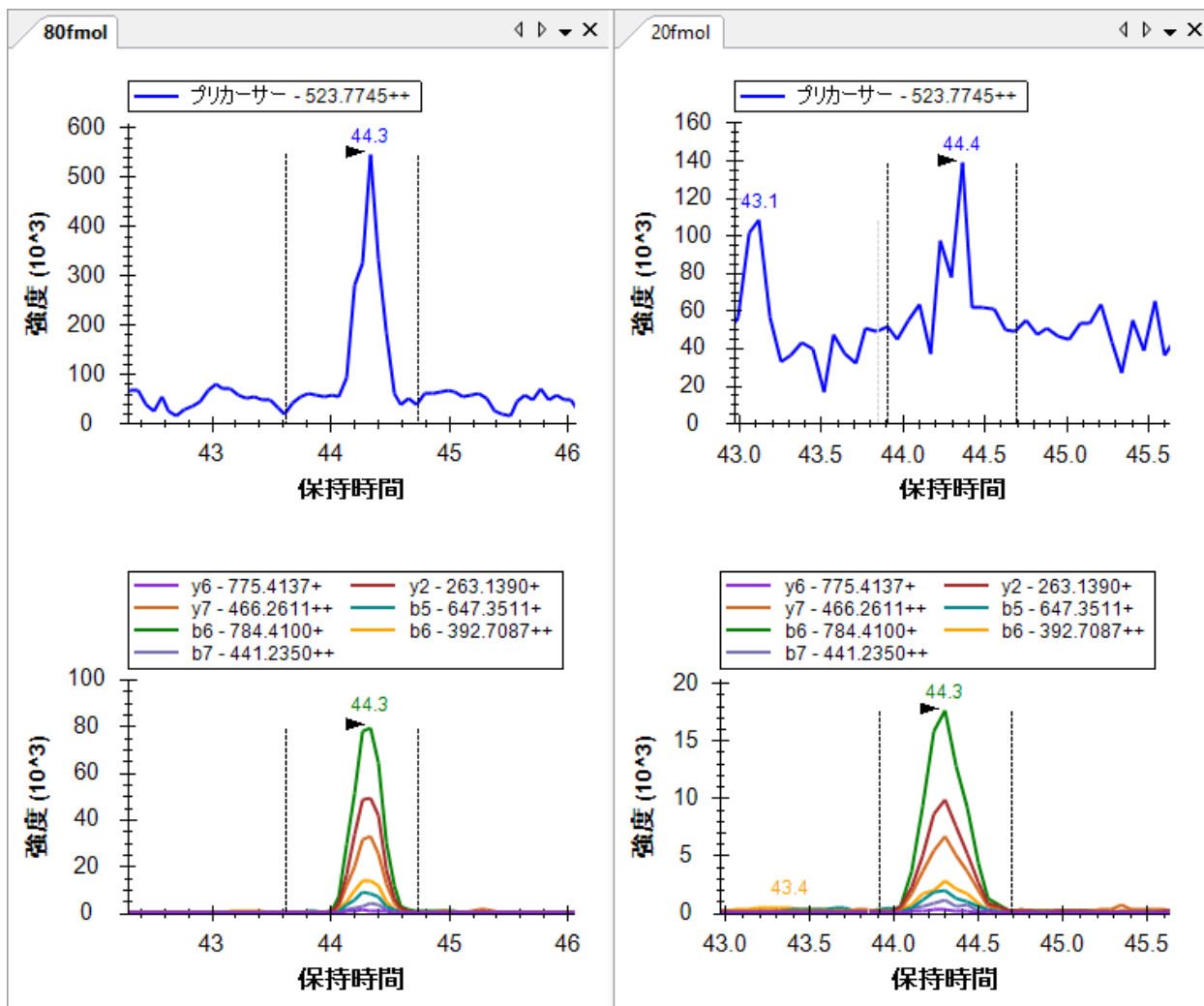
次に、ヒトペプチド DRVYIHPF に注目してみましょう。ここでは、試料名 80 fmol および 20 fmol で 4:1 の濃度比が見られると予測されます。Skyline が実際に行った測定値の詳細を見るには、以下の操作を行います。

- [ピーク面積] グラフを右クリックして [トランジション] を選択し、[すべて] をクリックします。
- [ピーク面積] グラフを右クリックして [トランジション] を選択し、[グラフの分割] をクリックします。

[ピーク面積] グラフは以下ようになります。



80 fmol プロダクトイオンは合計約 3×10^6 、および 20 fmol プロダクトイオンは合計約 0.7×10^6 となります。これは予測された 4:1 の比率からかけ離れているというわけではありませんが、MS1 スキャンから抽出されたプリカーサーイオンは、80 fmol の面積が約 8×10^6 、20 fmol の面積がほぼ 0.9×10^6 、9:1 の比率となっています。この相違の原因を見つけるためにクロマトグラムに注目してみましょう。



プロダクトイオンクロマトグラムのノイズは、MS1 から抽出したクロマトグラムと比較してかなり少ないということがわかります。Skyline によってバックグラウンドが差し引かれると、バックグラウンドを超える 20 fmol のプリカーサー面積はかなり小さくなります。MS/MS からのプロダクトイオンクロマトグラムは、同一分解能での MS1 からのプリカーサークロマトグラムよりも選択的であり、プロダクトイオンクロマトグラムのバックグラウンドはかなり小さくなっています。

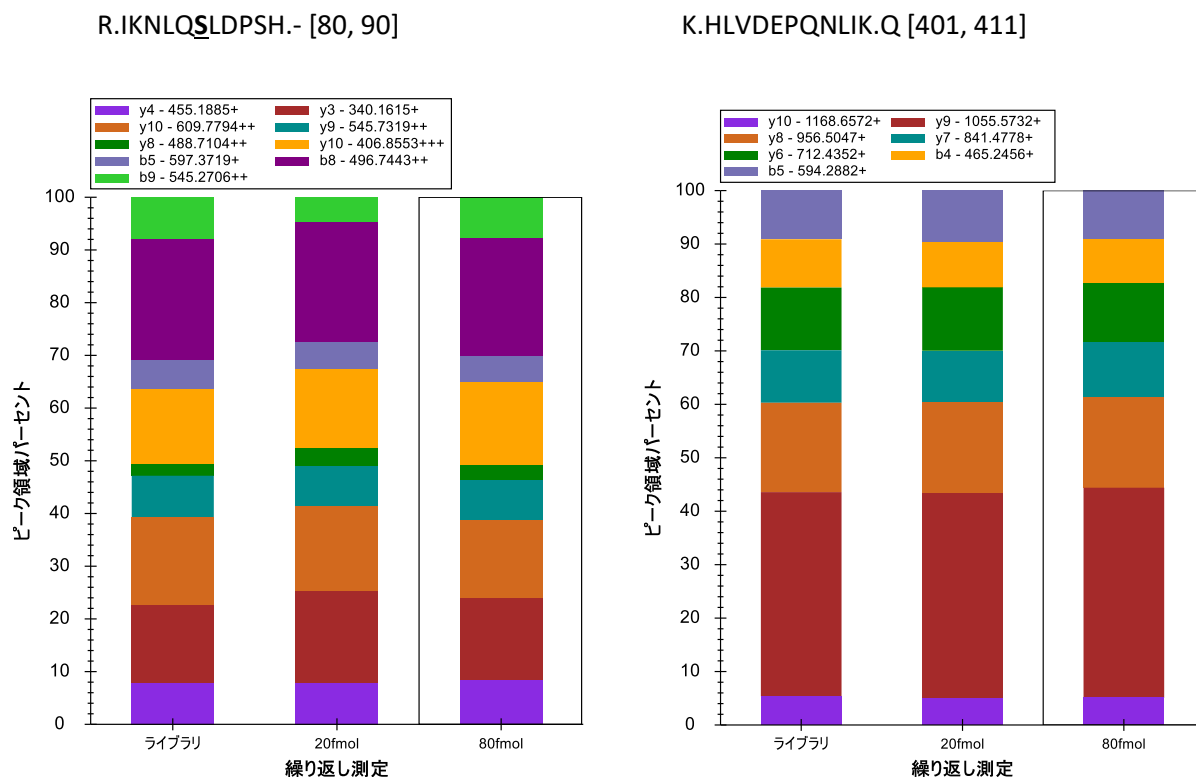
ここで、ドキュメント内の最後の 4 つのペプチドをすべて確認すると、4 つのペプチドすべてが 80 fmol の試料と 20 fmol の試料との間で、予想どおり約 4:1 の強度比を示していることがわかります。（このデータは希釈系列から 2 ポイントを選んだものです。本チュートリアルではサイズを考慮して、2 ポイントのみで行っています。）

これらのデータおよびその他の実験は、低分解能 LTQ が MS/MS スペクトルから抽出されたフラグメントイオンクロマトグラムを使用した定量実験の実施に十分な装置であることを示しています。¹

また以下の操作を行うことで、繰り返し測定間の相対イオン存在量の比較もできます。

- [ピーク面積] グラフを右クリックして[トランジション]を選択し、[プロダクト]をクリックします。
- [ピーク面積] グラフを右クリックして[正規化]を選択し、[合計]をクリックします。

このモードでは、ドキュメント内のすべてのペプチドを再確認して、フラグメントイオンの相対存在量が繰り返し測定間で類似すること、またライブラリスペクトルのフラグメントイオン強度に類似することがわかります。



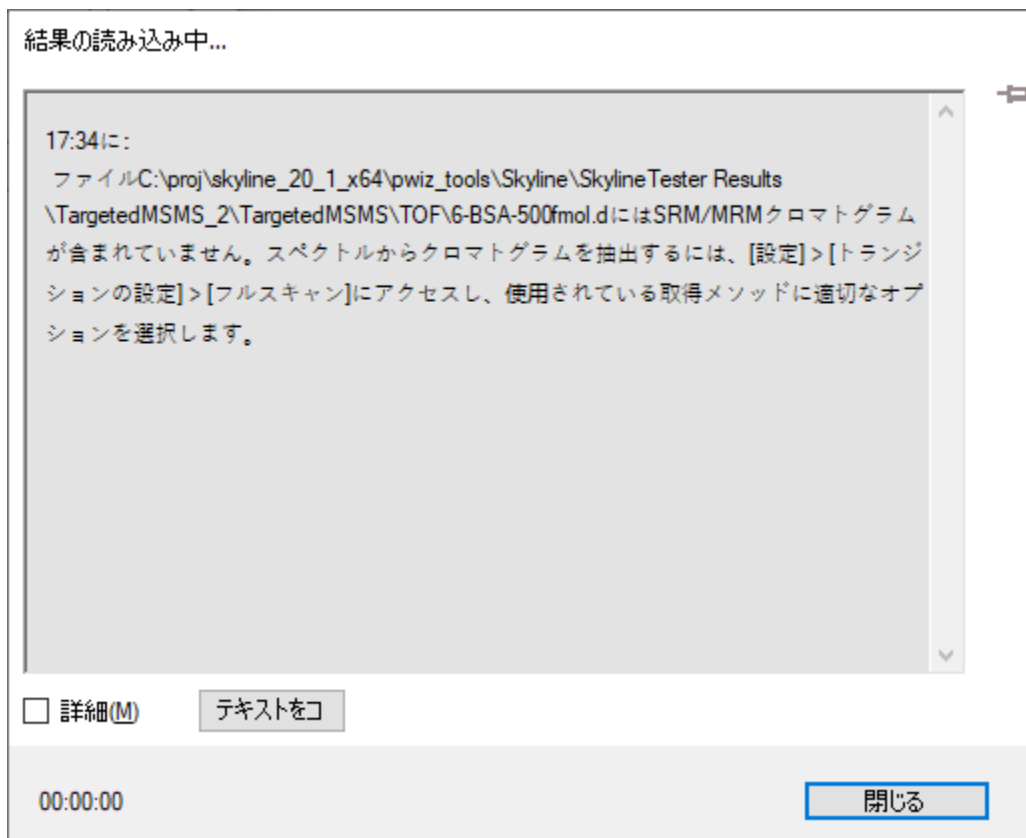
高分解能マススペクトルでのやり方

本チュートリアルに含まれているその他のデータセットは、BSA ペプチド断片を使った希釈系列データで、Agilent 6500 Series Q-TOF で測定しています。このデータを本チュートリアルでダウンロードできる小さいサイズに収めるため、Skyline フルスキャンフィルタはスペクトルをプロファイル表示にして動作しますが、高分解能スペクトル内のすべてのスペクトルピークはセントロイド化されています。Skyline ではベンダーのセントロイド化されたスペクトルでかなりうまく動作することがわかったので、現在はプロファイルスペクトルが利用可能なときでもセントロイド化されたスペクトルの使用を強制するオプションがあります。

この Q-TOF データで作業を開始するには、今開いているファイルを保存し、作成済みのチュートリアルフォルダの「TOF」サブフォルダにある「BSA_Agilent.sky」ファイルを開きます。

高分解能 PRM 用の Skyline ドキュメントの設定

繰り返しになりますが、これは「TOF」フォルダ内の生データファイルにより測定された実験の全 Skyline ドキュメントであり、その設定では現在 SRM データしかインポートできません。この時点で、このチュートリアルに含まれている TOF 質量分析計データファイルをインポートしようとする、以下のエラーメッセージが表示されます。



実際にこれを行った場合、以下の操作を行ってドキュメントを元の状態に戻します。

- [閉じる] ボタンをクリックします。
- [編集] メニューで [元に戻す] (Ctrl+Z) をクリックします。

以下の操作を行うと、ドキュメント設定を調整し、チュートリアルデータファイルに取り込まれた PRM 実験と互換性を持たせることができます。

- [設定] メニューで [トランジション設定] をクリックします。
- [フルスキャン] タブをクリックします。
- MS1 フィルタの場合、
 - [含まれる同位体ピーク] ドロップダウンリストから「数」を選択します。
 - [ピーク] フィールドに「3」と入力します。
 - [プリカーサー質量アナライザー] ドロップリストから「Centroided」を選択します。
 - [質量精度] フィールドに「20」 ppm と入力します。

- MS/MS フィルタの場合、
 - [取得メソッド] ドロップリストから「Targeted」を選択します。
 - [プロダクト質量分析] ドロップリストから「Centroided」を選択します。
 - [質量精度] フィールドに「20」 ppm と入力します。

[フルスキャン] タブは以下のようになります。

このデータセットでは、MS/MS ID を取得するようなペプチド検索結果がありません。そのためこのオプションは赤字になっています。データのインポート前にペプチドが溶出する保持時間を予測する方法也没有。設定をこのままにしておくと、Skyline は一致するスキャンすべてから抽出を行います。これは MS/MS ID の情報が欠けているからです。以下の操作を行えばこれを明確に選択することもできます。

- [保持時間のフィルタ]の[一致する全てのスキャンを含める]オプションをクリックします。

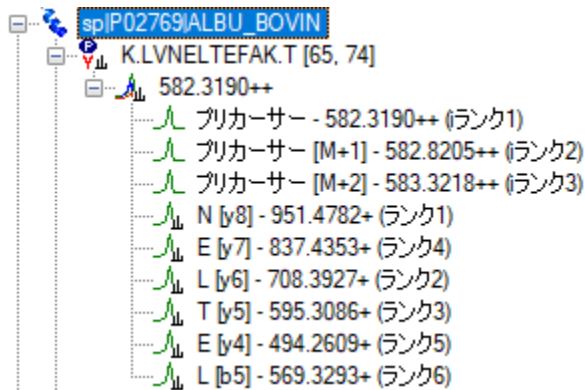
Skyline ではこのオプションが赤で表示され、マウスカーソルを赤いテキストの上に合わせると、「全グラジエントクロマトグラムのインポートには時間がかかり、ディスク容量を消費する上、ピークの見つけが効果的に行えない場合があります。」というヒントが表示されます。ただしこの場合、データはスケジュール化された PRM メソッドで取得されており、MS1 スペクトルが全グラジエントで取得されたにもかかわらず、Skyline ではクロマトグラムの長さを MS/MS スペクトルが取得された時間範囲で自動的に調整します。

- [OK] ボタンをクリックします。

各ペプチドプリカーサー項目にプリカーサートランジションが含まれるようにするには、以下の操作を行います。

- [編集]メニューで[すべて展開]を選択し、[プリカーサー] (Ctrl+W) をクリックします。

この場合には、すべてのペプチドが3つのプリカーサートランジション (M、M+1、および M+2) を含んでいることがわかります。そしてこれは高分解能 MS1 スキャンでのみ可能です。[ターゲット]表示のトランジションは以下のようになります。



プリカーサートランジションが自動的に追加されます。これはどのペプチドも手動で編集されておらず、自動選択モードのままになっているからです。ここでも、Skyline は [フィルタ] タブで自動的に「p」イオンタイプを追加しました。これは MS1 フィルタが選択されたためです。

また、Skyline は Orthogonal ランキングを利用して、プリカーサー同位体ピーク (irank) およびプロダクトイオンピーク (rank) をランク付けしていることがわかります。プリカーサー同位体ピークは、予測同位体分布に従ってランク付けされます。一方プロダクトイオンピークは、一致するライブラリスペクトルでの相対強度により個別にランク付けされます。

高分解能フルスキャンデータのインポートと確認

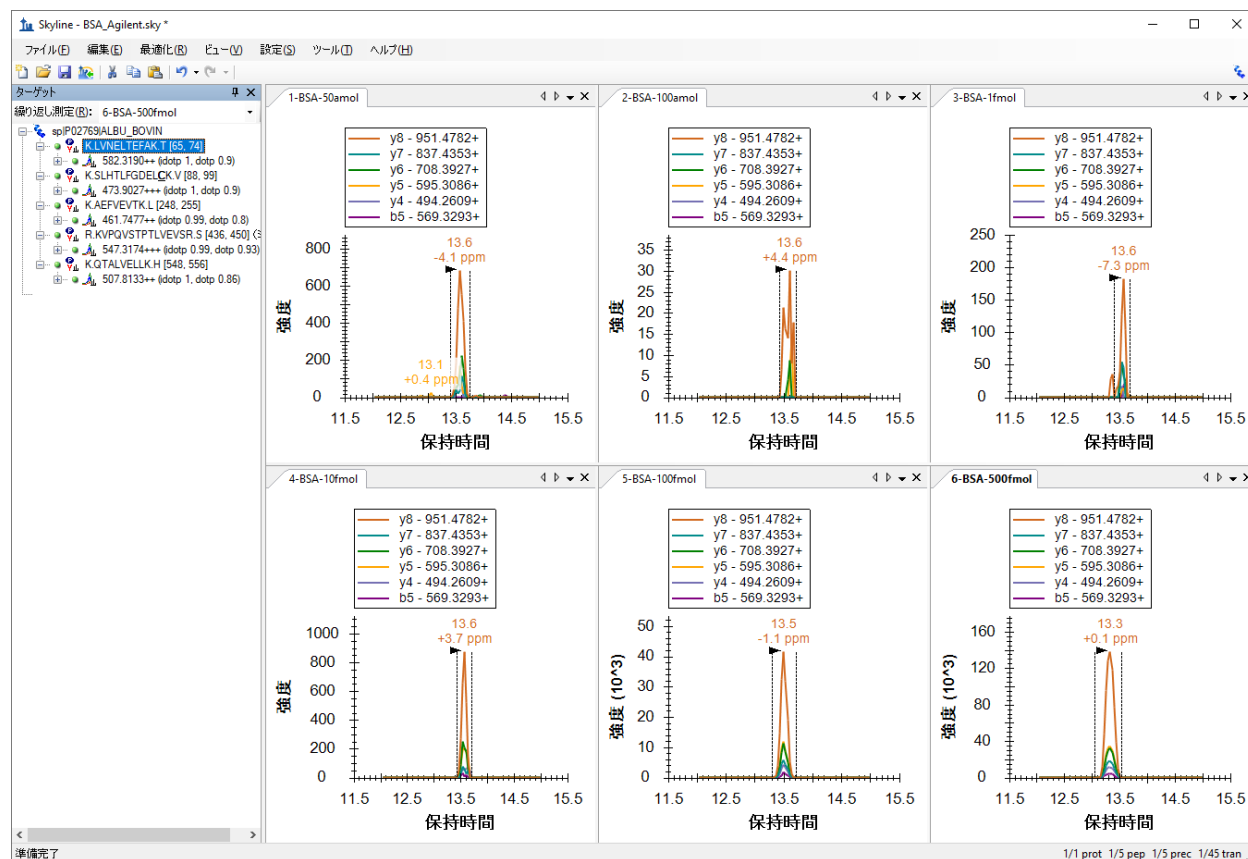
希釈系列の最高濃度での測定をドキュメントにインポートするには、以下の手順を実施します。

- [ファイル]メニューで[インポート]を選択し、[結果]をクリックします。
- [結果をインポート]フォームで[OK]ボタンをクリックします。
- .dで終わる6個のファイルすべてを範囲選択し、ドラッグアンドドロップします。
- [結果ファイルをインポート]フォームで[開く]ボタンをクリックします。

ターゲットクロマトグラムの抽出とピークが分析されている間、以下の操作を行って抽出されたクロマトグラムの表示を準備できます。

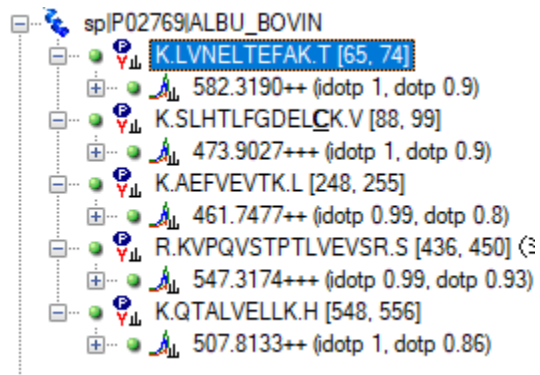
- [ターゲット]表示内の最初のペプチド (K.LVNELTEFAK.T [65, 74]) を選択します。
- [編集]メニューで[すべて折り畳む]を選択し、[プリカーサー] (Ctrl+Shift+W) をクリックします。
- [ライブラリの一致]表示の右上隅の「X」をクリックして、表示を閉じます。
- [ビュー]メニューで[グラフを配置]を選択し、[タイル]をクリックします。

インポートが完了すると、Skyline ウィンドウは以下のようになります。



まず、グラフ内のクロマトグラムは3分の範囲のみ表示していることに注意します。上図では12分から15分です。

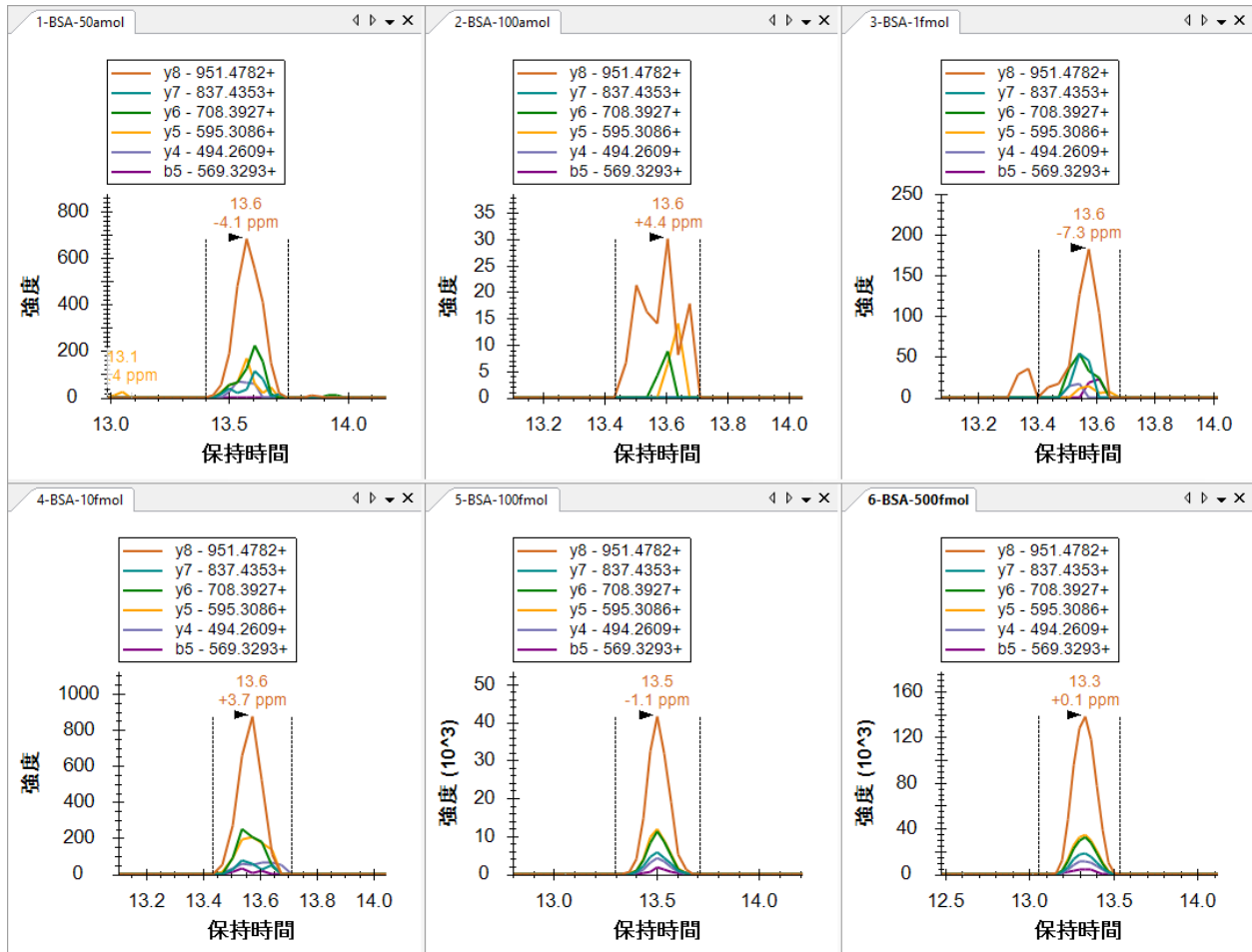
[ターゲット]表示を拡大すると、プリカーサー同位体分布およびプロダクトイオン強度に新たに2つの直交内積値である、idotp および dotp がそれぞれ追加されているのがわかります。最高濃度のデータである 500 fmol の場合、これらの値はクロマトグラムピークと予測相対強度との間の非常に良好な相関度があることを示しています。



すべてグラフにおいて選択したピークを拡大するには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで[自動ズーム]を選択し、[最適ピーク] (F11) をクリックします。

これにより、クロマトグラムは以下ようになります。

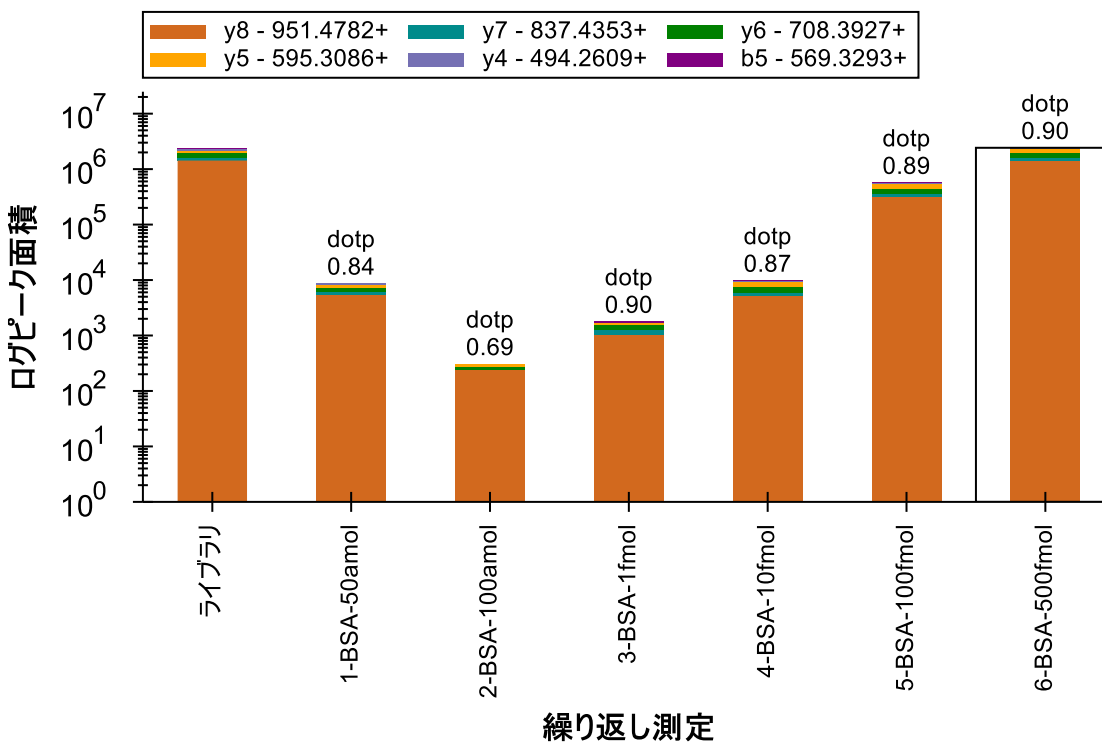


6つのクロマトグラムグラフからわかるのは、100 amol の試料ピーク（40）よりも 50 amol の試料ピークの方が、高強度（700）で形状が優れていることです。すべてのピークの保持時間は非常に近く、Skyline が 100 amol の試料で誤ったピークを選択したという可能性は低くなっています。また高分解能データについては、ピーク保持時間の注釈の下に質量誤差値が表示され、これは予測 m/z 値とピーク内のポイントの加重平均との間の差異を示します。上図は、高強度のデータは低強度のデータより精度が高くなるという全般的な傾向がかなりはっきりと示されており、これはノイズによって生じる強度比の変動が原因であると考えられます。

50 amol の試料の強度の問題については、以下の操作を行うともう少し詳細に調べられます。

- [ビュー]メニューで[ピーク面積]を選択し、[繰り返し測定の比較](F7)をクリックします。
- [ピーク面積]グラフを右クリックし、[対数目盛り]をクリックします。

これにより、[ピーク面積]グラフは以下ようになります。



この表示では、50 amol の試料は 100 amol の試料より 10 fmol の試料によく一致しているようです。その他の 4 つのペプチドを確認すると、2 つ (SLHTLFGDELCK および KVPQVSTPTLVEVSR) では 50 amol の試料の総ピークの強度は実際に 10 fmol の試料の総ピークの強度より高くなっていますが、その他の 2 つについてはピークは小さくなっていることがわかります。明らかに、この試料の濃度は実際に 50 amol ではありません。反応が 10 fmol と 100 fmol との間であった 2 つのペプチドでは、実際の濃度がこれらの濃度の間の値であったように思われますが、その他の 3 つのペプチドを見るとそうではないようです。

またもう一つ確認すべきことは、試料がラベルした番号順 (1、2、3 ... 6) で実際に測定されたかどうかです。これを確認するには、以下の操作を行います。

- [ピーク面積] グラフを右クリックして [次数] を選択し、[取得時間] をクリックします。

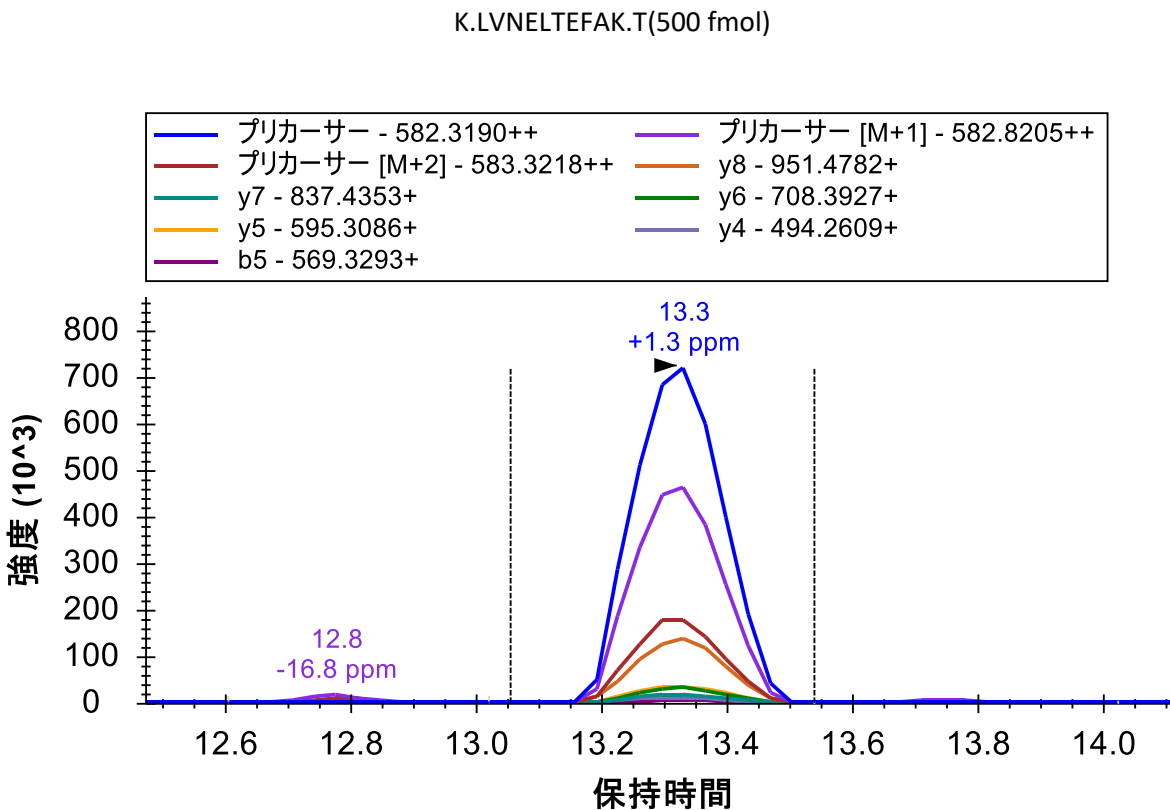
グラフに変化は見られません。すなわち、試料は表示されている次数で実際に取得されたということです。このような反応曲線は通常、最低濃度から最高濃度へと取得され、キャリーオーバーの影響を低減します。

Skyline を利用することで、濃度曲線データの質を非常に素早く考察することができます。

最後の検証ステップとして、MS1 フィルタプリカーサーピークも同様であるかどうかを見てみましょう。MS1 ピークを表示するには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで[トランジション]を選択し、[すべて] (Shift+F10) をクリックします。
- [ビュー]メニューで[トランジション]を選択し、[グラフの分割]をクリックします。

クロマトグラムは以下のようになります。

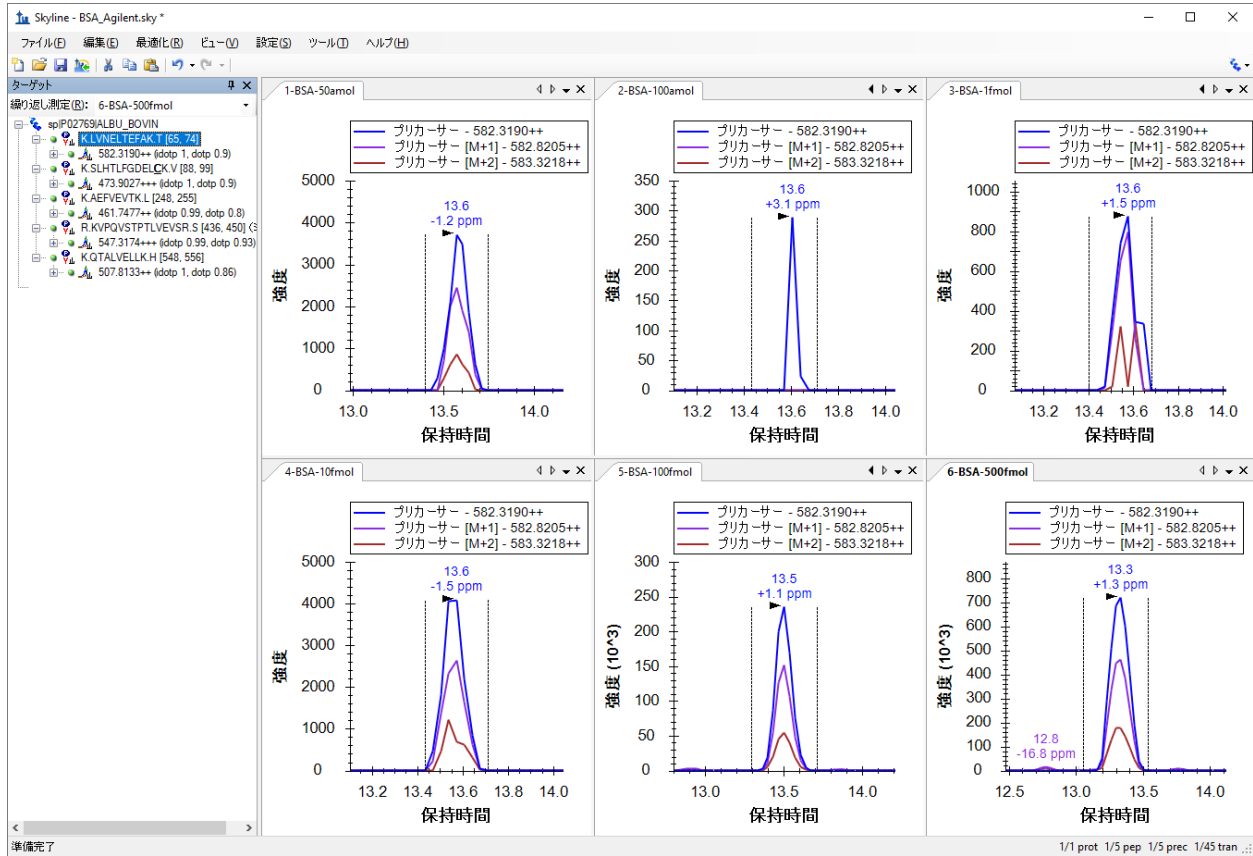


以前と同じように、最高強度のプロダクトイオン(y8)はモノアイソトピックプリカーサー強度の約 1/5 (1.4×10^5 v. 7.2×10^5) に達しており、M+2 ピークでも y8 ピークより強度が高くなっています。

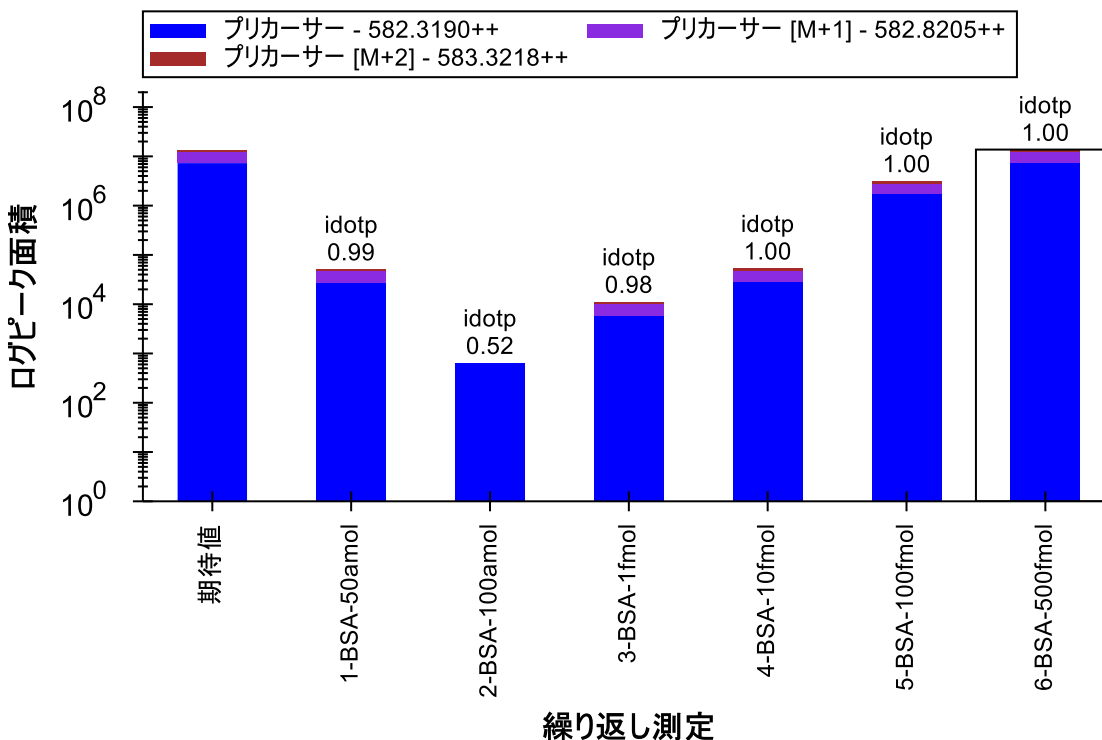
プリカーサーピークのみを表示するには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで[トランジション]を選択し、[プリカーサー] (Alt+F10) をクリックします。

これにより Skyline は以下ようになります。



[ピーク面積] グラフは以下ようになります。



5つのペプチドをそれぞれもう一度確認すると、濃度ポイントの相対強度はプロダクトイオンでの比較で見られたものと非常に似ていることがわかります。

結論

本チュートリアルでは、PRM 実験実施用に Skyline ドキュメントを設定する方法を習得しました。これにより、SRM のような実験をイオントラップや Q-TOF (および Q-Orbitrap) 装置といったフルスキャン装置で実施できるようになります。また通常のシステム適合性試験、品質管理試験、診断試験向けに、フルスキャン装置でこの技術を利用することも可能です。PRM メソッドをエクスポートする方法 (現在は Thermo、SCIEX、Burker で利用可能)、そして Skyline レポートを使用してメソッドエクスポートを現在サポートしていない装置のターゲットプリカーサー m/z 値のリストを取得する方法も学びました。(注: Skyline は Agilent、SCIEX、Thermo、Waters 装置用の PRM 単離リストをエクスポートできるようになりました。) また、生データファイルをインポートする方法、およびこれらのファイルに含まれる可能性のある MS1 スキャンからクロマトグラムを抽出する方法についても学びました。インポートが完了すると、含まれる MS1 スキャンの *irank* や *idotp* といった新しい注釈が表示されるようになるため、MS1 スキャンまたは MS/MS スキャンいずれかからの情報のみ表示する選択が可能です。その他にも、Skyline がデータを理解しやすくするために提供しているクロマトグラム、要約グラフ、レポートについては三連四重極 SRM の実験またはチュートリアルを参照してみてください。

参照文献

1. Stacy D. Sherrod *et al.* Label-Free Quantitation of Protein Modifications by Pseudo-Selected Reaction Monitoring with Internal Reference Peptides. *J. Proteome Res.* (submitted)
2. Schilling, B. *et al.* Platform Independent and Label-Free Quantitation of Proteomic Data Using MS1 Extracted Ion Chromatograms in Skyline. Application to Protein Acetylation and Phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* (2012).doi:10.1074/mcp.M112.017707