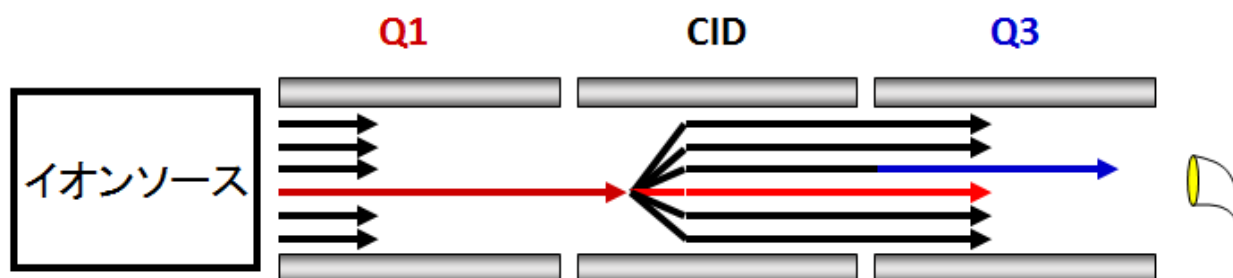


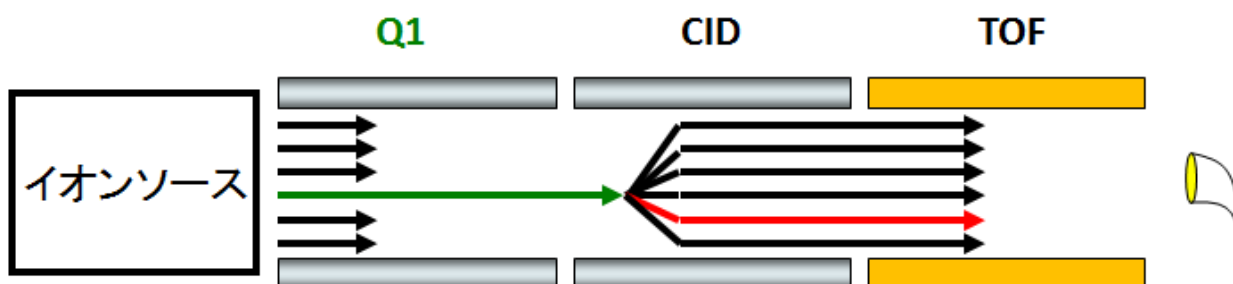
Skyline 並列反応モニタリング (ドラフト版)

Skyline では、イオントラップや Orbitrap、Q-TOF といったフルスキャンでの質量分析計からの生の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メソッドをサポートしています。Skyline は、主要質量分析計ベンダー6社 (Agilent、Bruker、SCIEX、島津製作所、Thermo-Scientific、Water) の装置に対する分析メソッドをサポートし、高分解能の質量アナライザーにも低分解能の質量アナライザーにも十分に柔軟性あるアプローチを使用しています。

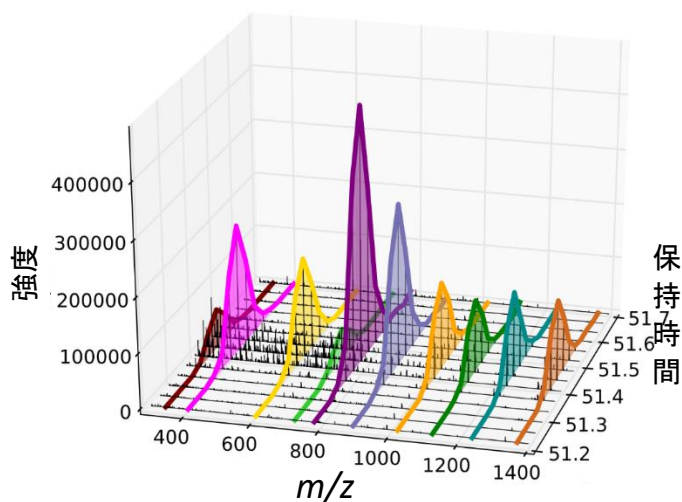
本チュートリアルでは、Skyline を使用して pseudo-SRM および MRM-HR™ または並列反応モニタリング (PRM) と呼ばれるターゲットアプローチで取得した MS/MS スペクトルを分析する方法を学びます。これらの別名が示唆するとおり、PRM は Skyline が使用を開始した三連四重極質量分析計での SRM の実施に最も類似したフルスキャンメソッドです。



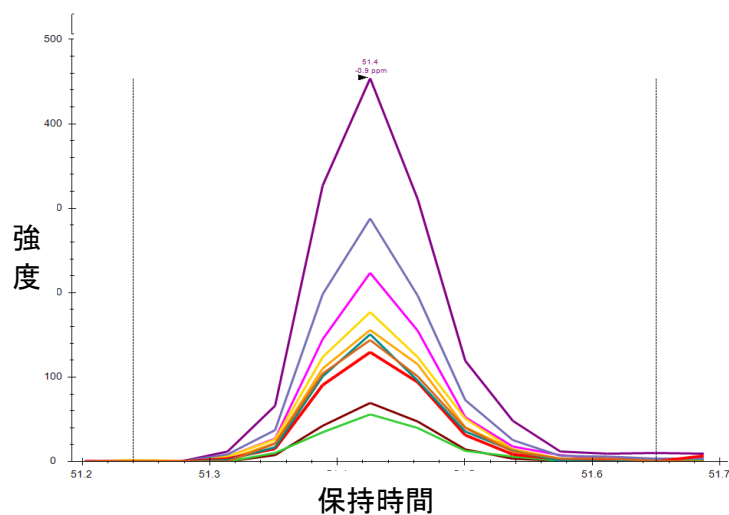
SRM がプリカーサーイオンとプロダクトイオンの複数のペアをスキャンして、経時的にサイクル内のそれぞれに対する単一強度の測定を収集していくのに対し、PRM はプリカーサーイオンのデータ非依存リストをスキャンして、経時的にサイクル内のそれぞれに対するフル MS/MS スペクトルを収集していきます。



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をかけることができないときにその代わり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一致パイプラインの MS/MS スペクトルのデータ依存取得 (DDA) に利用されていますが、幅広いフルスキャン型の装置でのシステム安定性測定にも使用できます。ただし、ID を使用しない品質管理アプローチについては、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 でのターゲット定量的測定に対する PRM の使用について見ていきます。

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.gs.washington.edu/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。

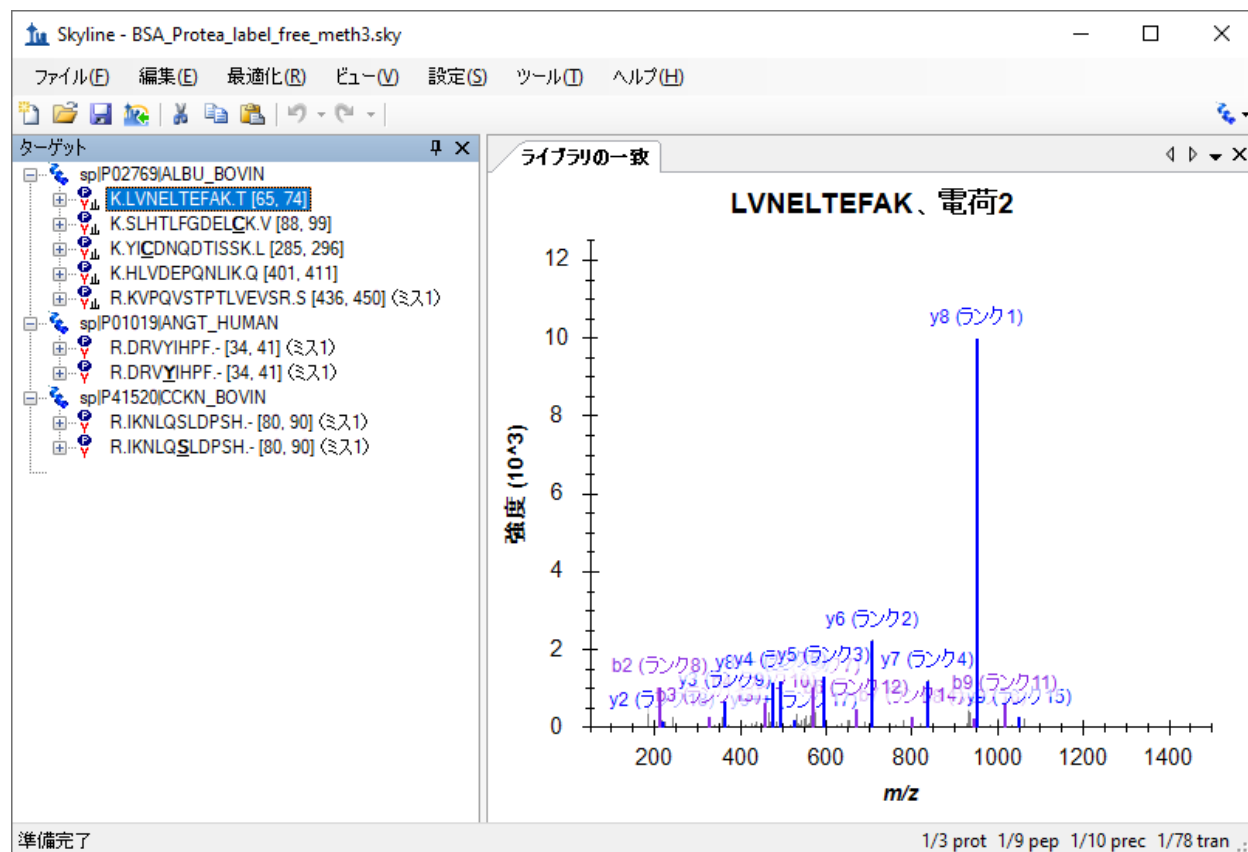
C:\Users\brendanx\Documents

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

本チュートリアルには、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は、合計 78 個のプロダクトイオンまたはトランジションのターゲットを有する 10 個のペプチドの

プリカーサーが含まれていることを示しています。プリカーサーの中には、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 ライブラリスペクトルと関連付けられているものもあります。また、MS/MS ライブラリスペクトルを有しない非修飾とリン酸化修飾で測定された 2 つの他のペプチド (ヒトとウシと 1 つずつ) がそれぞれ表示されています。

Skyline 内でこのような 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、数々の入門チュートリアルおよび取扱説明ビデオで 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メソッドのエディタとして Skyline に慣れていることを前提として、既存の Skyline ドキュメントから始めていきたいと思えます。

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 データに対して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、一部変更が必要になります。[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 label 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 フィルタの場合は、[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(U): 数 プリカーサー質量アナライザ(P): QIT

ピーク(K): 1 分解能(O): 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(O): 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、すべての断片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 [MS/MS ID の 5 分以内のスキャンのみを使用] 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 がいないため、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 ライブラリスペクトルの一致が Skyline が抽出するクロマトグラムに正しく反映されるよう、フルスキャン設定の MS/MS 分解能がライブラリイオン許容誤差と一致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。

The image shows a 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 five 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). The "ライブラリ" tab is selected. Inside the dialog, there is a section for "イオン許容誤差(D):" (Ion tolerance) with a text box containing "0.7" and "m/z" next to it. Below this is a checked checkbox labeled "ライブラリスペクトルが利用可能な場合、最も強度の高いイオンを選択(S)" (When library spectrum is available, select the ion with the highest intensity). Underneath is a section for "選択(P):" (Selection) with two text boxes: the first contains "6" and is labeled "プロダクトイオン" (Product ion), and the second is empty and labeled "最小プロダクトイオン数" (Minimum number of product ions). At the bottom of the dialog are three radio buttons: the first is selected and labeled "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)" (From charge number and ion type of filtered ions), the second is labeled "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)" (From charge number and type of filtered ions, and filtered product ions), and the third is labeled "フィルタされたプロダクトイオンから(D)" (From filtered product ions). At the bottom right of the dialog are two buttons: "OK" and "キャンセル" (Cancel).

ここで、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 の間の値が通常は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、ドキュメント内に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]フィールドにすでに「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(U): イオンタイプ(U):
2, 3 1, 2, 3 y, b, p

プロダクトイオンの選択

開始点(U): 終了点(U):
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。

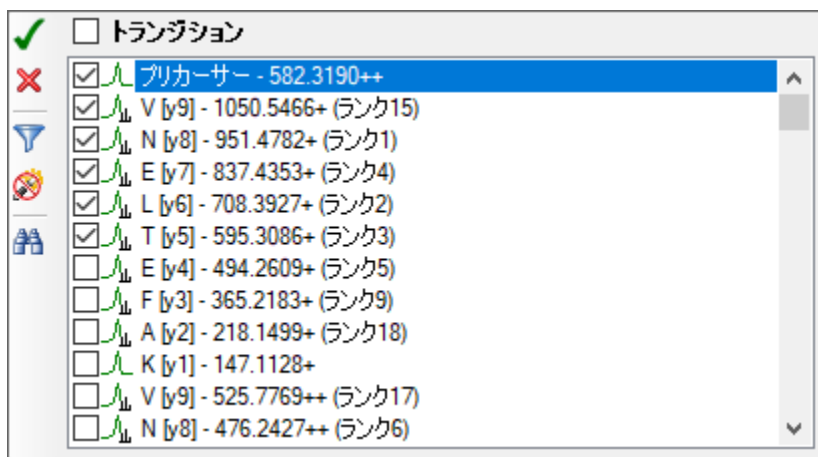
各ペプチドプリカーサー項目にプリカーサートランジションが含まれていることを確認するには、以下の操作を行います。

- [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が[フィルタ]タブでの変更に対応してトランジションを変更することができません。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を使用して行うのが一番です。これは、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において、ソフトウェアがその他の設定でも動作するように考慮していないからです。Skyline では、これらのベンダーのライブラリを使用して、提供するプレートメソッドに必要な変更を行う必要があります。一部のケースにおいては、ベンダーソフトウェアを別のパソコンで設定して、装置制御 PC 上の環境を模倣させることも可能ですが、これは推

奨されません。Skyline ドキュメントをご利用のパソコンで編集し、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に 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、Skyline がデフォルトで「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]フィールドの横の[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

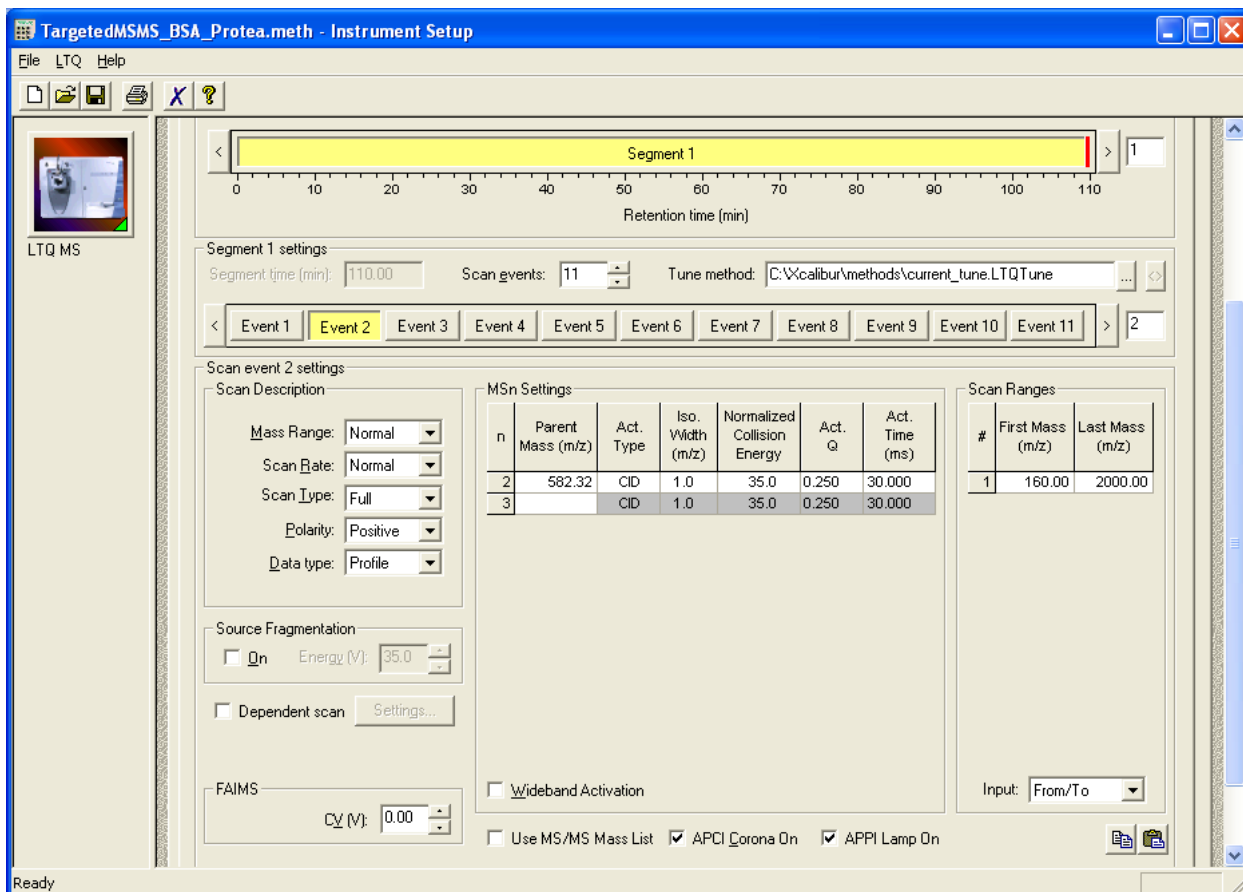
メソッドタイプ(T): 標準

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

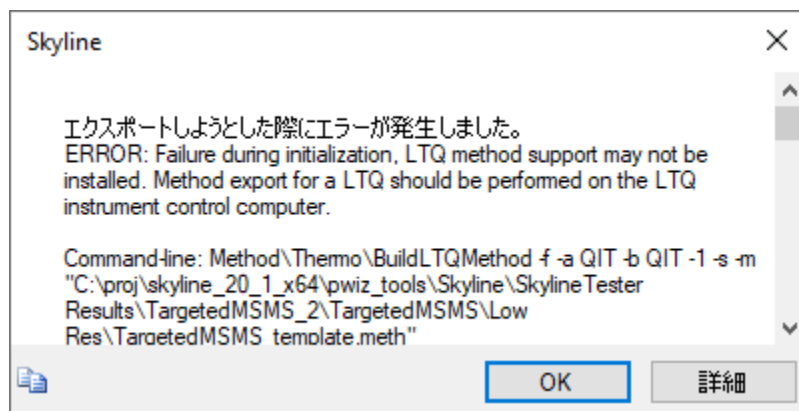
- [OK] ボタンをクリックします。
- 表示される [Thermo LTQ メソッドをエクスポート] フォームで、メソッドを保存するフォルダに移動します。
- [ファイル名] フィールドに、「TargetedMSMS_BSA_Protea.meth」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

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 の装置設定ソフトウェアで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。



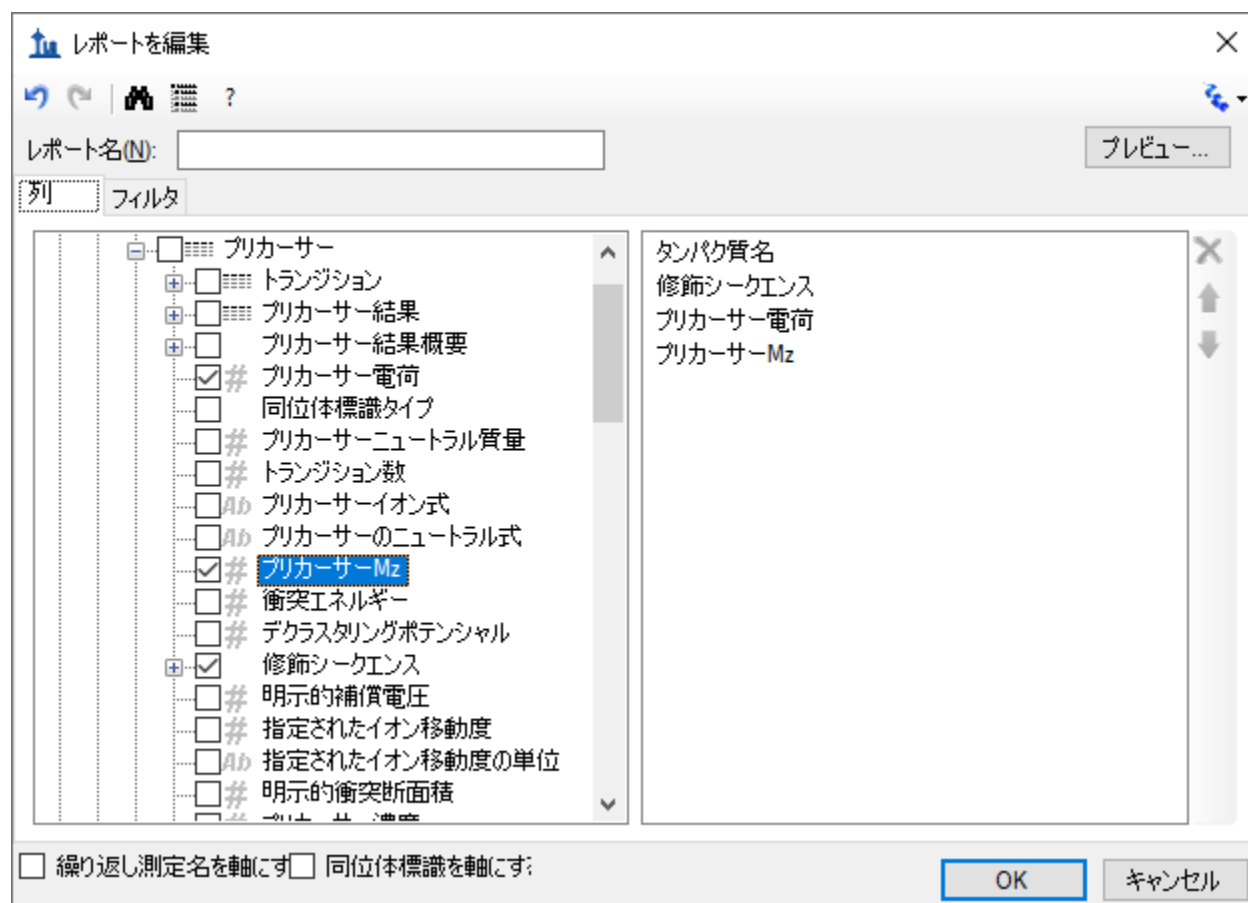
[OK] ボタンをクリックしてチュートリアルの残りを継続しますが、Thermo Ion Trap and Fusion、Bruker QTOF および SCIEX QTOF の装置制御用コンピュータでも同様の手順が動作することを覚えておきましょう。または、[ファイル] > [エクスポート] > [Agilent TOF および Thermo Q Exactive 装置の単離リスト] から行えます。

このように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の 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のみであるため、上記

のようなメソッドは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 値を含むレポートを生成するには、以下の手順を実施します。

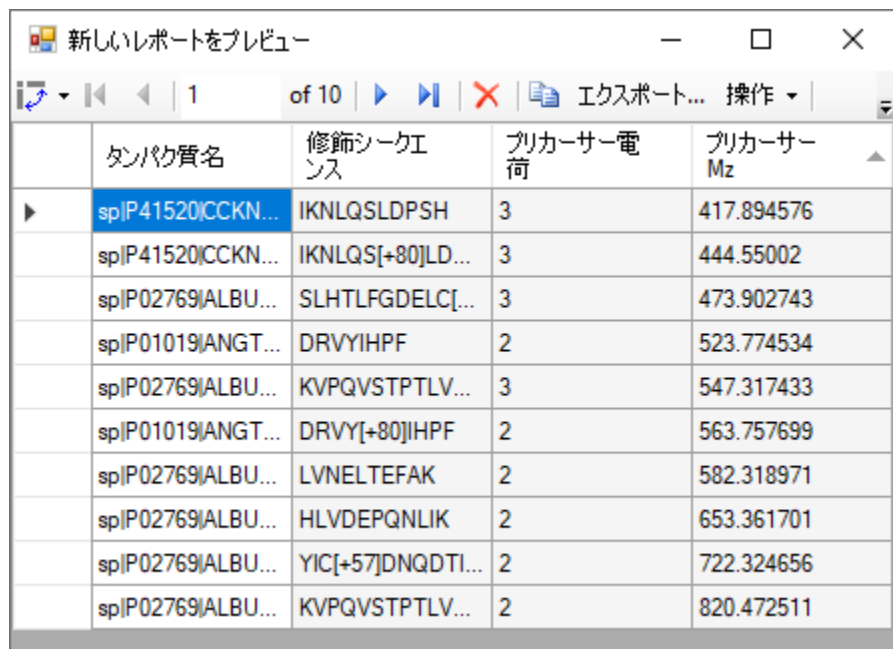
- [ファイル]メニューで[エクスポート]を選択し、[レポート]をクリックします。
- [レポートをエクスポート]フォームで[リストを編集]ボタンをクリックします。
- [レポートを編集]フォームの[追加]ボタンをクリックします。
- [レポートを編集]フォームで以下のフィールドを追加します。
 - タンパク質名
 - ペプチド修飾シーケンス
 - Peptides.Precursors.Charge
 - Peptides.Precursors.Mz

[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。



The screenshot shows a window titled '新しいレポートをプレビュー' (Preview New Report). The window contains a table with the following columns: 'タンパク質名' (Protein Name), '修飾シーケンス' (Modification Sequence), 'プリカーサー電荷' (Precursor Charge), and 'プリカーサーMz' (Precursor m/z). The table lists 12 rows of peptide data.

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 値が表示されており、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、実際、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。PRM 実験は、Skyline でのスケジュールアルゴリズムが急速に重要になった SRM 同様に、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

Thermo LTQ 上で収集した本ドキュメント用のペプチド検索結果と 2 つの生データの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。

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。これを今行うには、以下の手順を実施します。

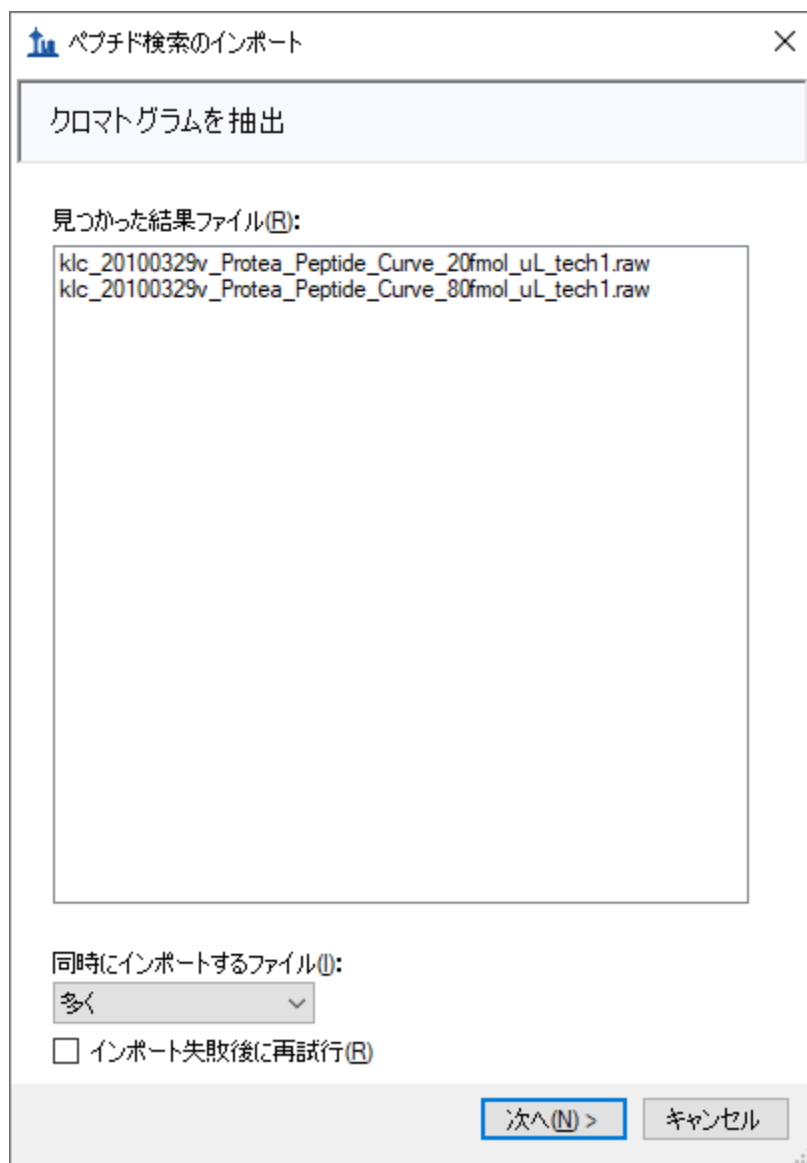
- [**カットオフスコア**] フィールドに「0.99」と入力します。
- [**ドキュメント内のペプチドをフィルタリング**] チェックボックスをオンにして、ドキュメント内のペプチドを同定するスペクトルのみを残すようにします。
- [**ペプチド検索のインポート**] フォームの [**ファイルを追加**] ボタンをクリックします。
- 「Low Res」フォルダの「search」サブフォルダに移動します。
- [**ファイル名**] フィールドに「*.xml」と入力します。
- Ctrl キーを押したまま、このフォルダ内の.perc.xml で終わる 2 つのファイルをクリックします。
-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

フォームは以下ようになります。

- [次へ] ボタンをクリックします。

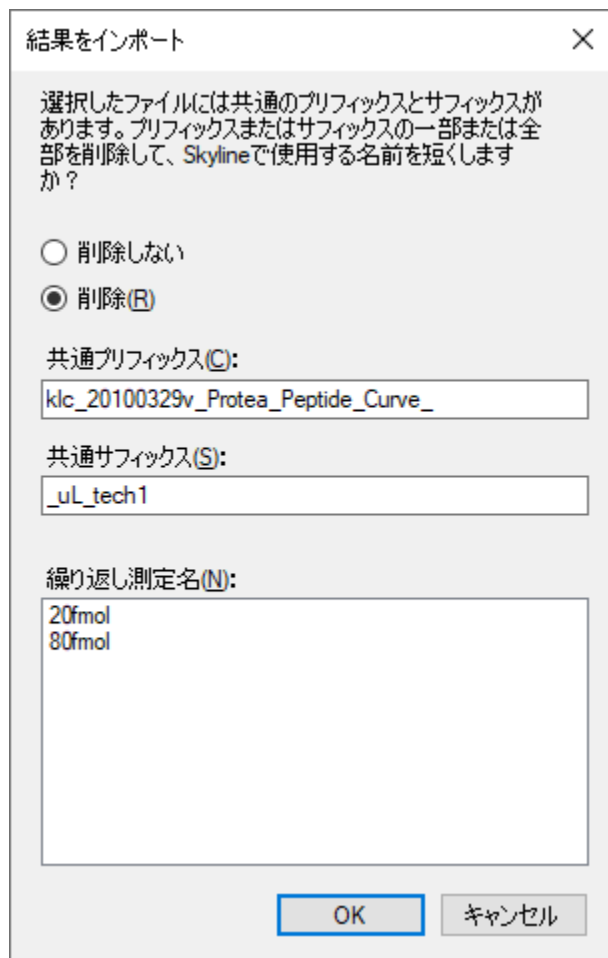
Skyline が本実験用の PRM データで実行された Sequest/Percolator ペプチド検索の結果からスペクトルライブラリを構築し始め、同時に進行状況フォームを表示します。この手順を完了すると、Skyline はペプチド検索スペクトルソースファイルまたは Skyline ドキュメントに生データのファイルがないか検索します。この場合は、一致する Thermo の生ファイルが 2 つ見つかります。一致するデータファイルが見つからなかった場合は、ファイルを検索するよう求められます。

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(R)

共通プリフィックス(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ラベルやその他の UI 要素で表示するため、このように短くなった名前を容認するのはよいアイデアです。ここでは短くなった名前を容認します。

- [OK] ボタンをクリックします。

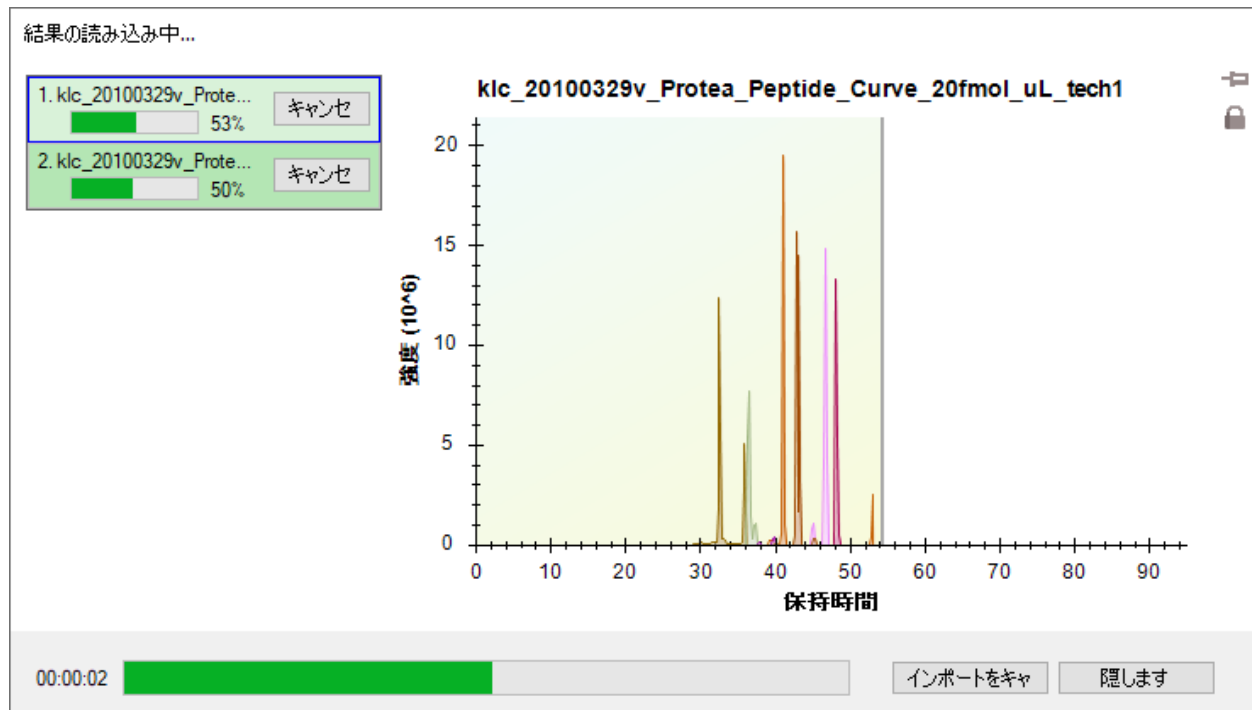
Skyline はすでに調整された複数のトランジション設定を表示します。これらの設定は、[MS1 フルスキャンフィルタチュートリアル](#)のように白紙状態から始めるときに有用となりますが、ここでは今後これを変更する必要は一切ありません。

- 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。これもやはりこのデータセットに対してすでに調整済みです。

- [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。

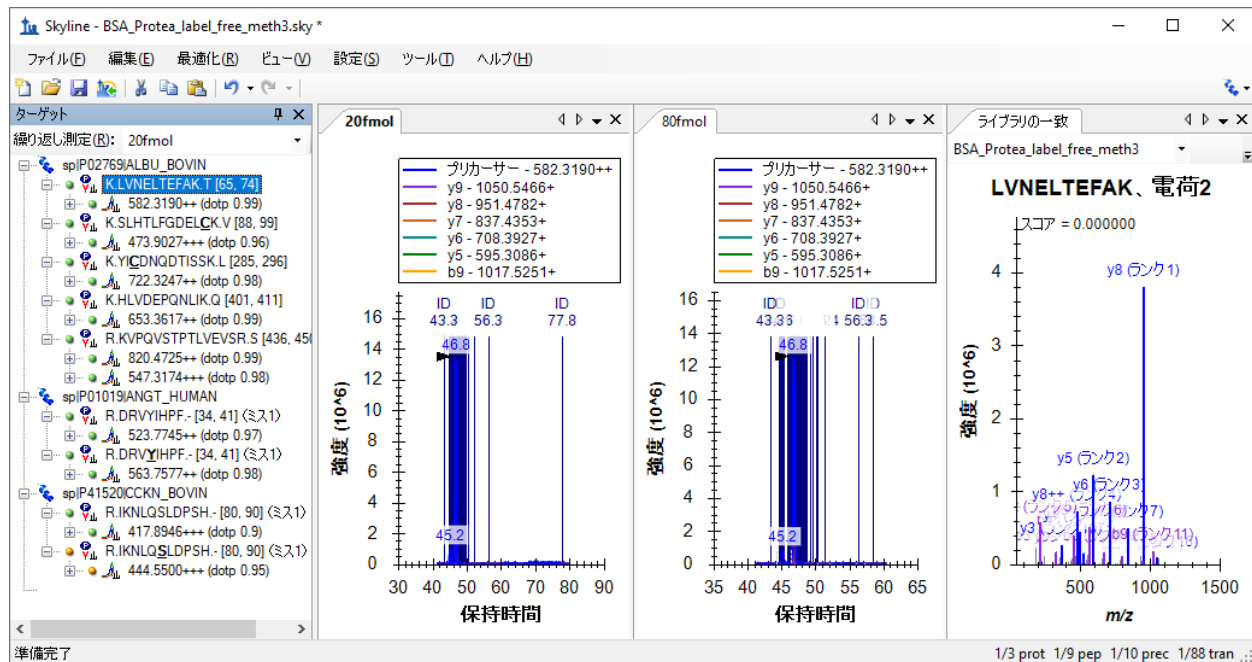


データの確認

ターゲットクロマトグラムが抽出されピークが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 ウィンドウは以下のようになります。



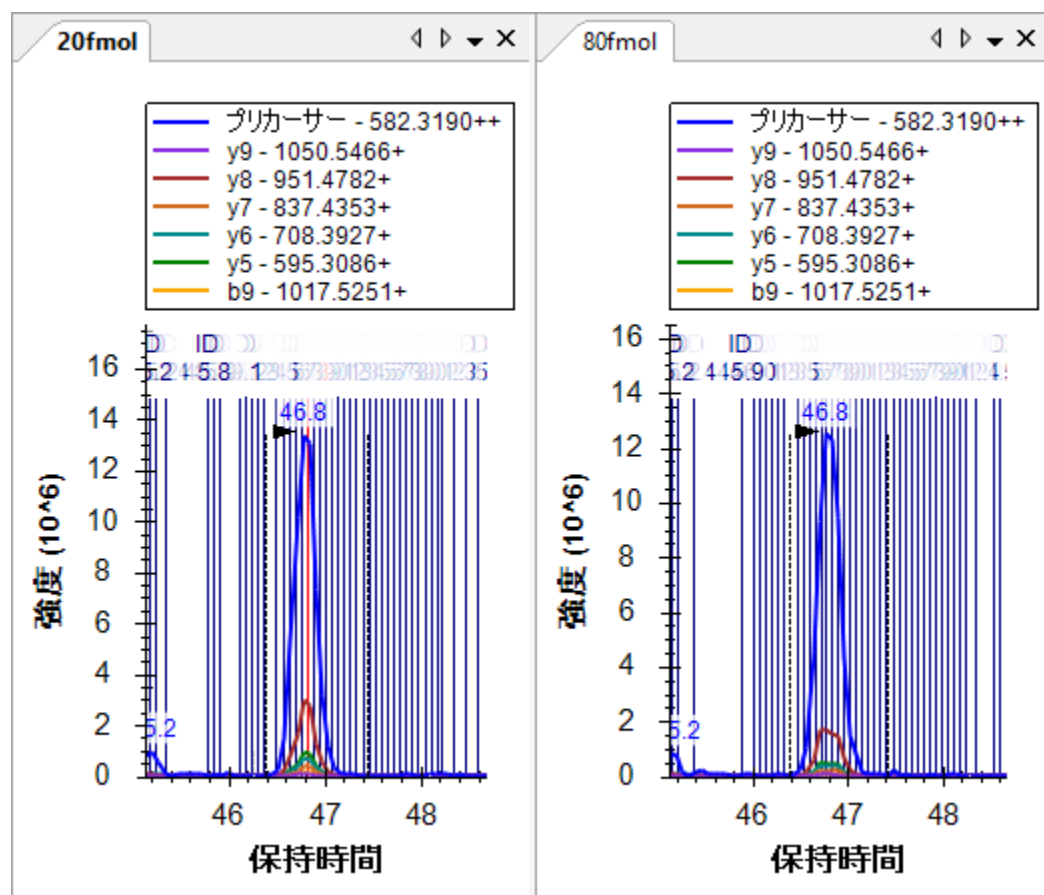
この表示には濃い青の縦線、「ID」の文字および同定されたスペクトルの分単位での時間が注釈付けられたスペクトルIDが多数あるため、クロマトグラムを確認しづらいことがあります。選択したクロマトグラムピークが、その頂点を示す黒の矢印ポイント付きで、これらのIDの真ん中に表示されます。

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 タンパク質概要を一定のバックグラウンドとして使用したためです。

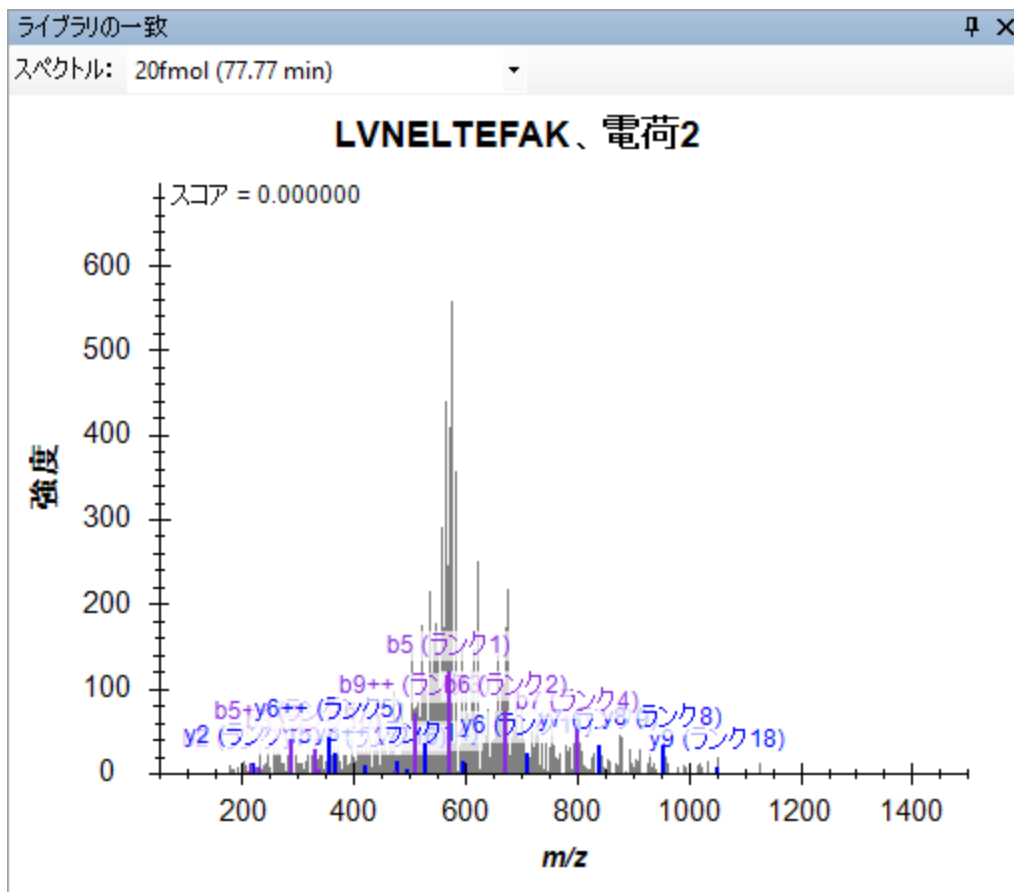
このフルクロマトグラム表示が Skyline で表示されている場合は、以下の操作を行ってクロマトグラムの積分ピークにズームインします。

- [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] 表示に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長い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。ピーク積分境界以降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。




それにもかかわらず、検索は3つの予想されるタンパク質を含む FASTA ファイルに対して未指定切断を使い、続いて Uniprot の FASTA ファイル全体を逆に実施されました。

- [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グラフ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[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。

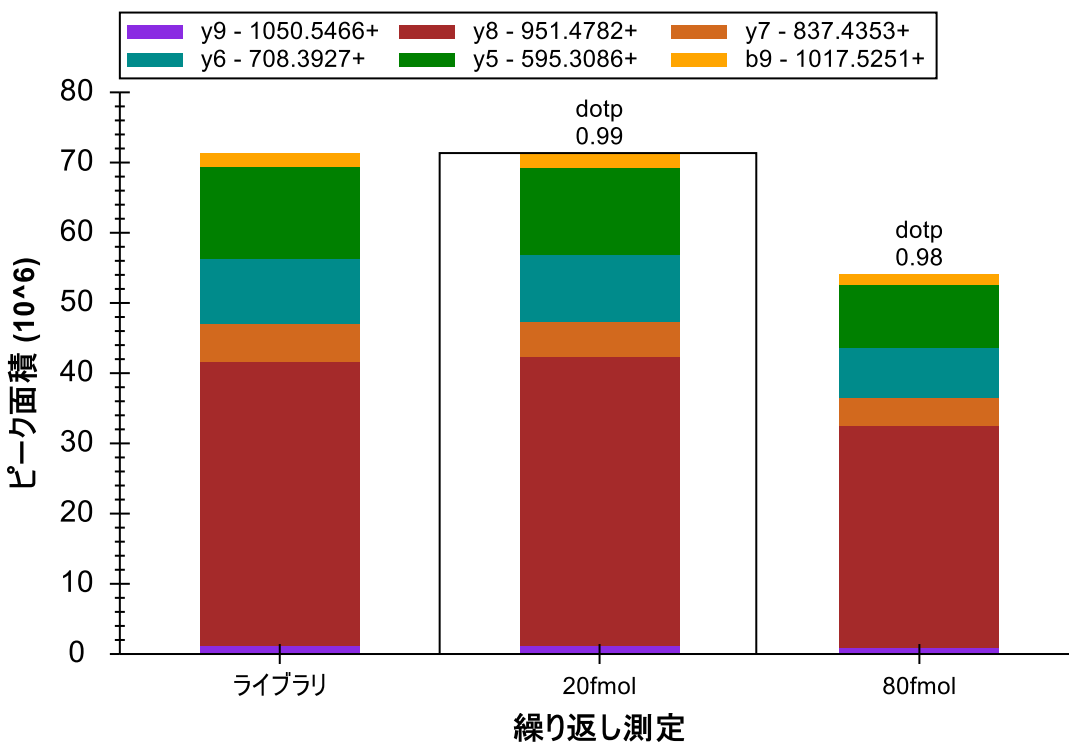
[ターゲット] 表示に注目してみると、すべてのターゲットペプチドに一致する MS/MS スペクトルがあり、小さなスペクトル付きのアイコン  が右下隅に表示されます。最低内積スコア（「dotp」という標識）は、0.84 であることがわかります。これにより、プリカーサー「417.8946+++ (dotp 0.84)」の測定済みのプロダクトイオンピーク面積とライブラリスpekトル内の断片イオン強度との間の相関度スコアが提供されます。[ターゲット] 表示には有効な繰り返し測定、すなわち「20fmol」の内積スコアのみが表示されています。有効な繰り返し測定は、タブテキストが太字になっており、[ターゲット] 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グラフをクリックするか、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。

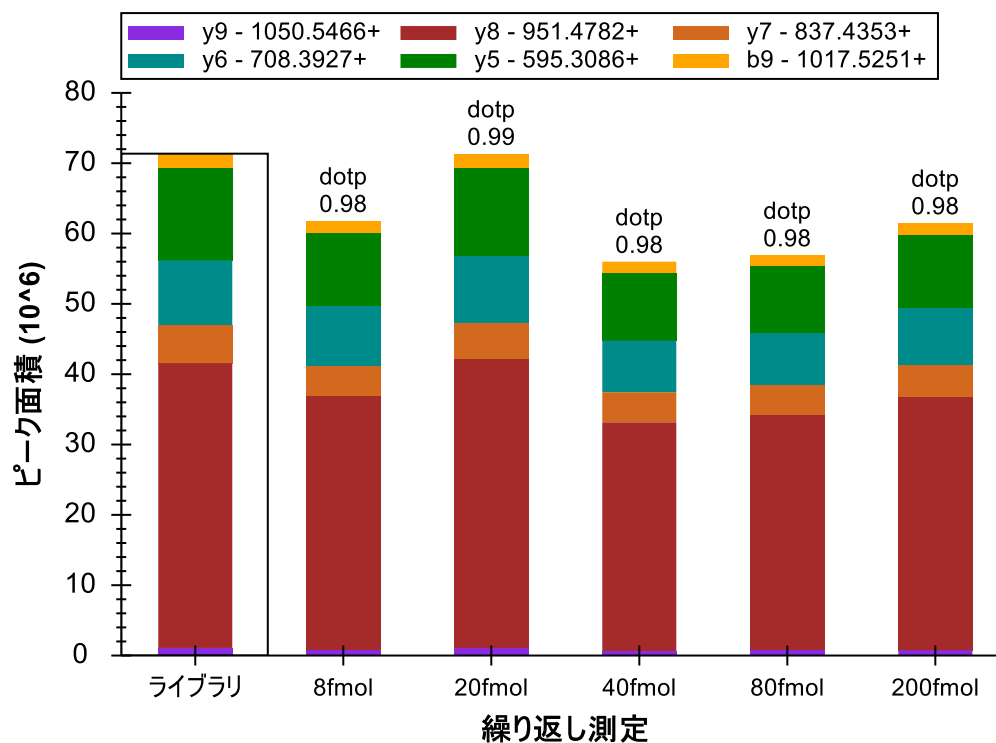


そのように表示されない場合は、以下の手順のうち複数を実施する必要があります。

- [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

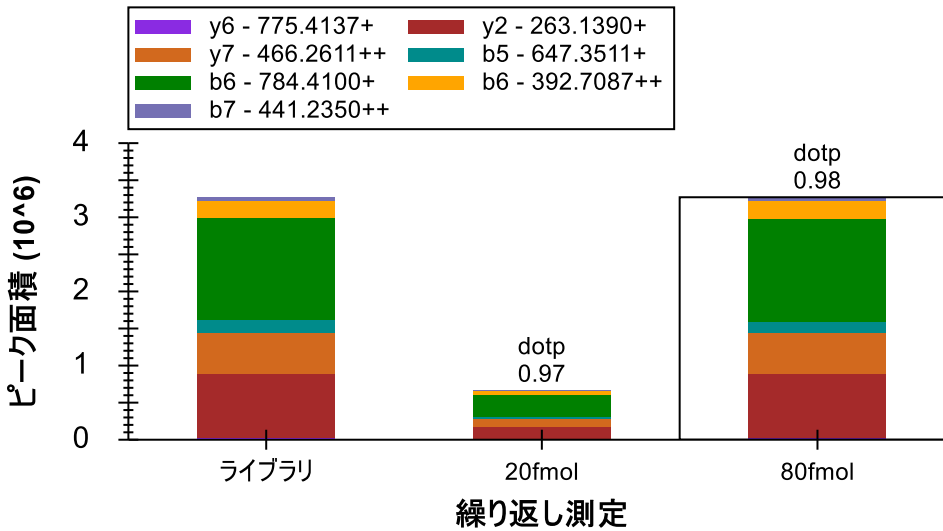
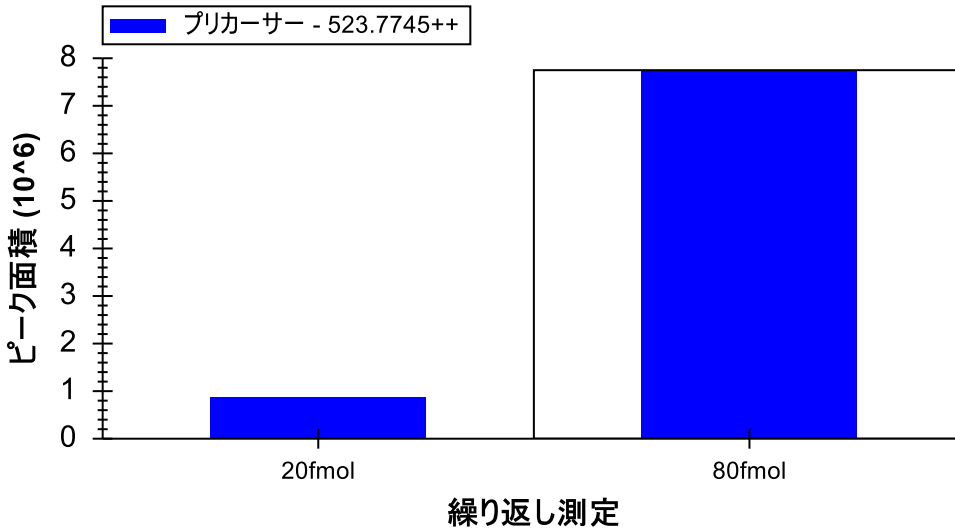
ものです。全5ポイント希釈曲線については、上記 LVNELTEFAK ペプチドのピーク面積グラフは以下ようになります。



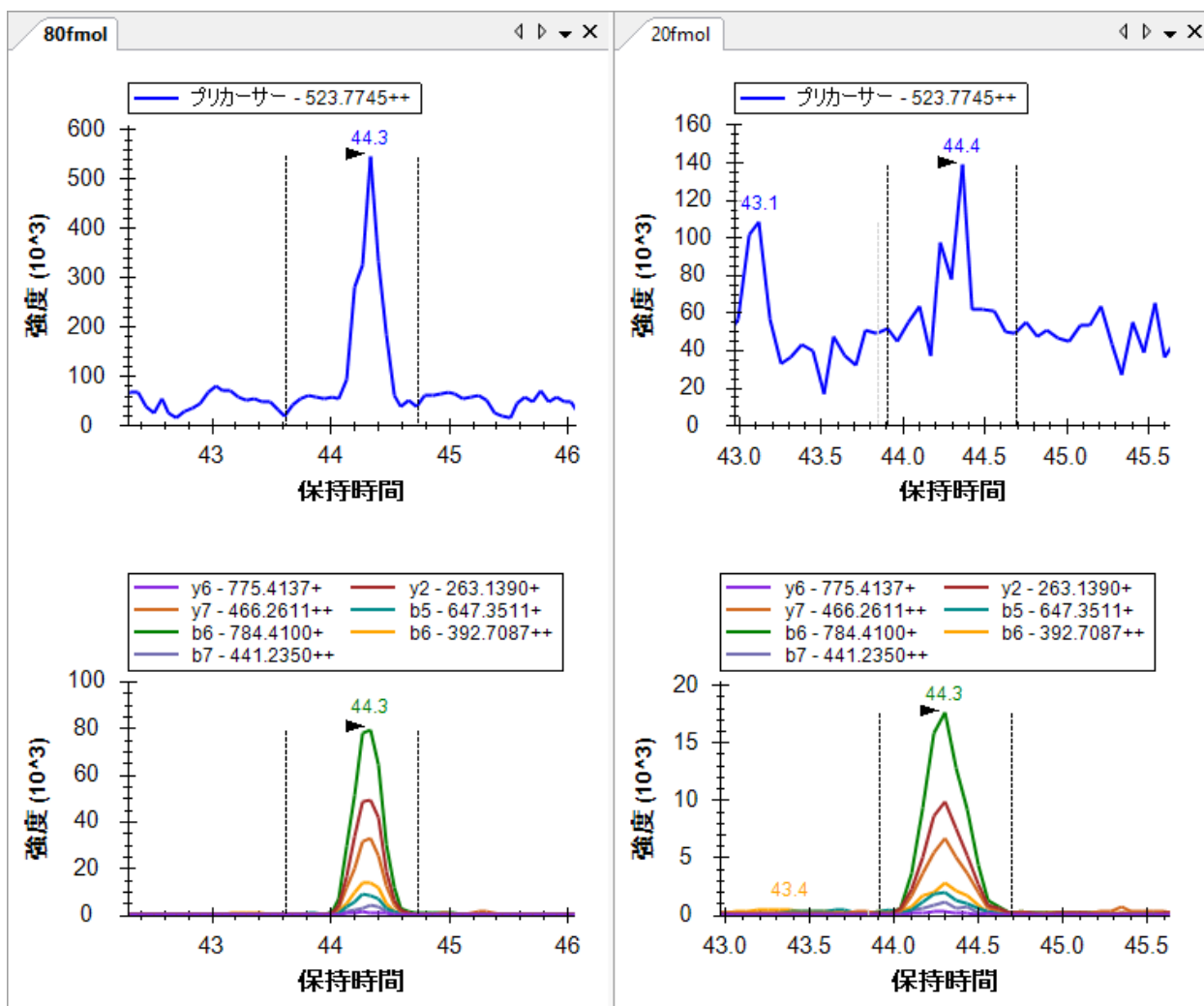
次に、ヒトペプチド DRVYIHPF に注目してみましょう。ここでは、試料名 80 fmol および 20 fmol で 4:1 の濃度比が見られると予測されます。Skyline が実際に行った測定値の詳細を見るには、以下の操作を行います。

- [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] グラフは以下のようになります。



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 面積は約 8×10^6 および 20 fmol 面積はほぼ 0.9×10^6 、または 9:1 の比率となっています。クロマトグラムグラフに注目して、この相違の原因を理解してみましょう。



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。

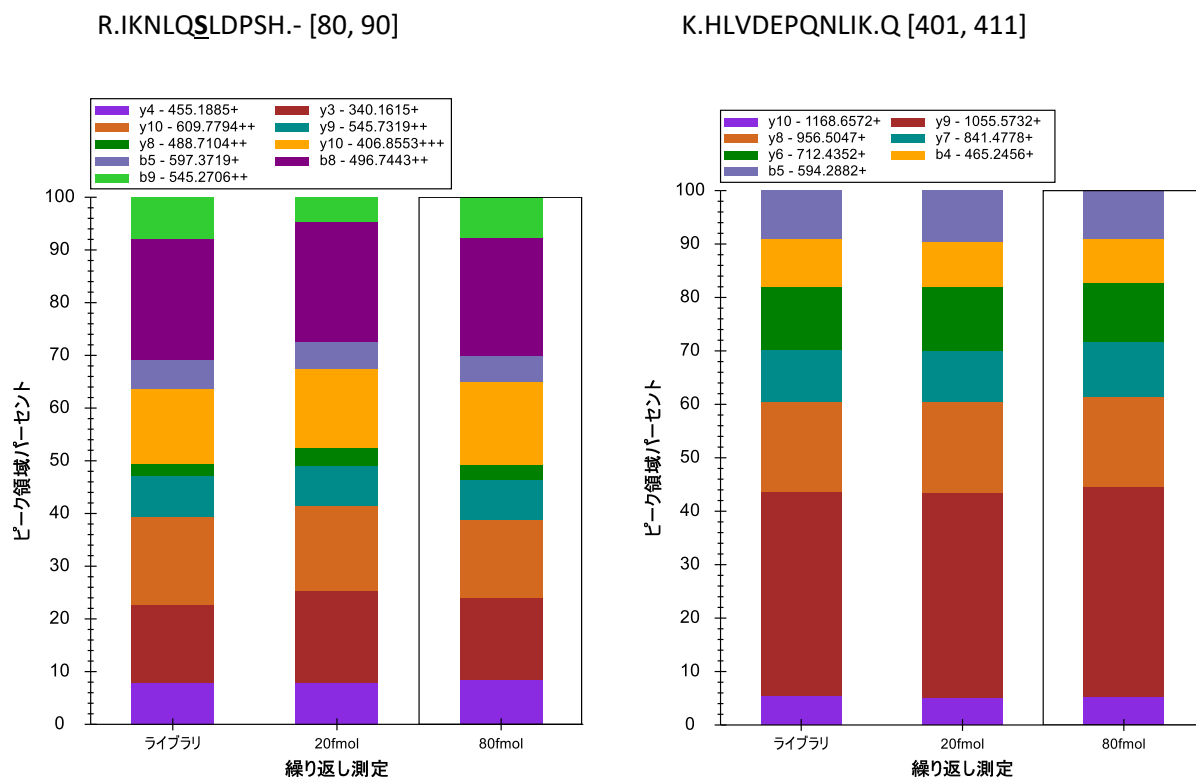
ここで、ドキュメント内の最後の 4 つのペプチドをすべて確認すると、4 つのペプチドすべての形態が 80 fmol の試料と 20 fmol の試料との間で、予想どおり約 4:1 の強度比を示していることもわかります。（このデータは希釈シリーズから 2 ポイントを選んだものです。本チュートリアルではサイズを考慮して、2 ポイントのみで行っています。）

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断片イオンクロマトグラムを使用した定量的実験の実施に十分な装置であることを示しています。¹

以下の操作を行って、繰り返し測定間の相対イオン存在量が比較できます。

- [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もう一度確認して、断片イオンの相対存在量が繰り返し測定間で非常に似ていること、またライブラリスペクトル断片強度に非常に似ていることがわかります。



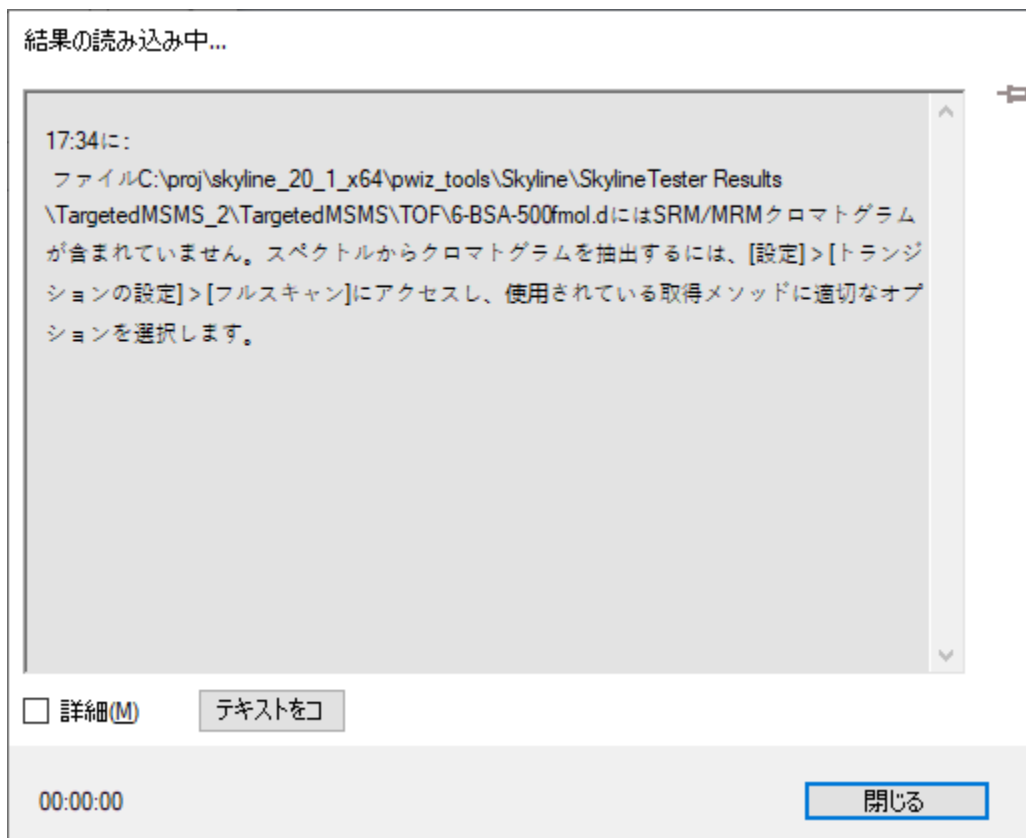
高分解能質量スペクトルでの作業

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 ダイジェスト上で実行され、Agilent 6500 Series Q-TOF で測定された全希釈シリーズです。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プロファイルスキャンで動作しますが、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 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ため、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、作業を行っ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はありません。このオプションが赤になっているのはそのためです。データ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。以下の操作を行って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。

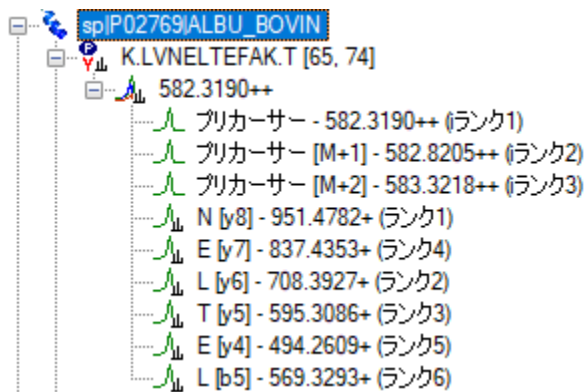
Skyline ではこのオプションが赤で表示され、マウスカーソルを赤いテキストの上に合わせると、「全グラジエントクロマトグラムへのインポートには時間がかかり、ディスク容量を消費する上、ピークの見つけが効果的に行えない場合があります。」というヒントが表示されます。ただしこの場合は、データがスケジュール化された PRM メソッドで取得されており、MS1 スペクトルが全グラジエントで取得されたにもかかわらず、Skyline はクロマトグラムの長さを自動的に MS/MS スペクトルが取得された時間範囲のみに調整します。

- [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、すべてのペプチドに3つのプリカーサーランジション (M、M+1、および M+2) が含まれていることがわかります。これは、高分解能 MS1 スキャンでのみ可能です。[ターゲット]表示のランジションは以下のようになります。



プリカーサー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 (i ランク) およびプロダクトイオンピーク (ランク) 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

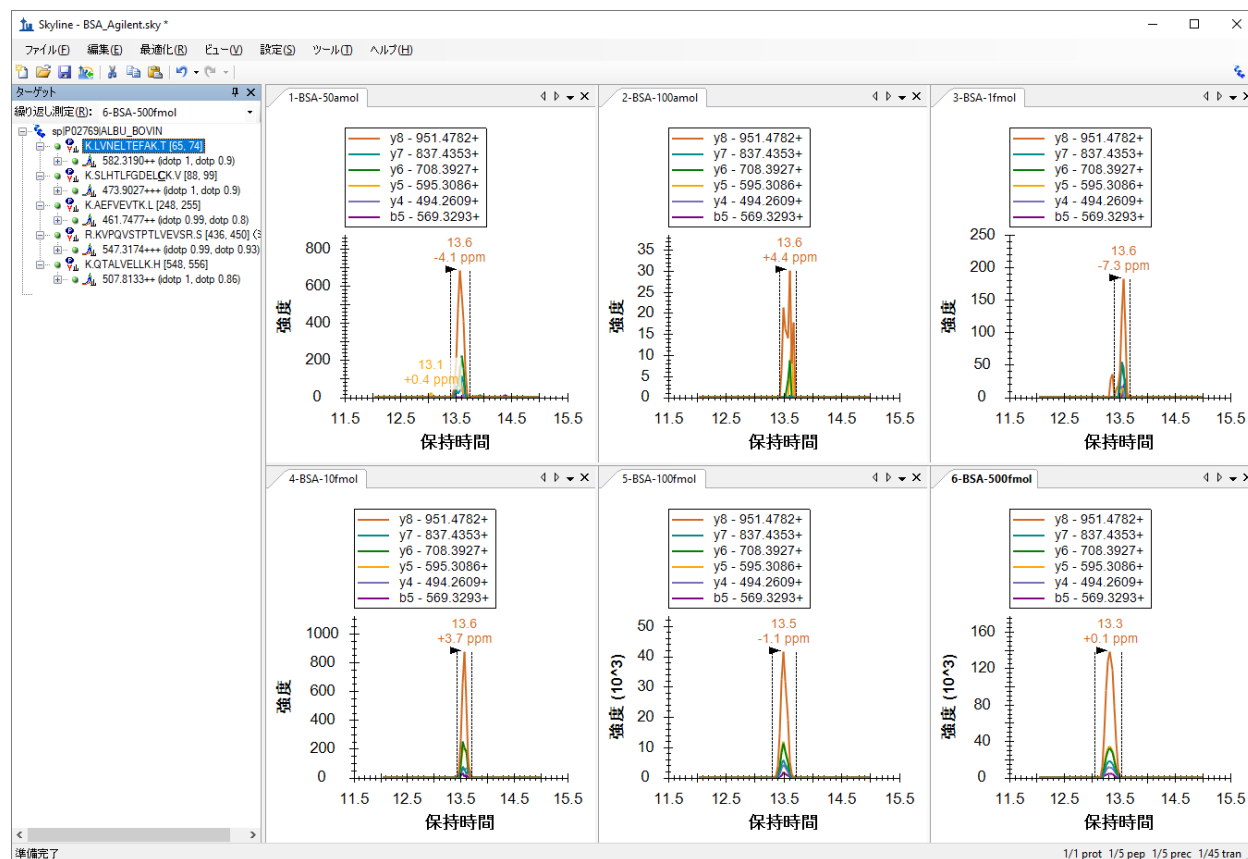
希釈シリーズの最高濃度での測定をドキュメントにインポートするには、以下の手順を実施します。

- [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、その周囲の長方形をクリックしてドラッグし、選択します。
- [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が抽出されピークが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。

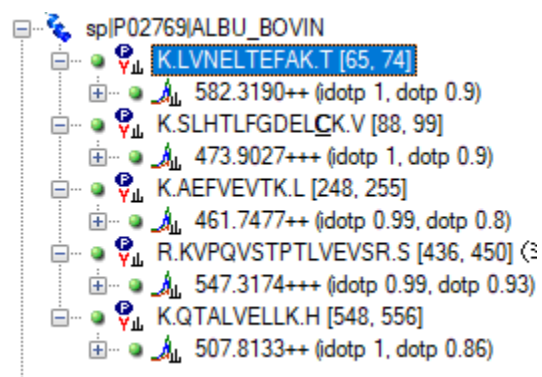
- [ターゲット]表示内の最初のペプチド (K.LVNELTEFAK.T [65, 74]) を選択します。
- [編集]メニューで[すべて折り畳む]を選択し、[プリカーサー] (Ctrl+Shift+W) をクリックします。
- [ライブラリの一致]表示の右上隅の「X」をクリックして、表示を閉じます。
- [ビュー]メニューで[グラフを配置]を選択し、[タイル]をクリックします。

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

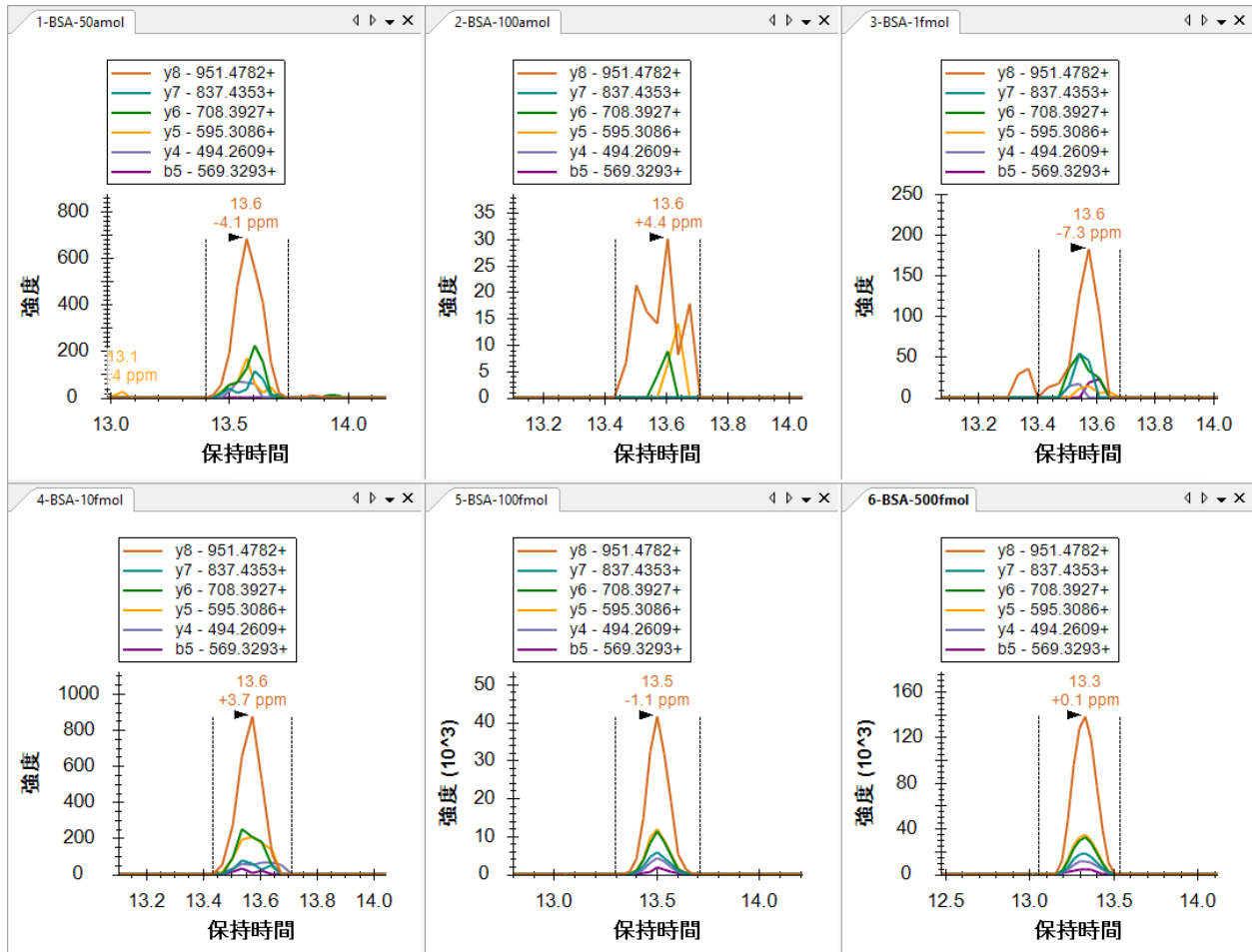
[ターゲット]表示を拡大すると、プリカーサー同位体分布およびプロダクトイオン強度に新たに2つの Orthogonal 内積値である、idotp および dotp がそれぞれ追加されているのがわかります。この一番高濃度のデータである 500 fmol の場合、これらの値はクロマトグラムピークと予測相対強度との間の非常に良好な相関度があることを示しています。



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。

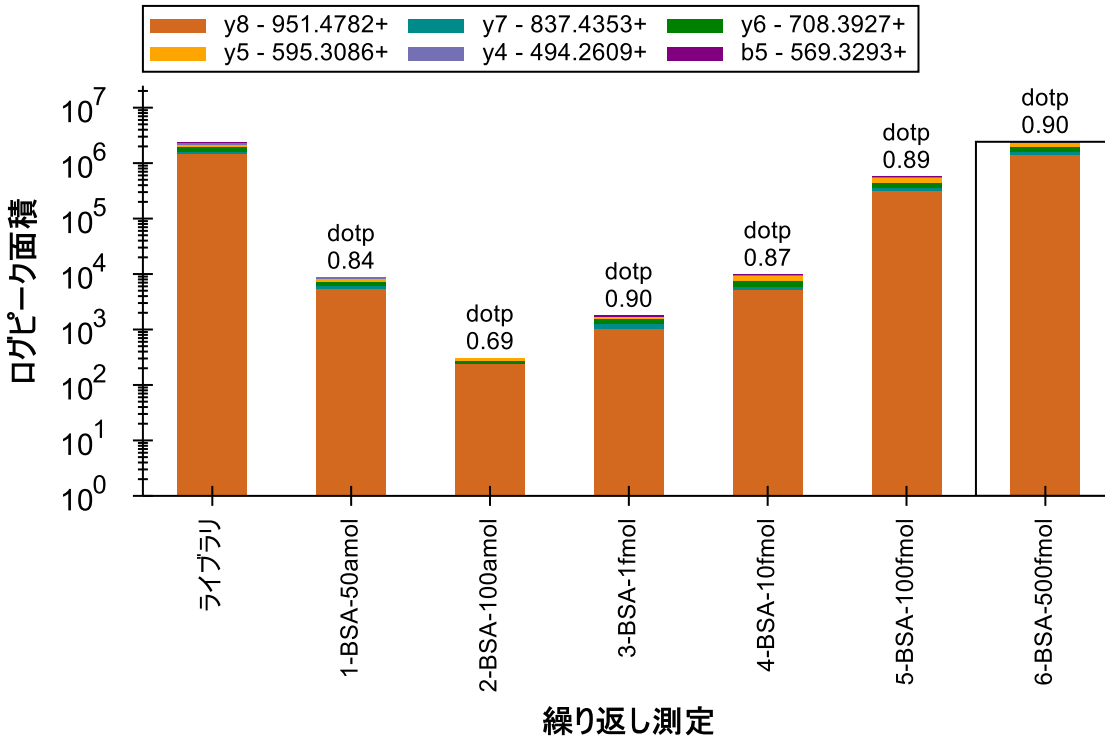


6つのクロマトグラムグラフからわかるのは、100 amol の試料 (40) よりも 50 amol の試料のピークグループの方が、高強度 (700) で形状が優れていることです。すべてのピークの保持時間は非常に類似しており、Skyline が 100 amol の試料で誤ったピークを選択したという可能性は低くなっています。また高分解能データについては、ピーク保持時間の注釈の下に質量誤差値が表示され、これは予測 m/z 値とピーク内のポイントの加重平均との間の差異を示します。上図には、高強度のデータは低強度のデータより精度が高くなるという全般的な傾向がかなりはっきりと示されており、これはノイズ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

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より深い洞察が得られます。

- [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、確認する価値があると思われるのは、試料が数値プリフィックス(1、2、3... 6)で示される回数で実際に測定されたかどうかです。これを達成するには、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 [回数] 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回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。

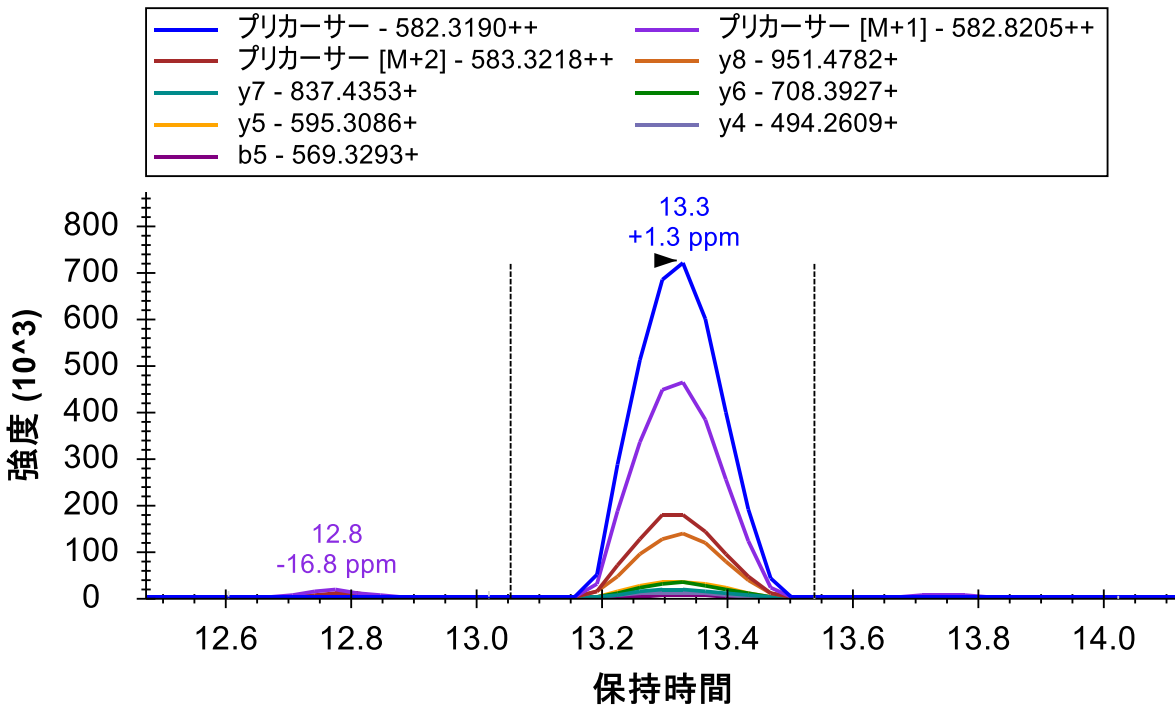
Skyline により、濃度曲線データの品質についての洞察が非常に素早く得られます。

最後の検証手順として、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。

クロマトグラムグラフは以下のようになります。

K.LVNELTEFAK.T(500 fmol)

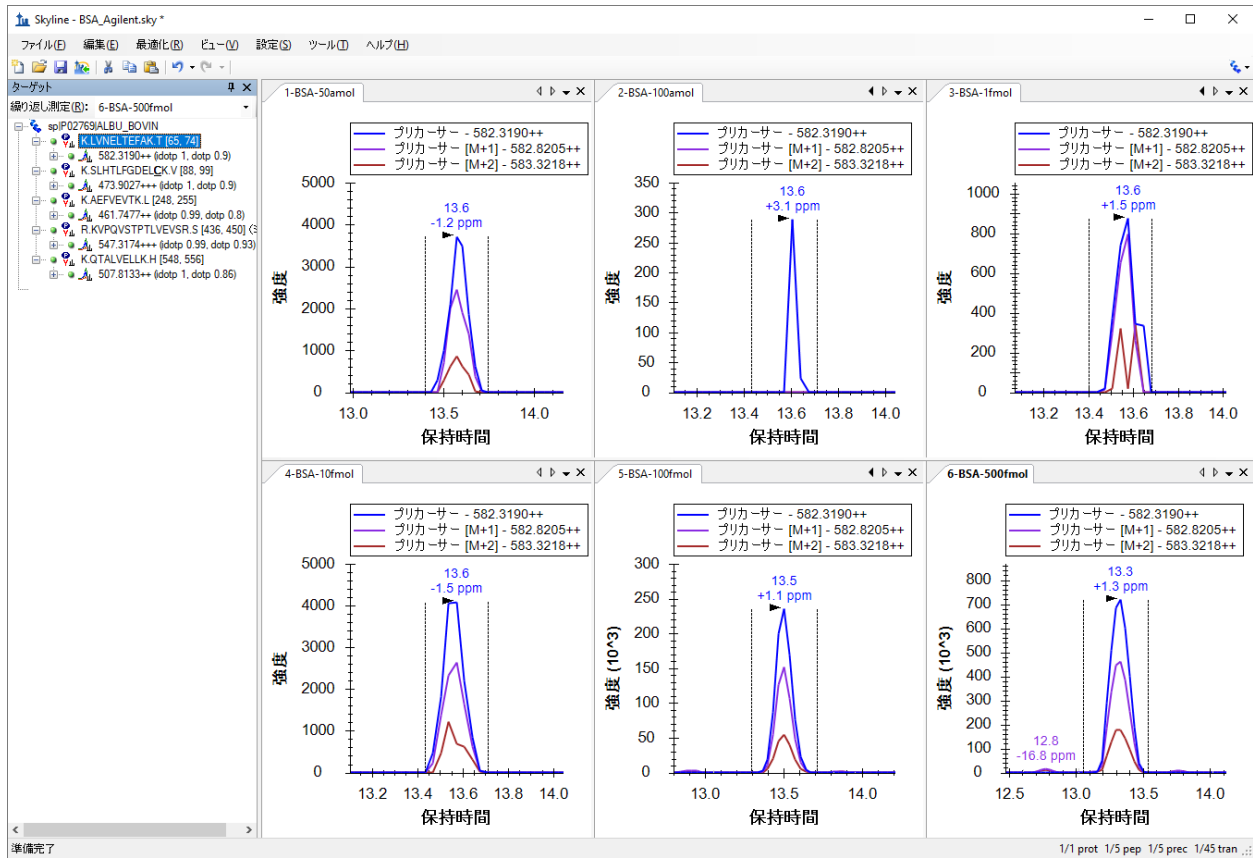


以前と同じように、最高強度のプロダクトイオン(y8)はモノアイソトピックプリカーサー強度の約 1/5 (1.4×10^5 v. 7.2×10^5) に達しており、M+2 ピークでも y8 ピークより強度が高くなっています。

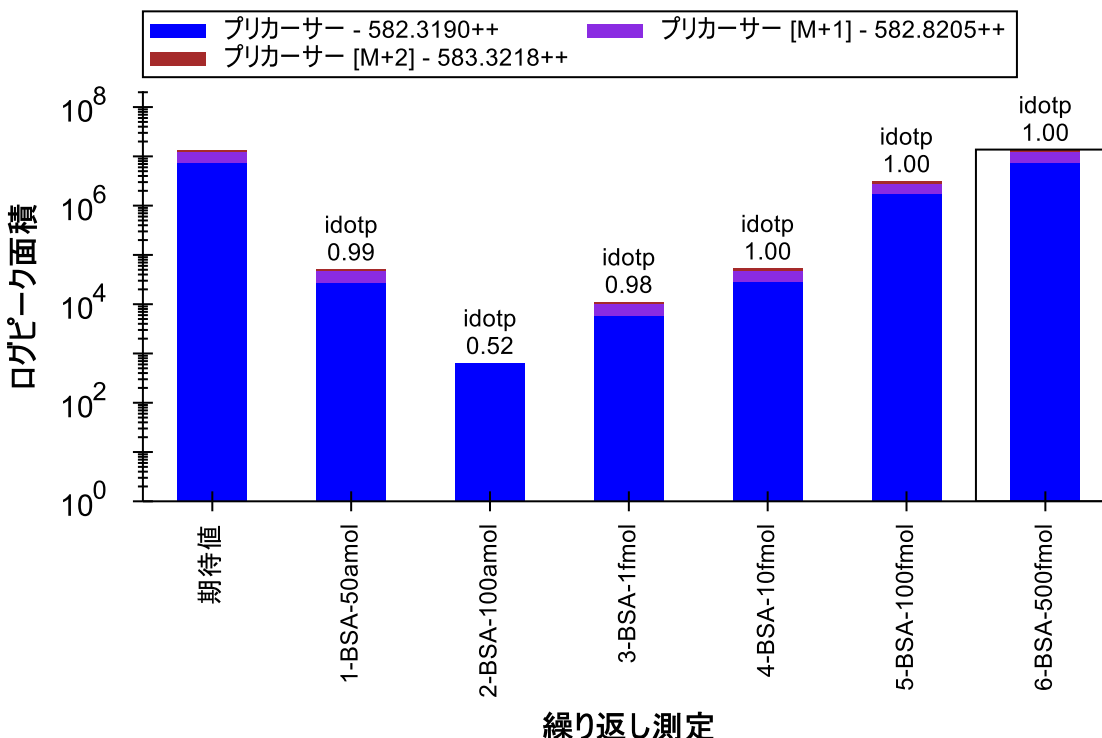
プリカーサーピークのみを表示するには、以下の操作を行います。

- [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学びました。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、品質管理、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 で機能)、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を学びました。(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、ネイティブ結果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を表示するよう選択が可能です。それ以外に Skyline がデータを理解しやすくするために提供するクロマトグラム、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考してください。

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