

Skyline MS1 フルスキャンフィルタ(ドラフト版)

Skyline ターゲット質量分析環境は、Skyline ドキュメントにインポートする質量分析計の生データの情報を視覚的に表示します。この画面を利用して、測定ペプチドやトランジションの最適化および積分境界の設定操作ができます。当初、Skyline は、質量分析法を用いた選択反応モニタリング (SRM—複数反応モニタリングまたは MRM と呼ばれます) 定量アッセイ用に開発されましたが、MS1 スペクトルから時間-強度クロマトグラムを抽出するように機能が拡張され、データ依存的 MS/MS を使用した質量分析を実行するペプチド定量に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¹では、質量分析計をデータ依存的取得 (DDA) モードで操作した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 の既存あるいは新機能を利用すると、多数の繰り返し測定取得におけるペプチドプリカーサーMS1 シグナルの定量化が容易になります。Skyline ではデータ視覚化プロットが非常に優れているため、このモードを使用すると他の「標識のない」定量ツールからの定量出力を視覚化し、よりよく理解できます。

本チュートリアルでは、Skyline の MS1 フィルタを効果的に利用するのに重要な、以下の分野について説明します。

- MS1 フィルタ用の Skyline ドキュメントの設定
- 生データのインポートとスペクトルライブラリからの保持時間情報の使用による、MS1 フィルタでのピーク選択の誘導
- MS1 フィルタされたペプチドのさらなる処理による、繰り返し測定データ全体の定量的情報の取得

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

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/MS1Filtering_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。

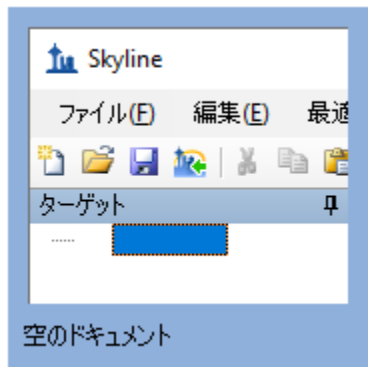
C:\Users\brendanx\Documents

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\MS1Filtering

本チュートリアルを始める前に Skyline を使用していた場合には、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。

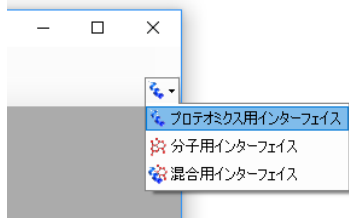



- [設定]メニューで[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで[いいえ]をクリックします。

Skyline のこのインスタンス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、以下のような [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、Skyline ウィンドウの右上隅のタンパク質アイコン  が表示す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多数の方法で編集開始できますが、本チュートリアルではウィザードと呼ばれ、ペプチド検索結果を処理し、ターゲットを設定し、質量分析計データファイルをインポートするステップをガイドするフォームの一連のセットを使用します。

データ依存法でのペプチド検索の Skyline ドキュメントへのインポート

MS/MS のデータ依存取得に基づいてペプチド検索を取得する一番簡単な方法は、[ペプチド検索のインポート]ウィザードを使用して、ペプチド検索結果を Skyline ドキュメントに取り込むことです。

次に、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 MS1Filtering フォルダに移動します。
- [ファイル名] フィールドに「Ms1FilterTutorial.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。

Skyline には以下のようなフォームが表示されます。

次に、このウィザードを使用して、Skyline がサポートしている多数のペプチド検索エンジンの 1 つの出力結果からスペクトルライブラリを作成します。サポートされている検索パイプラインの詳細については、「[ターゲットメソッドの編集](#)」チュートリアルを参照してください。本チュートリアルで使用するファイルは、zip ファイルのダウンロードができるだけ速くなるよう、最低限の情報のみを含むように縮小されていますのでご注意ください。

以下の操作を行って、含まれる検索結果をライブラリに追加します。

- [**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 MS1Filtering フォルダにある .group.xml ファイルを両方とも選択します。
- [**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。

ペプチド検索のインポート

スペクトルライブラリ

構築 既存を使用する

カットオフスコア(C):
0.95

ファイルを検索(S):

100803_0001_MCF7_TiB_L.group.xml
100803_0005b_MCF7_TiTip3.group.xml

ファイルを追加(A)...

ファイルを削除(R)

iRT標準ペプチド:
なし

曖昧な一致を含める(I)

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

- [次へ] ボタンをクリックします。

Skyline は、Ms1FilterTutorial.sky ドキュメントに関連する新しいスペクトルライブラリを構築し、その進行状況を表示します。Skyline によって新しいスペクトルライブラリが保存された MS1Filtering フォルダには、以下の 2 つの新しいファイルが表示されます。

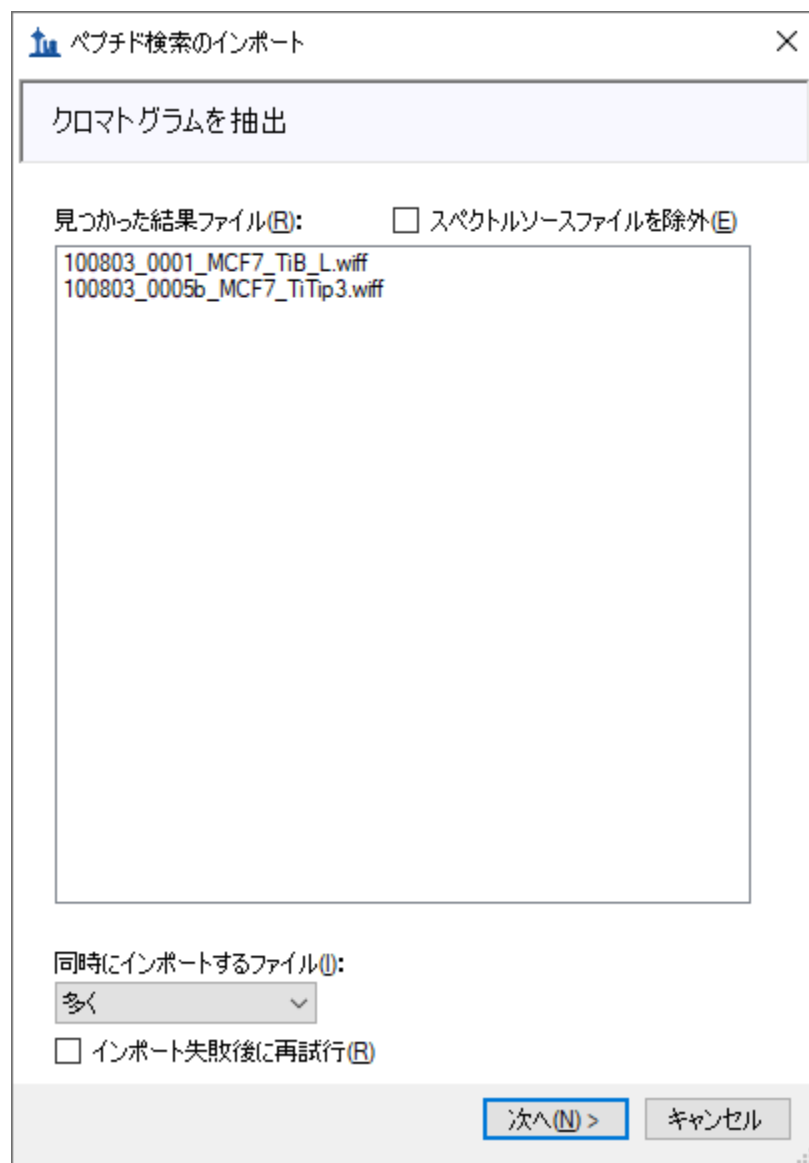
- 最良の一致スペクトルを含む非冗長ライブラリ「MS1FilteringTutorial.blib」。
- すべての一致スペクトルを含む冗長ライブラリ「MS1FilteringTutorial.redundant.blib」。

Ms1FilterTutorial.blib	10/15/2013 10:26 ...	BLIB File	803 KB
Ms1FilterTutorial.redundant.blib	10/15/2013 10:26 ...	BLIB File	1,160 KB

また、ファイル「MS1FilterTutorial.slc」も表示されます。これはライブラリの読み込み時間を改善するための「Skyline Library Cache」ファイルです。これは削除でき、必要に応じて Skyline によって再作成されます。

過去に Skyline を使用してスペクトルライブラリを構築したことがある場合には、随意に名前を付けて好きなのところに保存してきた可能性があります。この場合は、Skyline によって .sky ファイルと同じ名前のライブラリが作成されます。これは、ドキュメント専用のクロマトグラムを保存するのと非常によく似た方法です。クロマトグラムデータで行ってきたのと同じように、後でさらに検索結果を追加し、検索結果を削除することもできます。

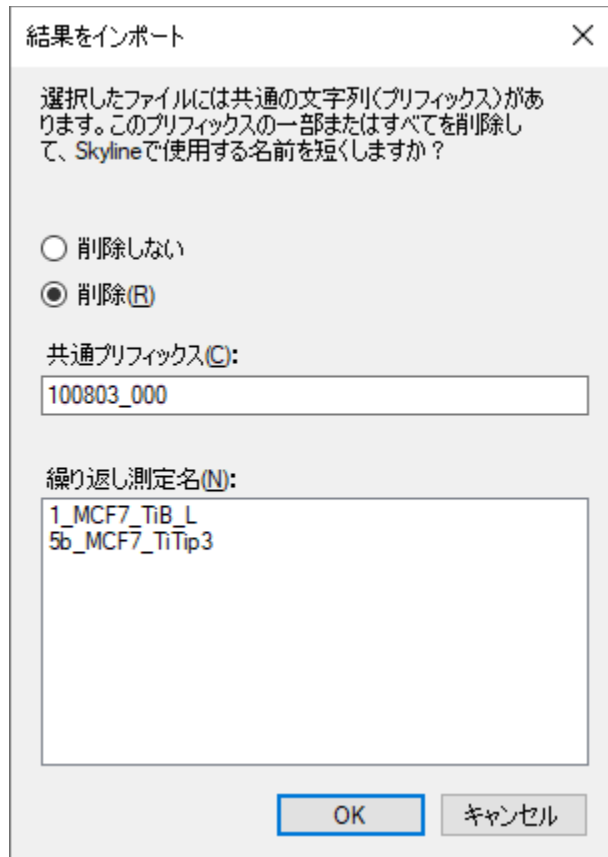
ライブラリ構築が完了すると、以下のようにウィザードで次のページが表示されます。



この場合、ライブラリ構築に利用したスペクトルのソースファイルと一致する WIFF データファイルが見つかっており、当該ライブラリには同定された MS/MS スペクトルを Skyline が抽出するクロマトグラム上で位置付けるために必要な保持時間情報があると思われます。Skyline がクロマトグラム抽出に適したデータファイルを見つけることができない場合には、それを検索するようユーザーに求められます。ライブラリ構築でインポートされたペプチド検索ファイル中に保持時間の情報が見つからない場合は、Skyline からその旨が通知されます。ペプチド検索結果ファイルからのスペクトルソースファイルや保持時間情報の判断に関して Skyline で発生するような問題のトラブルシューティングについては、後述の「ライブラリ保持時間情報の検証」セクションを参照してください。本チュートリアルを続けるには、以下の操作を行います。

- [次へ] ボタンをクリックします。

2 つの WIFF ファイルに共通のプリフィックスをどのように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文字列(プリフィックス)があります。このプリフィックスの一部またはすべてを削除して、Skylineで使用する名前を短くしますか？

削除しない

削除(R)

共通プリフィックス(C):

100803_000

繰り返し測定名(N):

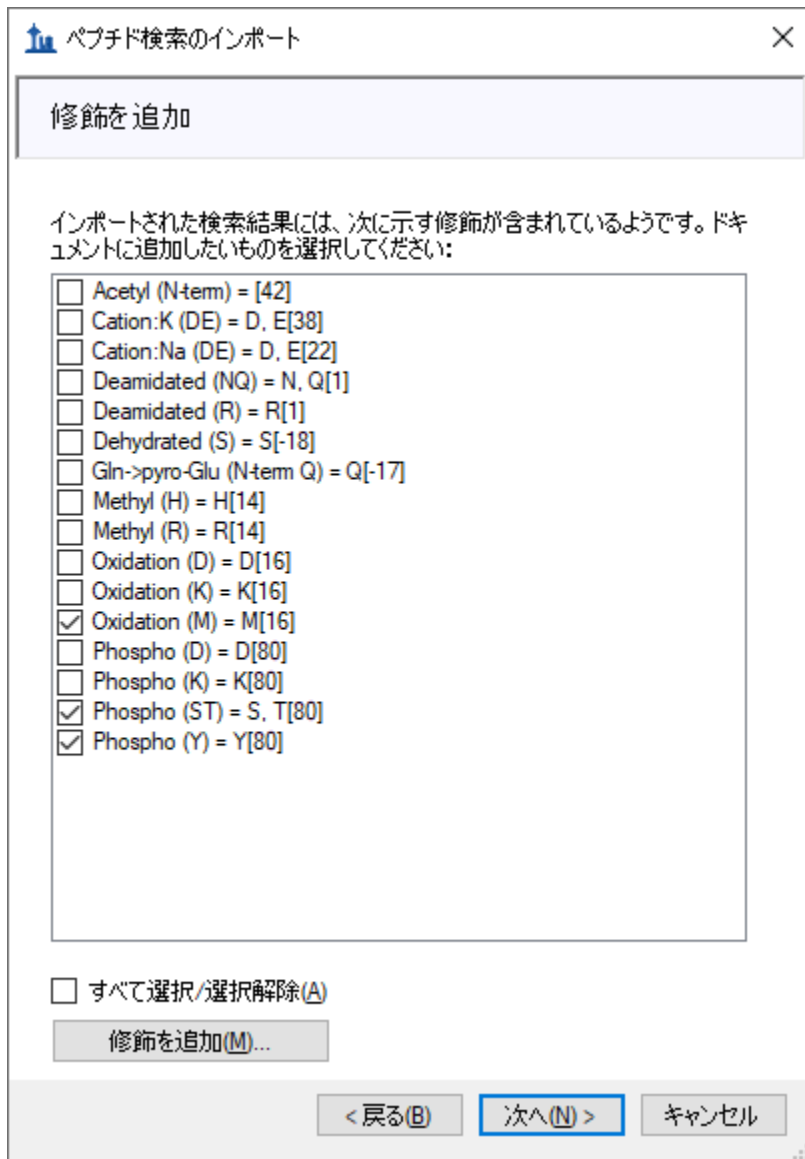
1_MCF7_TiB_L
5b_MCF7_TiTip3

OK キャンセル

- [OK] ボタンをクリックします。

ウィザードは[修飾を追加]ページに進みます。ここでは、検索結果では見つかったものの、ドキュメントにはまだないアミノ酸修飾がすべてリストアップされています。場合によっては、検索で見つかったアミノ酸、質量の組み合わせに一致する Unimod 部位の特定の修飾を提案します。

本チュートリアルに必要な修飾は、「Phospho (ST)」、「Phospho (Y)」および「Oxidation (M)」のみです。リストでこれらのチェックをオンにすると、ウィザードは以下ようになります。



ドキュメントによっては、これらの修飾（例: Oxidation (M)）のうちいくつかはすでに定義されており、その場合リストの表示は異なる可能性があります。

- [次へ] ボタンをクリックします。

ウィザードは [MS1 フルスキャン設定を行う] ページに進み、このページでは以下の操作を行います。

- [プリカーサーの電荷] フィールドに「2,3,4」と入力します。

このページの他のフィールドは、すべて本チュートリアルに使用可能な規定値にし、ウィザードは以下ようになります。

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. Below the title bar is a header area with the text "フルスキャン設定を行う" (Perform full scan settings). The main content area is divided into several sections:

- プリカーサーの電荷** (Precursor charge): A text input field containing "2, 3, 4".
- MS1フィルタ(M)** (MS1 filter): A sub-section containing:
 - 含まれる同位体ピーク(I)** (Included isotopic peaks): A dropdown menu set to "数" (Number).
 - プリカーサー質量アナライザー(P)** (Precursor mass analyzer): A dropdown menu set to "TOF".
 - ピーク(K)** (Peak): A text input field containing "3".
 - 分解能(Q)** (Resolution): A text input field containing "10000".
- 高選択性の抽出を使用します** (Use high selectivity extraction).
- 保持時間のフィルタ** (Retention time filter): A sub-section containing:
 - のスキャンのみを使用します** (Use only the scan): A text input field containing "5".
 - 一致する全てのスキャンを含める** (Include all matching scans).

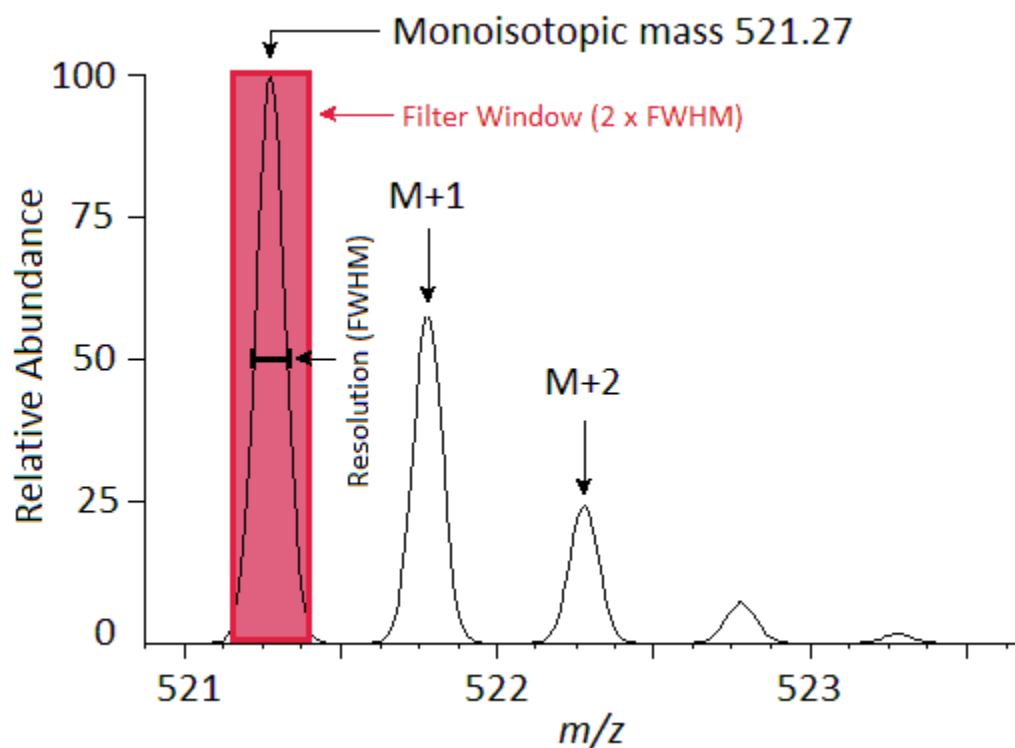
At the bottom of the dialog box, there are three buttons: "<戻る(B)" (Back), "次へ(N)>" (Next), and "キャンセル" (Cancel).

[MS1 フィルタ]セクションでは、デフォルト設定は以下のようになります。

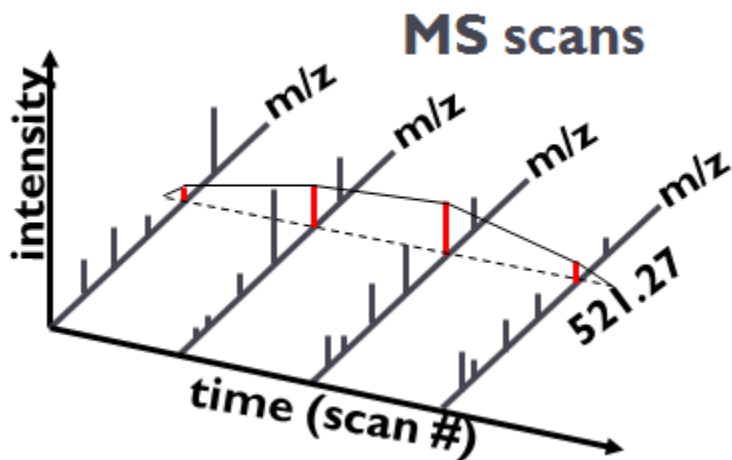
1. [含まれる同位体ピーク]ドロップダウンリストで、「数」を選択します。
2. [ピーク]フィールドでは「3」を選択し、最初の3つの同位体ピーク（M、M+1、およびM+2）が、この高分解能データから選択されるようにします。
3. [プリカーサー質量アナライザー]ドロップダウンリストでは、「TOF」を選択します（データがQSTAR Eliteで取得されているため）。
4. [分解能]フィールドのデフォルト値は「10,000」です。このフィールドにより、各プリカーサー m/z のMS1フィルタウィンドウ幅が規定されます。Skylineでは、この値を用い

て m/z のピーク半値全幅 (FWHM) を予測し、また以下に示すように、その FWHM 値の 2 倍の値をフィルタウィンドウとして使用します。

注：[高選択性の抽出を使用します] チェックボックスをオンにすると、抽出範囲を FWHM に狭めることができます。複雑な試料ではこの設定が推奨されます。その他のデータセットおよび実験については、装置の性能によって分解能を調整できます。



Skyline で表示されるクロマトグラムは、以下に示すように、経時的に抽出した一連のシグナル強度で構成されます。



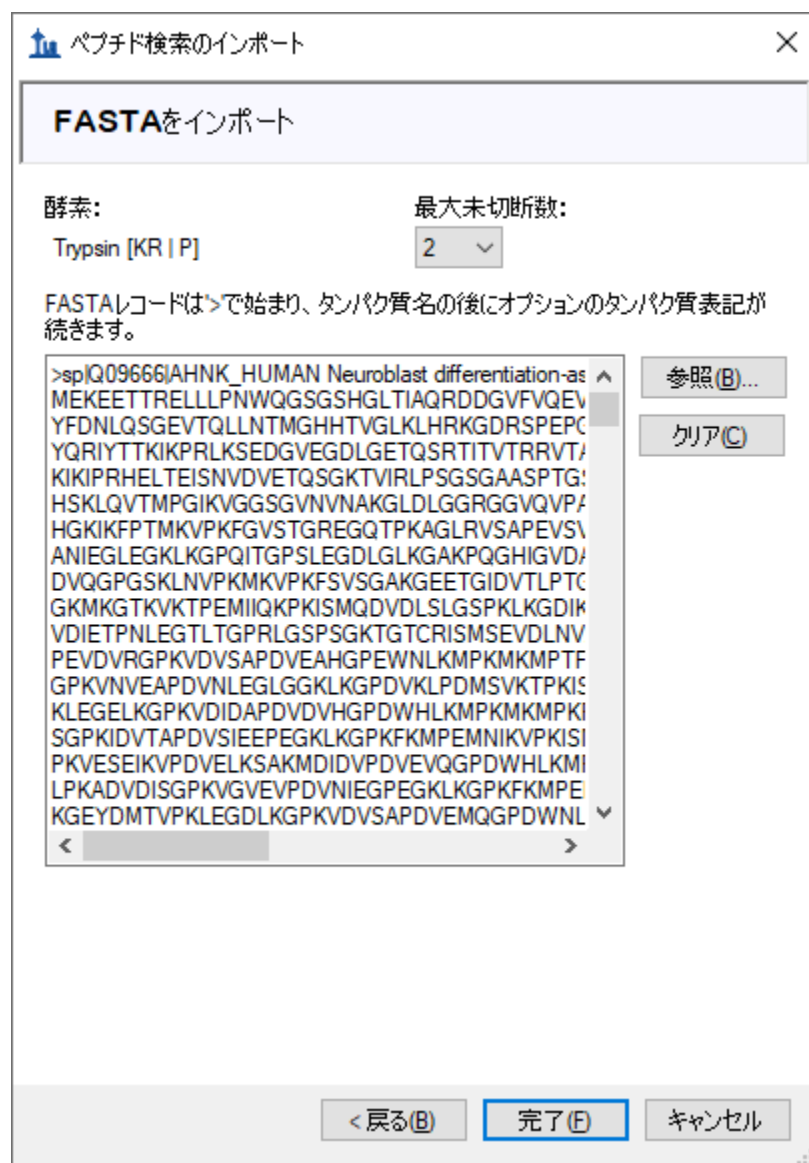
[保持時間のフィルタ] セクションでは、[MS/MS ID の [5] 分以内のスキャンのみを使用] を選択していることに注意してください。これは、ID が 1 つだけのペプチドに対し、Skyline はその ID 周囲の 10 分のクロマトグラムを抽出することを意味します。3 分間にわたる複数セットの ID については、これらの ID の両側に 5 分ずつが追加された計 13 分のクロマトグラムが抽出されます。ある測定に特定のペプチドの ID が一切ない場合、Skyline は他の測定の ID の保持時間を並べ比較して、クロマトグラムを抽出する時間の範囲を決めます。

- [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。SwissProt のヒトタンパク質全エントリの FASTA ファイルをインポートすると、既知のペプチドの包括的なリストが入手できます（この MS 実験では、MCF7 ヒト乳がん細胞株試料と後続のリン酸化ペプチド濃縮物を使用しています）。ただし、ファイルサイズの関係で、以下の操作を行って 12 個のヒトタンパク質のみを含む本来よりもずっと小さい FASTA ファイルをインポートします。

- [最大未切断数] ドロップダウンリストで、「2」を選択します。
- [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 MS1Filtering フォルダの「12_proteins.062011.fasta」ファイルを選択します。
- [FASTA を開く] の [開く] ボタンをクリックします。

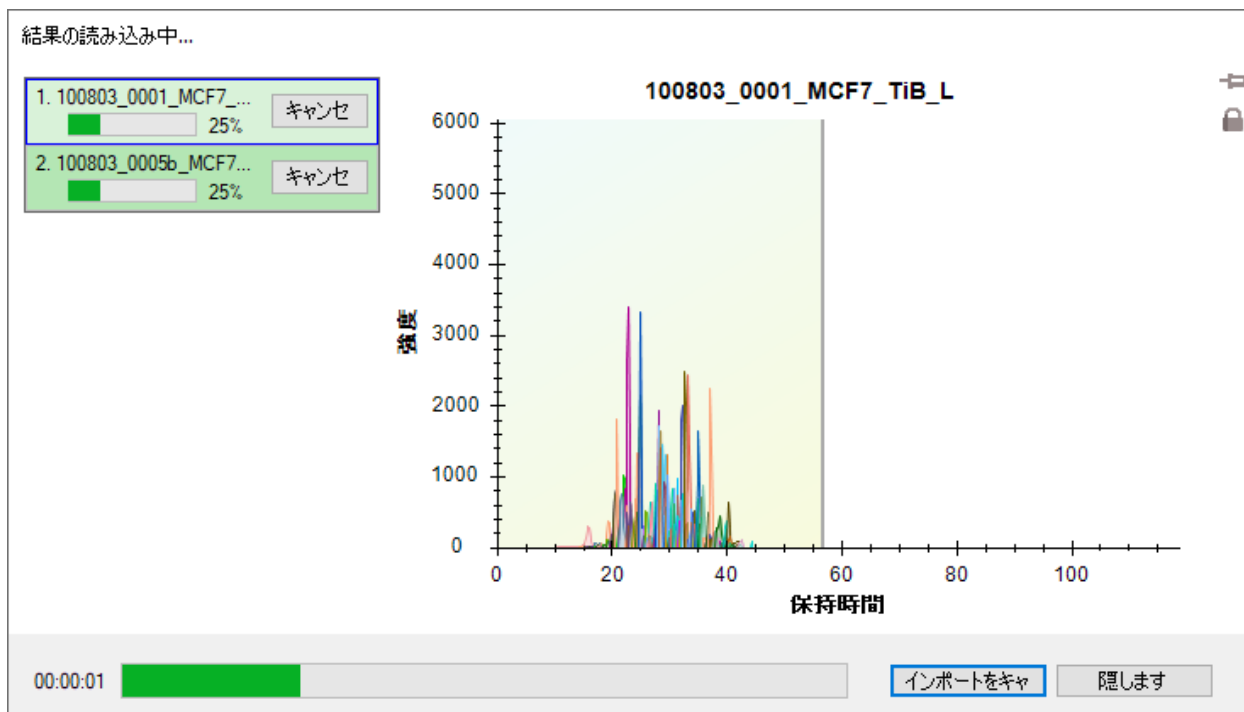
ウィザードは以下ようになります。



- [完了] ボタンをクリックします。

Skyline は、FASTA ファイル内でインポートしたペプチド検索結果中のスペクトルと一致するすべてのペプチドに対してターゲットを追加します。その後、2つの WIFF ファイルのインポートと、そこからのクロマトグラムの抽出を開始します。

進行状況はグラフで表示されます。



インポートが完了したら、クロマトグラムデータを検討する前に、まず今作成したスペクトルライブラリの詳細を見てみましょう。

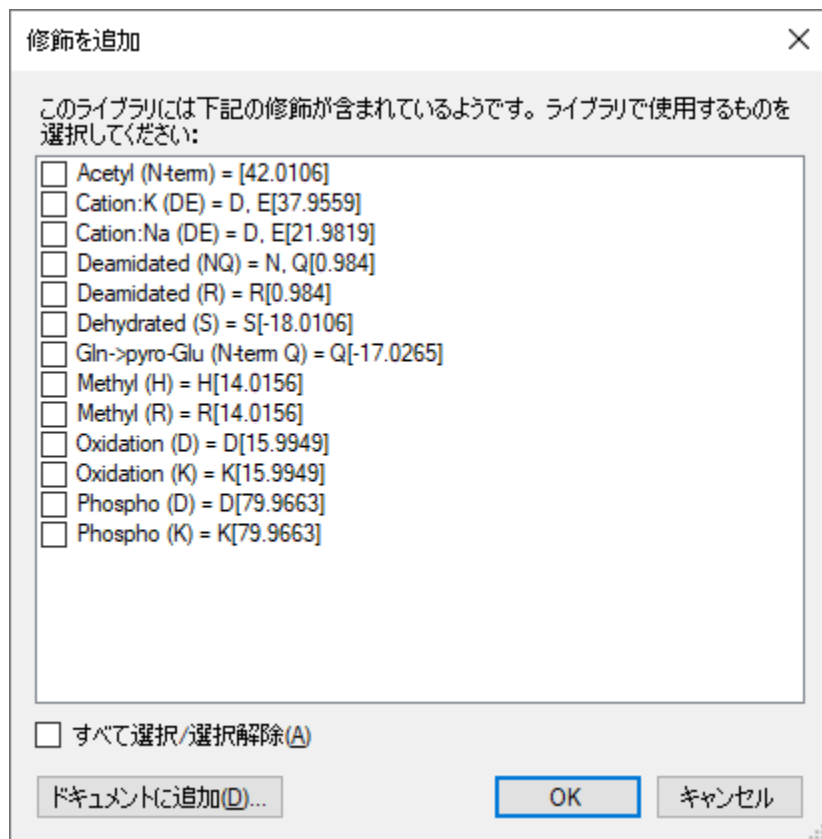
ライブラリの保持時間情報の検証

ペプチド検索パイプライン結果からの MS1 フィルタのスペクトルライブラリ構築はまだ行っていませんが、これを構築する場合にはこれから説明する Skyline の機能を活用するのに必要な保持時間情報が、作成したライブラリに含まれていることを必ず確認してください。[ペプチド検索のインポート]ウィザードを使用するメリットの1つは、作成したライブラリに必要な情報が欠けていると早期に通知されることです。

MS1 フィルタピークを選択やピーク注釈に使う保持時間の情報が先ほど作成したライブラリに含まれているかを検証するには、以下の手順を実施します。

- [ビュー]メニューで[スペクトルライブラリ]をクリックします。

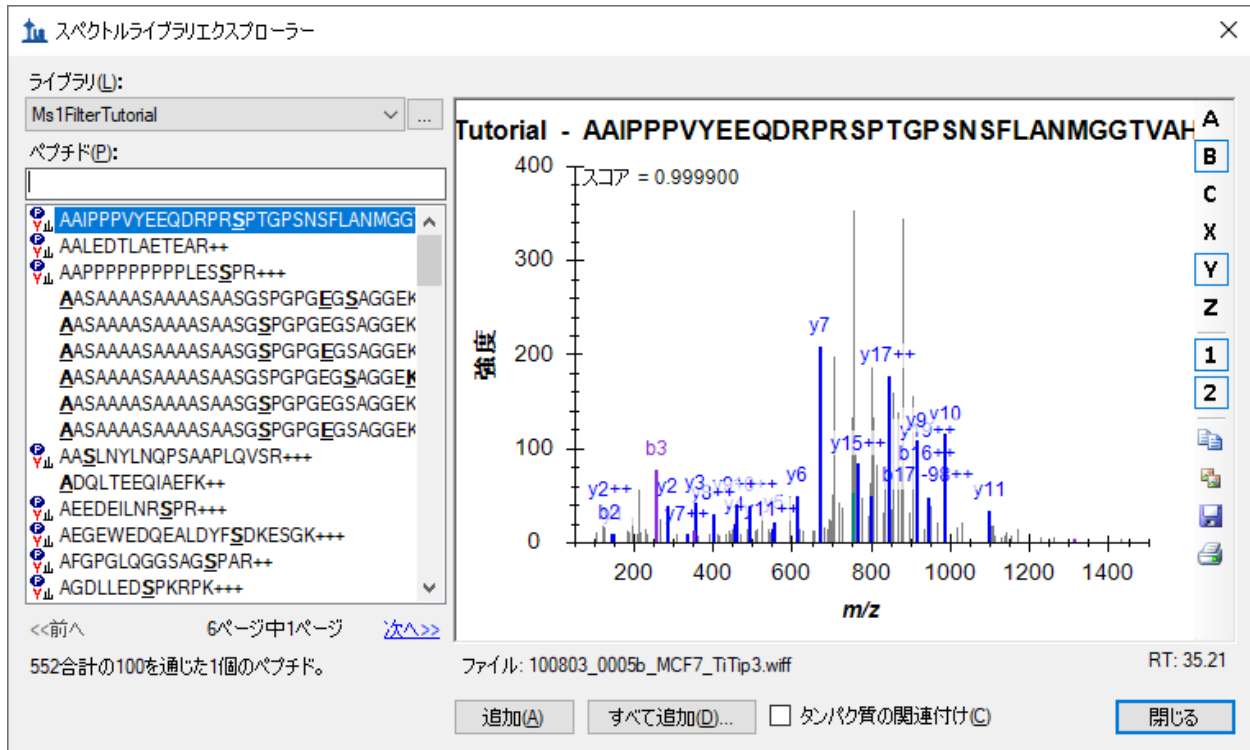
Skyline はここでも、ライブラリ中で検出された修飾の使用を提案してきます。これは [ペプチド検索のインポート] ウィザードでドキュメントに追加しないことにした修飾です。



これらの修飾を [スペクトルライブラリエクスプローラー] で使用することにしても、その修飾を受けるペプチドを [スペクトルライブラリエクスプローラー] でドキュメントに追加しない限り、これらは現在のドキュメントには追加されません。ただし、これらの修飾は本チュートリアルでは重要ではないため、次の操作を行ってそのまま続けます。

- [OK] ボタンをクリックします。

[スペクトルライブラリエクスプローラー] は以下のように表示されます。



ペプチドリストの中で、シーケンス文字列の左側にアイコンの付いていないペプチドが、今回使用しないことにした修飾を含むペプチドです。

スペクトルグラフの下には、「ファイル: 100803_005b_MCF7_TiTip3.wiff」および「RT: 35.21」と表示されています。「RT:」値により、保持時間情報があることがわかります。また「ファイル:」値により、このスペクトルが Skyline にインポートされたファイルと正しく関連付けられていることがわかります。「ファイル:」値がインポートするファイルとぴったり一致する必要はありません。Skyline は、多くのペプチド検索パイプラインで生の装置データが mzXML、mzML、MGF、MS2 などのフォーマットに変換されることを認識しています。一般に、Skyline は「basename.mgf」が「basename.wiff」に一致するような、ベース名の一致を検索します。パイプラインでは大幅な柔軟性が必要となる特殊な事情があるため、「BASENAME.mzML」が「Baseline.RAW」と一致するようにこの一致は大文字小文字も区別せずに行われます。最後に、複数のドット拡張子の処理も含まれており、「basename.c.mzXML」は「basename.raw」と一致することになります。ただし、「F011852.dat」のようなものや、Skyline にインポートしようとするデータとベース名を共有しない他の検索出力ファイルの場合は、検索パイプラインを再検討するか、Skyline チームと協力して、この問題を解決する必要があります。特に Mascot .dat ファイルについては、Skyline ウェブサイトの「[Mascot 検索結果が欠けている ID 注釈](#)」ページを参照することをお勧めします。その他の問題については、Skyline サポート掲示板 ([ヘルプ]メニューで[サポート]をクリック) に、そのような問題を投稿することをお勧めします。

ここで、下向き矢印キーを押して別のペプチドを選択すると、「ファイル:」値および「RT:」値が変わります。MS/MS スペクトル、そのソースファイルや保持時間を見たら、以下の操作を行って作成したドキュメントに戻ります。

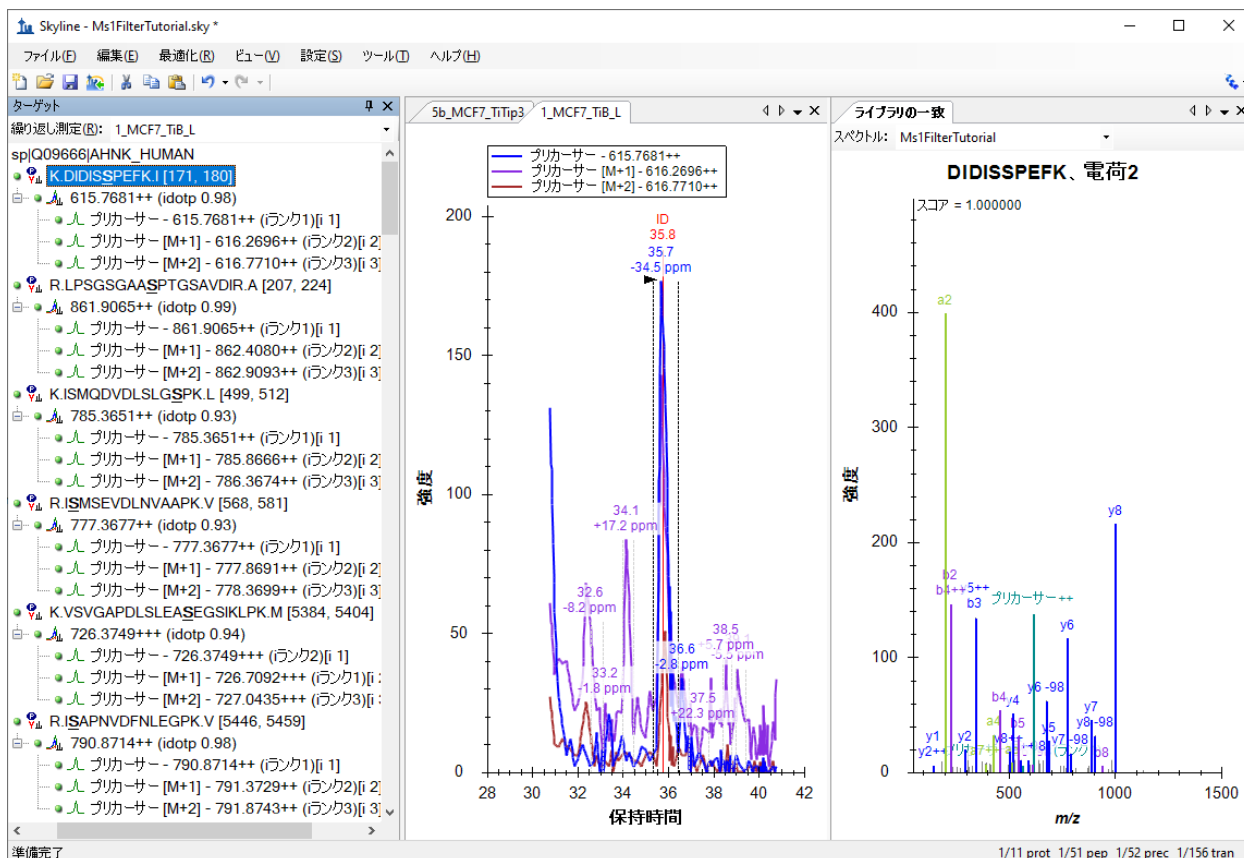
- [スペクトルライブラリエクスプローラー]の[閉じる]ボタンをクリックします。

ペプチドターゲット、スペクトル、およびクロマトグラム

Skyline [ターゲット] 表示には、51 個のペプチド（ステータスバーでカウント表示）が表示されます。

- 最初のホスホペプチドである K.DIDISSPEFK.I のシーケンスをクリックすると、MS/MS スペクトルが表示されます。（ペプチドシーケンスで太字の下線付きの残基「**S**」は、セリンリン酸化を示していることに注意します。）
- [ビュー]メニュー上に MS/MS スペクトルが見られない場合は、[ライブラリー致]をクリックします。
- 以下の画像と同じ数の注釈付きピークが見られない場合は、[ビュー]メニューで[イオンタイプ]を選択し、[A]、[B]、[Y] および[プリカーサー]のチェックをオンにします。
- 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]を選択し、[なし] (Shift+F11) をクリックします。
- [編集]メニューで[すべて展開]を選択し、[プリカーサー]をクリックします。

Skyline ドキュメントは以下ようになります。



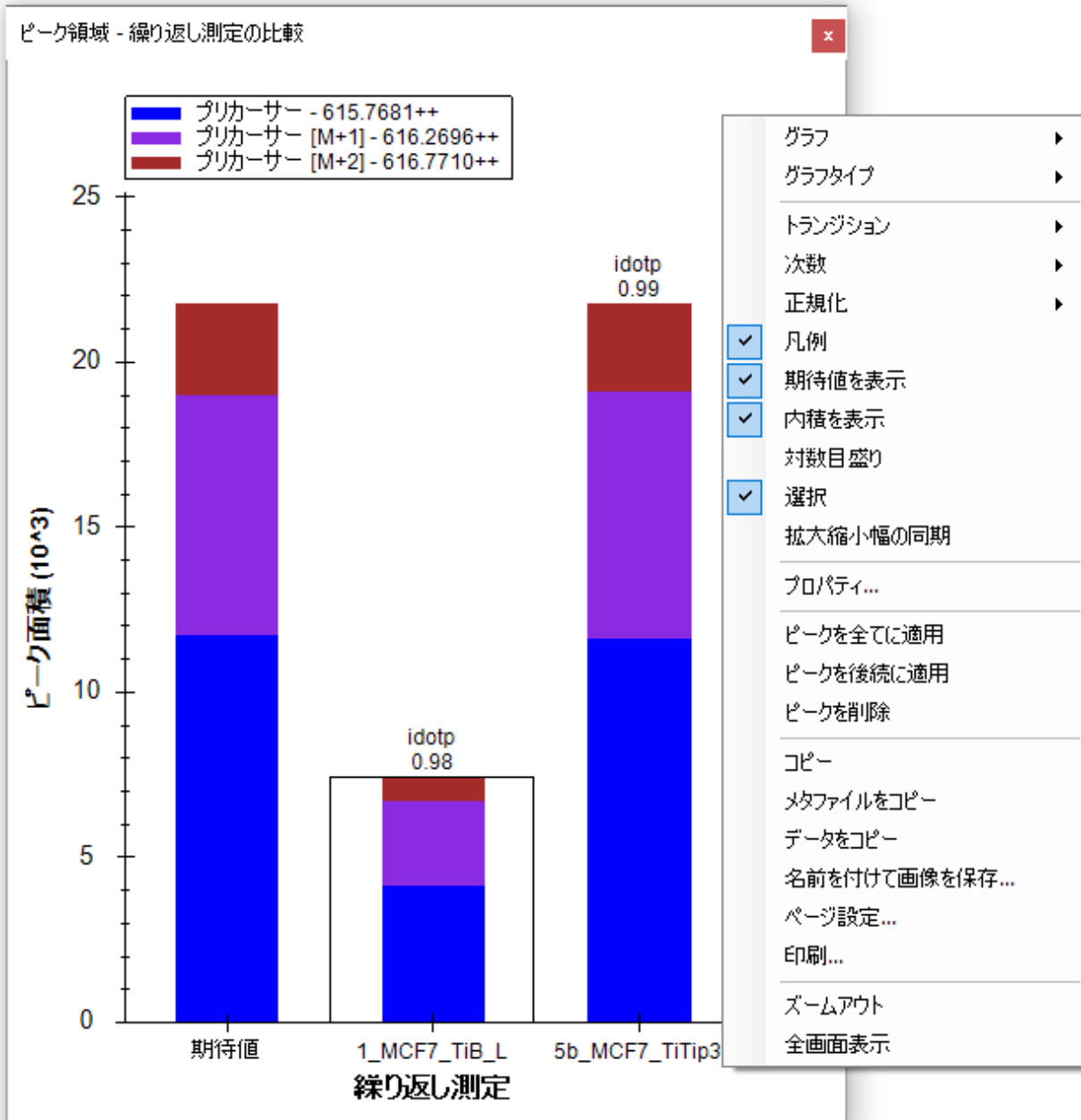
このドキュメントは完全に MS1 フィルタ向けに設定されており、DDA モードでの測定結果 2 件がインポートされています。インポートウィザードで [MS/MS ID の [5] 分以内のスキンのみを使用] と設定したため、このビューのクロマトグラムの時間は約 10 分 (31~41 分) となっています。Skyline ドキュメントを MS1 フィルタ向けに設定した場合、三連四重極 SRM 実験ではプロダクトイオンのトランジション (y-イオンなど) が表示される場所では、ペプチド DIDISSPEFK ではプリカーサー - 615.7681++, プリカーサー [M+1] - 616.2696++, プリカーサー [M+2] - 616.7710++ のように、プリカーサーの異なる同位体ピークが表示されることに注意してください。

一般に、特に特定の MS1 フィルタデータの視覚化に役立つ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 (ここではプリカーサーイオン M, M+1, および M+2) すべてのクロマトグラム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。

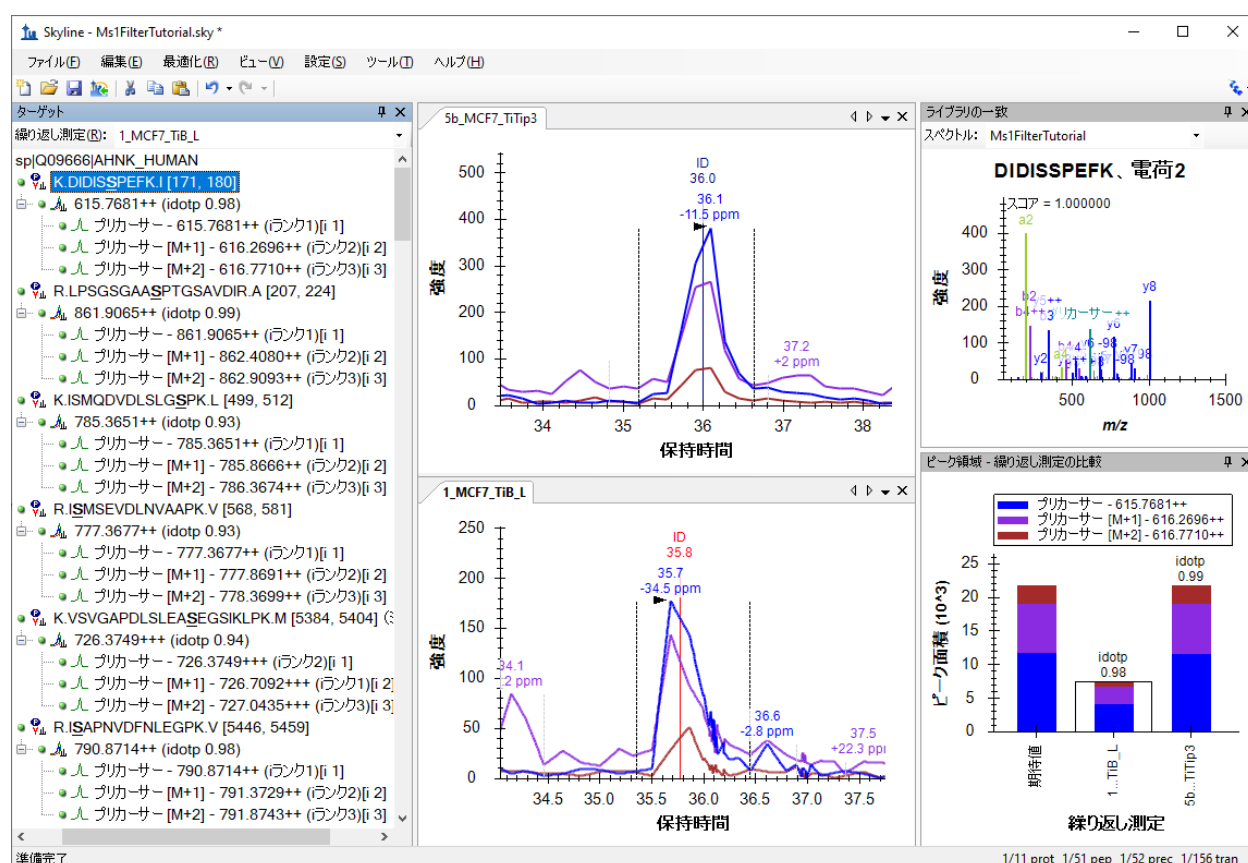
- [ビュー]メニューで[ピーク面積]を選択し、[繰り返し測定の比較]をクリックします。
- [ピーク面積]ウィンドウで右クリックし、[正規化]を選択して[なし]をクリックします。
- [ピーク面積]ウィンドウ内を右クリックし、[期待値を表示]および[内積を表示]のチェックをオンにします（これら2つの機能については後述します）。



以下の操作を行うと、[ピーク面積]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、マウスのカーソルを[ライブラリの一致]表示までドラッグします。
- 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、左マウスのボタンから指を離して Skyline ウィンドウの右端で、[ピーク面積]表示と[ライブラリの一致]表示でスペースを分割します。
- [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、[タイル] (Ctrl+T) をクリックします。

Skyline ファイルは以下ようになります。



クロマトグラム表示には、すべてのプリカーサー同位体イオン M (青)、M+1 (紫)、M+2 (茶) の MS1 抽出イオンクロマトグラムが表示されます。SRM 用に Skyline を使用してきた人は見慣れているかもしれませんが、選択したピークの保持時間注釈の下には質量誤差の注釈が新たに表示されます。これは、注釈付きクロマトグラム全体のすべての積分ポイントにおける質量誤差の加重平均です (この場合、M または青線のもの)。質量誤差が表示されない場合、クロマトグラム表示を右クリックして [質量誤差] をクリックします。先に述べたように、データは古い

QSTAR Elite からのものであるため、質量精度は最新の高分解能装置で期待できるほどのものではありません。

また、抽出イオンクロマトグラム上には、グラフ上部に ID 注釈のある縦線が表示されています。ID は「同定」を意味し、取得された MS/MS スペクトルの保持時間が、この特定のペプチドに信頼性をもって同定されていることを示しています。赤線は、これが [ライブラリの一致] 表示で現在表示されているスペクトルであることを示します。グラフ上部の ID 注釈をクリックすると、[ライブラリの一致] 表示に 5b_MCF7_TiTip3 繰り返し測定 の同定されたスペクトルが表示されます。これらは、以前インポート時に作成したライブラリに保存されています。また、繰り返し測定名および保持時間 (36 分) は、ID 注釈をクリックする前に選択された非常長ライブラリからの最良スペクトルではなく、[ライブラリの一致] 表示の上部にある [スペクトル] ドロップダウンリストで選択されます。ID 注釈をクリックするか、[スペクトル] ドロップダウンリストを使用して 2 つの収集されたスペクトル間を切り替えると、これらの 2 つのスペクトルはかなり類似していることがわかります。

本ドキュメント内の他の 51 個のペプチドをいくつか検討する前に、まずは以下の操作を行います。

- [編集] メニューで [すべて折り畳む] を選択し、[ペプチド] をクリックします (Ctrl+shift+D) 。

次に、フォーカスが [ターゲット] 表示にあることを確認し、キーボードの下向き矢印キーを使用して 1 つずつペプチドを選択します。最初の 3 つのリン酸化ペプチドについては、それぞれが各繰り返し測定で 1 回同定されており、[ライブラリの一致] スペクトルグラフでは、「-98」 (-H₃PO₄) の注釈がついたニュートラルロスイオンが複数見られます。

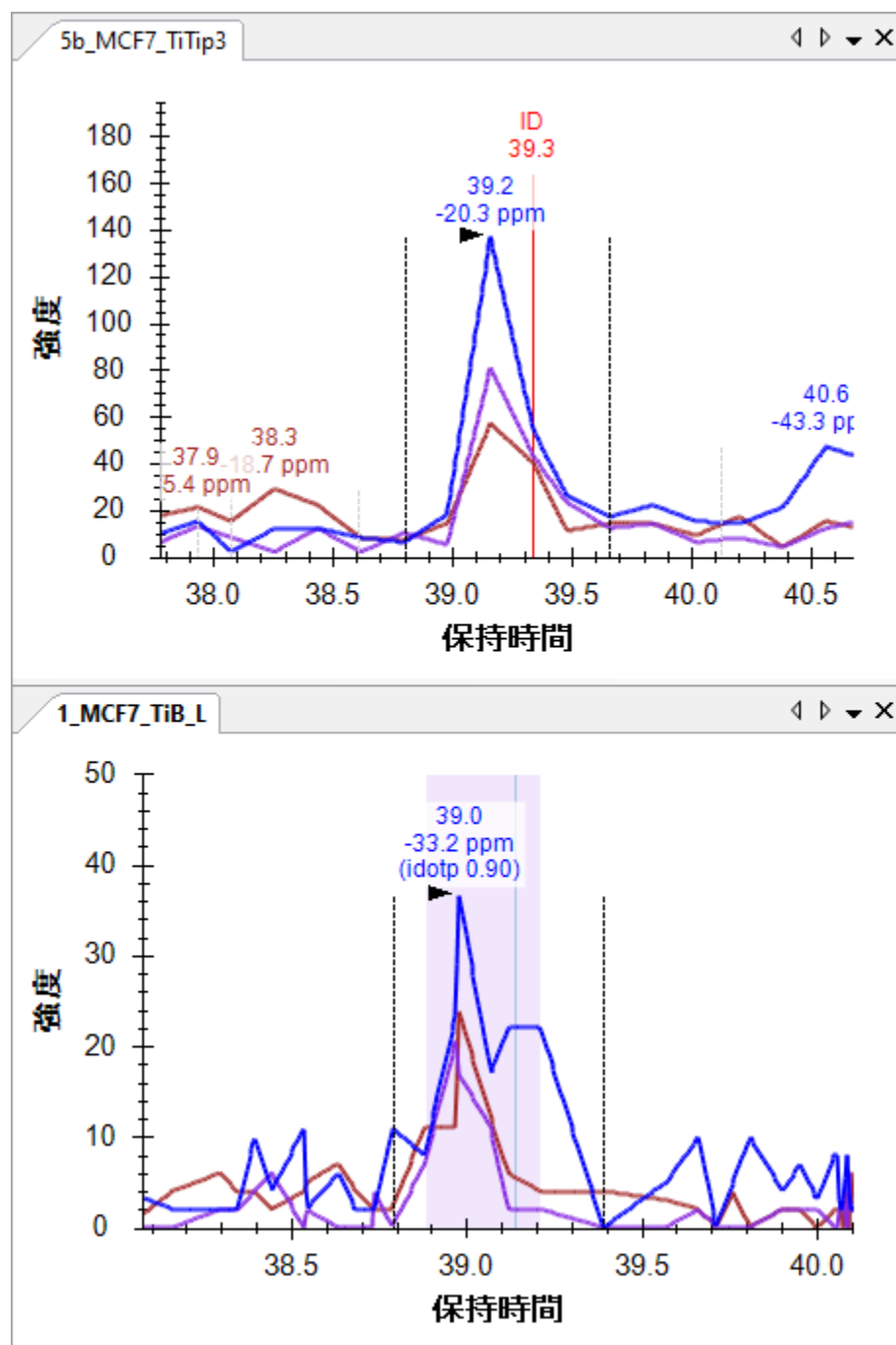
4 つ目のペプチド ISMSEVDLNVAAPK については、繰り返し測定 5b_MCF7_TiTip3 のみに ID 注釈が付いていることがわかります。繰り返し測定 1_MCF7_TiB_L のピークは、5b_MCF7_TiTip3 の ID の保持時間のアライメントによって選択されました。アライメントされた ID を確認するには、次の操作を行います。

- クロマトグラムグラフを右クリックし、[ペプチドが同定された回数] を選択して、[アライン] のチェックがまだオンになっていなければクリックしてオンにします。

繰り返し測定 1_MCF7_TiB_L のピーク積分境界の内側に水色の線が表示されます。この場合、ピークはまだ積分境界の左側にある可能性が高くなっています。これを修正するには以下の操作を行います。

- X 軸の下約 38.8 分のところでクリックし、約 39.4 分のところまでドラッグします。

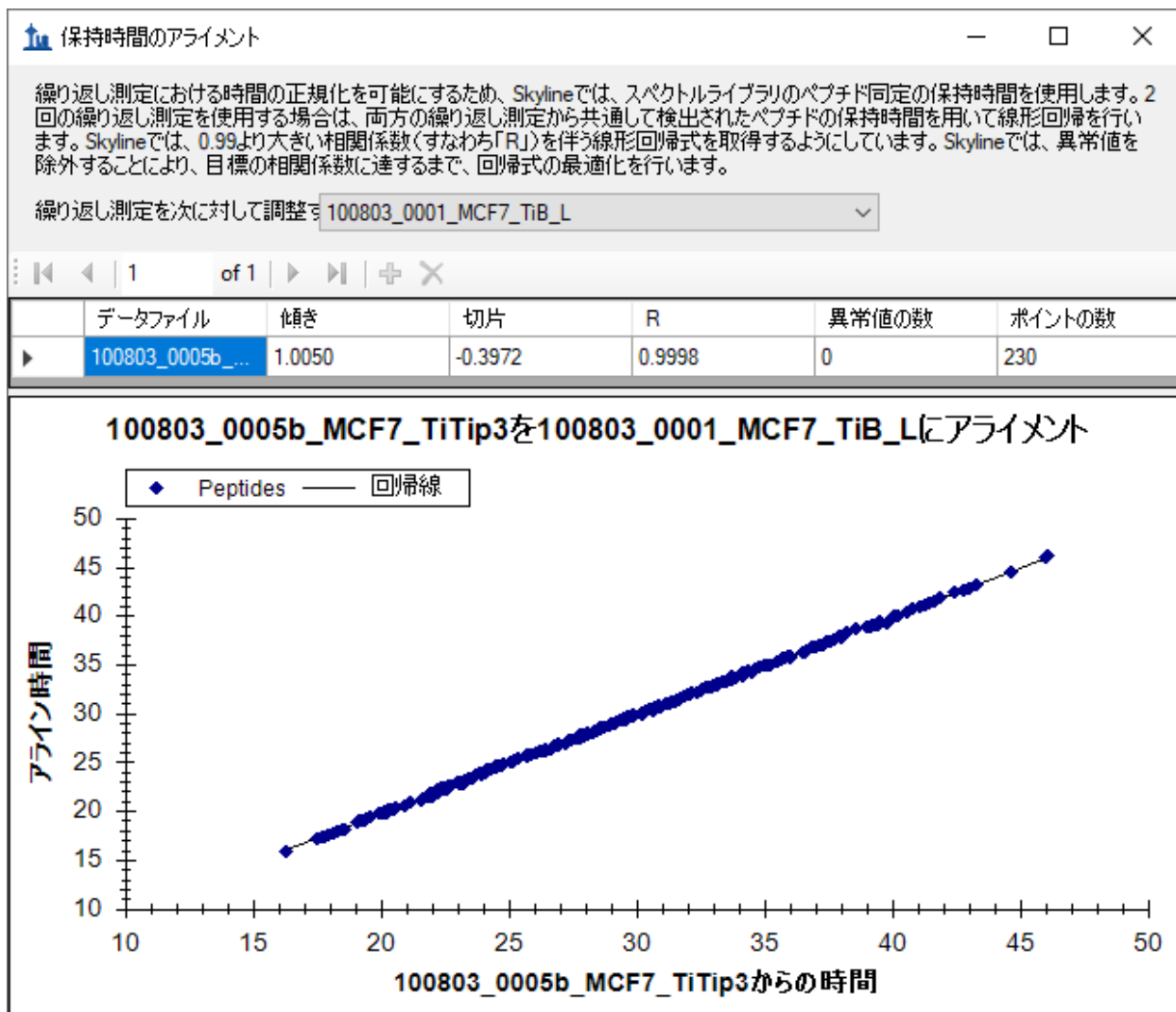
クロマトグラムグラフは以下ようになります。



保持時間アライメントがどのように動作しているのかについての洞察を得るには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで[保持時間]を選択し、[アライン]をクリックします。

Skyline には以下のようなウィンドウが表示されます。



このウィンドウには、各測定間での保持時間のアライメントに使用した線形回帰のポイントが表示されます。Skyline では、スペクトライブラリ内の各スペクトルのソースファイルと、その他すべてのスペクトルソースファイルとの間で、このような線形回帰が計算されます。2つ以上の測定結果が存在する場合、[繰り返し測定を次に対して調整する] ドロップダウンリストで選択したもの以外のすべての結果が1行ずつ表示されます。計算された一次方程式を用いると、上図のようにある測定でIDが存在しない場合に各測定間でMS/MS ID時間をマッピングしてピーク選択を改善できます。線形回帰を利用した保持時間スケール間マッピングの詳細については、[iRT 保持時間予測](#) チュートリアルをご覧ください。

この場合、2つの測定における保持時間の再現性は、傾き 1.005、切片 -0.3972、相関係数 (R) 0.9998、異常値なしと、かなり良好であることがわかります。当該フォーム上部にあるパラグラフで述べられているように、R が 0.99 未満である場合、Skyline では R が 0.99 より大きい一連のペプチドが見つかるまで異常値を破棄し、結果として生じる一次方程式を利用します。

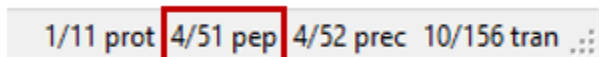
- グラフを右クリックし、[プロット]を選択して[残余]をクリックすると、線の30秒以内にすべてのポイントが収まるのがわかります。

また、この回帰の計算は230個のポイントで計算されていることに気付かれたかもしれませんが、ドキュメントには51個のペプチドしかなく、必ずしもすべてが両測定で同定されたわけでもありません。ただし、構築したこのライブラリには合計552個のペプチドがあり、多くには本ドキュメントで使用されない修飾があります。つまり、552個中230個のペプチドしか両ファイルでは同定されなかったということです。Skylineは、この回帰分析を行うにあたり、2つの検索結果ファイルに存在するIDすべてを利用しようとしています。1回の測定に複数のIDがある場合、Skylineは一番保持時間が早いIDを使用します。これは、遅い時間のIDや平均的なIDよりも安定している可能性が高いためです。たとえば、早期に溶出するペプチドが勾配洗浄中に再び同定されるという例がありました。

- [保持時間のアライメント]ウィンドウの右上隅の赤いX印をクリックしてウィンドウを閉じます。

データの再確認

この基礎知識とこのようなSkylineの設定により、このドキュメントにある51個のペプチドすべてを素早く確認することができます。そのためには[ターゲット]表示をクリックし、下向き矢印キーを使って各ペプチドを順に選択してください。51個あるペプチドのうちどれが現在選択されているかは、Skylineウィンドウ右下にあるステータスバーで確認できます。



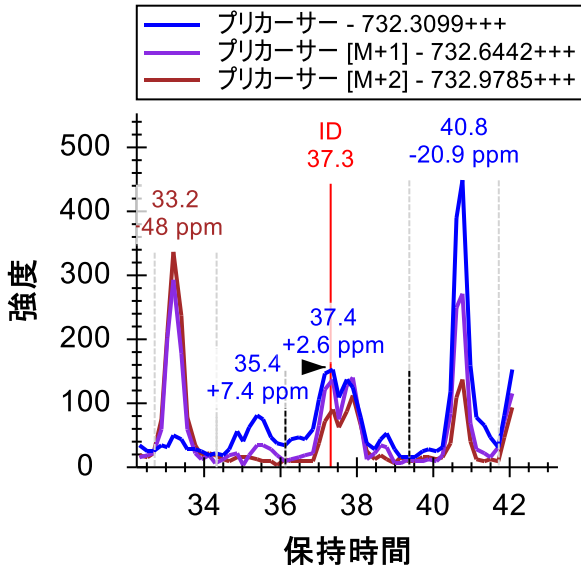
1/11 prot 4/51 pep 4/52 prec 10/156 tran ...

ペプチドISKの下には、ピーク積分が容認できるペプチドが4つあります。ただしVSVGAPDLSLEAS~~E~~EGSIKLPKは、5b_MCF7_TiTip3に対して微調整された可能性があります。両測定でIDのつくペプチドもあれば、1つの測定でしかIDが見つからないものもあります。Skylineは、アライメントを利用して正しいピークを選びます。

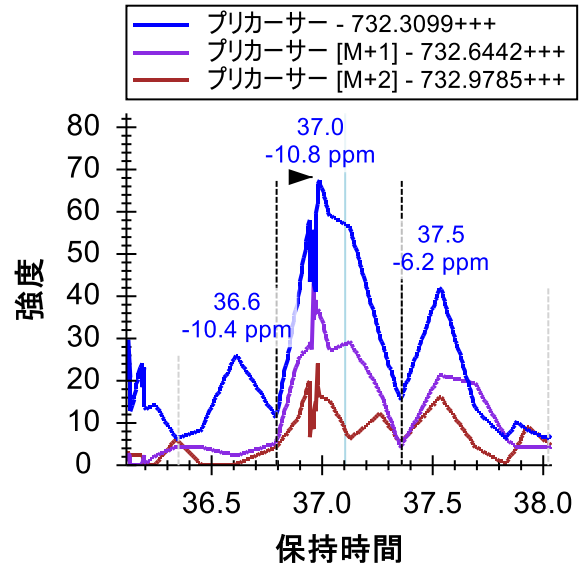
クロマトグラフィー環境の基礎知識

9番目のペプチド、SSKA~~S~~LG~~S~~LEGEAEAEASSPKについては、測定1_MCF7_TiB_LでこのペプチドにIDが見つからないのみならず、積分も多少ずれて見えます。

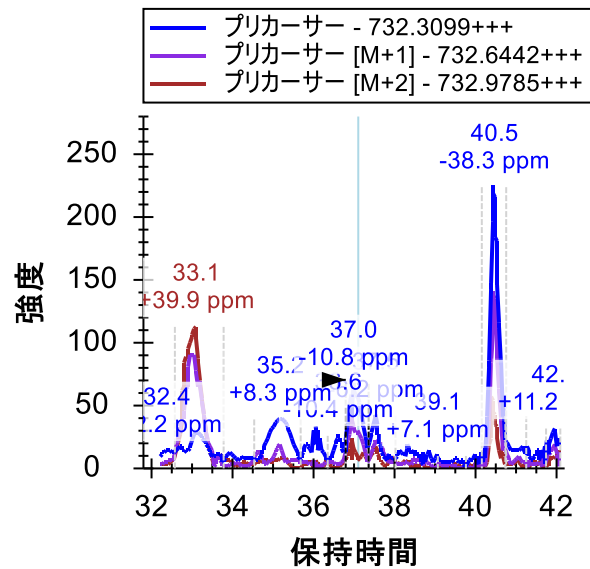
5b_MCF7_TiTip3



1_MCF7_TiB_L



マウスのスクロールホイールを使用して（手前にスクロールして）、5b_MCF7_TiTip3 のグラフと同じピークが見えるまで、1_MCF7_TiB_L のグラフをズームアウトします。



これは、クロマトグラフィーデータを扱う際に非常に重要なことです。ターゲットペプチドが一連の測定において毎回同じような時間に溶出すると予想されるように、他のペプチドにも同じことが予想できます。ターゲット（37分）のいずれか側（33分および40.5分）にある2つのピークは、2つの他のペプチドによるピークであるため、ターゲットペプチドと共溶出した場合には干渉を考慮する必要があります。共溶出しない場合でも、他のペプチドに由来するシグナルは繰り返しの環境を形成することがあり、微弱なシグナルであってもターゲットの保持時間を判断でき

ます。クロマトグラムを抽出する範囲内にシグナルが検出されるペプチドがより多くなるのが期待できるため、これは MS1 フィルタのような選択性の低いメソッドの場合に特に当てはまりません。

以下の操作を行って 1_MC7_TiB_L の積分範囲を修正します。

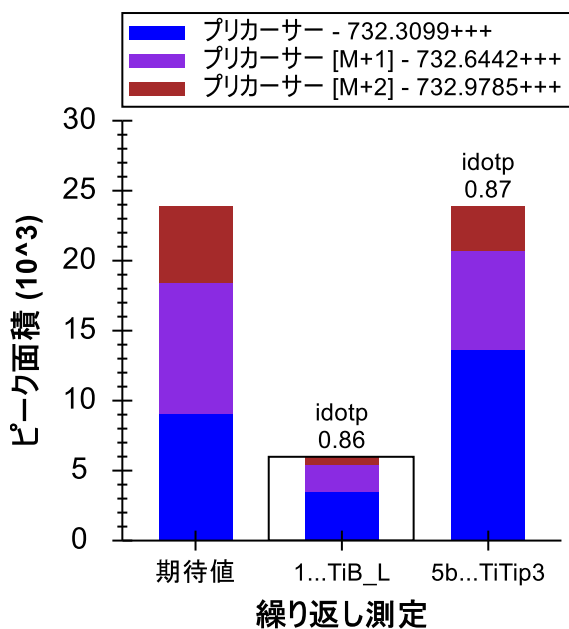
- 保持時間軸の下 36.5 分のところでクリックし、38 分のところまでドラッグします。

これによって、ピークの idotp（同位体内積）値が 0.87 から 0.9 に改善され、また質量誤差もわずかですが -10.8ppm から -9.4ppm へと改善することが [ピーク面積] グラフで確認できます。

残りのペプチドに進む前に、抽出クロマトグラムにより取り込まれた別の 2 つのピークを検討してみましょう。40.5 分のピークでは、3 つのプリカーサーチャンネル (M、M+1、M+2) すべてにおいて、良好なシグナルが得られています。ただし、質量誤差を見ると、予測される質量よりも確実にかなり軽いことがわかります (-20.9ppm および -38.3ppm)。

- 40.5 分のピークの上にあるラベルをクリックします。

これにより、Skyline がこれらのピークを選択し、[ピーク面積] グラフでは idotp 値が以前に選択されたピークよりも低い (0.9 および 0.99 に対して 0.86 および 0.87) ことが表示されます。



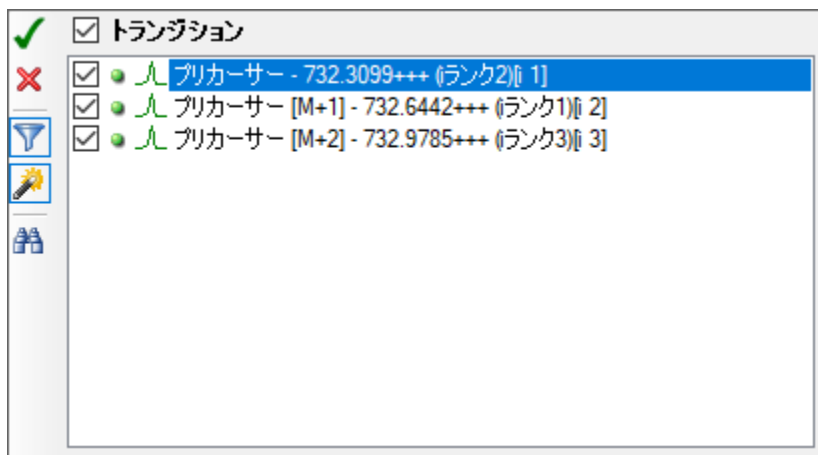
[期待値] と記された棒の分布から、M+2 ピークと M+3 ピークがターゲットペプチドに対して予測される同位体分布より小さいため、このピークの原因となっているペプチドには、ターゲットペプチドより炭素原子が少ない（したがって、¹³C が得られる可能性も低い）ことがわかります。また、約 37 分にも MS/MS ID があります。

33 分のピークを見てみると、ターゲットペプチドのモノアイソトピック m/z には実際のシグナルは一切見られません。ただし、M+1 と M+2 にほぼ同じ強度のピークがあり、ターゲットペプチドの M と M+1 の予測同位体分布とよく似ています。5b_MCF7_TiTip3 の質量誤差は+25.8ppm であり、完全に積分された場合の 1_MC7_TiB_L の質量誤差は+5.6ppm です。40.5 分のピークほど悪くはありませんが、それでも、平均誤差+15.7ppm は 37 分のピークの平均誤差 -3.5ppm よりもかなり悪い値です。

33 分のピークの同位体分布に関する問題を完全に理解するため、以下の操作を行います。

- [ターゲット] 表示のペプチド要素の左側の+アイコンをクリックして、展開します。
- マウスイカーソルを 732.3099+++ プリカーサー要素上に合わせます。
- プリカーサー要素の右側に表示されるドロップダウン矢印をクリックします。

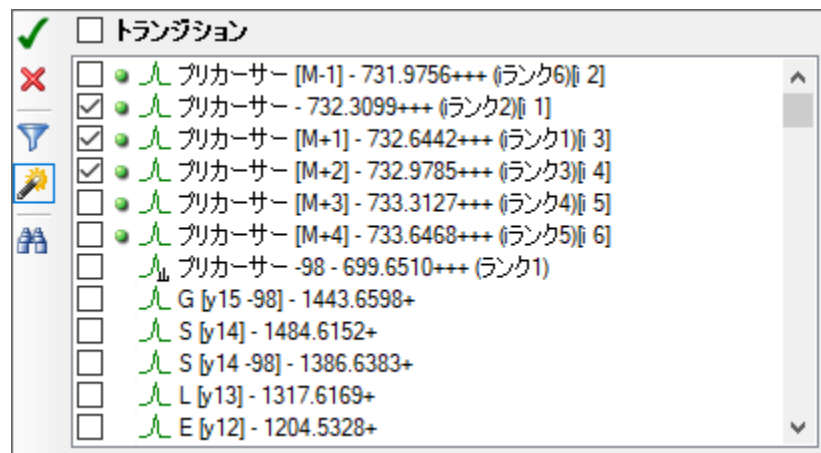
Skyline には、以下のようなポップアップが表示されます。



これら 3 つのプリカーサートランジションしか表示されない場合は、以下の操作を行います。

- 漏斗のアイコンをクリックして、トランジションフィルタを取り除きます。

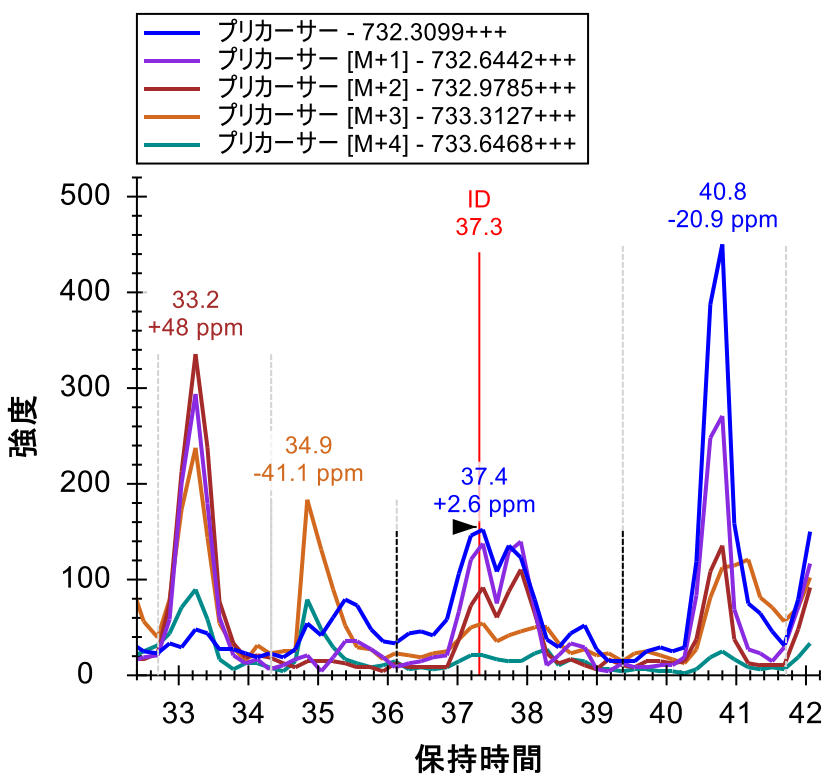
これにより、このペプチドプリカーサーについて考えられるすべてのトランジションが Skyline に表示されます。



緑の丸は、Skyline にクロマトグラムデータがすでにあるトランジションを示します。Skyline は、同位体分布全体の 1%以上を占めると予測される分布中のすべてのピークに対するクロマトグラムを自動的に抽出します。また、M-1 のクロマトグラムも常に抽出します。その理由は、干渉を受けていない正しく選択されたピークには通常この m/z のシグナルはないからです。

- M+3 トランジションと M+4 トランジションのチェックをオンにします。
- 左上の緑のチェックボタンをクリックするか、Enter を押します。

これにより、M+3 と M+4 のクロマトグラムがグラフに追加され、33 分のピークで 37 分の同定ピークよりも多くのシグナルが表示されるようになります。Skyline でのあらゆるクロマトグラムデータに関する作業において、保持時間の再現性が信頼できることの重要性はどれだけ誇張してもし過ぎることはありません。



これによって、33分のピークがターゲットに非常によく似た原子組成の別のペプチドにより生じていること、またそれはモノアイソトピック質量が1ダルトン大きい3価のペプチドであることによりかなり確信を持てると思います。

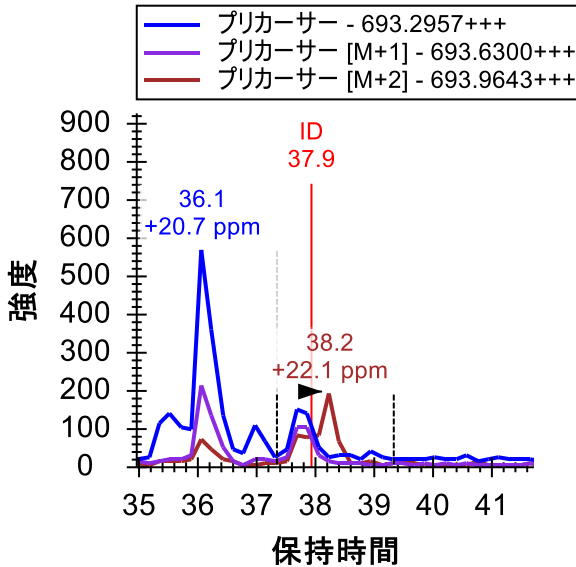
- 元の積分修正へ戻るまで、[元に戻す] ボタン(Ctrl+Z) を3回クリックします。

MS1 スペクトルの検査

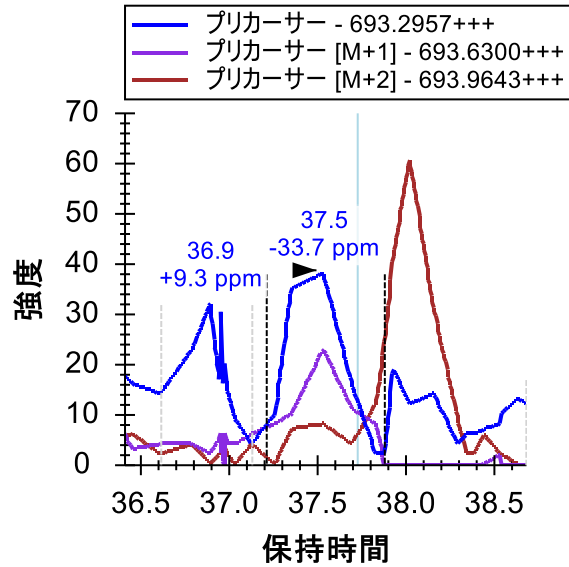
クロマトグラムの抽出元である MS1 スペクトルも、単純なポイント&クリックインターフェイスを使って検査できます。これは 33.2 分のピークと 37.4 分のピークの違いを迅速に把握する最も簡単な方法です。この新しい見解を得るには、以下の操作を行います。

- マウスカursorを、37.4 分にある 5b_MCF7_TiTip3 クロマトグラフピーク上に合わせます。
- カーソルの下に表示される円をクリックします。

5b_MCF7_TiTip3



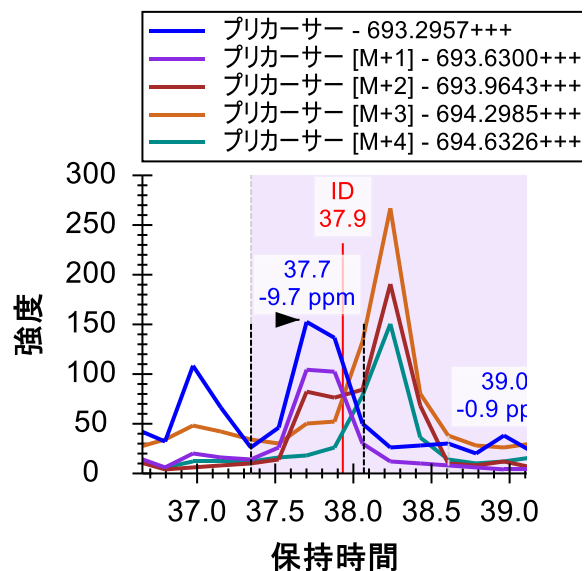
1_MCF7_TiB_L



ここでも、1_MCF7_TiB_Lではなく MCF7_TiTip3 のペプチドに ID があります。1_MCF7_TiB_Lにあるピークは、5b_MCF7_TiTip3 の ID とのアライメントに基づいて選択されました。M+2 クロマトグラムでは、ピークからその右側までからの干渉はほとんどなさそうであり、最も大きなピークでの質量誤差は-33.7ppm となっています。マウスのスクロールホイールを使用して再度ズームアウトすると、36 分のあたりに、質量誤差が+20.7ppm で idotp 値が 0.78 のものと、質量誤差が+27.5ppm で idotp 値が 0.76 の非常に似通ったピークが両グラフに含まれています（これは保持時間注釈をクリックしてピークを選択した後に、[ピーク面積]表示で見られます）。

5b_MCF7TiTip3 の積分境界には M+2 への干渉シグナルが含まれており、実際のところ、このクロマトグラムの他のピークは非常に近いため、非常に慎重に手作業で積分してもそのシグナルを完全に排除することはできないように見えます。試してみると、idotp 値 0.94 および質量誤差 -9.7ppm のピーク積分が得られます。

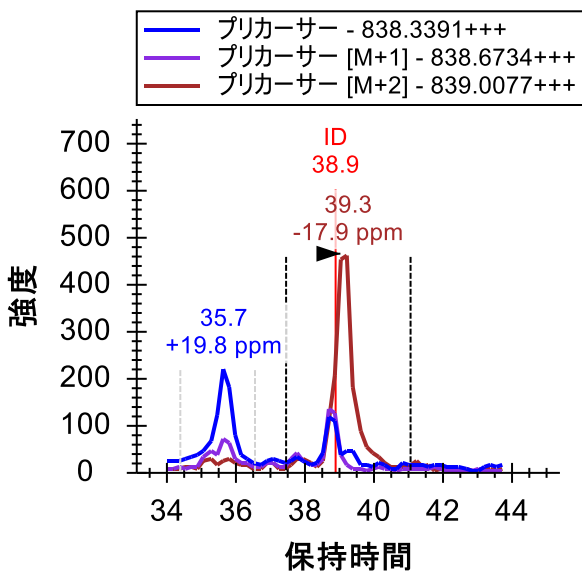
M+3 と M+4 の追加と同じ手法を利用すると、干渉ピークはおそらく質量が 2 Da 大きい別の 3 価ペプチドにより発生している可能性が考えられます。



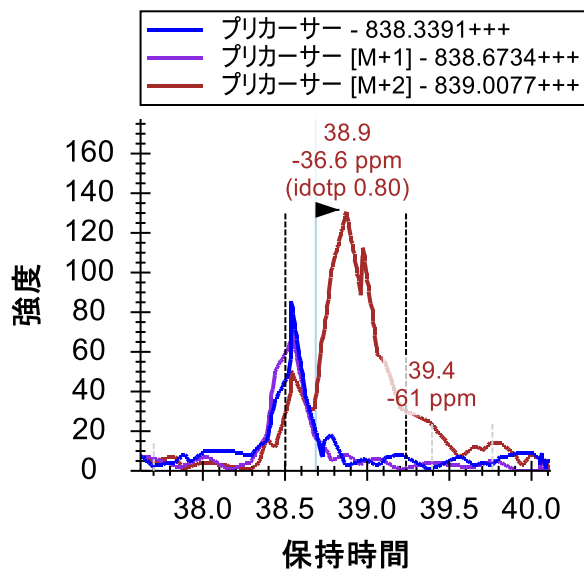
- [元に戻す] ボタンをクリックしてこの変更を元に戻し、調査を続けます。

さらに2つのペプチドの下にある AEGEWEDQEALDYFSDKESGK ではより強い干渉が見られ、そのシグナルの排除はさらに難しくなっています。

5b_MCF7_TiTip3

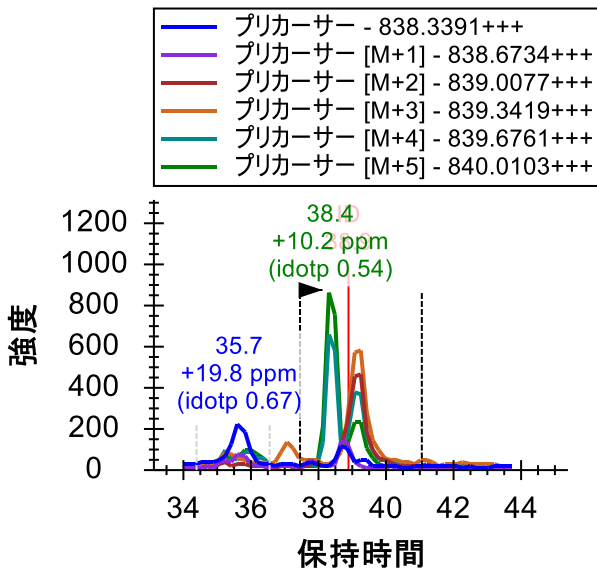


1_MCF7_TiB_L

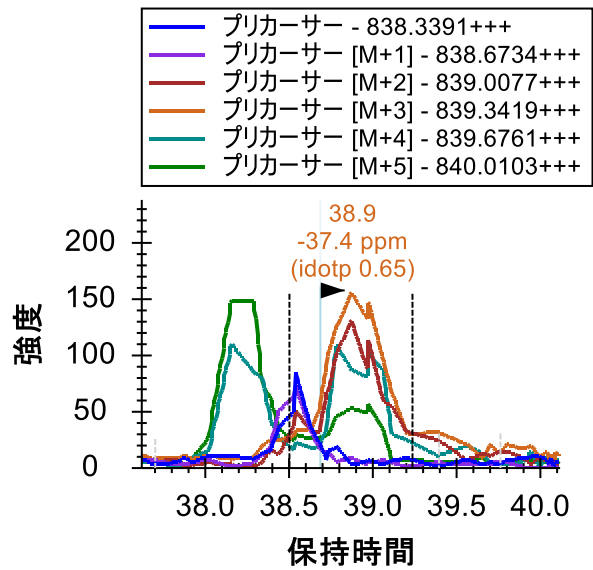


このペプチドの M+3、M+4、M+5 の各クロマトグラムを追加すると、プリカーサーイオン空間中で、特にこの特定の質量と保持時間の組み合わせがどれだけ混雑しているかがはっきりわかります。

5b_MCF7_TiTip3



1_MCF7_TiB_L



このペプチドに対して明確なピーク積分値を得るには、M と M+1 を除くすべてのクロマトグラムを削除する必要があります。まず M と M+1 以外のすべてのクロマトグラムを削除し、その後積分境界を適切に調整します。もう少し選択的なメソッドが望まれるところですが、MS1 スペクトルのみからでも、有用な定量データを多数取得することが可能です。定量的統計については、明確な干渉のない、ランキングが最も高いプリカーサーイオンだけに絞るといいでしょう。本チュートリアルで見てきたように、容認できるピーク同定を使用すると、干渉の影響を制限することができます。

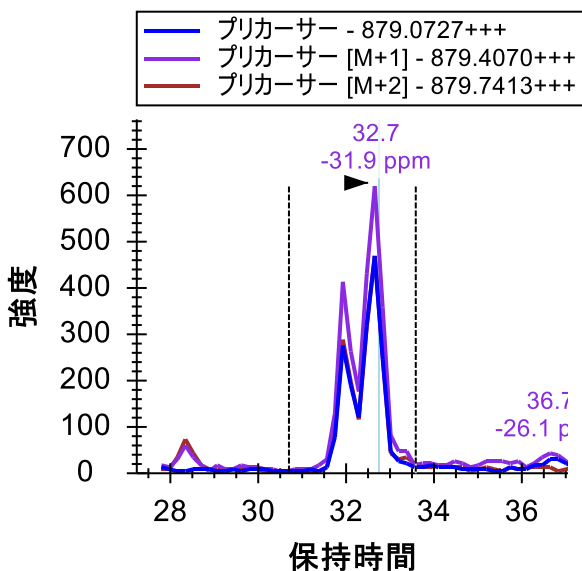
ペプチドの検討を続けていけば、わずかな積分調整を 1 つ行うだけで、22 番目のペプチド ALVEFESNPEETREPGSPPSVQR まで到達します。

異なる修飾形態のペプチド

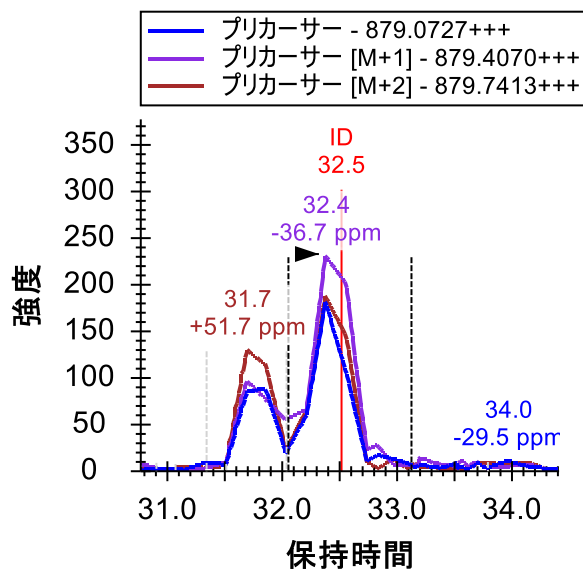
ここで、ドキュメントには ALVEFESNPEETREPGSPPSVQR およびその下の ALVEFESNPEETREPGSPPSVQR（どちらも 879.0727 のプリカーサー m/z を有する）が含まれています。検索エンジン（この場合は Protein Pilot）が前者を 5b_MCF7_TiTip3 で、後者を 1_MCF7_TiB_L で同定しましたが、クロマトグラムを見れば、どちらも約 32.5 分のところで同定されている同じピークであることは明らかです。

さらに興味深いことに、2 つのピークは同じ m/z 値で非常に近接しており、少なくとも良く似た同位体分布をもっていることがわかります。

5b_MCF7_TiTip3



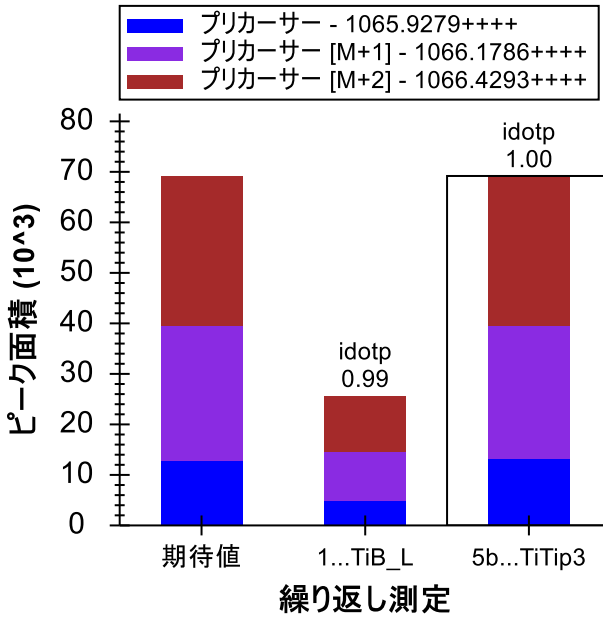
1_MCF7_TiB_L



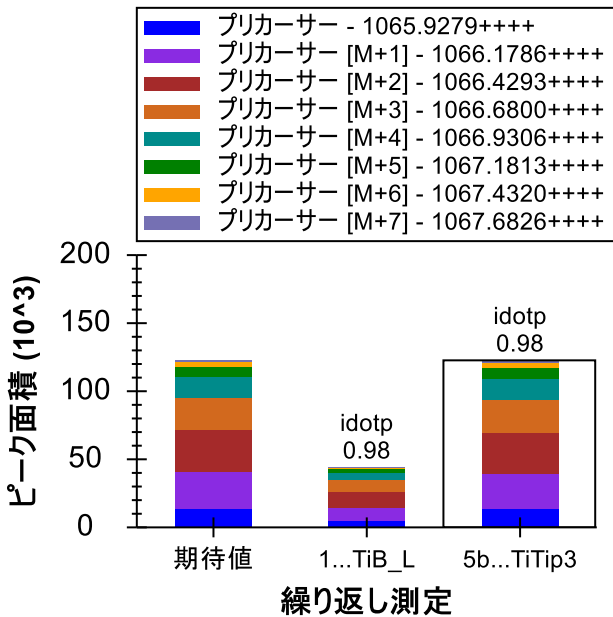
同位体分布と質量誤差を見ると、1_MCF7_TiB_Lにおける2つのピーク（どちらも31.5分と33分の間に出現しています）は5b_MCF7_TiTip3のピークとは違うように見えますが、これは単に実験のばらつきが原因である可能性があります。M+3、M+4、M+5を追加すると、両方のピークで0.9を超える idotp 値が維持できることが確認できます（再度それぞれを積分して[ピーク面積]表示を確認し、[元に戻す]）。このペプチドには異なるリン酸化部位が4つ考えられるため、2つのピークは同一ペプチドでもリン酸化状態が異なるものである可能性があります。または、リン酸アイソフォームの溶出プロファイルが重複している可能性もあります。MS1 フィルタ時には、検索エンジン出力結果を鵜呑みにせず、考えられるアイソフォームを慎重に評価することを推奨します。

その他のデータ分析用ツール

ペプチド25まで下がっていくと、このドキュメントで最長かつ初めての4価のペプチドプリカーサーである YGPADVEDTTGSGATDSKDDDDIDLFGSDDEESEEAKR があります。このペプチドは非常に大きいため、その同位体分布は、今まで見てきたそれよりも小さい2価のペプチドや、ある程度は大きな3価ペプチドとはかなり異なります。ここで、 ^{13}C 原子を持たないモノアイソトピックペプチドは、M+1やM+2の形態よりも存在率が低くなると予測できます。これらのクロマトグラムではそのとおりであることがわかり、予測される分布の idotp 値は1.0および0.99になります。



今までと同じようにトランジション選択リストを利用すると、M+3 から M+7 までのクロマトグラムが追加できます。これらはすべて同位体分布全体の 1%超を含んでおり、idotp 値は高めの 0.98 であることがわかります。

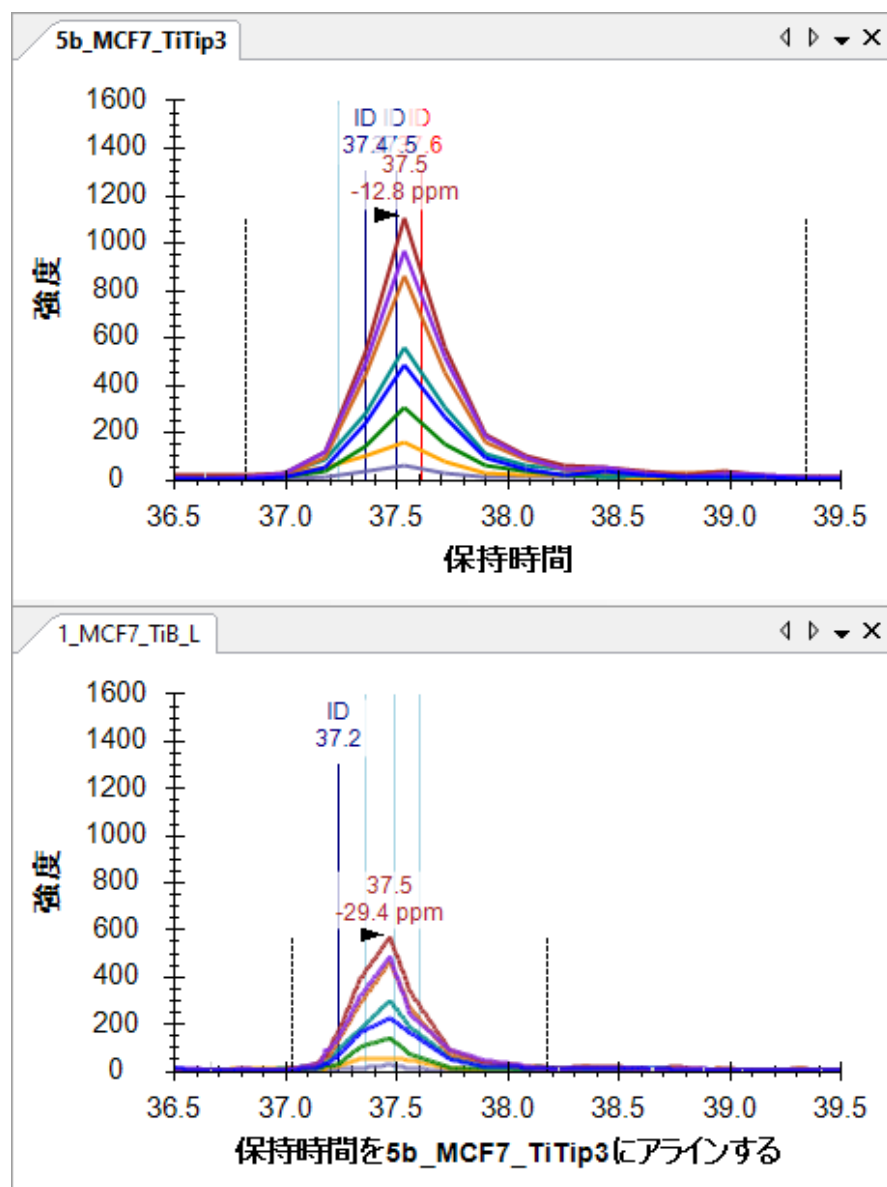


クロマトグラムグラフをみると、このペプチドは本ドキュメント内で唯一、1 回の測定で複数回同定されたものであることがわかります (5b_MCF7_TiTip3 において 3 回)。

以下の操作を行ってクロマトグラムを同一縮尺にすると、これらの ID が繰り返し測定間でどのようにアライメントされているかが解釈しやすくなります。

- クロマトグラムグラフを右クリックして [**拡大縮小幅の同期**] のチェックをオンにします。
- クロマトグラムグラフを右クリックして [**自動スケール Y 軸**] のチェックをオフにします。
- 5b_MCF7_TiTip3 クロマトグラムグラフを右クリックし、[**100807_0005b_MCF7_TiTip3 に時間をアラインする**] のチェックをオンにします。（これにより、この現在のペプチドのみでなく、再度これをオフにするまでこのデータセットのすべてのペプチドがアライメントされるため、注意してください。）
- マウスカーソルをプロット面積上に合わせ、マウスのスクロールホイールを手前にロールして少し縮小します。
- 5b_MCF7_TiTip3 の積分範囲周りの細長い長方形をクリックしてドラッグします。

クロマトグラムグラフは以下ようになります。

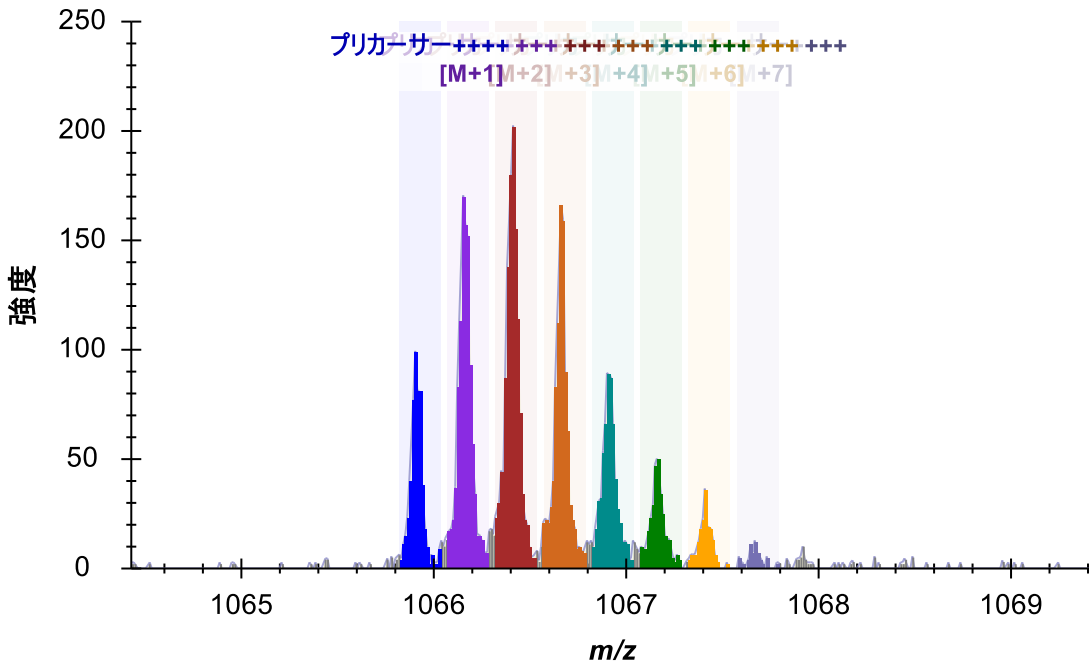


クロマトグラムポイントの抽出元である MS1 スペクトル内の同位体分布を確認するには、以下の操作を行います。

- 5b_MCF7_TiTip3 のピーク頂点にマウスマウスカーソルを合わせ、表示される丸をクリックします。

以下のようなプロットで[フルスキャン]表示が表示されます。

100803_0005b_MCF7_TiTip3.wiff (37.50 分)



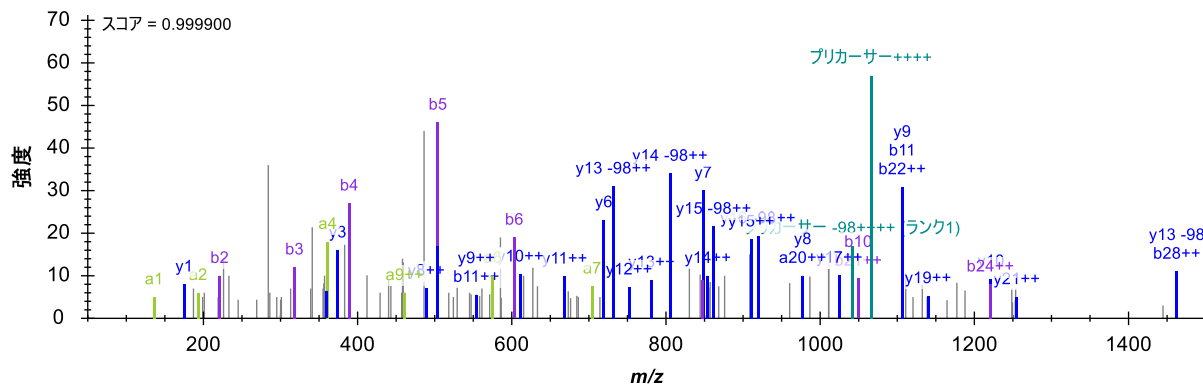
- [フルスキャン] 表示の右上隅の X をクリックして、表示を閉じます。

クロマトグラフプロットでは、アライメントにより ID とピークがきれいに並びました。Y 軸自動スケーリングによる拡大縮小幅の同期をオフにすると、ピークの相対的な高さがわかります。

クロマトグラムグラフ中の ID 注釈をクリックすると、検索エンジンがこのペプチドとして同定したスペクトルを確認できます。または、[ライブラリ的一致] 表示の上部にあるドロップダウンリストをクリックし、矢印キーを使用すると一致したスペクトルのページを上下に移動できます。異なる測定からのスペクトルが同一ペプチドからのものであると納得できるまでには、少し想像力を働かせなければなりません。

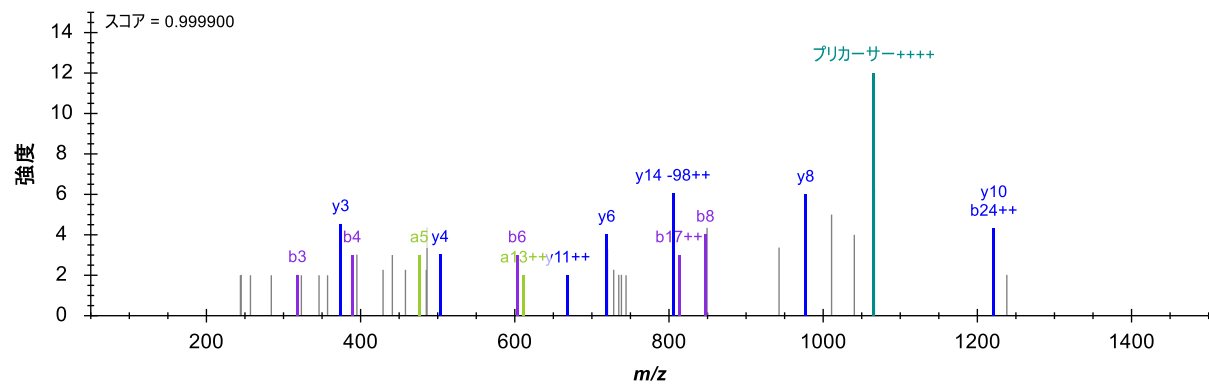
5b_MCF7_TiTip3 (37.61 分)

YGPADVEDTTGSGATDSKDDDDIDLFGSDDEEESEEAKR、電荷4



1_MCF_TiB_L (37.03 分)

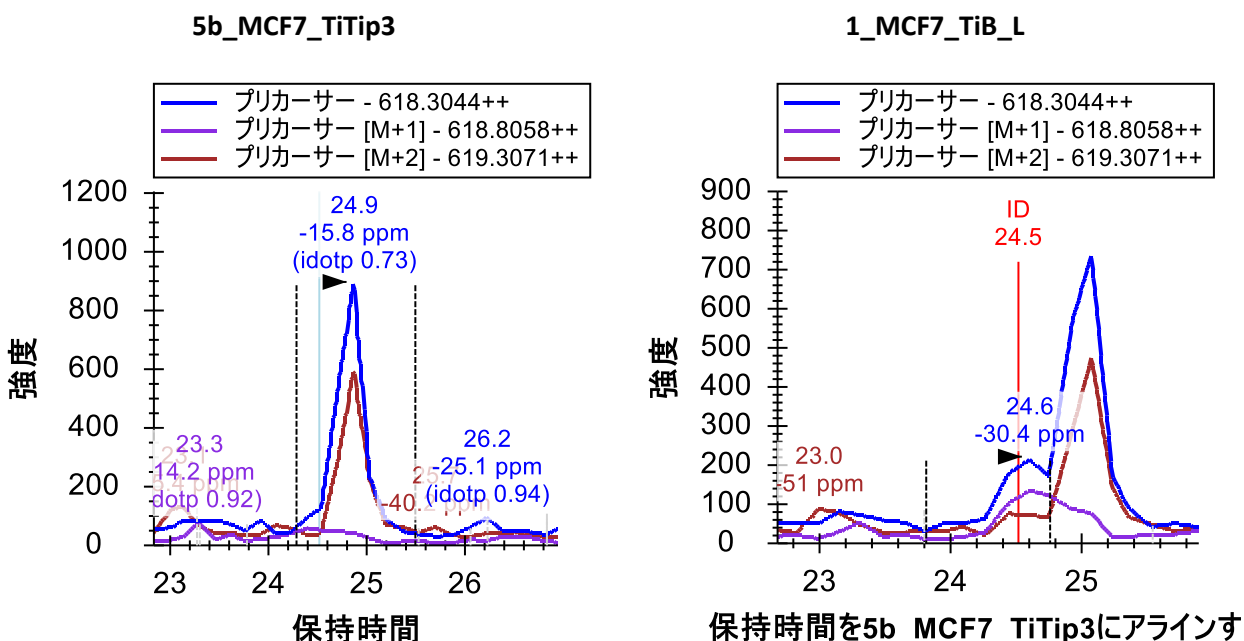
YGPADVEDTTGSGATDSKDDDDIDLFGSDDEEESEEAKR、電荷4



ただし、2つの測定のカロマトグラムピークは同一のペプチド分子を測定していると大いに確信できるはずです。

干渉に関する詳細

ペプチド DQVANSAFVER には、別の興味深い干渉があります。



1_MCF7_TiB_L では、ペプチドは 24.5 分で同定されましたが、どちらの繰り返し測定でも、25 分のあたりで強い干渉ピークが観察されています。しかしながら、干渉が観察されるのは M および M+2 のみです。ターゲットペプチドは 2 価であるため、これは干渉ペプチドが 1 価であることを示しています。5b_MCF7_TiTip3 ではターゲットのシグナルが弱く干渉シグナルがかなり強いため、ターゲットのピークは M+1 クロマトグラム上でさえもかなり確認が難しくなっています。

両繰り返し測定取得における干渉は深刻なものであるため、慎重を期して、このペプチドは MS1 定量化には不適合とすべきです。この特定のペプチドをどうしても測定したい場合には、PRM や SRM といった、より選択的なメソッドに換えた方がよいかもしれません。

このファイルにはあと 7 つの問題が残っていますが、ほとんどはこれまで学習してきたことのおさらいです。以下の問題を理解し、解決できる力は身に付けられたと思います。また、興味がある方のために以下に挙げましたが、これは飛ばして次のセクションに進んでも構いません。

1. ETERASPIKMDLAPSK (31 および 32) – 同一タンパク質で 2 回反復 (1 つを削除)
2. KTGSYGALAEITASK および KTGSYGALAEITASK (34 および 35) – ピークに 2 つのリン酸化部位あり
3. TPSPKEEDEEPEPPEKK(41) – 劣ったクロマトグラフィー、正しく積分されていない (ズーム、積分を調整)
4. KEKTPELPEPSVK(46) – M+1 と M+2 に干渉あり
5. EKTPELPEPSVK(47) – M+2 に干渉あり

6. VPKPEIPEPKEPSPEKNSK および VPKPEIPEPKEPSPEKNSK (49 および 50) –ピークに2つのリン酸化部位あり
7. KETES~~E~~AEDNLDDLEK(51)–M+1 に1価ペプチドからの干渉あり

クロマトグラムキャッシュファイルの最小化

これをドキュメントにある50個のペプチドで一通り完了すると、すべてがかなり良好に積分されているはず。先へ進む前に、現在のドキュメントを保存します。

- [ファイル]メニューで[保存] (Ctrl+S) をクリックします。

次に、以下の手順を実施して、このドキュメントと無関係なクロマトグラムデータを破棄し、ドキュメントをできる限り小さく、共有しやすくなるようにします。

- [編集]メニューで[結果を管理]をクリックします。
- [最小化]ボタンをクリックします。
- [に対するノイズを制限]チェックボックスをオンにします。
- フィールドに「2」を入力して、クロマトグラフピークの前後(分)のノイズを指定します。
- タブキーを押して、フォームによるサイズ縮小の再推定を実行します。

[結果を最小化]フォームは以下のようになります。

結果を最小化
✕

このドキュメントで使用していないクロマトグラムを破棄したり、クロマトグラムの長さを制限することで、Skylineキャッシュファイル (.skyd) のサイズを小さくできます。

使用していないクロマトグラムを破棄

に対するノイズを制限

キャッシュファイルの現在のサイズは878.18 KBです
最小化後、キャッシュファイルは現在のサイズの51%に縮小されます

繰り返し測定	現在のサイズ	最小化したサイズ
1_MCF7_TiB_L	474.90 KB	48%
5b_MCF7_TiTip3	403.28 KB	54%

所定の場所に最小
最小化してファイル名を付けて保存...
キャンセル

このフォームは、この操作によってキャッシュファイルのサイズが約 878KB から約 448KB、つまり現在のサイズの 51%に縮小される見込みであることを示します。

- [最小化してファイル名を付けて保存] ボタンをクリックします。
- [ファイル名を付けて保存] の [ファイル名] フィールドに、「Ms1FilteringTutorial-2min.sky」という名前を入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

再度 Shift+F11 を押して縮小すると、この新しいドキュメントのペプチドのクロマトグラムが確認でき、積分境界から両方向に 2 分だけ拡大されていることがわかります。

クロマトグラムの最小化は、大規模な実験のためにドキュメントを作成する際に非常に重宝し、ドキュメントは論文原稿の補足データとして共有できます。それでも生データをオンラインで利用できるようにしたいかもしれませんが、最小化された Skyline ドキュメントは、ダウンロードコストのほんの一部で多面的に表示するデータを提供します。

MS1 フィルタ用包含リストのエクスポート

上述のように、DDA 法を用いた複数の繰り返し測定の研究により、MS/MS データの取得不足が示されており、各 1 回の取得繰り返し測定では、MS/MS 同定されていないペプチドがあることが示されています。この問題については、既に説明したように、MS1 フィルタで RT アライメントを使用すると克服できます。ただし、初期探索から比較的多数の標的ペプチドの確認へと移行した場合は、Skyline を使用して DDA 実験用の包含リストメソッドをエクスポートし、「精密包含質量スクリーニング」²と呼ばれるアプローチを取ることができます。包含リストメソッドでは、ガイドされていない DDA 法と比べて対象となるペプチドを測定する可能性が高くなります。

チュートリアル Skyline ドキュメントから次の MS1 フィルタ用の包含リストメソッドをエクスポートするには、以下の手順を実施します。

- [設定] メニューで [ペプチド設定] をクリックします。
- [予測] タブをクリックします。
- [保持時間の実測値があれば使用します] チェックボックスをオンにします。
- [時間ウィンドウ] フィールドで、たとえば「10」分といった、予測されるクロマトグラムフィア安定性に適した範囲を入力します。範囲の重複を少なくすることは、SRM の場合ほど重要ではありません。
- [OK] ボタンをクリックします。
- [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] ドロップダウンリストで、「SCIEX QTOF」を選択します。
- [メソッドタイプ] ドロップダウンリストで「スケジュール」を選択します。
- [テンプレートファイル] フィールドで、QSTAR システムの取得メソッドテンプレートファイルへのパスを入力します。

サポート対象のベンダーいずれか（SCIEX Analyst または Thermo Xcalibur）の装置ソフトウェアがインストールされているシステムを実際に所有している場合を除き、このチュートリアルで装置メソッドエクスポートについて行う作業はここまでです。Skyline からのすべてメソッドエクスポートについては、メソッドを実行しようとする装置の制御用コンピュータ上で実行されている Skyline のインスタンスのエクスポート機能を実行することが推奨されます。研究室にサポート対象装置がある場合でも、本チュートリアルをその装置で行っている可能性は低いため、上記手順を完了するかどうかは必要なときにユーザーが判断するものとします。

結論

本チュートリアルでは、Skyline を使用して DDA 実験データの MS1 スキャンから定量的情報を抽出するための、最も基本的で極めて重要な機能について学びました。幸運にも、元々 SRM クロマトグラムのために考案された Skyline の既存の機能のほとんどは、MS1 抽出クロマトグラムにも同様にうまく適用できます。したがって、その他の Skyline チュートリアルで提示される資料および説明ビデオの理解にかなりの時間を割くことをお奨めします。MS1 スキャンから抽出したクロマトグラムピーク面積を利用するという考えは長い間ありましたが、Skyline はこのデータタイプの調査に利用可能な最も豊かな環境を提供するようになりました。MS1 定量化に別の定量化ツールを使用している場合でも、Skyline を使用して結果を確認し、検証するとよいでしょう。また、Skyline を使用して DIA などの他の取得メソッドのスペクトルライブラリの作成に使用された DDA データを確認するのもよいでしょう。これによってデータやその品質、考えられる問題がよりよく理解できるようになることは間違いありません。

補足

MS1 フィルタの原著論文用に処理された実際のデータセットの確認に興味をお持ちの場合は¹、以下のリンクで、上記で説明した最小化されたドキュメントをダウンロードできます。

http://proteome.gs.washington.edu/supplementary_data/MS1_Filtering/minimized/

完全な Skyline ドキュメントおよび生データについては、親ディレクトリを参照してください。

参考文献

1. Schilling, B. *et al.* Platform-independent and Label-free Quantitation of Proteomic Data Using MS1 Extracted Ion Chromatograms in Skyline APPLICATION TO PROTEIN ACETYLTATION AND PHOSPHORYLTATION. *Mol Cell Proteomics* **11**, 202–214 (2012).
2. Jaffe, J. D. *et al.* Accurate Inclusion Mass Screening. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1952–1962 (2008).