

Skyline 低分子ターゲット

Skyline ターゲット質量分析環境では、質量分析計の raw データを Skyline ドキュメントにインポートし、情報を視覚的に表示します。本来プロテオミクス用に開発された Skyline ですが、一般の低分子でも作業できるように拡張されています。Skyline を利用したさまざまなタイプのデータ解析 (SRM、PRM、MS1 フィルタ、DIA など) のチュートリアルも多数用意されています。本チュートリアルは、Skyline を使用してタンパク以外の分子をターゲットとする場合の違いに焦点を当てます。

本チュートリアルでは、メチオニン経路化合物のグループの SRM アッセイを構築します。

Skyline は、ターゲット定量的質量分析研究のためのメーカーに依存しないプラットフォームの提供を目指しており、Agilent、Bruker、SCIEX、Shimadzu、Thermo-Scientific、および Waters の各メーカーの装置から raw データをインポートできます。さまざまな装置プラットフォームからデータをインポートすることで、再現可能なメソッドの普及、研究室間の技術の移転、装置間の比較および複数の大型施設間での共同研究や比較が非常に容易になります。プロテオミクスの分野で何年もできていたことが、一般的な分子をターゲットとして Skyline を使用しても同じように利用できます。

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/SmallMolecule_3_6.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\bspratt\Documents

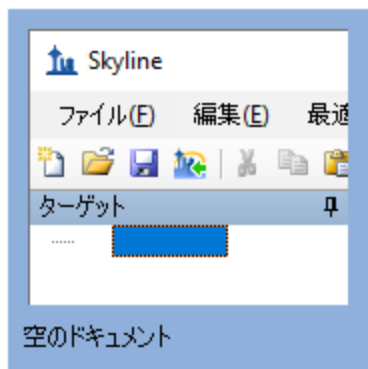
これにより以下の新しいフォルダが作成されます。

C:\Users\bspratt\Documents\SmallMolecule

フォルダには、この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。

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。

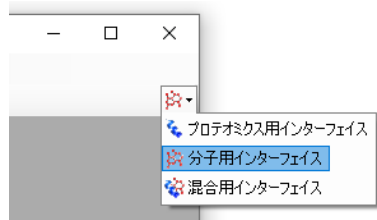



- [設定]メニューで、[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで[いいえ]をクリックします。

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。

このチュートリアルは低分子に関するものであるため、以下のようにして分子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、[分子用インターフェイス]を選択します。



Skyline は、Skyline ウィンドウの右上隅の分子アイコン  で表示される分子モードで動作しています。元のプロテオミクスメニューやコントロールが表示されなくなり、低分子の分析に集中できます。

分子トランジションリストの Skyline ドキュメントへのインポート

分子トランジションリストを Skyline ドキュメントに取り込む最も簡単な方法は、空のドキュメントから始めて、[編集]>[挿入]>[トランジションリスト]メニュー項目を利用することです。

注：データに Skyline が認識できる列ヘッダーがあれば、[ファイル]>[インポート]>[トランジションリスト]メニュー項目も利用できます。認識できる列名のリストを確認するには、[編集]>[挿入]>[トランジションリスト]ウィンドウにある「ヘルプ」ボタンを押してください。

Skyline では、最低でも各プリカーサーとプロダクトイオンの電荷状態と、イオン組成式または m/z が既知である必要があります。トランジションリストにプロダクトイオンの情報がない場

合は、プリカーサーターゲットのリストであると推定されます。プロダクト情報が異なるプリカーサー情報が繰り返される場合は、ペプチドの場合と同様、単一プリカーサーからの複数トランジションを示すものと認識されます。

イオン式および付加物の記述に関するノート

プロテオミクス用途では、Skyline はプロトン付加によるイオン化を問題なく推定できます。そのため、電荷ペプチドの記述に必要とされるものは、その配列および電荷状態だけです。しかし、一般の低分子の場合はナトリウム獲得、水素損失など、さまざまな方法でイオン化が起こり得ます。Skyline では、<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/> に記載されたスタイルで付加物を記述し、イオン化モードを例えば「[M+Na]」、「[M-2H]」、「[2M+ACN+H]」のように指定できます。

付加物の記述法を用いて、分子が同位体で標識されていることを示すことができます。たとえば、付加物「[M3Cl374H2-Na]」は、分子の 3 個の Cl 原子が 37Cl で置換され、4 個の H 原子が重水素で置換され、分子がナトリウム損失によってイオン化されていることを示します。

組成が分からない分子については、付加物で質量シフトを示すことができます。たとえば、「[M(-1.23)+H]」は、変化していない場合よりも分子の質量が 1.23 AMU 軽く、分子は水素獲得によってイオン化されることを示します。

どのようにイオン化するかがわからない分子の場合は、付加物が電荷のみを示すことがあります。たとえば、「[M+3]」は電荷状態 3 を示します。 m/z 値は分子質量の $1/3$ となります。プリカーサーでもプロダクトでも、トランジションリストを完全に m/z 値で記述することはできませんが、化学式がなければ Skyline は同位体分布を提供できません。したがって、中性分子と付加物の説明の両方の化学式があることが望ましいです。

トランジションリストの挿入

非プロテオミクス分子をターゲットとする Skyline ドキュメントの作成を開始するには、以下の操作を行います。

- チュートリアルフォルダ以内にある「SMTutorial_TransitionList.csv」ファイルを探し、Excel で開きます。
- Skyline [編集] メニューで [挿入] を選択して、[トランジションリスト] をクリックします。

Skyline は以下のような [挿入] フォームを表示します。

挿入

トランジションリスト

分子リスト名	プリカーサー名	プリカーサーイオンの式	プリカーサー付加物	プリカーサー m/z	プリカーサー電荷	プロダクト名	プロダクトイオン式	プロダクトの付加物	プロダクト m/z	プロダクト電荷	標識タイプ	明示的保持時間	明示的保持時間ウインドウ	明示的衝突エネルギー	メモ	InChIKey
▶▶																

ペプチド(P)
 分子(M)

ダウンロードしたトランジションリストスプレッドシートには、以下のような値が表示されます。

Molecule List Name	Precursor Name	Precursor Formula	Precursor Adduct	Precursor Charge	Precursor RT	Precursor CE	Product m/z	Product Charge	Label
Amino Acid	Methionine	C5H11NO2S	[M+H]	1	2.5	15	104.07	1	
Amino Acid	Methionine	C5H8H'3NO2S	[M+H]	1	2.5	15	107.09	1	heavy
Amino Acid	Isoleucine	C6H13NO2	[M+H]	1	2.9	15	86.096	1	
Amino Acid	Leucine	C6H13NO2	[M+H]	1	3	15	86.096	1	
Amino Acid	Leucine	C6H10H'3NO2	[M+H]	1	3	15	89.1	1	heavy
Amino Acid	Phenylalanine	C9H11NO2	[M+H]	1	3.1	15	120.08	1	
Amino Acid	Phenylalanine	C9H11NO2	[M6C13+H]	1	3.1	15	126.11	1	heavy
Amino Acid	Arginine	C6H14N4O2	[M+H]	1	2.01	15	116.07	1	
Amino Acid	Arginine	C1C'5H14N4O2	[M+H]	1	2.01	15	121.11	1	heavy
Amino Acid	Ornithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	70.07	1	
Amino Acid	Ornithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	116.07	1	
Amino Acid	Ornithine	C5H10H'2N2O2	[M+H]	1	0.85	15	72.07	1	heavy
Amino Acid	Ornithine	C5H10H'2N2O2	[M+H]	1	0.85	15	118.07	1	heavy
Organic Acid	creatine	C4H9N3O2	[M+H]	1	1.1	15	90.06	1	
Organic Acid	creatine	C4H6H'3N3O2	[M+H]	1	1.1	15	93.06	1	heavy
5'-methylthioadenosine	MTA	C11H15N5O3S	[M+H]	1	3.4	15	136.1	1	
5'-methylthioadenosine	MTA	C11H12H'3N5O3S	[M+H]	1	3.4	15	136.1	1	heavy
S-adenosyl methionine	SAM	C15H22N6O5S	[M+H]	1	2.9	15	250.11	1	
S-Adenosyl homocysteine	SAH	C14H20N6O5S	[M+H]	1	2.9	15	136.08	1	
Polyamine	Spermidine	C7H19N3[M+H]		1	3.3	15	129.15	1	
Polyamine	Spermine	C10H26N4	[M+H]	1	3.5	15	112.112	1	

イオン組成および付加物の説明についてのその他の注意

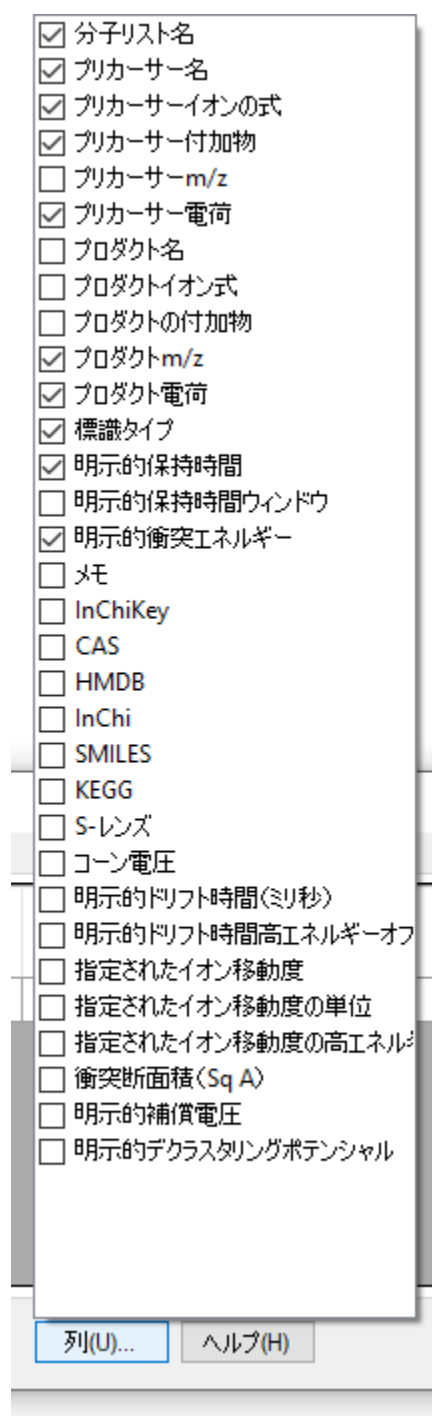
この例では、メチオニンと d3-メチオニンのように非標識体と標識体のペアがあります。トランジションリストでは、これが **C5H11NO2S [M+H]** および **C5H8H'3NO2S [M+H]** として記述されていますが、付加物の記述法を使用すると、これは **C5H11NO2S [M+H]** および **C5H11NO2S [M3H2+H]** とも記述できます。フェニルアラニンの非標識体と標識体のペアでもこの例があります。式は同じですが、標識体の付加物の記述は 6 個の炭素が C13 で置換されていると指示して

います。プリカーサー付加物列はオプションであることに注意してください。スペルミジンの例にあるように、付加物はイオン組成の一部として与えられることもあります。また、プリカーサー電荷列は実質的に不要であることにも注意してください。電荷状態は、付加物の記述から推定できます。標識タイプ列も厳密には不要です。標識の有無はプリカーサーイオン組成や付加物から推定できます。

[挿入] フォームには、スプレッドシート内のフォームにはない追加の列があり、また、列の順序も同一ではありません。どちらの問題も以下のようにして簡単に修正できます。

- **[列]** ボタンをクリックします。

これにより、列選択メニューは以下のようになります。



A screenshot of a column selection menu. The menu is a vertical list of 30 items, each with a checkbox. The first 10 items are checked, while the remaining 20 are unchecked. At the bottom of the menu are two buttons: '列(U)...' and 'ヘルプ(H)'. The items in the menu are:

- 分子リスト名
- プリカーサー名
- プリカーサーイオンの式
- プリカーサー付加物
- プリカーサーm/z
- プリカーサー電荷
- プロダクト名
- プロダクトイオン式
- プロダクトの付加物
- プロダクトm/z
- プロダクト電荷
- 標識タイプ
- 明示的保持時間
- 明示的保持時間ウィンドウ
- 明示的衝突エネルギー
- メモ
- InChiKey
- CAS
- HMDB
- InChi
- SMILES
- KEGG
- S-レンズ
- コーン電圧
- 明示的ドリフト時間(ミリ秒)
- 明示的ドリフト時間高エネルギーオフ
- 指定されたイオン移動度
- 指定されたイオン移動度の単位
- 指定されたイオン移動度の高エネルギー
- 衝突断面積(Sq A)
- 明示的補償電圧
- 明示的デクラスティングポテンシャル

- スプレッドシートに表示されていない列のチェックボックスをオフにします。

次に、以下の操作を行って、[挿入]フォームの列を再度並べ替えます。

- 各列ヘッダーをクリック&ドラッグして、スプレッドシートと順序が一致するように移動します。

列を選択し、並べ替えたら、[挿入]フォームは以下のようになります。

	分子リスト名	プリカーサー名	プリカーサーイオンの式	プリカーサー付加物	プリカーサー電荷	明示的保持時間	明示的衝突エネルギー	プロダクト m/z	プロダクト電荷	標識タイプ
*										

ペプチド(P)
 分子(M)

スプレッドシートで指定されているトランジションを追加するには、以下の操作を行います。

- ヘッダーを含む最初の行を除く、スプレッドシートのコンテンツを選択します。
- ツールバーの[コピー]ボタンをクリックします（またはキーボードで Ctrl+C キーを押します）。
- Skyline に戻ります。
- フォームの最初のセルが青にハイライトされている状態で、キーボードで Ctrl+V キーを押して貼り付けます。
- [エラーを確認]ボタンをクリックします。

注：誤ってヘッダーの行をコピーした場合、または列の順序が違う場合は、この時点で誤りが確認できます。

[挿入] フォームは以下ようになります。

トランジションリストを挿入

エラーなし

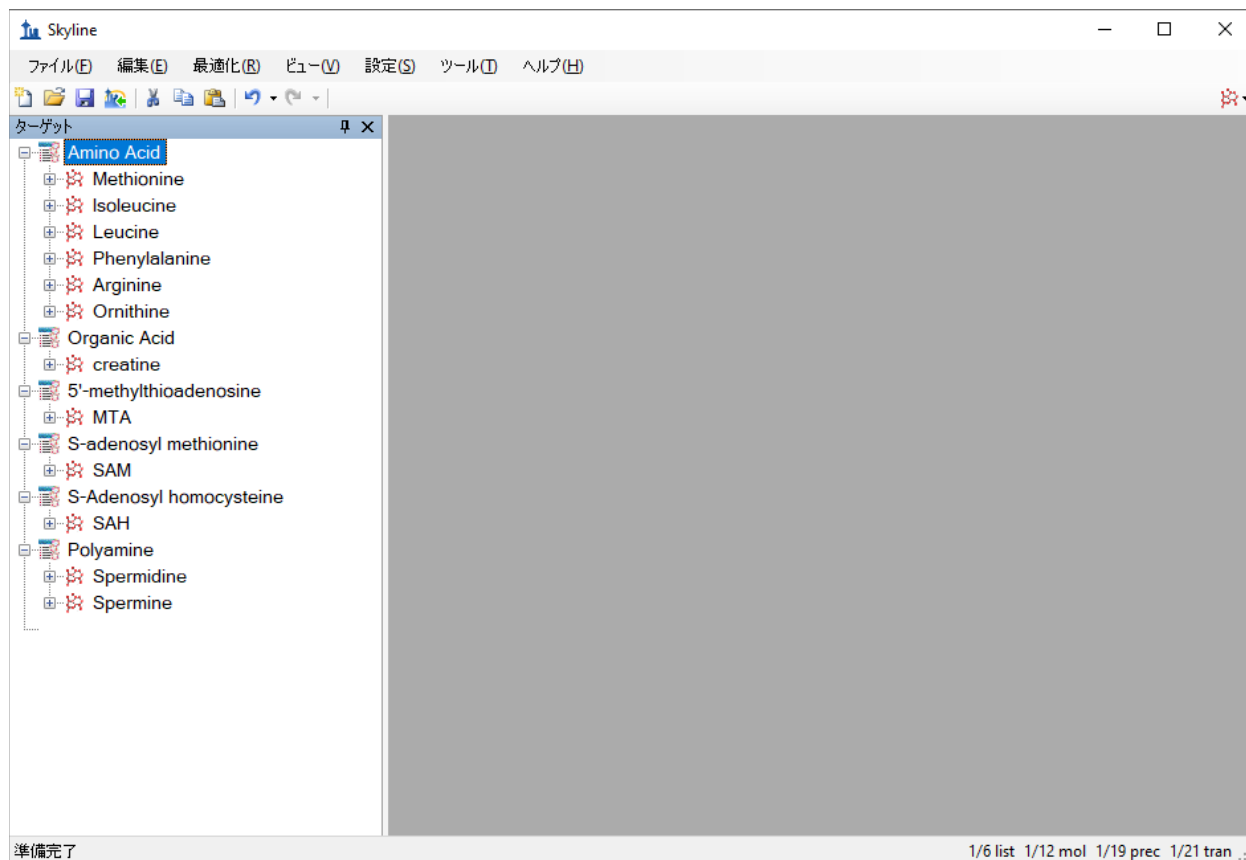
トランジションリスト

	分子リスト名	プリカーサー名	プリカーサーイオンの式	プリカーサー付加物	プリカーサー電荷	明示的保持時間	明示的衝突エネルギー	プロダクトm/z	プロダクト電荷	標識タイプ
▶	Amino Acid	Methionine	C5H11NO2S	[M+H]	1	2.5	15	104.07	1	
	Amino Acid	Methionine	C5H8H ³ N...	[M+H]	1	2.5	15	107.09	1	heavy
	Amino Acid	Isoleucine	C6H13NO2	[M+H]	1	2.9	15	86.096	1	
	Amino Acid	Leucine	C6H13NO2	[M+H]	1	3	15	86.096	1	
	Amino Acid	Leucine	C6H10H ³ ...	[M+H]	1	3	15	89.1	1	heavy
	Amino Acid	Phenylalani...	C9H11NO2	[M+H]	1	3.1	15	120.08	1	
	Amino Acid	Phenylalani...	C9H11NO2	[M6C13+H]	1	3.1	15	126.11	1	heavy
	Amino Acid	Arginine	C6H14N4O2	[M+H]	1	2.01	15	116.07	1	
	Amino Acid	Arginine	C1C ⁵ H14N...	[M+H]	1	2.01	15	121.11	1	heavy
	Amino Acid	Omithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	70.07	1	

ペプチド(P) 分子(M)

- [挿入] ボタンをクリックします。

これで Skyline ウィンドウは以下ようになります。



この時点で、装置メソッド、プリカーサー単離リスト（PRM 用）、またはトランジションリスト（SRM 用）のいずれかをエクスポート可能です。この手順の実行方法の詳細については、[ターゲットメソッドの編集](#)、[既存の定量実験](#)、または[ターゲット MS/MS \(PRM\)](#) チュートリアルをご覧ください。

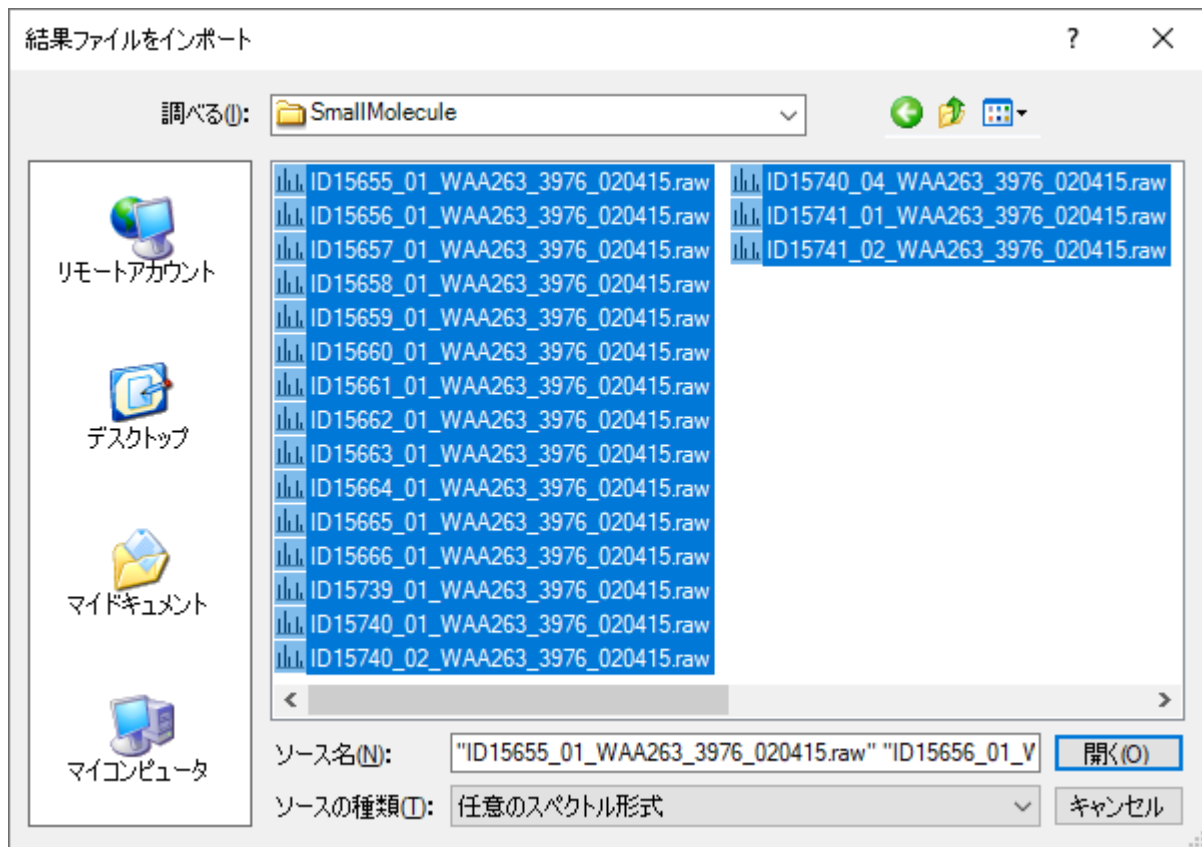
raw データファイルのインポート

本チュートリアルでは、Skyline からエクスポートしたメソッドで、Waters Xevo TQS を用いて取得した raw データをインポートしてみましょう。これを今行うには、以下の操作を行います。

- [ファイル]メニューで、[保存]をクリックします。（Ctrl+S）
- このドキュメントを、作成したチュートリアルフォルダに「Amino Acid Metabolism.sky」として保存します。
- [ファイル]メニューで、[インポート]を選択して[結果]をクリックします。
- [結果をインポート]フォームで、[ファイルにシングルインジェクション繰り返し測定を追加]を選択します。
- フォームの下部にある[同時にインポートするファイル]ドロップダウンリストで、最良のインポートパフォーマンスを提供する[多く]をクリックします。
- [OK]ボタンをクリックします。

- リストの最初のフォルダをクリックし、Shift キーを押しながら最後のフォルダをクリックしてチュートリアルフォルダにある 18 の raw データフォルダすべてを選択します。

[結果ファイルをインポート] フォームは以下のようになります。



- [開く] ボタンをクリックします。
- [結果をインポート] フォームで共通プリフィックスを削除するか聞かれた場合は、[削除しない] オプションを選択します。
- [OK] ボタンをクリックします。

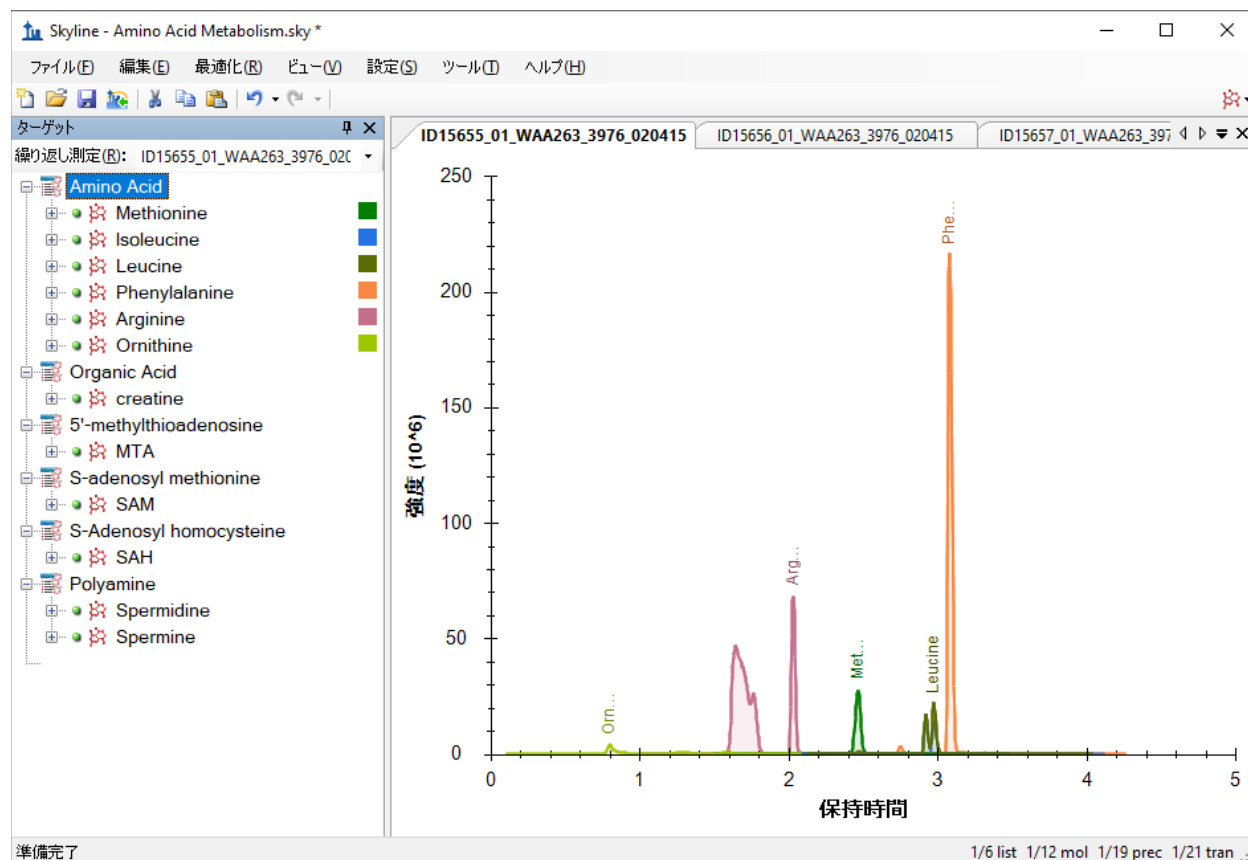
当該ファイルは、特定のアミノ酸欠乏条件下のがん細胞株の代謝物の抽出です。アミノ酸メチオニン、アルギニン、または両方を 3 時間欠乏させたものと対照（すべてのアミノ酸）とを比較しています。¹

ファイル名と条件：

ID15739_01_WAA263_3976_020415 – Double Blank
 ID15740_01_WAA263_3976_020415 – Extraction Blank (contains SIL standards)
 ID15740_02_WAA263_3976_020415 – Extraction Blank (contains SIL standards)
 ID15740_04_WAA263_3976_020415 – Extraction Blank (contains SIL standards)
 ID15655_01_WAA263_3976_020415 – All AA Sample 1
 ID15656_01_WAA263_3976_020415 – All AA Sample 2
 ID15657_01_WAA263_3976_020415 – All AA Sample 3

ID15658_01_WAA263_3976_020415 – Minus Met Sample 1
 ID15659_01_WAA263_3976_020415 – Minus Met Sample 2
 ID15660_01_WAA263_3976_020415 – Minus Met Sample 3
 ID15661_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg Sample 1
 ID15662_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg Sample 2
 ID15663_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg Sample 3
 ID15664_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg, Minus Met Sample 1
 ID15665_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg, Minus Met Sample 2
 ID15666_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg, Minus Met Sample 3
 ID15741_01_WAA263_3976_020415 – Pooled QC Sample 1
 ID15741_02_WAA263_3976_020415 – Pooled QC Sample 2

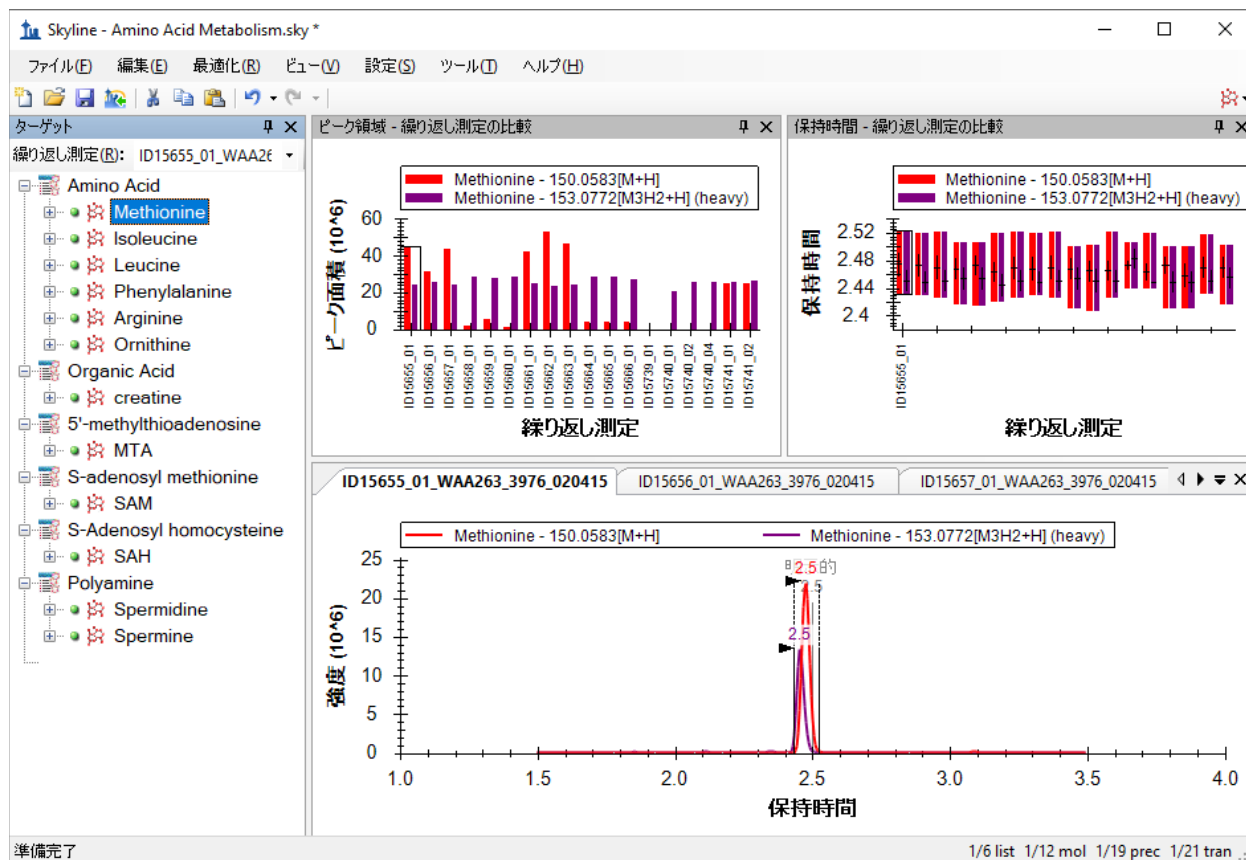
当該ファイルは瞬時にインポートされ、Skyline ウィンドウは以下ようになります。



Skyline 概要グラフを利用して個別のターゲットを表示するには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで、[ピーク面積]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします。
- [ビュー]メニューで、[保持時間]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします。
- これらのビューをクリック&ドラッグして、クロマトグラムグラフの上にドックします。
- [ターゲット]ビュー内の最初のターゲット「Methionine」を選択します。

これで Skyline ウィンドウは以下のようになります。



まとめ

本チュートリアルでは、Skyline ドキュメントを、ターゲット分子のプリカーサーイオンの化学式および付加物、さらにプロダクトイオンの m/z 値で指定して作成する方法を学びました。メタボロミクス研究者が取得した繰り返し測定データセットをインポートし、もともとはターゲットプロテオミクス用に開発された Skyline の既存の機能の多くが、非プロテオミクス分子データにも適用できることを理解しました。

参考文献

1. Tang, X. *et al.* Comprehensive Profiling of Amino Acid Response Uncovers Unique Methionine-Deprived Response Dependent on Intact Creatine Biosynthesis. *PLoS Genet* **11**, e1005158 (2015).