

Skyline MS1 フィルタ用 DDA 検索

Skyline を用いたターゲット質量分析は、Skyline ドキュメントにインポートした質量分析計の生データの有益な情報を視覚的に表示します。測定対象となるペプチドとトランジションの最適化や積分境界の調整も可能です。Skyline は SRM (selected reaction monitoring: 選択反応モニタリング) または MRM (multiple reaction monitoring: 複数反応モニタリング) 質量分析データの定量解析ソフトとして開発されましたが、新たに MS1 スペクトルの時間-強度クロマトグラムが抽出できるように機能が拡張され、データ依存 MS/MS モードで計測されたデータを使用した質量分析測定によるペプチド定量データも使用できるようになりました。

Skyline MS1 フルスキャンフィルタでは、質量分析計をデータ依存測定 (DDA) モードで操作した時の探索的なプロテオミクス実験のデータセットのインポートをサポートしています。生データのインポート後に Skyline の新しい機能や従来の機能を利用すると、多数の繰り返し測定データにおけるペプチドプリカーサー MS1 シグナルの定量が容易になります。Skyline はデータの視覚化に非常に優れているため、このモードは他の「非標識」の定量化ツールからの定量出力を視覚化し、よりよく理解するためにも使用できます。

本チュートリアルは、Skyline を使って DDA データにおける MS/MS スペクトルのペプチドスペクトルマッチングを実施したいときに Skyline MS1 フィルタを有効に使用するために重要な以下の分野を網羅します。

- MS1 フィルタ用の Skyline ドキュメント作成
- raw データに対し DDA 検索を実施して定量ターゲット候補を検索

Skyline は、ターゲット質量分析研究のための、ベンダーに依存しないプラットフォームの提供を目指しています。Skyline は、Agilent、Bruker、SCIEX、島津製作所、Thermo-Scientific、Waters といった装置ベンダーから MS1 フィルタの生データをインポートできるため、ここで得る専門知識はこれらのベンダーの装置を使用するあらゆる質量分析研究室に譲渡可能です。

はじめに

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

<https://skyline.ms/tutorials/DdaSearchMS1Filtering.zip>

この中のファイルを、以下のコンピュータ上のフォルダに解凍します。

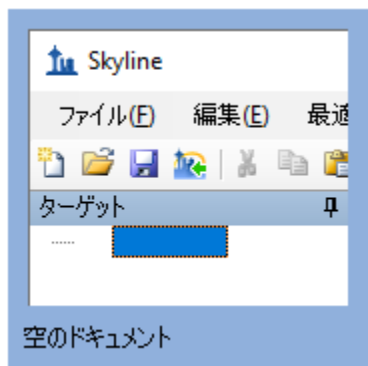
C:\Users\brendanx\Documents

これにより以下の新しいフォルダが作成されます。

C:\Users\brendanx\Documents\DdaSearchMS1Filtering

本チュートリアルを開始する前に、Skyline をすでに使用している場合は、Skyline をデフォルト設定に戻すことをお勧めします。デフォルト設定に戻すには、以下の操作を行います。

- Skyline を起動します。
- 開始ページで、以下のような空のドキュメントをクリックします。

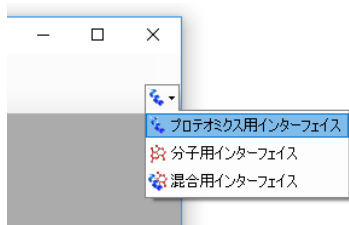



- [設定]メニューで、[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで[いいえ]をクリックします。

Skyline のこの場合のドキュメント設定がデフォルトにリセットされました。

本チュートリアルはプロテオミクスに関するものであるため、以下の操作を行うとプロテオミクス用インターフェイスを選択できます。

- Skyline ウィンドウの右上隅にあるユーザーインターフェイス管理をクリックし、[プロテオミクス用インターフェイス]をクリックします。



Skyline は、ウィンドウの右上隅のタンパク質アイコン  で表示されるプロテオミクスモードで動作しています。

この空のドキュメントは様々な方法で編集できますが、本チュートリアルでは質量分析計データ依存測定 (DDA) データファイルの検索、ターゲットペプチドの設定、これらのファイルからのクロマトグラムのインポートという一連の流れをガイドするウィザードというフォームを使用します。

DDA 検索を始める前に、Skyline がデフォルトで使用する内部標準を変更する必要があります。

- [設定]メニューで[ペプチド設定]をクリックします。
- [修飾]タブをクリックします。

- [内部標準タイプ]を「なし」に設定します。

[ペプチド設定]フォームは以下のようになります。

- [ペプチド設定]フォームの[OK]ボタンをクリックします。

Skyline ドキュメントにペプチドを読み込むための DDA ファイルの検索

[ペプチド検索をインポート]ウィザードを使用することで、DDA データファイル内の MS/MS スペクトルからペプチド検索を実行できます。

まず、以下の操作を行って新しいドキュメントを保存します。

- ツールバーの[保存]ボタン(Ctrl+S)をクリックします。
- 本チュートリアル用に作成した DdaSearchMS1Filtering フォルダに移動します。
- [ファイル名]フィールドに「DdaSearchMS1FilteringTutorial.sky」と入力します。

- [保存] ボタンをクリックします。

[ペプチド検索をインポート] ウィザードを以下のように開始します。

- [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。

以下のようなフォームが表示されます。

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:

ファイルを追加(A)...

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(U)

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

[構築] オプションは、DDA 検索エンジンからの出力 (Comet からの pepXML ファイル、Mascot からの .dat など) に、また [DDA 検索を実行] オプションは生データ (RAW、WIFF、*.d、mzML、mzXML など) に対して有効です。本チュートリアル の mz5 ファイルは、質量分析計が生成した元のプロファイル Thermo RAW ファイルよりも高速でダウンロードできるようにセントロイド化されています。

次の操作を行ってチュートリアルに含まれている DDA mz5 ファイルを検索に追加します。

- [DDA 検索を実行] ラジオオプションをクリックします。
- [ファイルを追加] ボタンをクリックします。
- 本チュートリアル用に作成した DdaSearchMS1Filtering フォルダにある mz5 ファイルをすべて選択します。
- [開く] ボタンをクリックします。

ウィザード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。

3つの mz5 ファイルに共通のプリフィックスをどう取り扱うかを尋ねるフォームが表示されます。

結果をインポート

選択したファイルには共通のプリフィックスとサフィックスがあります。プリ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(D)

共通プリフィックス(C):
QE_140221_0

共通サフィックス(S):
spiked.mz5

繰り返し測定名(N):
1_UPS1_100fmol
2_UPS1_300fmol
3_UPS1_600fmol

OK キャンセル

- [OK] ボタンをクリックします。

ウィザードの [修飾を追加] ページが開きます。ここでは、ドキュメント中の DDA 検索に含めたいアミノ酸修飾すべてがリストされています。ここでは、固定修飾と可変（バリアブル）修飾を区別することが重要です。固定（静的とも呼ばれる）修飾は、常に指定されたアミノ酸に適用されます。たとえば、Carbamidomethyl C ではデータ中のすべてのシステインがアルキル化すると予測されるため、通常は固定修飾として扱われます。酸化はサンプルの取り扱いによって左右されるため、Oxidation M はほぼ常に可変修飾として扱われます。Skyline の検索は、同位体標識を常に可変修飾として扱いますが、[修飾を編集] ボタンをクリックすれば他の修飾を固定として扱うか可変として扱うかを変更できます。

また、このページからドキュメントに修飾を追加することもできます。ドキュメントがデフォルトにリセットされているため、リストは **Carbamidomethyl (C)** のみで開始となります。

これらのデータは **SILAC** 標識であるため、ここでヘビー標識の修飾を追加する必要があります。これらを追加するには、以下の操作を行います。

- [修飾を編集] ボタンをクリックします。
- [重い修飾を編集] メニューオプションをクリックします。
- [同位体修飾] リストの横にある [リストを編集] ボタンをクリックします。
- [同位体修飾を編集] フォームの [追加] ボタンをクリックします。
- [同位体修飾を編集] フォームの [名前] フィールドに「Label:13C(6)15N(2) (C-term K)」と入力します。
- [名前] フィールドの右にある下向き矢印をクリックし、同じ名前の項目をクリックします。これによって **Unimod** から特異性と組成フィールドが入力されます。

[同位体修飾を編集] フォームは以下のように表示されます。

同位体修飾を編集

名前(N):
Label:13C(6)15N(2) (C-term K)

OK
キャンセル

アミノ酸(A): K
末端(T): C

化学式(C)

13C 15N 18O 2H

モノアイソトピック質量(M): 8.014199
平均質量(V): 7.941847

相対保持時間:
一致

- [OK] ボタンをクリックします。

以下の手順を行って 2 つ目の同位体修飾を追加します。

- [同位体修飾を編集] フォームの [追加] ボタンをクリックします。
- [同位体修飾を編集] フォームの [名前] ドロップダウンリストから「Label:13C(6)15N(4) (C-term R)」を選択します。

アルギニン分子内にあるすべての炭素原子に **13C** を、すべての窒素原子に **15N** を使用するよう
に設定するため、[13C] および [15N] のチェックボックスが自動的にオンになっており、総質
量シフトは 10 ダルトンとなります ($6 \times {}^{13}\text{C} + 4 \times {}^{15}\text{N}$)。

[同位体修飾を編集] フォームは以下のように表示されます。

同位体修飾を編集

名前(N):
Label:13C(6)15N(4) (C-term R)

OK
キャンセル

アミノ酸(A): R
末端(T): C

化学式(C)

13C 15N 18O 2H

モノアイソトピック質量(M): 10.008269
平均質量(V): 9.928665

相対保持時間:
一致

Skyline は 13C および 15N を用いて、モノアイソトピック質量と平均質量の計算を自動的に行います（リジン (K) については約 8 ダルトン、アルギニン (R) については約 10 ダルトンとなります）。ヘビー修飾の追加を終了するには、以下の操作を行います。

- [同位体修飾を編集] フォームの [OK] ボタンをクリックします。
- [同位体修飾を編集] フォームの [OK] ボタンをクリックします。
- [修飾を追加] リストで、先ほど作成した「Label:13C(6)15N(2) (C-term K)」修飾および「Label:13C(6)15N(4) (C-term R)」修飾のチェックボックスをオンにします。

今度は Oxidation (M) を構造修飾として追加します。

- [修飾を編集] ボタンをクリックします。
- [構造修飾を編集] メニューオプションをクリックします。
- [同位体修飾] リストの横にある [リストを編集] ボタンをクリックします。
- [構造修飾を編集] フォームの [追加] ボタンをクリックします。
- [構造修飾を編集] フォームの [名前] フィールドに、「Oxidation (M)」と入力します。
- [名前] フィールドの右にある下向き矢印をクリックし、同じ名前の項目をクリックします。これによって Unimod から特異性と組成フィールドが入力されます。
- [構造修飾を編集] フォームの [OK] ボタンをクリックします。
- [構造修飾を編集] フォームの [OK] ボタンをクリックします。
- [修飾を追加] リストで、先ほど作成した「Oxidation (M)」修飾のチェックボックスをオンにします。

- また、「Carbamidomethyl (C)」のチェックボックスもオンになっていることを確認します。これは、デフォルト設定が選択されたためです。

この時点で、[修飾を追加] ページは以下のようになります。

The screenshot shows a dialog box titled "ペプチド検索のインポート" (Peptide Search Import) with a close button (X) in the top right corner. The main heading is "修飾を追加" (Add Modification). Below the heading is the instruction: "検索に含めたい修飾をすべて指定してください。" (Specify all modifications you want to include in the search). A list of four modifications is shown, each with a checked checkbox:

- Carbamidomethyl (C) = C[57] (固定)
- Label:13C(6)15N(2) (C-term K) = K[8] (同位体標識)
- Label:13C(6)15N(4) (C-term R) = R[10] (同位体標識)
- Oxidation (M) = M[16] (変数)

At the bottom of the list area is a button labeled "修飾を編集(E)" (Edit Modification). At the very bottom of the dialog are three buttons: "<戻る(B)" (Back), "次へ(N) >" (Next), and "キャンセル" (Cancel). The "次へ(N) >" button is highlighted with a blue border.

- [次へ] ボタンをクリックします。

ウィザードが [フルスキャン設定を行う] ページに進みます。

- [質量精度] フィールドに「20」と入力します。

このページの他のフィールドは、本チュートリアルで使用可能なデフォルト設定のままにしておいてください。ウィザードは以下のようになります。

ペプチド検索のインポート

フルスキャン設定を行う

プリカーサーの電荷
2

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ー(P): Centroided

ピーク(K): 3
質量精度(A): 20 ppm

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
 一致する全てのスキャンを含める

<戻る(B) 次へ(N) > キャンセル

- この設定の詳細については、[MS1 フルスキャンフィルタのチュートリアル](#) (9 ページ) を参照してください。
- [次へ] ボタンをクリックします。

ウィザードの [FASTA をインポート] ページに移動します。本チュートリアルでは、先頭に追加されたシグマアルドリッチの Universal Proteomics Standard (UPS) のシークエンスでヒトタンパク質 FASTA を使用します (Skyline が UPS と非 UPS タンパク質の間で共有されるあらゆるペプチドにこのアクセス番号を使用できるようにするため)。FASTA を選択するには、以下の操作を行います。

- [参照] ボタンをクリックします。
- 本チュートリアル用に作成した「2014_01_HUMAN_UPS.fasta」ファイルを選択します。
- [FASTA を開く] フォームの [開く] ボタンをクリックします。

ウィザードは以下ようになります。

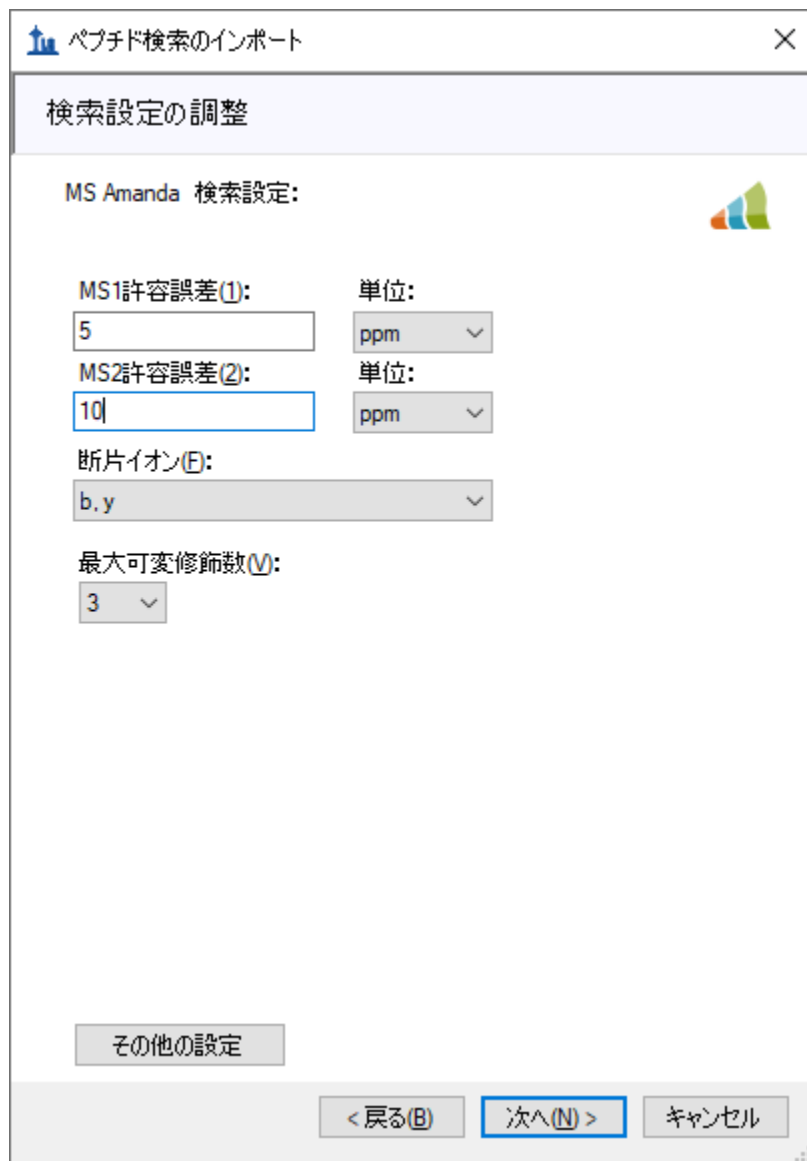
- [次へ] ボタンをクリックします。

ウィザードが [検索設定の調整] ページを開きます。ここでは、DDA 検索に最も重要なパラメータを設定できます。本チュートリアルでは、以下の操作を行います。

- [MS1 許容誤差] フィールドに「5」と入力します。(テキストボックスから移動すると、フォームは単位が ppm であると推定し、単位ボックスをそのように設定するので注意してください。)

- [MS2 許容誤差] フィールドに「10」と入力します。

フォームは以下のようになります。



ペプチド検索のインポート

検索設定の調整

MS Amanda 検索設定:

MS1許容誤差(1): 単位: ppm

MS2許容誤差(2): 単位: ppm

断片イオン(E):

最大可変修飾数(M):

その他の設定

<戻る(B) **次へ(N) >** キャンセル

- [次へ] ボタンをクリックして検索を開始します。

[DDA 検索] ページが検索の進捗状況を示します。このページの [検索をキャンセル] ボタンをクリックして検索をキャンセルすることもできます。

The screenshot shows a window titled "ペプチド検索のインポート" (Peptide Search Import) with a sub-header "DDA 検索" (DDA Search). Below the header, there is a section "検索の進捗状況:" (Search Progress) with a checkbox "タイムスタンプを表示(T)" (Show Timestamps) which is currently unchecked. A large text area displays the following progress log:

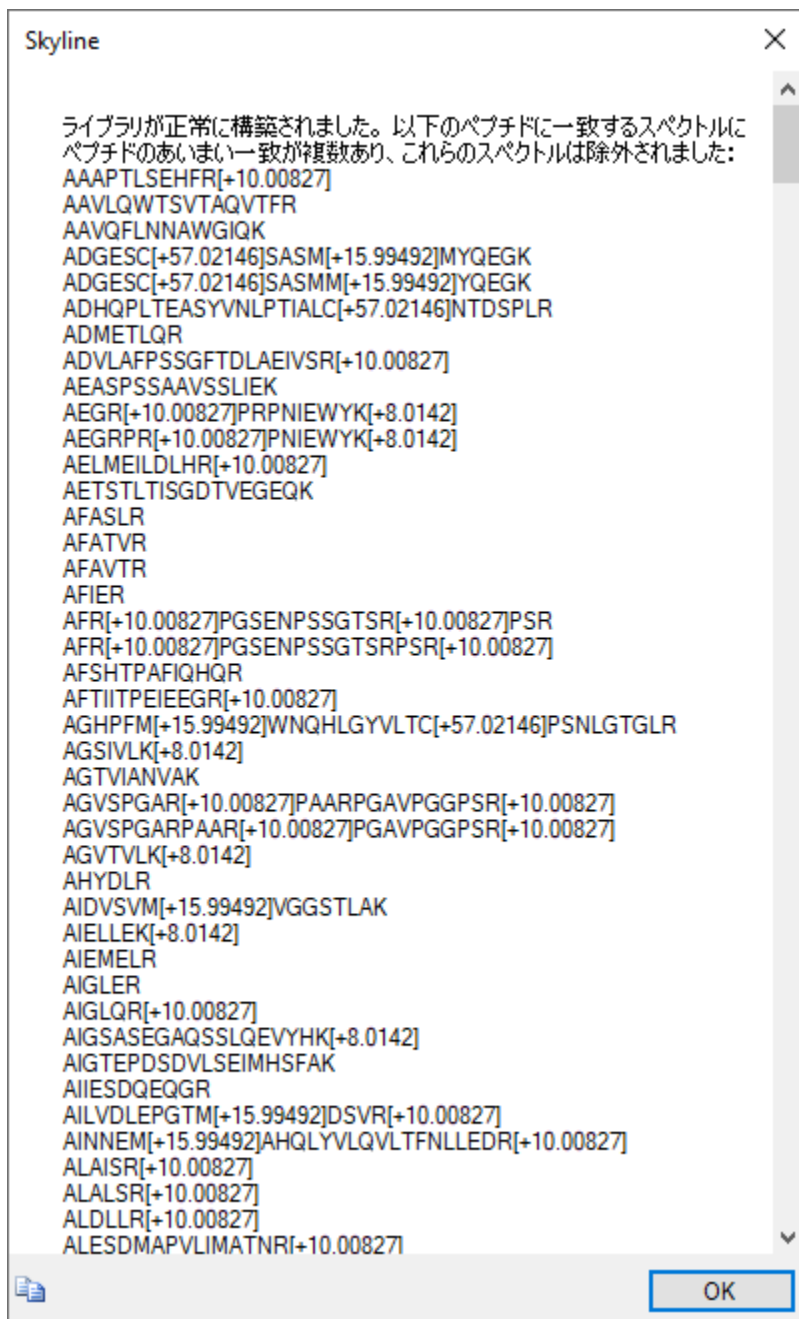
```
Input files contain 106460 ms2 spectra
Searching file 'QE_140221_01_UPS1_100fmolspiked.mz5'...
Searching spectra 1 - 10000 of 106460 spectra
  Starting search against fwd database...
  Loading database
  Loading database done
  Search against fwd database finished.
  Starting search against decoy database...
  Loading database
  Loading database done
  Search against decoy database finished.
Search finished for 10000/106460 spectra
Searching spectra 10001 - 20000 of 106460 spectra
  Starting search against fwd database...
  Search against fwd database finished.
  Starting search against decoy database...
  Search against decoy database finished.
```

Below the text area is a "検索をキャンセル(C)" (Cancel Search) button with a green progress bar to its right. At the bottom of the window, there are three buttons: "< 戻る(B)" (Back), "完了(F)" (Done), and "キャンセル" (Cancel).

検索が完了したら、以下の操作を行います。

- [完了] ボタンをクリックします。

Skyline が検索結果からスペクトルライブラリの構築を開始します。ライブラリの構築が完了するとメッセージボックスが表示され、信頼性が等しい複数の異なるペプチドと解釈することのできるスペクトルがあり、これらのペプチドは無視されるという警告が表示されます。



- [OK] ボタンをクリックしてメッセージを閉じます。

Skyline はその後、ライブラリのドキュメントへのインポートを開始します。インポートが終了すると、ドキュメントにタンパク質を含む基準を設定するようにプロンプトされます。

FASTAをインポート

この操作は、次のターゲットを作成しています。
19,388 蛋白質、47,509 ペプチド、94,412 前駆体、283,234 遷移

ペプチドが含まれている数でタンパク質を抽出しますか。

タンパク質毎の最小ペプチド数
1

すべてのデータを保持

反復ペプチドを削除

重複ペプチドを削除

残り:
6,211 蛋白質、12,582 ペプチド、24,937 前駆体、74,809 遷移

OK キャンセル

- [反復ペプチドを削除] チェックボックスをオンにします（一意ではないペプチドに対して最初に発生するペプチドを維持）。
- [OK] ボタンをクリックします。

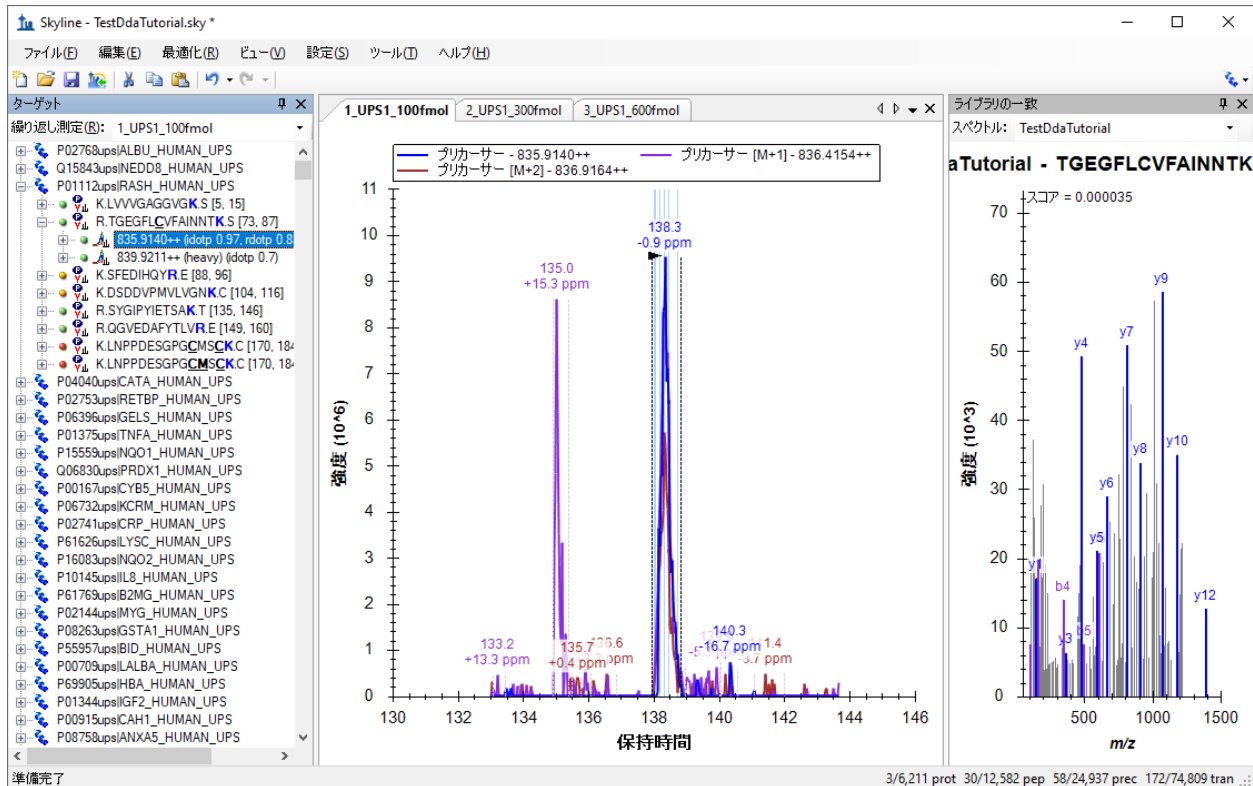
インポートされたデータを表示する Skyline の設定

タンパク質がドキュメントにインポートされると、メイン Skyline ウィンドウで [ターゲット] ビューの上部に UPS タンパク質が表示されます。そこには **6,025** 個のタンパク質が表示されます（ステータスバーに表示される）。Skyline はまた、クロマトグラムの抽出を開始し、進捗状況を [結果をインポート] フォームに表示します。クロマトグラムの抽出の完了には数分かかります。ただし以下の最終ステップ以外はインポート中にそのまま操作を続けることができます。

- 3 番目のタンパク質「P01112ups|RASH_HUMAN_UPS」の横にある [+] アイコンをクリックします。
- そのタンパク質の 3 つ目のペプチド「R.TGEGFLCVFAINNTK.S」の横にある [+] アイコンをクリックします。
- そのペプチドの最初のプリカーサー 835.9140++ をクリックすると、プリカーサーのクロマトグラムとペプチドの MS/MS スペクトルが表示されます。（なおペプチドシーケンス内の太字の下線付きの残基「**C**」は、カルバミドメチルシステインを示します。）
- MS/MS スペクトルが見られない場合は、[ビュー] メニューで [ライブラリー一致] をクリックしてください。

- [ライブラリー一致]ビューで下図の画像ほど多くの注釈付きピークが表示されない場合は、[ビュー]メニューで[イオンタイプ]を選択し、[B]および[Y]のチェックボックスをオンにします。
- ペプチドの全クロマトグラムが見られない場合は、[ビュー]メニューで[自動ズーム]から[なし] (Shift+F11) をクリックします。
- クロマトグラム上を右クリックし、[ペプチドが同定された回数]を選択し、[調整済み]がオンになっていない場合はオンにしてください。

Skyline ウィンドウは以下のようになります。



このドキュメントは、DDA モードでの測定結果 3 件のインポートを含み、MS1 フィルタ向けにフル設定されています。インポートウィザードで [MS/MS の ID の時間 (5 分) のスキャンのみを使用します] の設定が選択されているため、このビューのクロマトグラムの表示時間範囲は約 10 分 (133~143 分) となっています。Skyline ドキュメントを MS1 フィルタ向けに設定しているため、三連四重極 SRM 測定結果にはプロダクトイオンランジション (y-イオンなど) の代わりに、ペプチド TGEGFLCVFAINNTK のプリカーサー -835.914++、プリカーサー[M+1]-836.4154++、プリカーサー[M+2]-836.9164++などの異なるプリカーサー同位体ピークが表示されることに留意してください。

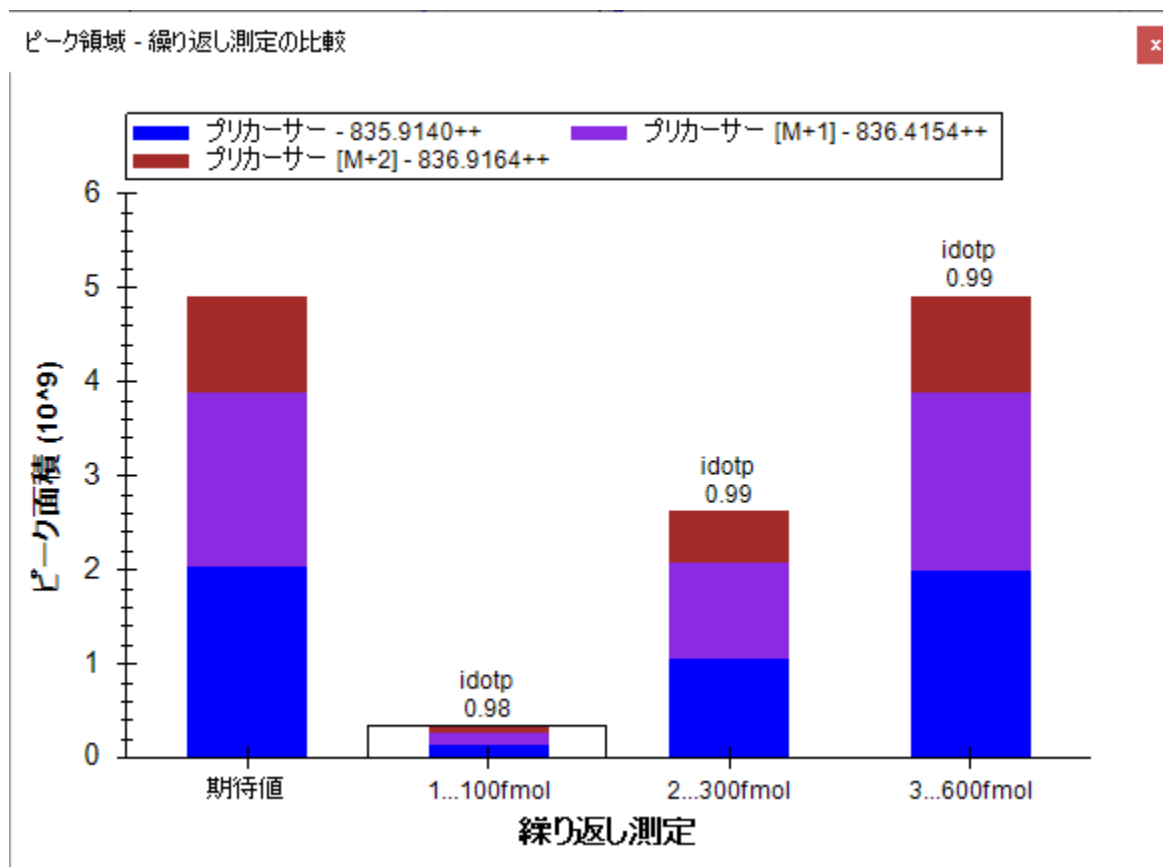
特に特定の MS1 フィルタデータの視覚化をさらに向上させるその他の複数の機能を設定するには、以下の手順を実施します。

- [設定]メニューで[すべて積分]のチェックをオンにします。

これにより、ピークが最大ピークと共溶出しているように見えるかどうかに関わらず、Skylineではピークグループ内のすべてのクロマトグラム（ここではプリカーサーイオン M、M+1、および M+2）が合わせて積分されます。以前のように積分ピーク面積に影響することはなくなりました。

- [ビュー]メニューで、[ピーク領域]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします。

グラフを含む次のようなウィンドウが表示されます。

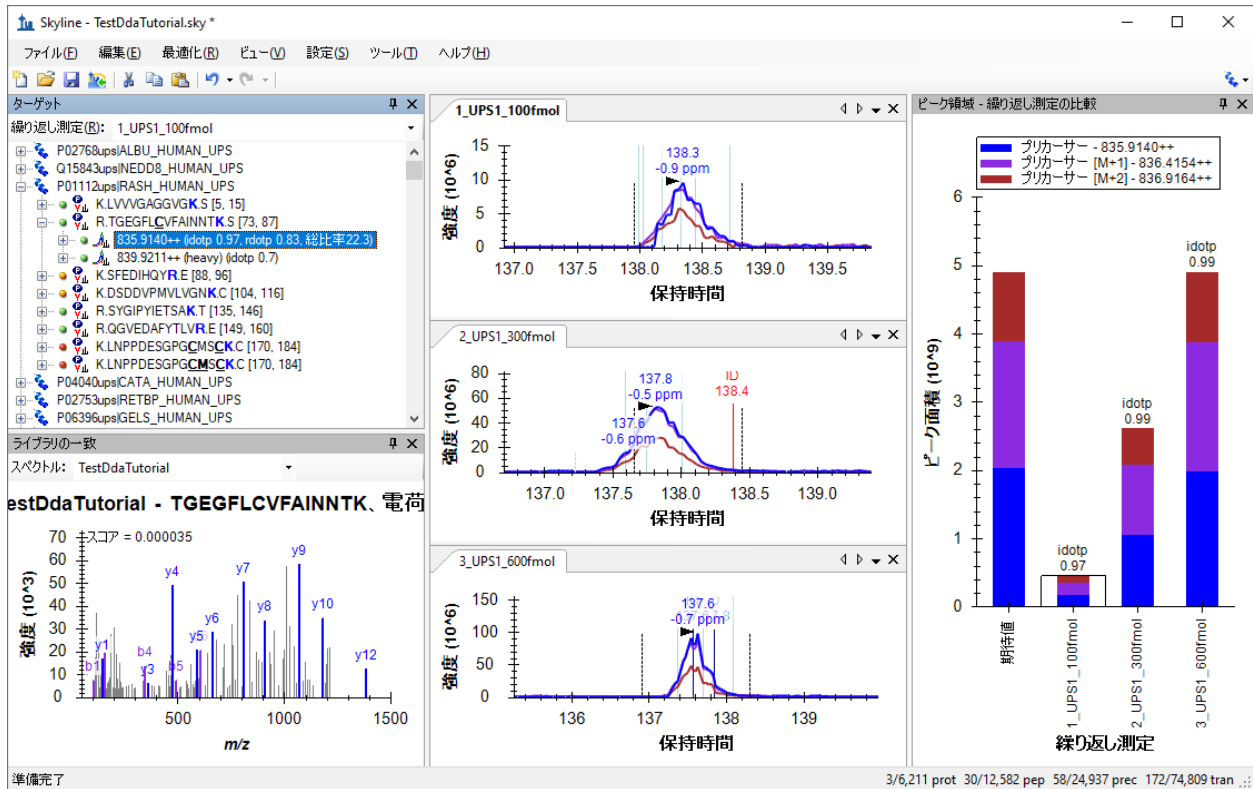


以下の操作を行うと、[ピーク領域]ウィンドウを好きな場所にドッキングできます。

- マウスの左ボタンを押したまま、マウスを[ライブラリの一致]へドラッグします。
- 十字形に並んだ5個のアイコンのセットが表示されたら、マウスを下部アイコンに移動させてマウスの左ボタンから指を離し、Skylineウィンドウの右端で[ピーク領域]と[ライブラリの一致]を上下に分割表示します。
- 同様の手順で、[ライブラリの一致]ビューを[ターゲット]ビューの下に移動します。
- [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。

- [ビュー]メニューで、[グラフを配置]を選択して[列]をクリックします。
- クロマトグラムグラフを右クリックし、[凡例]をクリックしてクロマトグラムグラフ中の凡例の表示をオフにします。

Skyline ウィンドウは以下ようになります。



ここからは、[MS1 フルスキャンフィルタのチュートリアル](#)を見て DDA データを使った作業についての詳細を学ぶことができます。