

Skyline によるデータ非依存 Proteomics 解析

データ非依存性解析 (Data-independent acquisition, DIA) は、網羅的ターゲットプロテオミクス実験を行うための新技術です。これまでのターゲットプロテオミクスでは選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) や並列反応モニタリング (parallel reaction monitoring, PRM) が主流でした。しかしこれらのターゲットプロテオミクスは、スケジュールなし (保持時間情報なし) の場合で数ペプチド程度。スケジュールありの場合でも質量分析実行あたり十から百程度のペプチドしか解析することはできませんでした。しかし、新技術である DIA を用いることで SRM と比較して感度、選択性および再現性を大きく損なうことなく 1000 以上 (Proteome レベル) のペプチドを解析、測定することが可能となります。DIA は測定するペプチドを事前に指定、スケジュール化する必要がないだけでなく、ペプチドのプリカーサーが広範囲の m/z の中から選択可能であり、またそこからプロダクトイオンクロマトグラムを、DIA 実行後に容易に抽出できるという利点があります。

DIA データからクロマトグラム抽出の Skyline サポートは 2010 年 10 月から始まっており現バージョンは、DIA データ分析の中でも人気の高い戦略およびワークフローをサポートしています。また Skyline は、AB SCIEX、Agilent、Bruker、Waters の 4 社の Q-TOF 装置、および Thermo 社の Q-Orbitrap 装置を含む、すべての DIA 対応装置をサポートしています。

DIA ワークフローとしてのやり方はまず特定の装置およびクロマトグラフィー設定のもと、データ依存性解析 (data-dependent acquisition, DDA) を任意数実行することです。これは、DIA を実行するのと同じ装置で、これらのショットガン測定を実行するのに役立ちます。また使用するフラグメンテーション方法 (CID など) とクロマトグラフィー設定が類似している場合も、異なる装置のプラットフォーム間でターゲット分析を転送することも可能です。これらの DDA 測定ではサンプルを分別化も可能です。さらに質の高いプロテオーム解析ができるように簡素化することも可能です。DDA では、ペプチドスペクトルサーチを利用して処理され、そこからペプチド ID、スペクトルおよび保持時間が得られます。その後、スペクトルライブラリおよび保持時間 (iRT) ライブラリの作成 (Skyline 内) に使用されるか、「検定ライブラリ」と呼ばれる (フラグメントイオンのサブセットの類似情報を持つ) 拡張トランジションリストの作成 (その他ツール内) に使用されます。これらのフラグメントイオンの相対強度ライブラリおよび保持時間 (iRT) のライブラリ (Retention time index) は、保持時間アライメントについて同一装置および標準ペプチドを利用する、その後の DIA 解析において使用可能です。

DDA 検索結果をこのライブラリ DIA 分析アプローチに適したライブラリに変換するメソッドは ([Skyline チュートリアル Webinar#2](#) の「予備知識ワークフロー」に記載した通り) 多数存在します。その中で DIA 分析を開始するのに最も単純明快な方法は、DDA を同一装置上での DIA に利用すること、つまり DDA 結果のスペクトルおよび保持時間を DIA 解析の際に予測値として使用することです。どちらのアプローチでも、フラグメントイオン相対強度および保持時間を用いた的確なライブラリ (iRT) の作成が可能です。これはクロマトグラムライブラリ (詳細は [Panorama クロマトグラムライブラリチュートリアル](#) で説明) と呼ばれており、実際に DIA ランを使用して今後の DIA をも予測しています。

このチュートリアルではシンプルな DDA/DIA アプローチを用いて Skyline での DIA 実行の設定、インポート、および処理の方法を学習します。(チュートリアルにはより高度なメソッドのポイントも含まれます)

はじめに

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/DIA.zip>

ファイルが非常に大きい (ダウンロード時 4.5 GB、および非圧縮で 6.0 GB) ののでご注意ください。DIA にはサイズの大きいファイルが必要で、SRM 実行のファイルと比べておよそ 100~200 倍ほどの大きさになります。ダウンロードが長くかかり過ぎる場合、またはディスク空き容量が十分でない場合は、代替としてより小サイズバージョン (ダウンロード時 73 MB、非圧縮で 113 MB) のチュートリアルを以下のリンクよりダウンロードできます:

https://skyline.gs.washington.edu/tutorials/DIA_Small.zip

小サイズバージョンには質量分析 raw データファイルが含まれておりませんので、一部のチュートリアル内の手順を、スキップする必要があります (後述のテキストに記載)。ZIP ファイルのサイズにかかわらずファイルを以下の手順でコンピュータ上のフォルダへと解凍します:

C:\Users\damodei\Documents

これにより新しいフォルダが作成されます:

C:\Users\damodei\Documents\DIA

チュートリアルに必要なファイルが含まれています。フォルダの中のファイル「DIABlank.sky」を開きます。Windows Explorer 内で当該ファイルをダブルクリックす

るか、Skyline の実行中インスタンス内で [ファイル] メニューの [開く] メニュー (Ctrl-O) をクリックしてください。

DIA の Isolation スキーム設定

開いた Skyline ドキュメントはトランジションも、質量分析データも、特別設定もない、完全に空白なものです。Skyline での DIA データ分析の全プロセスを理解するため、DIA 分析に適した Skyline ドキュメントを初めから構築し、必要な設定、トランジション、スペクトルライブラリ、および保持時間情報の設定入力について学びます。

実際に DDA ワークフローをもとにした DIA で実験をするのであれば、プリカーサー m/z 範囲が当該ターゲットを含むようにするなど、まずはターゲットの一般事項に注目すべきです。まず DIA と DDA の両方の装置設定から始めるのが一般的です。DDA メソッドの利用はユーザー次第ですが、Skyline では「Isolation スキーム」(MS/MS の断片に対するプリカーサー単離ウィンドウのパターン) を設定することで、DIA メソッドのセットアップが可能になります。DIA データがすでに収集済みであっても、使用した Isolation スキームを設定し Skyline が DIA を処理できるようにする必要があります。チュートリアルで実験の Isolation スキームを設定するには、以下の手順が必要です:

- [設定] メニューで [トランジションの設定] をクリック。
- [フルスキャン] タブをクリック。
- [アクセッションメソッド] ドロップダウンリストで「DIA」を選択して DIA データをインポートできるように設定します。
- [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。
- [ピーク] フィールドに「3」と入力。

多くの場合のトリプシンペプチドは最初の 3 つの同位体ピークが最も高い強度です。ベース (最も強度の高い) 同位体ピークの割合を基にした強度閾値が使用可能ですが、これらの設定はトリプシンペプチドにとっての合理的なデフォルトです。

- [プリカーサー質量分析] および [プロダクト質量分析] を「Orbitrap」に設定。
(このデータは、Orbitrap を使用して MS1 スキャンと MS2 スキャンの両方を実行した Q-Exactive 上で収集されました。)
- [MS1 フィルタ] の m/z 200 以下の [分解能] を「35000」に設定し、同様に [MS/MS フィルタ] の m/z 200 以下の [分解能] を「17500」に設定。

[トランジションの設定] フォームは次のようになります:

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
プリカーサー質量分析(P): Orbitrap

ピーク(K): 3
分解能(Q): 35000
以下の値で(A): 200 m/z

同位体標識濃縮度(B): デフォルト

MS/MSフィルタ(S)

アクセッションメソッド(C): DIA
プロダクト質量分析(M): Orbitrap

単離スキーム(L):
分解能(Q): 17500
以下の値で(I): 200 m/z

保持時間のフィルタ

MS/MS IDから 5 分以内のスキャンのみを使用
 予測されるRTから 5 分以内のスキャンのみを使用
 一致するすべてのスキャンを含める

OK キャンセル

ここではフルスキャン時の装置パラメータが設定されています。DIA 実行時は装置が DIA Isolation スキームまたはプリカーサー m/z 範囲のパターンを周期的に変化させるため、その設定をまずは指定する必要があります。例えば、本チュートリアルデータセットにおいて Q Exactive 装置は、500~520 m/z から開始、次に 520~540 m/z 、最後は 880~900 m/z (または 500~900 m/z の 20 連続 20 m/z ウィンドウ) となります。このサイクルを繰り返されます。この Isolation スキームを Skyline 内で指定するため以下の操作を行います:

- [単離スキーム] ドロップダウンリストメニューで、<追加...>を選択。

[単離スキームを編集] フォームが以下のように表示されます:

名前(N):

結果データの単離ターゲットを使用(U)

単離幅(W): m/z

デコンボリューション(D):

非対称(A)

事前に指定した Isolation window(P)

| 開始 | 終了 |
|----|----|
| | |

計算(C)... グラフ(G)...

デコンボリューション(D):

マージン(N):

スキャン毎のウィンドウ数(W):

ターゲットを指定(T)

- [事前に指定した Isolation window] を選択。

これにより、Isolation ウィンドウを指定できるグリッドが有効化されます。グリッド内でウィンドウ境界を手動で入力可能ですが、このケースではウィンドウ境界のサイクルが非常に定格であるため（20 m/z 刻みで 500~900 m/z）、境界をより迅速に指定する方法があります：

- [計算] ボタンをクリックすると、[Isolation スキームを計算] フォームが表示されます。
- [m/z の開始] の欄に、「500」を入力。
- [m/z の終了] の欄に、「900」を入力。

- [ウィンドウ幅]の欄に、「20」を入力。
- [ウィンドウ位置の最適化]のチェックボックスをオンにします。

これで、通常ペプチドが現れない領域にウィンドウ領域が設定されます。Q1での Isolation が設定の限界値付近でも有効であるように思われる場合は、SWATHに関する論文で提案されているようなウィンドウ（両端に 0.5 m/z のマージンあり）重複の必要性は減ります。作業中の DIA データがすでに取得済みの場合はここで定義した Isolation スキームが、データ取得に使用された装置の設定を反映していることが重要です。

[Isolation スキームを計算] フォームは以下のようになります：

単離スキームを計算

m/zの開始(S): 500 m/zの終了(E): 900

ウィンドウ幅(W): 20 ウィンドウタイプ(W): 測定

ウィンドウ数(W): 20

デコンボリューション(D): なし マージン(M): なし

スキャン毎のウィンドウ数(D): マージン幅(G):

ウィンドウ位置の最適化(P) ターゲットを生成(I)

OK

キャンセル

- [OK] ボタンをクリック。

Skyline で、 m/z が 20 間隔で m/z 500~900 までをカバーするのに必要な、20 ウィンドウの境界が自動記入されます。[Isolation スキームを編集] フォームは以下のようになります：

単離スキームを編集

名前(N): OK キャンセル

結果データの単離ターゲットを使用(U)

単離幅(W): m/z デコンボリューション(D):

非対称(A)

事前に指定した Isolation window(P) 計算(C)... グラフ(G)...

| 開始 | 終了 |
|----------|----------|
| 500.4774 | 520.4865 |
| 520.4865 | 540.4956 |
| 540.4956 | 560.5047 |
| 560.5047 | 580.5138 |
| 580.5138 | 600.5229 |
| 600.5229 | 620.5319 |
| 620.5319 | 640.5410 |
| 640.5410 | 660.5501 |
| 660.5501 | 680.5592 |
| 680.5592 | 700.5683 |
| 700.5683 | 720.5774 |
| 720.5774 | 740.5865 |
| 740.5865 | 760.5956 |

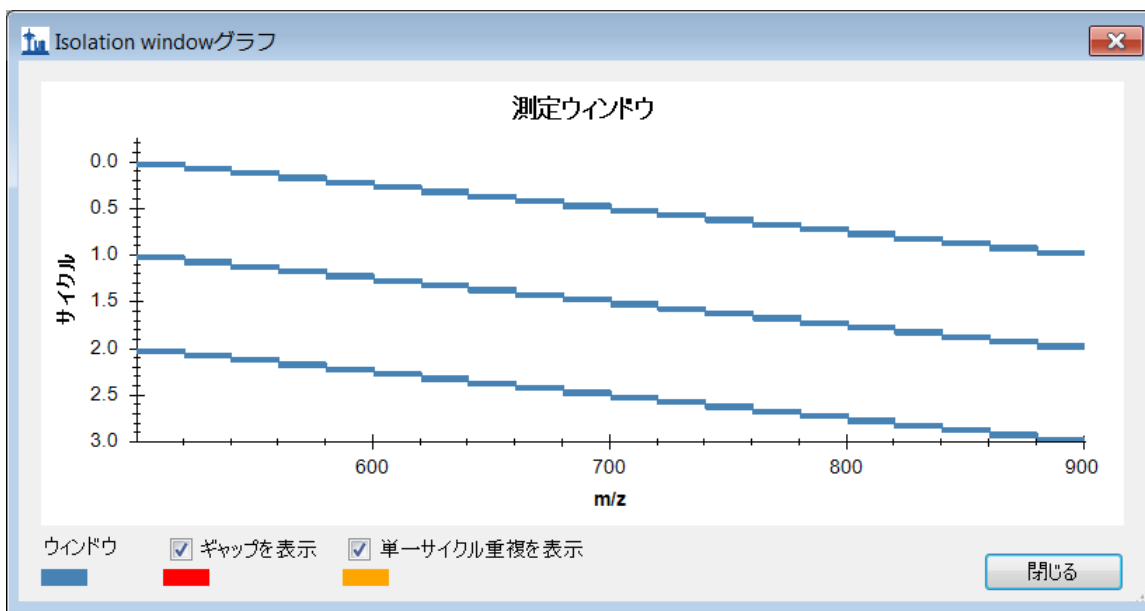
デコンボリューション(D): マージン(N):

スキャン毎のウィンドウ数(W): ターゲットを指定(T)

Skyline でプリカーサー m/z 範囲が経時的に可視化されるため、入力した内容をチェックできます:

- 先ほどクリックした [計算] ボタンの横にある [グラフ] ボタンをクリック。

時間に合せて進行する、Isolation ウィンドウサイクルがグラフで見られます。y 軸は 1 時間あたりのサイクル数、x 軸は m/z を表します:



- [閉じる] ボタンをクリック。
- この Isolation スキームの [名前] に、「500 to 900 by 20」を入力。
- [Isolation スキームを編集] フォームの [OK] ボタンをクリック。
- [トランジションの設定] フォームの [OK] ボタンをクリック。

注: DIA では装置による一連の特定のトランジション (SRM) またはプリカーサー (PRM) の測定は必要なく、ターゲットの項目は空のままでも DIA 実行設定に必要なすべての情報が揃ったこととなります。DIA Isolation スキームは、以下の装置へとエクスポート可能です:

- [ファイル] メニューで、[エクスポート] を選択して [Isolation リスト] をクリック。

[Isolation リストをエクスポート] フォームが表示され、Isolation リストエクスポートの形式を選択できるようになります。

- [装置タイプ] ドロップダウンリストで「**Thermo Q Exactive**」を選択。

フォームは以下のように見えます:

単離リストをエクスポート

装置タイプ(I):
Thermo Q Exactive

OK
キャンセル

シングルメソッド(S)
 タンパク質毎の1つのメソッド(Q)
 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(I):
標準

- [OK] ボタンをクリック。
- 表示された [保存] フォーム内で、本チュートリアル用に作成したフォルダへと移動します。
- [ファイル名] に、名前「DIA_tutorial_isolation_list.csv」と入力します。
- [保存] ボタンをクリック。

保存したファイルを開きくと以下のように表示されます:

| | A | B | C | D |
|----|----------|---|---|---|
| 1 | 510.4819 | | | |
| 2 | 530.491 | | | |
| 3 | 550.5001 | | | |
| 4 | 570.5092 | | | |
| 5 | 590.5183 | | | |
| 6 | 610.5274 | | | |
| 7 | 630.5365 | | | |
| 8 | 650.5456 | | | |
| 9 | 670.5547 | | | |
| 10 | 690.5638 | | | |
| 11 | 710.5729 | | | |
| 12 | 730.582 | | | |
| 13 | 750.5911 | | | |
| 14 | 770.6002 | | | |
| 15 | 790.6093 | | | |
| 16 | 810.6183 | | | |
| 17 | 830.6274 | | | |
| 18 | 850.6365 | | | |
| 19 | 870.6456 | | | |
| 20 | 890.6547 | | | |
| 21 | | | | |

この Isolation スキームでは、（本チュートリアル内のデータが取得された）Thermo Q Exactive 向けにフォーマットされていますが、もちろんその他のタイプの装置へも Skyline でエクスポートすることが可能です。

実際の DIA 解析にもこの Isolation リストファイルを利用してお使いの装置上で DIA を実行できます。また、装置ソフトウェア内で Isolation スキームを手動で指定することも可能です。データ取得のためのその他のメソッドパラメータ（例えば、MS/MS 単離幅や分解能）は、メソッドファイル内で手動で設定する必要があります。本チュートリアルにおいて DIA の結果は入力済みですが、後述の「質量分析データをインポートする」セクションまでは実際のインポートは行いません。

DDA からスペクトルライブラリを設定する

すべての DDA および DIA が、実際に本チュートリアルと同様に、すでに完了している場合はデータ分析ワークフローを開始することが可能です。初めに X! Tandem などの検索エンジンを利用して DDA からの MS/MS スペクトルの一致度を見ます（データベースサーチ）。Peptide Prophet や Trans Proteomic Pipeline（Trans Proteomic Pipeline, TPP）を用いた場合は.xtan.xml ファイル、または.pep.xml ファイルの Format になります。本チュートリアルで DIA.zip（DIASmall.zip ではない）をダウンロードした場合、DDA のために単一の.pep.xml ファイルと、元の raw DDA データファイルの.mzXML ファイルコンバージョン（804 MB）が得られます。関連する DIA を分析するために必要な最初の手順は、検索結果を Skyline へとインポートし、結果取得時の MS/MS スペクトルおよび保持時間情報を含むスペクトルライブラリを作成することです。DDA 検索結果をインポートするには以下の操作を行います：

- [設定] メニューで [ペプチド設定] をクリック。
- [ペプチド設定] の [ライブラリ] タブをクリック。
- [構築] ボタンをクリックしてスペクトルライブラリを構築。

[ライブラリを構築] フォームは以下のように表示されます：

ライブラリを構築

名前(N):
|

出力パス(O):
| 参照(B)...

動作(A):
作成 冗長ライブラリを保持(K)

カットオフスコア(C):
0.95

研究室管轄者 (proteome.gs.washington.edu など) (U):
|

ライブラリID(I):
|

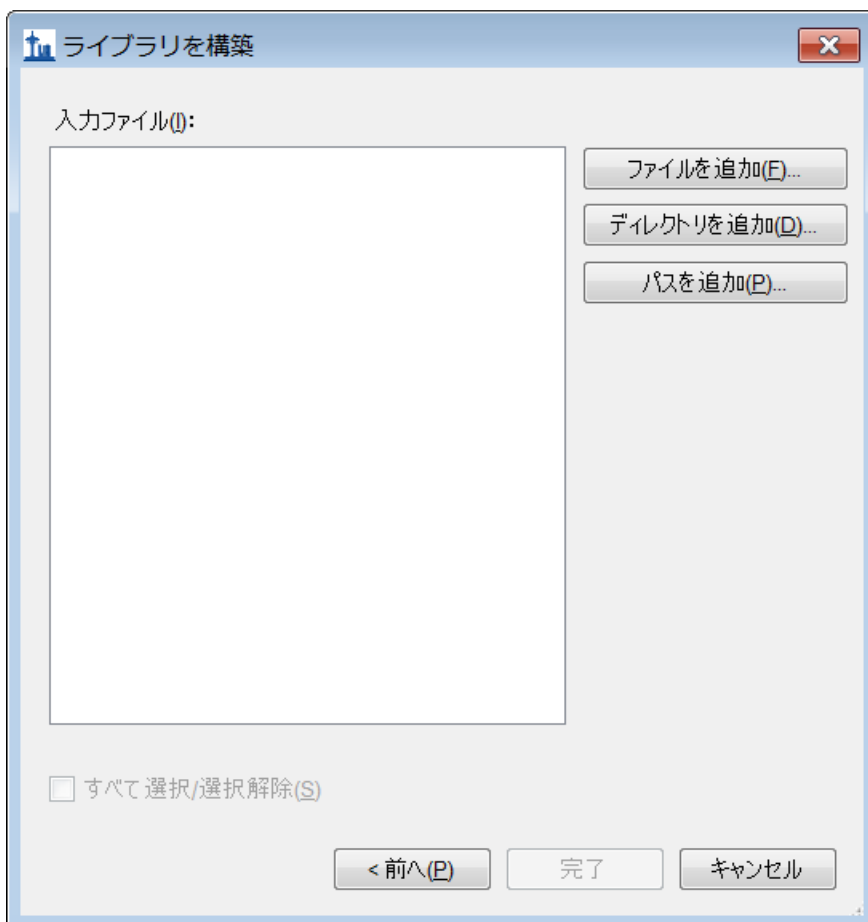
< 前へ(B) 次へ(N) > キャンセル

- [名前] に、作成するライブラリの名前「DIA_tutorial_library」を入力。
- [研究室の管轄者] フィールドに、「proteome.gs.washington.edu」と入力。
- [参照] をクリックします。
- 「DIA_tutorial_library.blib」ファイルが、チュートリアルファイルを解凍したディレクトリ内にあることを確認してください。
- [保存] ボタンをクリック。
- その他のフィールドが上記通りであることを確認してください（[カットオフスコア] が 0.95 であり、[冗長ライブラリを保持] ボックスのチェックがオフであること）。

このデータセットでは、[カットオフスコア] フィールドが「0.95」に設定されています。DDA データが（ペプチドの MS スペクトルが SEQUEST に一致した後に）TPP と共に処理され、ペプチドスペクトルの PeptideProphet スコアが 0.95 以上のスコアのもものが選択されることとなります。q 値または期待スコア（0 が最良、1 が最悪）を使用するその他のスペクトル一致パイプラインについては、カットオフスコアは 1 - スコアを使用します。つまり、0.95 は ≤ 0.05 を意味します。再利用可能なライブラリについては 0.99（すなわち ≤ 0.01 または q 値の不正発見率 1%）といったより厳しいカットオフを使用するのが推奨されます。冗長ライブラリは、今後さらに多くのスペクトルサーチの結果をライブラリへと追加する場合、またはライブラリに含まれているクロマトグラムデータを開いてペプチドの MS スペクトル一致度を確認するために MS スペクトルを参照できるようにしたい場合に必要です。

- [次へ] ボタンをクリックします。

[ライブラリを構築] ウィザードは以下のように次ページに進みます：



- [ファイルを追加] ボタンをクリックします。
- 表示される [入力ファイルを追加] フォームで、チュートリアルがあるディレクトリから以下のファイルを選択します：
 - interact-20130311_DDA_Pit01.pep.xml

このファイルには、単一 DDA からのペプチドスペクトル一致結果が含まれています。実際の実験の場合は、質量分析装置上で DDA 取得を実際に行い、その後、検索エンジンを通じて出力ファイルを実行して複数のファイルを作成することになります（通常、TPP 作成の pepXML のために 1 つ）。チュートリアルではこれらのファイルがすでに用意されています。注: 元の DDA 実行データファイル（mzXML へ変換）、interact-20130311_DDA_Pit01.mzXML も、同一フォルダ内に存在しています。このファイルはクロマトグラム抽出のためにインポートする必要はありませんが、ライブラリ Builder が当該ライブラリの MS/MS スペクトルを検索できるようにあらかじめ用意しておく必要があります（.pep.xml ファイル内には存在していません）。Mascot DAT ファイル、Proteome Discoverer MSF ファイル、および X! Tandem ネイティブ XML ファイルといった、その他のスペクトル一致パイプライン出力には、単一出力ファイルのすべての必要情報が含まれています。

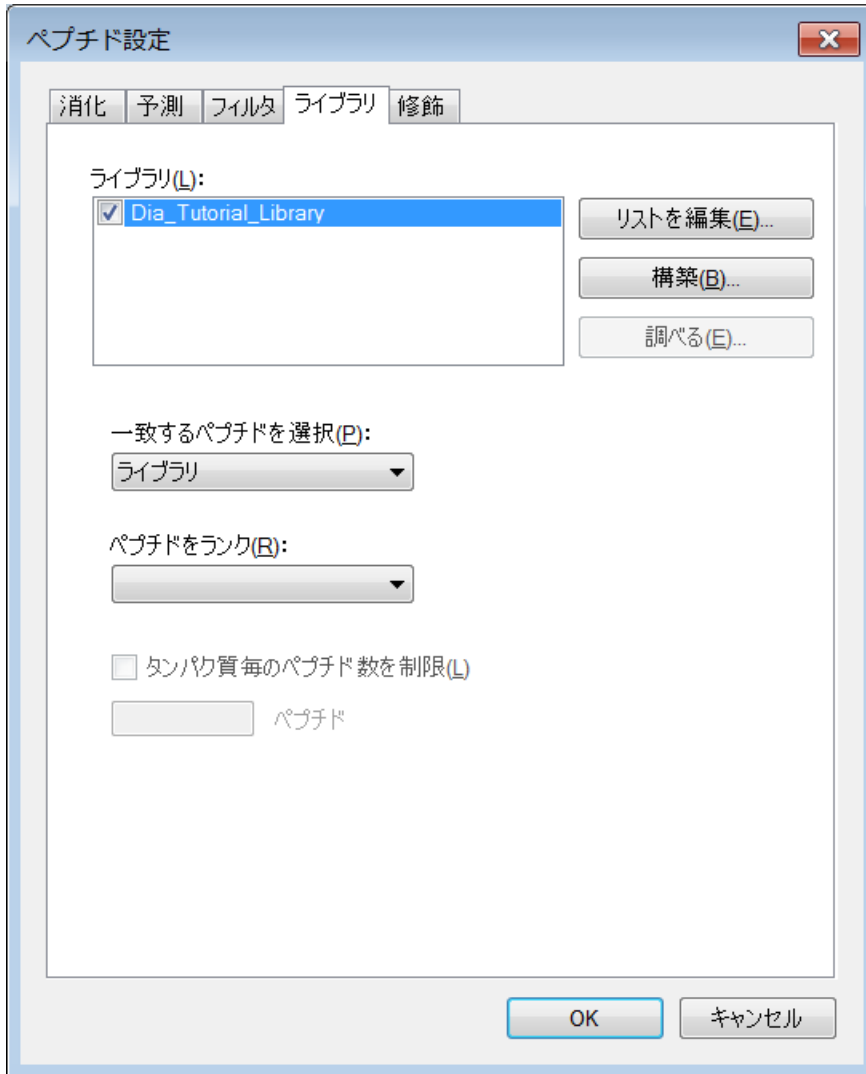
- [開く] をクリックすると、これらのファイルを構築中のライブラリに追加できます。
- [ライブラリを構築] フォーム内の [完了] をクリックすると、ライブラリを構築できます。

注: 小サイズバージョンのチュートリアルをダウンロードした場合、元の DDA .mzXML ファイルが小サイズバージョンには含まれていないため、エラーメッセージが出ます。小サイズバージョンをダウンロードした場合はここで、無事に読み込まれたスペクトルライブラリを含む Skyline ドキュメント「DIASetup.sky」を開いて、次のセクションに進んでください。

フルバージョンをダウンロードした場合、[ペプチド設定] フォーム内で、ライブラリリストに構築中の [ライブラリ] が表示されます。

- 「DIA_tutorial_library」の左側にあるチェックボックスをオンにして、DIA データセットの分析で利用が可能になるようにします。

[ペプチド設定] フォームは以下のように見えます:



- [一致するペプチドを選択] ドロップダウンリストで、「ライブラリ」が選択されていることを確認します。
- [OK] ボタンをクリックして、新しい設定およびライブラリを確認します。

DDA からの MS/MS スペクトルと保持時間が一致したすべてのペプチドはこれで、Skyline ドキュメント ([ビュー] → [スペクトルライブラリ] でレビュー可能) に含めることができるようになりました。このチュートリアルの後半で、Skyline、DIA データから抽出できるフラグメントイオンを選択する際あるいは測定済みのフラグメントイオンの相対量および MS/MS スペクトル保持時間を使用して得られたクロマトグラムピークをデータベースマッチさせる際にこの情報を利用します。

クロマトグラム抽出のための保持時間範囲指定

DIA データをインポートする前に、Skyline で、各クロマトグラムから抽出すべき保持時間 (retention time, RT) の範囲を指定しなければなりません。スケジュール SRM では設定される LC 溶出時間前後の時間枠ですべてのトランジションが記録されます。DIA はこれとは異なり、プリカーサーのすべてのフラグメントをカバーする DIA MS/MS スペクトルでは実行全体が記録されます。したがって、各ターゲットトランジションの勾配全体について、クロマトグラムの抽出が可能です。しかし実際にはクロマトグラムの全抽出では、多くの共雑物によって非常に紛らわしいクロマトグラムとなることが多く、クロマトグラム上で Target のピーク特定が困難となります。クロマトグラムの仕様によりファイルも非常に大きくなり、データのインポート時間も長くなるようになります。Skyline でのクロマト抽出は可能ですが、RT 予測に基づくクロマトグラム範囲に制限することが推奨されます。SRM クロマトグラムでは時間範囲は装置のメソッドで設定されるスケジュールリングで制限されますが、DIA クロマトグラムでは時間範囲をクロマトグラム抽出で制限するのが最適となります。

RT 範囲を制限するには各ペプチドの RT 予測が必用であり、RT の予測には何種類かの方法があります。本チュートリアルでは、最もシンプルで最もアクセス可能なメソッドに焦点を当てます。同メソッドでは、DDA で検出された raw ペプチド ID 時間を使用します (先に構築したスペクトルライブラリ内に存在)。ここでは、DDA と DIA との間クロマトグラフィー変更の修正 (例えば、均一シフト) は上手くいきませんが、正確性が著しく損なわれることはありません。保持時間予測も Skyline 内で、ペプチドシーケンス (SSRCalc) に基づくアルゴリズムの使用、もしくは正規化され保存されている RT 測定値に基づくアプローチを使用することで予測可能です (用語「iRT」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)。

スペクトルライブラリ内のペプチド ID 時間に基づく RT 範囲を制限するには、以下の手順を行います:

- [設定] メニューで [トランジションの設定] をクリック。
- [フルスキャン] タブをクリック。
- [フルスキャン] タブの下部付近にある [保持時間のフィルタ] で、[MS/MS ID から 5 分以内のスキャンのみを使用] を選択。

保存時間のフィルタは以下ようになります:

保持時間のフィルタ

MS/MS IDから 5 分以内のスキャンのみを使用

予測されるRTから 5 分以内のスキャンのみを使用

一致するすべてのスキャンを含める

これで、ライブラリで見つかったペプチドスペクトルの5分以内で取得されたDIAスペクトルのみを抽出することが、Skyline内で指定されます。単一のペプチドスペクトル一致の抽出ウィンドウ合計は10分となります。例えば任意ペプチドにIDが複数ある場合、Skylineは、最小ID時間マイナス5分から最大ID時間プラス5分までの範囲内のスペクトルから抽出を行います。（注:後に確認する通り、先に構築済みの非冗長ライブラリ内でも、すべてのID保持時間が保管されます。）2番目のオプション、[予測RTから[5]分以内のスキャンのみを使用]では、RT予測（例えば、SSRCalcまたはiRTカルキュレータ）を使用して抽出時間範囲を判定します。本チュートリアルではRT予測は使用しませんが、複数のその他のチュートリアルおよび[検定ライブラリをインポートする](#)ヒント（[ヒント > その他の定量ツールで作業する](#)の下のSkylineウェブページ）で説明されています。

オプションで[一致するすべてのスキャンを含める]を利用するとSkylineは、クロマト全体（装置タブで指定されている最小時間と最大時間の間）を抽出できるようになります。これは特殊例となるためこのチュートリアルでは使用しません。

- [トランジションの設定] フォームの [OK] ボタンをクリックします。

ここではSkylineドキュメント内で何も変更されませんが、本チュートリアルで後にDIAデータをインポートすると、そのクロマトグラム時間範囲が制限されます。

FASTA ファイルからのターゲットトランジションのインポート

この時点ではまだDIA分析でどのタンパク質、ペプチド、またはトランジションがターゲットとなるかが定義されていません。DIAについては、MSデータが記録されインポートされる直前まで、これを行う必要はありません。現在のSkylineドキュメントは（テンプレートとして）本チュートリアルのスペクトルライブラリの構築に使用したDDAに関連するDIA.rawファイルから目的のトランジションセットを抽出するのに何度でも利用できます。

何百何千ものペプチドをDIAで測定可能ですが、本チュートリアルでは、当該データを生成した実験設計でターゲットとされていた、6つのタンパク質のみを見ます。チュートリアルフォルダには、これらのタンパク質を指定するFASTAファイルが含まれています。インポートする前にまず、これらのタンパク質内にどのペプチドとトランジションを含めるべきかを設定します:

- [設定] メニューで [ペプチド設定] をクリック。
- [フィルタ] タブをクリック。
- [すべての一致ペプチドを自動選択] チェックボックスをオンにします。

これにより、FASTA ファイルがインポートされると、適格なペプチドがあるターゲットリストが自動的に入力されます。

構築したライブラリ内のスペクトルで一致したペプチドの方が優先されるため、[フィルタ] タブ内のその他の設定はそのままにしておいて構いません。フィルタ設定を適用したい場合は、[ペプチド一致を選択] オプションを「ライブラリ」以外の選択肢へと変更してください。「ライブラリおよびフィルタ」を使用すると、ライブラリ内に存在し、かつ [フィルタ] タブ基準を満たすペプチドのみが許可されます。

システインのアミドメチル化などの修飾がペプチド内にある場合これを修飾として Skyline で指定する必要があります:

- [修飾] タブをクリック。
- [構造修飾] リスト内で修飾「Carbamidomethyl (C)」がチェックされていることを確認します。

そうでなかった場合:

- [構造修飾] の [リストを編集] ボタンをクリック。
- [構造修飾を編集] の [追加] ボタンをクリック。
- [名前] フィールドで、右側のドロップダウン矢印をクリックして、Unimod 修飾のリストを表示します。
- リスト内で「Carbamidomethyl (C)」を選択。

[構造修飾を編集] は以下ようになります:

構造修飾を編集

名前(N):
Carbamidomethyl (C)

アミノ酸(A): C 末端(I): 変数

化学式:
H3C2NO

モノアイソトピック質量(M): 57.021464 平均質量(V): 57.05162

ロス(L) >>

- [構造修飾を編集] の [OK] ボタンをクリックします。
- [構造修飾] リストで Carbamidomethyl (C) チェック ボックスをオンにします。

[ペプチド設定] フォームはこのように見えます:

ペプチド設定

消化 予測 フィルタ ライブラリ 修飾

構造修飾(S):

Carbamidomethyl (C) リストを編集(E)...

最大変数修飾(M): 3 最大ニュートラルロス数(N): 1

同位体標識タイプ(I): heavy

同位体修飾(I): リストを編集(D)...

内部標準タイプ(N): light

OK キャンセル

- [OK] ボタンをクリック。

最後に Skyline で、各ペプチドのトランジションを指定します。ターゲットにされているタンパク質は非常に少数であるため、かなり広い範囲のトランジションを指定することから始めて、その後絞り込んでいって構いません:

- [設定] メニューで [トランジションの設定] をクリック。
- [フィルタ] タブをクリック。
- [プリカーサー電荷] フィールドに「1, 2, 3, 4」と入力。
- [イオン (プロダクトイオン) 電荷] フィールドに「1, 2」と入力。
- [プロダクトイオンタイプ] フィールドに「y, b, p」と入力します。(pにより、MS1 スペクトルから抽出されたプリカーサーイオンが追加されます。)

- [開始点] ドロップダウンリストで、「イオン3」を選択。
- [終了点] ドロップダウンリストで、「最終イオン-1」を選択。
- [一致するすべてトランジションを自動選択] をチェック。
- [DIA ウィンドウを用いて特定のプリカーサーを除く。

[トランジションの設定] フォームは次のようになります:

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

プリカーサー電荷(P): 1, 2, 3, 4 イオン電荷(I): 1, 2 イオンタイプ(T): y, b, p

プロダクトイオン

開始点(E): イオン3 終了点(O): 最後のイオン-1

特別イオン(S):

- N-terminal to Proline
- C-terminal to Glu or Asp
- iTRAQ-114
- iTRAQ-115
- iTRAQ-116
- iTRAQ-117
- TMT-126
- TMT-127L

リストを編集(E)...

排除に対しDIAプリカーサーウィンドウを使用(U)

一致するすべてトランジションを自動選択(A)

OK キャンセル

これらの設定により Skyline は、MS1 スキャンおよび MS/MS スキャンを含む、さまざまなトランジションを含めるようになります。[除外に対し DIA プリカーサーウィンドウを使用] を選択すると Skyline は、DIA ウィンドウのトランジションを含めなくなります (例えば、プリカーサーイオンが 500~520 m/z の場合は 513 m/z のプロダクトイオ

ンが検出されなくなります)。この設定が望ましくない場合もあります。特にフラグメント化されなかったプリカーサーイオンは、元の設定範囲を超えて MS/MS スペクトル内にノイズや干渉を引き起こす可能性があり、この範囲内のフラグメントイオンの定量に対する信頼度が損なわれるからです。

- [OK] ボタンをクリックします。

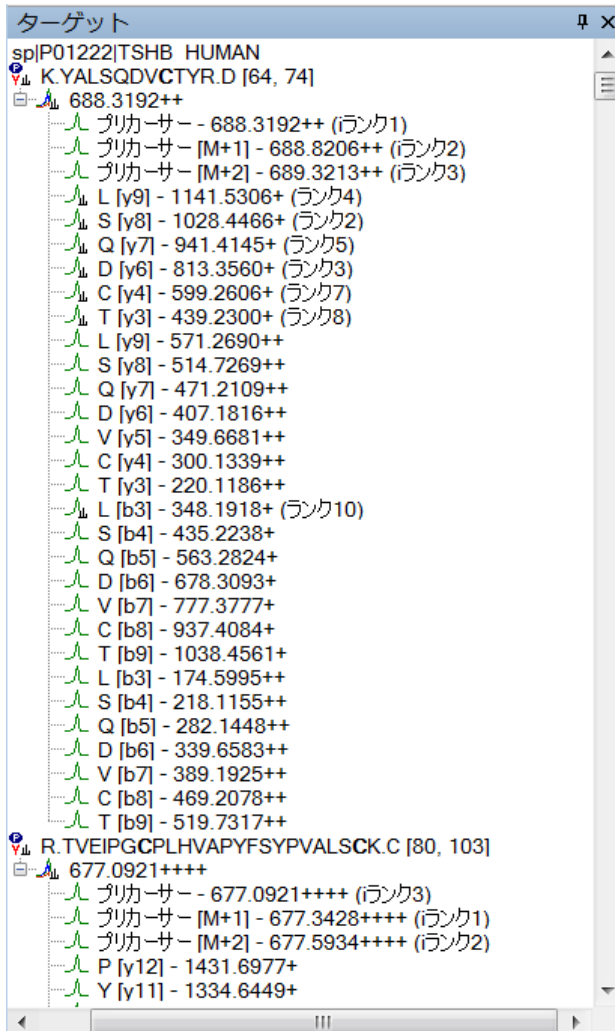
これで FASTA ファイルをインポートする準備ができます:

- [ファイル] メニューで、[インポート] を選択して [FASTA] をクリック。
- [FASTA をインポート] フォームで、作業してきたチュートリアルフォルダへと移動して、ファイル名「pituitary_database.fasta」をダブルクリック。

FASTA ファイル内の 6 つのタンパク質が属している 26 のペプチドのリストが、[ターゲット] に表示されるはずですが、各タンパク質について、スペクトルライブラリ内で表示されているペプチドのみが、このリストに含まれます。

- [編集] メニューで [すべて展開] を選択して、[プリカーサー] をクリック。

これにより、Skyline に含まれているすべてのトランジションが表示されます。各ペプチドには、m/z 500~900 でプリカーサーになりえるイオンがすべて含まれ、各プリカーサーには、b トランジションおよび y トランジション、さらには 3 種のプリカーサーイオン (M、M+1 および M+2) が全部含まれます。また各プリカーサーには、対応するライブラリスペクトルがあります。[ターゲット] ビューは以下のように見えます:



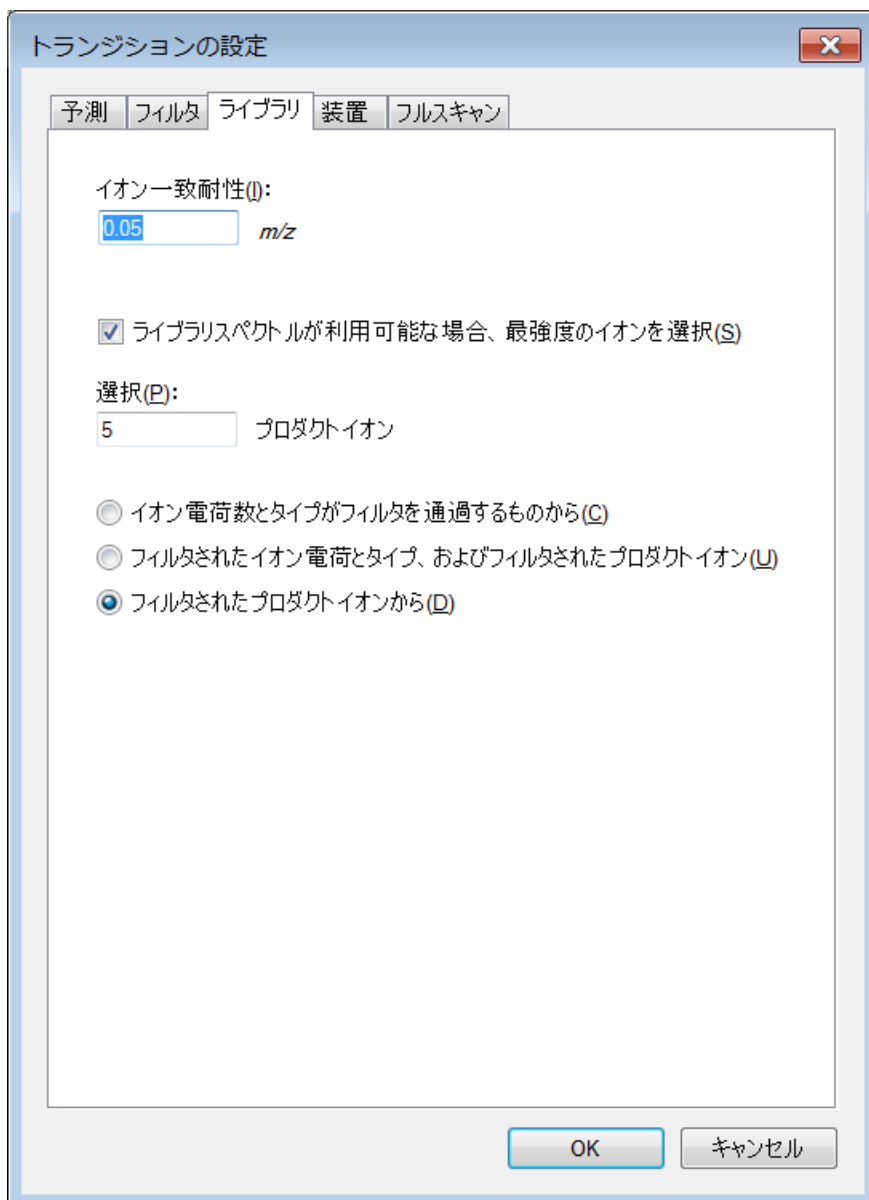
DIA では装置自体が、500~900 m/z の範囲のあらゆる可能なプリカーサーとプロダクトの組み合わせ（少なくとも測定された MS/MS スペクトル範囲内のもの）をカバーするため、これらのプロダクトイオンをすべて抽出することが可能です。しかし実際には、可能なプロダクトイオンすべてを抽出することは不必要であることが多いだけでなくノイズも多くターゲットペプチドのピーク強度が弱いクロマトグラムまで追加され、ペプチドの検知自体が妨げられる可能性があります。多くのケースにおいて、最も高い強度を持つと思われるトランジションのみを選択することが推奨されます。これは先に DDA 検索結果から構築したスペクトルライブラリを使用して行うことが可能です：

- [設定] メニューで [トランジションの設定] をクリック。
- [ライブラリ] タブをクリック。
- [ライブラリスペクトルが利用可能な場合、最強度のイオンを選択] をチェック。
- [選択] フィールドに「5」と入力して、各プリカーサーの5つのプロダクトイオンを選択するように設定します。
- [フィルタされたプロダクトイオンから] を選択します。

これはライブラリから選択した5つのプロダクトイオンが、[トランジションの設定]の[フィルタ]タブで定義されたフィルタ設定も、満たさなければならないことを意味します。

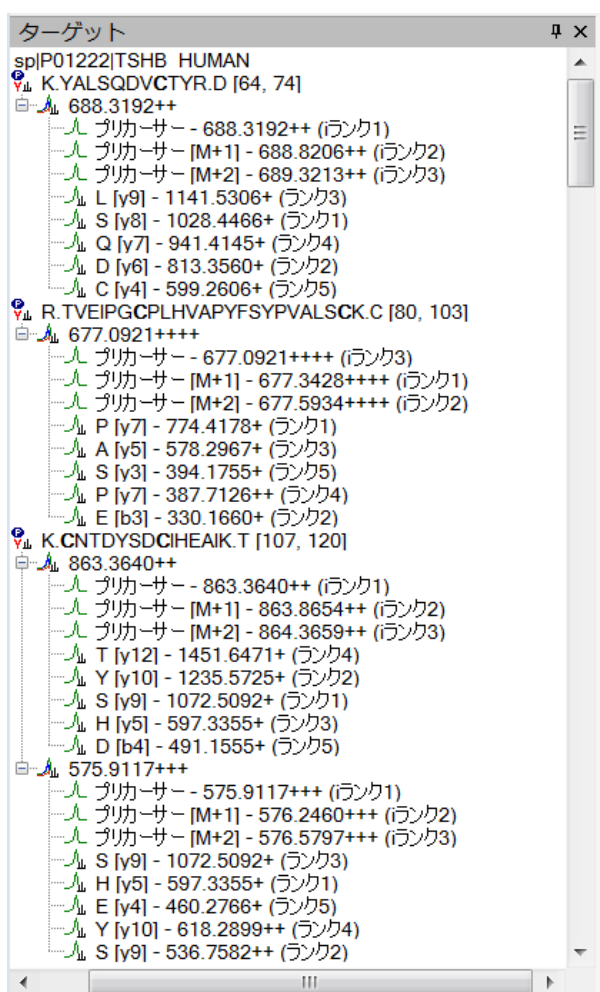
- また[イオン一致耐性]を0.05、または1000 m/z で50 ppmに設定します。DDAデータが高い質量精度で計測されるため設定として十分な値です。

[ライブラリ]タブは次のようになります:



- [OK] ボタンをクリック。

もう一度 [ターゲット] に注目します。3つのプリカーサーイオンとそこから生じる5つの最良のプロダクトイオンのみが含まれています:



DIA で、ペプチド、プリカーサー、およびそのトランジションを Skyline へとインポートする方法は (FASTA ファイルからのインポートだけでなく)、多数存在します。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。その他ツールを利用してトランジションリストを作成した場合は [既存および定量的実験](#) チュートリアルを参照してください。その他の DIA ツールでも、「検定ライブラリ」と呼ばれる拡張されたトランジションリストフォーマットを作成可能です。検定ライブラリには、トランジションのフラグメントイオンの相対強度、および保持時間予測情報を追加します。検定ライブラリは本チュートリアルでは使用しませんが、[検定ライブラリをインポートする](#) ヒントに詳細が説明されています。

大規模な DIA 測定では、デコイペプチドがあると詳細ピーク選択 (ペプチド検出) モデルに役立つ場合があります。これにより Skyline の自動ピーク選択機能が改善され、検知確率スコア (q 値) を計算できるようになります。デコイペプチドは、DIA ワーク

フローに必須というわけではなく、カスタムピークスコアメソッドの適用を選択する場合にのみ必要です。多くの場合 Skyline では、デフォルトのピーク選択が問題なく実行されるため、カスタムピーク スコアは必要ありません。また、カスタムピーク スコアを使用されている場合でさえも、デコイの代替は存在します（[詳細ピーク選択モデルチュートリアル](#)をご覧ください）。上記の理由で本チュートリアルでは、デコイの追加はしません。

データのインポートへと移る前に、ターゲットの選択を慎重に検討することが重要です。DIA データインポート後にターゲット変更を行うと、更新されたクロマトグラム抽出および自動ピーク選択についてはデータの再インポートが必要となります。

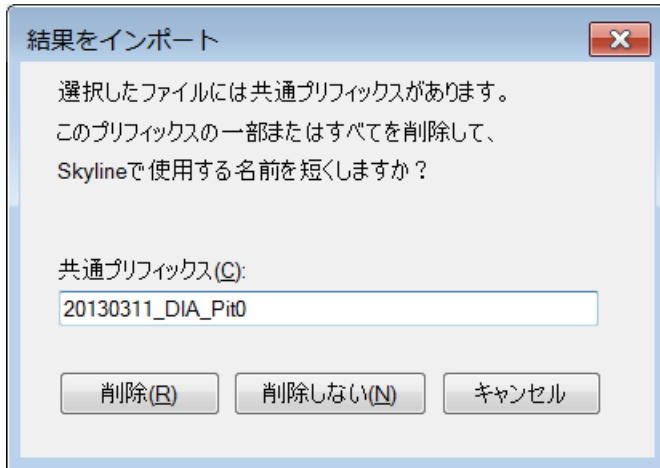
質量分析データのインポート

これで本チュートリアルのフルバージョンに含まれている DIA 質量分析ファイルを、実際にインポートする準備が整いました。ファイルのサイズが非常に大きいため（～5 GB）、フルバージョンのチュートリアルでのみ提供されています。小サイズバージョンをダウンロードしたい場合は、本セクションを飛ばして、完全にインポート済みの DIA 実行を含む Skyline ドキュメントファイル「DIAImported.sky」を開いてください。

フルバージョンのチュートリアルをダウンロードした場合は、DIA データをインポート可能です。DIA データのインポートは単純で、SRM データのインポートとまったく同じ手順となります：

- [ファイル] メニューで、[名前を付けて保存] をクリック。
- [ファイル名] フィールドで、名前を「DIATutorial.sky」に変更。
- [保存] ボタンをクリック。
- [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。
- [OK] ボタンをクリックして、[ファイル内の 1 回注入された繰り返し測定を追加]。
- シフトキーとマウスのクリックを利用して複数選択を行いながら、以下のファイルを選択します：
 - 20130311_DIA_Pit01.raw
 - 20130311_DIA_Pit02.raw
- [開く] ボタンをクリック。

Skyline により、ファイル名から共通プリフィックスを削除可能であると示唆するフォームが表示されます：



- テキスト「DIA_Pit0」を消去すると、共通プリフィックスが削除されるので、「20130311_」だけが残ります。
- [削除] ボタンをクリック。

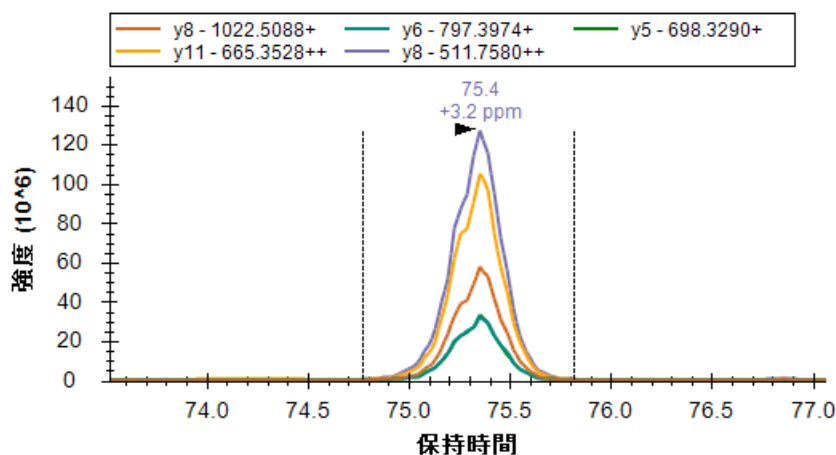
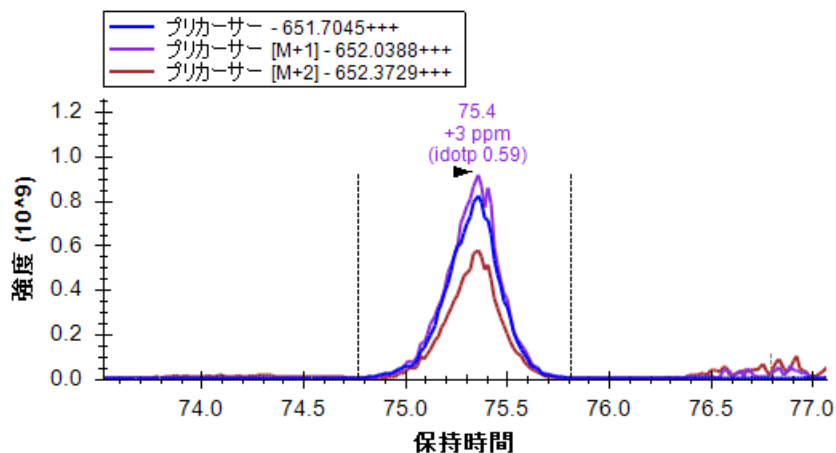
ここで [ターゲット] 内のすべてのプリカーサーおよびプロダクトイオンのクロマトグラムが、DIA データから抽出されます。この手順には数分かかります。読み込みが終了したら、ターゲットペプチドとデコイペプチドの両方のクロマトグラムが表示されます。

DIA 結果の検索

これで DIA 実行がインポートされたので、結果を閲覧できます：

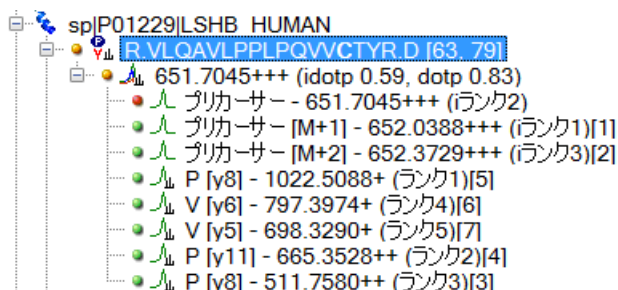
- ファイル DIA_Pit01 が、クロマトグラムで選択されていることを確認します。
- [編集] メニューで、[すべて折り畳む] を選択して [ペプチド] をクリック。
- [ターゲット] リストのペプチド R.VLQAVLPPLPQVVCTYR.D をクリック。（7番目のペプチド。）
- [ビュー] メニューで、[トランジション] を選択して [グラフを分割] をクリック。
- [ビュー] メニューで、[自動ズーム] を選択して [最良ピーク] (F11) をクリック。

クロマトグラムグラフは以下のように見えます：



プリカーサーを含むグラフが「idotp 0.59」と表示されていることに注目してください。これはプリカーサー同位体ピークの面積が予測同位体の分布とどれだけ相関しているかを示す測定値です。プリカーサーイオンは、DIA MS/MS 取得のサイクルの間に含まれていた、インターリーブした MS1 スキャンから得られます。ドット積 0.59 は、予測同位体分布として非常に低い値であり、MS/MS スキャンから得られるフラグメントイオン分布より変動幅を低くしておかなければいけないことを示唆しています。

[ターゲット] 内のペプチドを展開する場合、モノアイソトピックピークに赤い点が見られます。これは、ピーク面積にまったく寄与していないことを示します。



ピーク形状に良好に一致するかどうかに関わらず、積分境界間のすべての積分面積を含めるよう Skyline で設定するには、以下の操作を行います:

- [設定] メニューで、[すべて統合] をクリック。

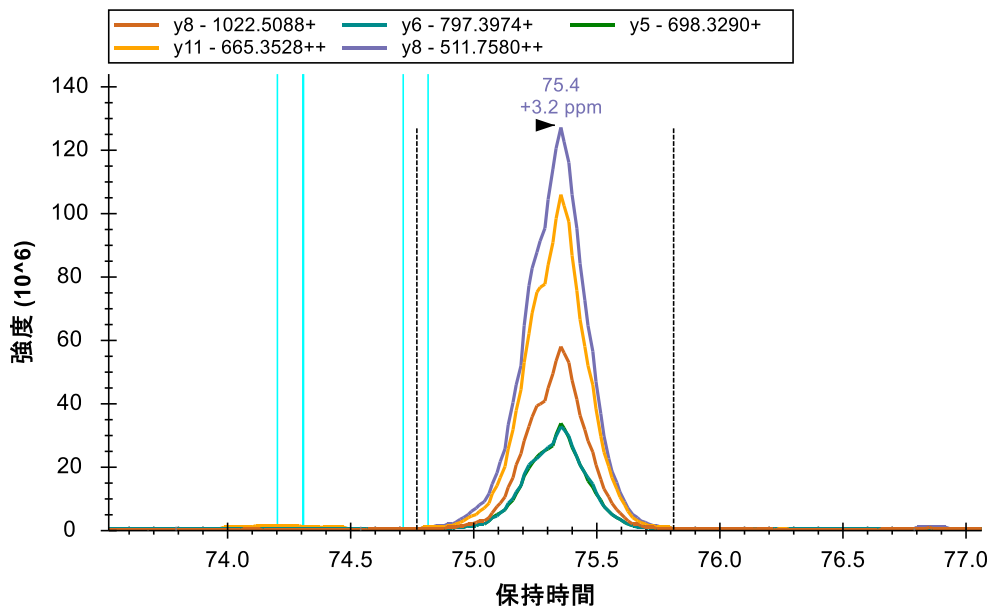
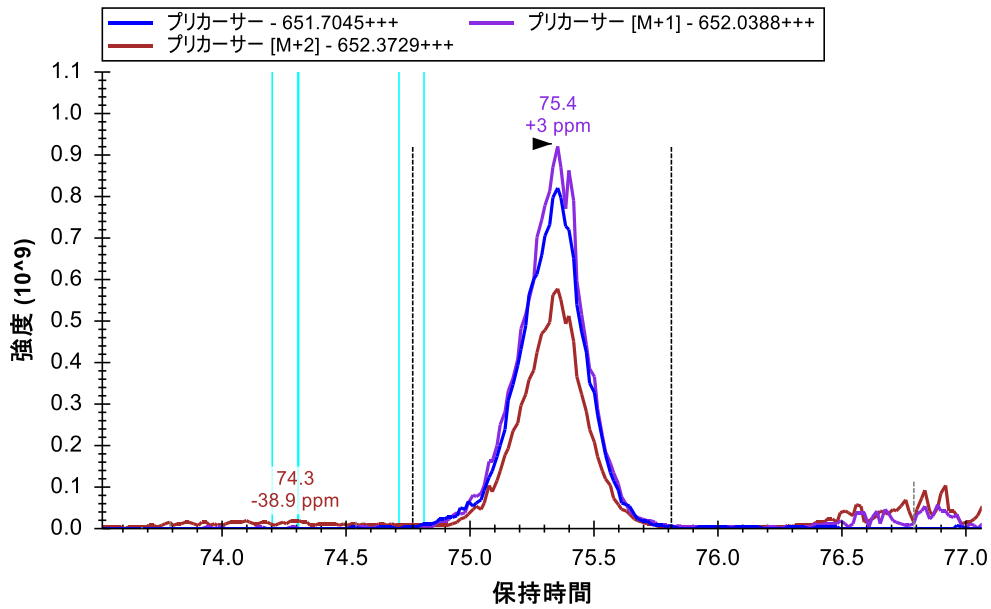
赤い点が緑に変わり、idotp 値が [ターゲット] 内で「idotp 0.99」に変わります。また、idotp 値がクロマトグラムビューから消えます。これで抽出されたクロマトグラム内で検知された全ピークグループが最良の分布と認識されました。

[ターゲット] ビュー内の idotp 値に続く「dotp 0.83」は、選択した 5 つのプロダクトイオンが一致ライブラリスペクトルで見つかった強度と、どれだけ良好に相関するかを示す測定値です。どちらの値もここでは比較的高く、このピークグループとターゲットペプチドとの間の関連を確認するのに役立っています。2 つの高いドット積、共溶出一致度とピーク形状、および約 3 ppm の質量誤差を組み合わせることで、該当ピークがターゲットペプチドであることがより高い精度で確認できます。

ここで保持時間を予測するのに使用したペプチド ID を表示するため、以下の操作を行います:

- クロマトグラムグラフで右クリックし、[ペプチド ID 時間] を選択し [その他の実行から] をクリック。

一連の縦の水色のラインが、以下のようにクロマトグラムウィンドウに表示されます:



水色のラインはスペクトルライブラリ作成に使用した DDA で取得した、このペプチドに一致する保持時間での MS/MS スペクトルです。それらが積分範囲の 1 分以内であることから、積分ピークにより関心対象のペプチドが測定されているという可能性は高くなります。（すべての一致した MS/MS スペクトルの保持時間を見るために、ライブラリは必ずしも必要ではないということに注意してください。すべての保持時間がライブラリに保存されますが、ペプチドプリカーサーあたり 1 つのスペクトルのみとなります。）

Skyline の自動ピーク選択機能はどのピークを選択するか決定時にはピーク面積ドット積および ID 保持時間を考慮に入れます。上記のケースでは明らかに正しいピークが選択されていることが確認できます。

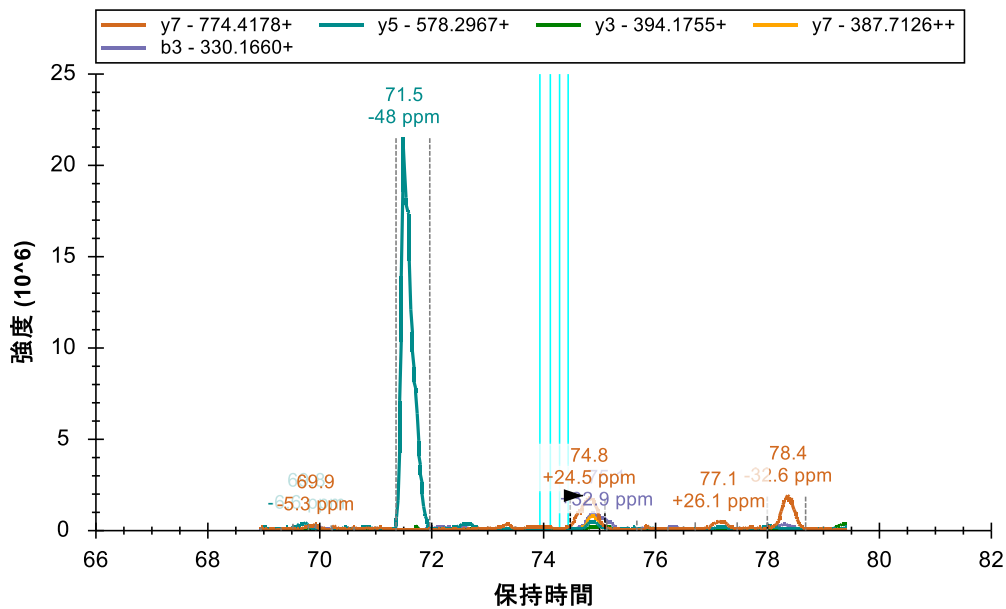
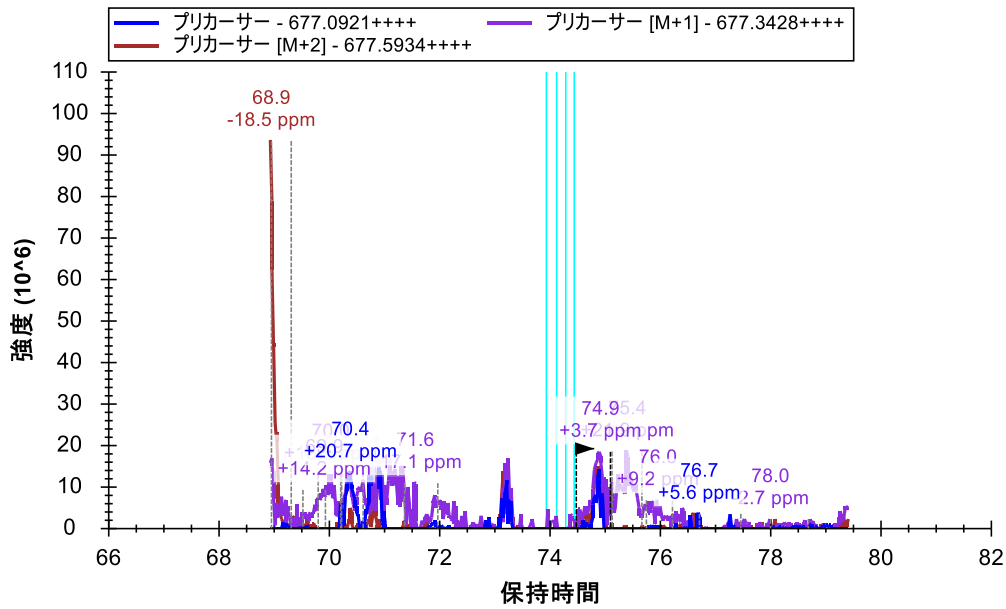
全範囲のクロマトグラム抽出を閲覧するには以下の操作を行います:

- [ビュー] メニューで、[自動ズーム] を選択して [なし] (Shift-F11) をクリック。

これにより、Skyline では DDA で ID 時間前後の +/-5 分のウィンドウにおけるクロマトグラムのみが抽出されていることが示されます。ID は 75 分近くかかるので Skyline では 70~80 分間抽出します。

DIA ではプリカーサーウィンドウが非常に幅広い (例えば、 m/z 10~25) 多くの干渉が起こり得ます。しかし Skyline 自動ピーク選択は、非常に多くの干渉がある場合でも、正しいピークを選択できることは可能です。これを見るには:

- [ターゲット] リスト内の 2 番目のペプチド
R.TVEIPGCPLHVAPYFSYPVALSCK.C をクリックします。



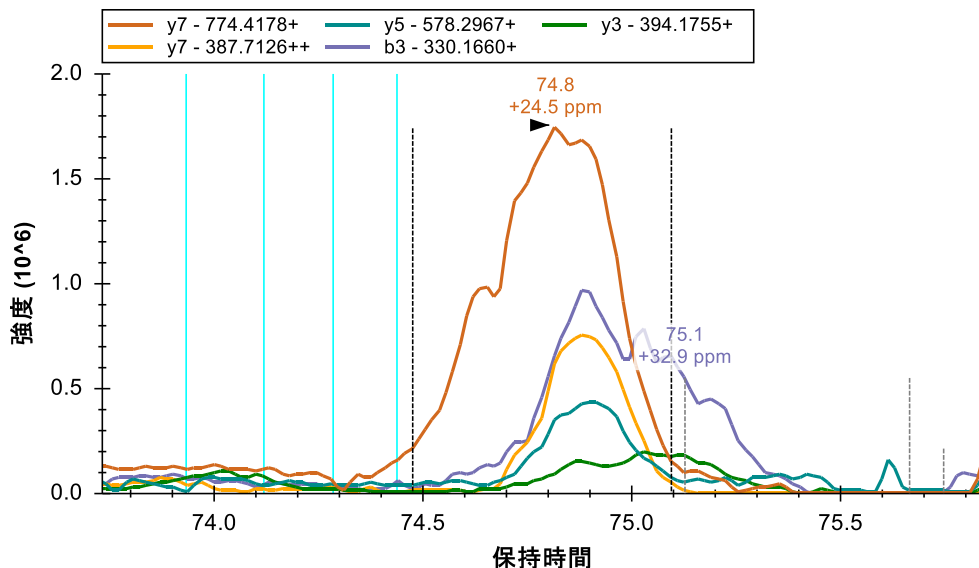
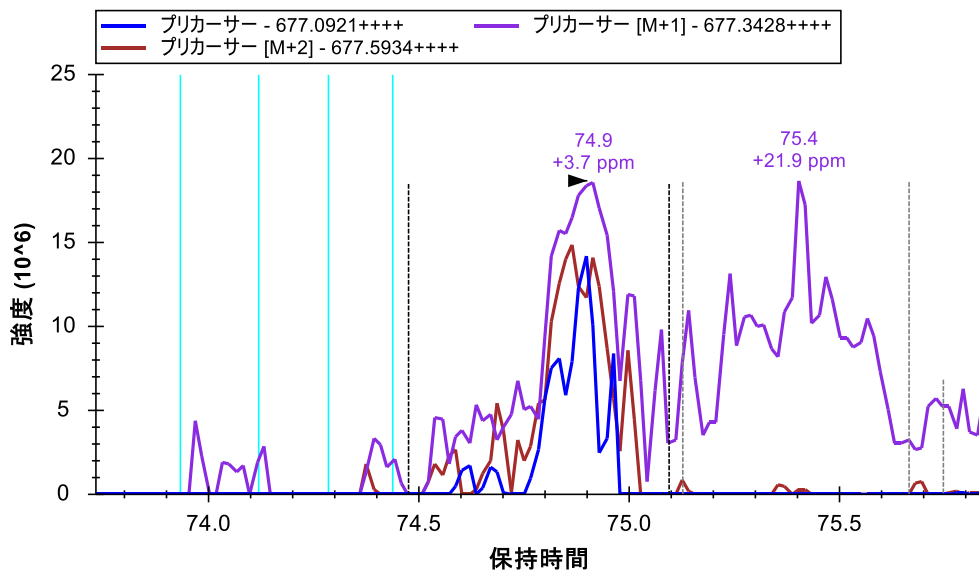
MS1 クロマトグラムで選択できるピークグループが複数あります。MS/MS クロマトグラムで、71.5分の1トランジションに巨大なピークがあり、75分の共溶出ピークの強度セットが非常に低く、予測RTに近づくとともに高いドット積を有します。Skylineでは、大きなピーク（おそらくは干渉）の有無に妨げられることなく、小さな共溶出ピークを選択することが可能です。

抽出されたクロマトグラムを理解する

プロダクトイオンピークについて+24.5 ppmの質量誤差が表示されることは、Orbitrap質量分析装置ではあまりないことです。何が問題を引き起こしているのか良く理解するため以下の操作を行います:

- [ビュー] メニューで、[自動ズーム] を選択して [最良ピーク] (F11) をクリック。

積分ピークにさらに近づいてみると、以下のように見えます:



R.VLQAVLPPLPQVVCTYR.D のピークほどの信頼度がありません。75分 RT 付近の対象プリカーサー付近の MS1 スキャンは明らかに通常とは異なる事象が起こっています

が、積分ピークにはわずかに 3.7 ppm の質量誤差しかなく、[ターゲット] ビューでペプチドを展開すると 0.91 idotp あることが確認できます。マウスカーソルをプリカーサーグラフ内の 74.5 分の積分境界の上に置いて、スプリッターカーソル (⊕) が見えるまでホバリングして、74.7 分前後 (メイン プリカーサーピークの左端付近) へと右側にドラッグすると、idotp 値が 0.96 に増加し質量誤差が 2.3 ppm に減少しているのが見られます。

注: [フルスキャン] ビューでの利用は完全なチュートリアルデータセットをダウンロードした場合にのみ機能します。そうでない場合は raw データ ファイルが見つからないというメッセージが表示されます。

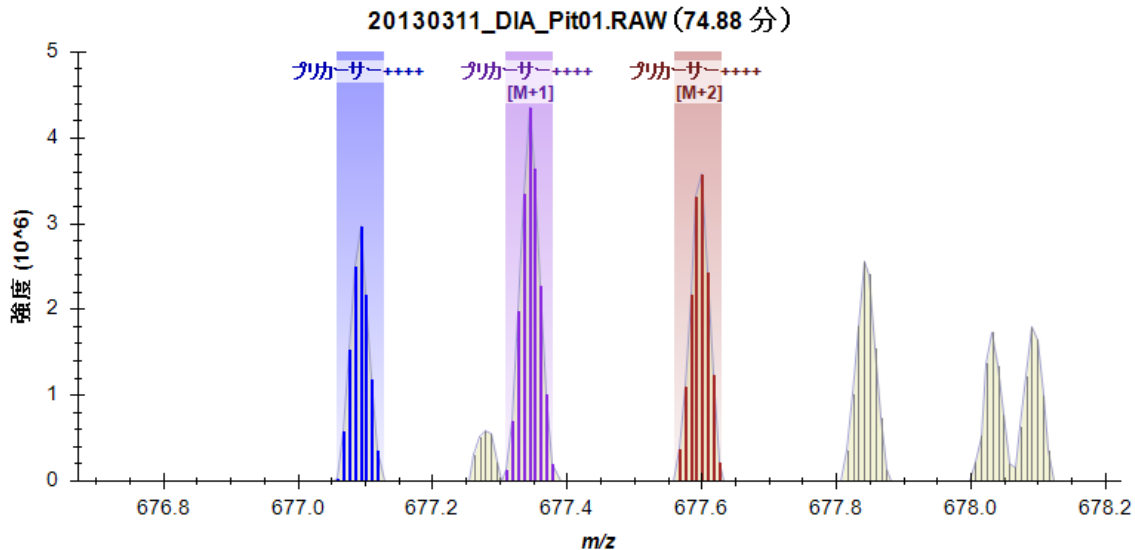
これらのクロマトグラムが抽出された MS1 スキャン内で何が起こり得たかを理解するため以下の操作を行います:

- マウスカーソルを「プリカーサー [M+1]」ピークの頂点に置いて、紫色の丸印が現れマウスカーソルが手の形に変わるまで、ホバリングします。
- 丸印をクリック。

プリカーサークロマトグラムポイントが抽出された MS1 スキャンの範囲を示す [フルスキャン] ビューが、Skyline に表示されます。虫眼鏡のボタンをクリックし、ビューの右上角にあるおよびプラスマーク (⊕) をクリックすると、MS1 スキャン全体が閲覧可能です。以下の操作を行います:

- ピークの周りで M、M+1、および M+2 とハイライト表示されている長方形をクリック・ドラッグして、ズームインします。
- 74.88 分に取得されたスペクトル (タイトルに表示) を閲覧していることを確認してください。または、右上角の矢印ボタンを利用して、このスペクトルに移動します。

[フルスキャン] Profiling mode の MS spectra は以下のように見えます:



プロファイルモード ピーク内の個別のイオン強度がラインと影のあるスティックとして表示されます。クロマトグラム上に点を作成するために合計された個別のイオン強度はクロマトグラムに表示されているのカラーでハイライト表示され、抽出範囲は陰の領域として表示されます。M+3 ピークおよび M+4 ピークは影付きピークの右側では抽出されませんでした。ターゲットペプチドに期待した通りの形状に見えます。しかしその一方で当該ペプチドの M+1 ピークと M+4 ピークに干渉しそうになっている 2 つのピーク (677.275 および 678.025) も見られます。

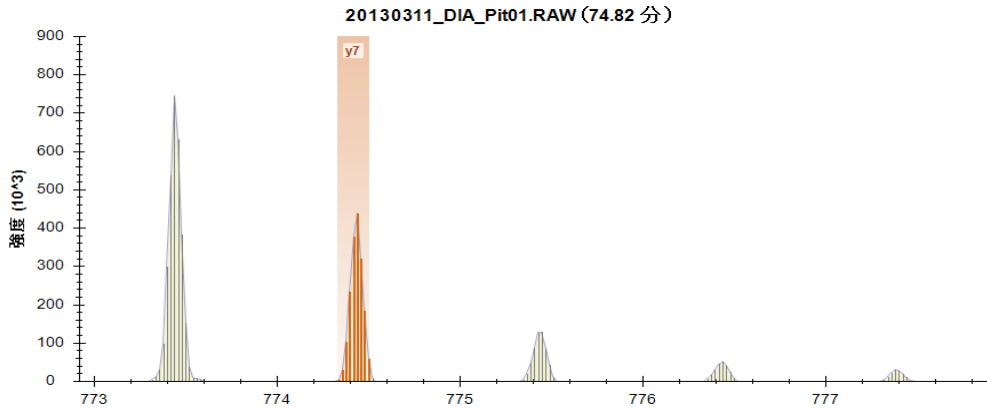
- ここで、[フルスキャン] ビューのツールバー内にある矢印ボタン (← →) を利用して、クロマトグラムピークの溶出プロファイルのスキャンを再確認します。

74.77 分~74.92 分付近は予測同位体分布に対応する MS1 信号が見られるため抽出範囲内で明らかに干渉している事象はないと判断できます。74.92 分以降では信号がクリアではなくなっていくます。少しズームアウトすると (マウススクロール・ホイールを使用)、その他のクリアなペプチド信号がこの m/z 範囲で併合されるのが見られます。

同様の分析をプロダクトイオン MS/MS スキャン上で実行するには:

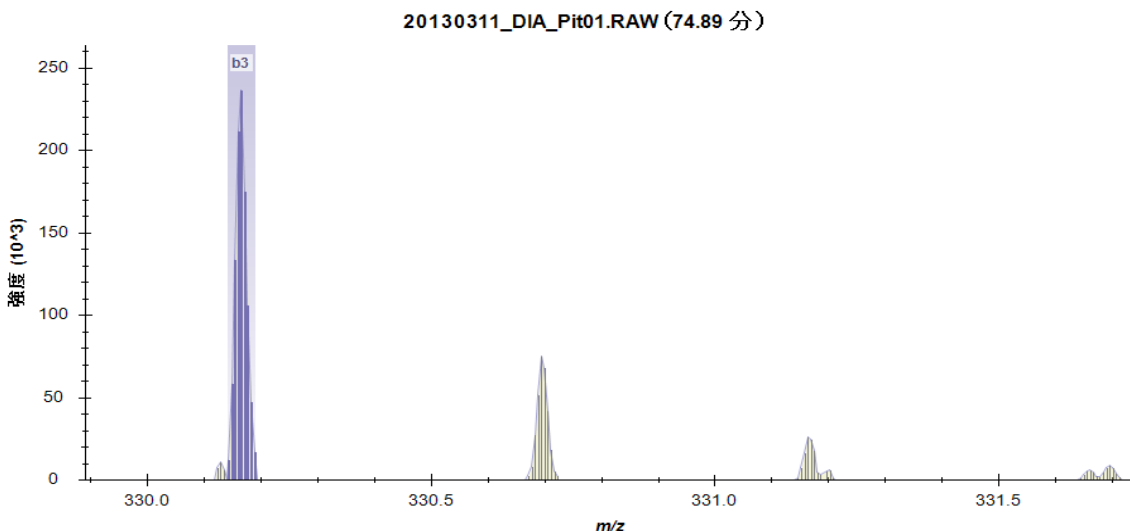
- マウスカーソルを「y7+」ピークの頂点に置いて、紫色の丸印が現れマウスカーソルが手の形に変わるまで、ホバリングします。
- 丸印をクリック。

[フルスキャン] ビュー内に、以下のようなグラフが見られます:

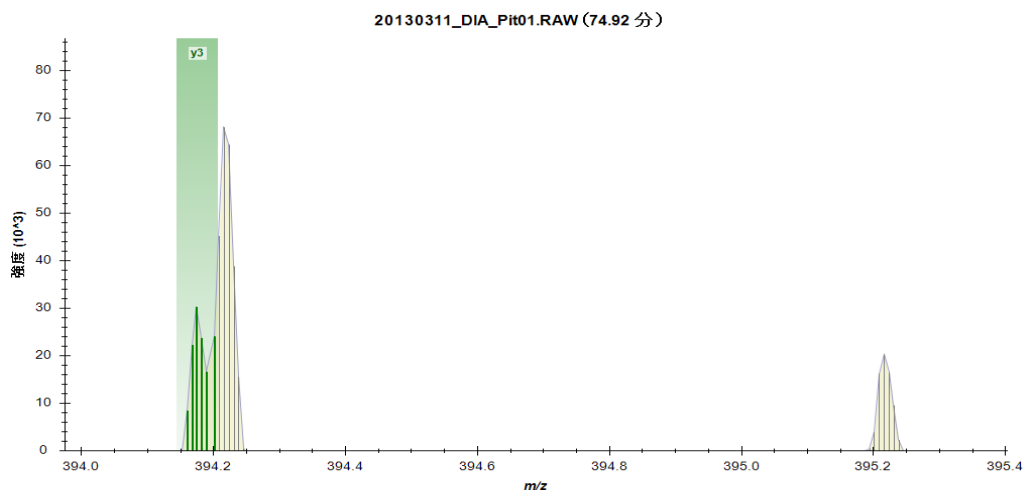


y7 クロマトグラム内の信号はターゲットフラグメント由来ではないことが瞬時に明らかになります。なぜなら y7 抽出範囲がモノアイソトピックピークにはないからです。y7 抽出範囲は 2 番目の同位体ピークにあり、一方でモノアイソトピックピークは 1 Da 軽くなります。y7 クロマトグラムはその他のプロダクトやプリカーサークロマトグラムとは共溶出の一致度が良くない（左側に展開し過ぎている）という事実と合せて考えると、このトランジションは破棄するのが良いかもしれません（[ターゲット] で、y7 を右クリックして [消去] をクリック）。ライブラリ MS/MS スペクトルからの最高強度のフラグメントであると予測され、ライブラリ スペクトルとのドット積相関度は現在 0.88 であるというのは正しくても、なにか奇妙に感じられることでしょう。

また、b3+イオンのクロマトグラムをクリックしてズームすると、その信号は 2 価イオンから発生していることが分かります（同位体ピーク間の 0.5 m/z ）：

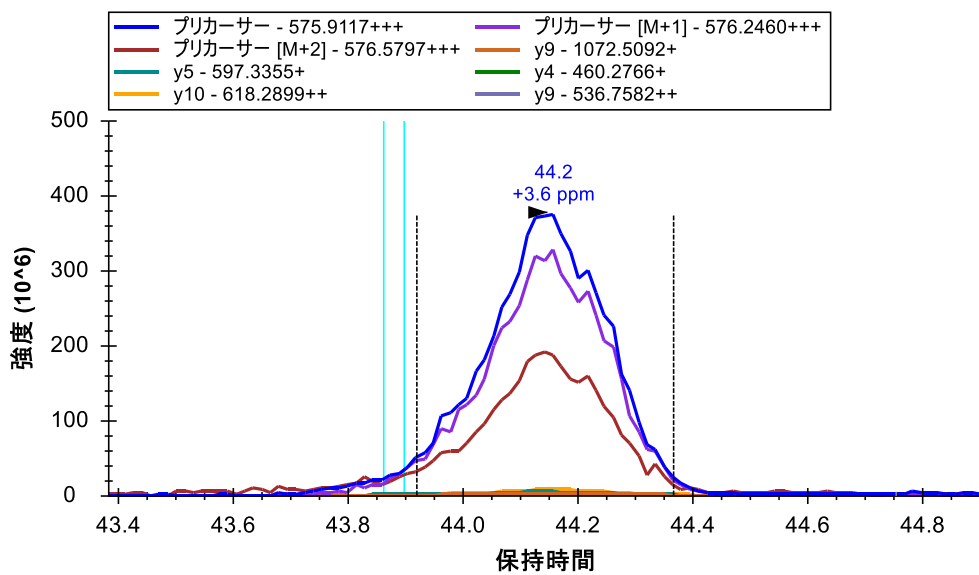
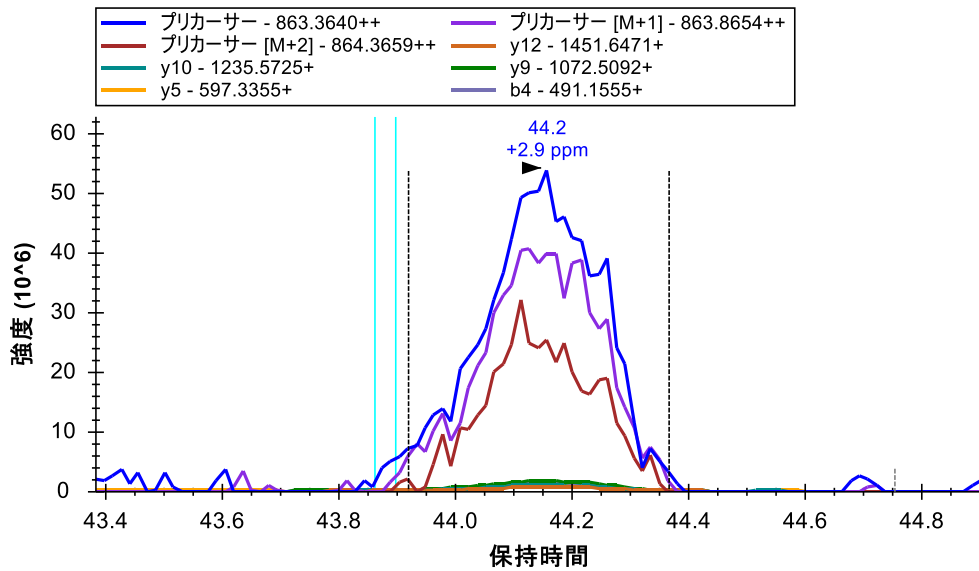


y7++および y5+のピークは問題ありませんが、y3+クロマトグラムは明らかにその溶出を通して干渉を受けており、74.92 分付近でそれが優位となっています：

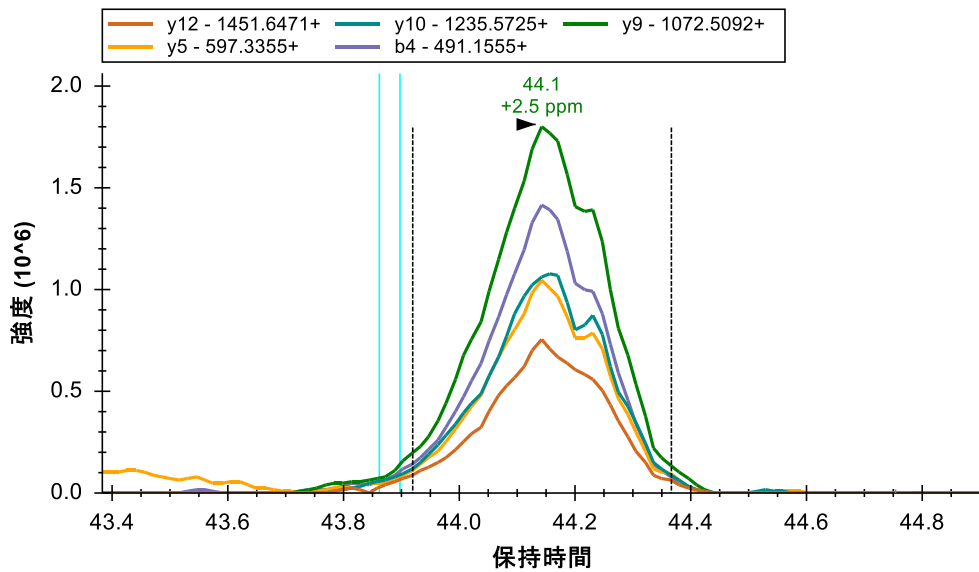
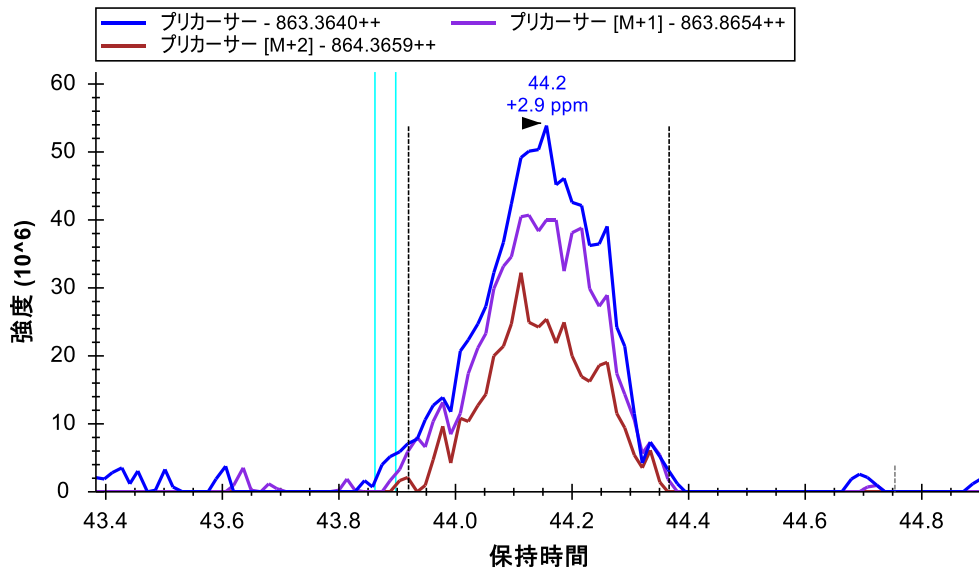


この時点でこのペプチドを定量化可能な候補から外すべきでしょう。このペプチドの新規フラグメントイオンでのクロマトグラム抽出に戻って代わりを見つけることは可能ですが、本チュートリアルでは行ないません。これには、まず [ターゲット] ペイン内で新規トランジションを選択して、その後 DIA ファイルをインポートすることが必要です。

次にペプチド K.CNTDYSDCIHEAIK.T です。複数の電荷状態がある場合トランジション分割ビューは、イオンタイプではなく電荷状態で分割します。また、MS1 スキャンから抽出されたプリカーサーイオン強度が典型的に、MS/MS スキャンから抽出されたプロダクトイオン強度を矮小化するのが見られます：

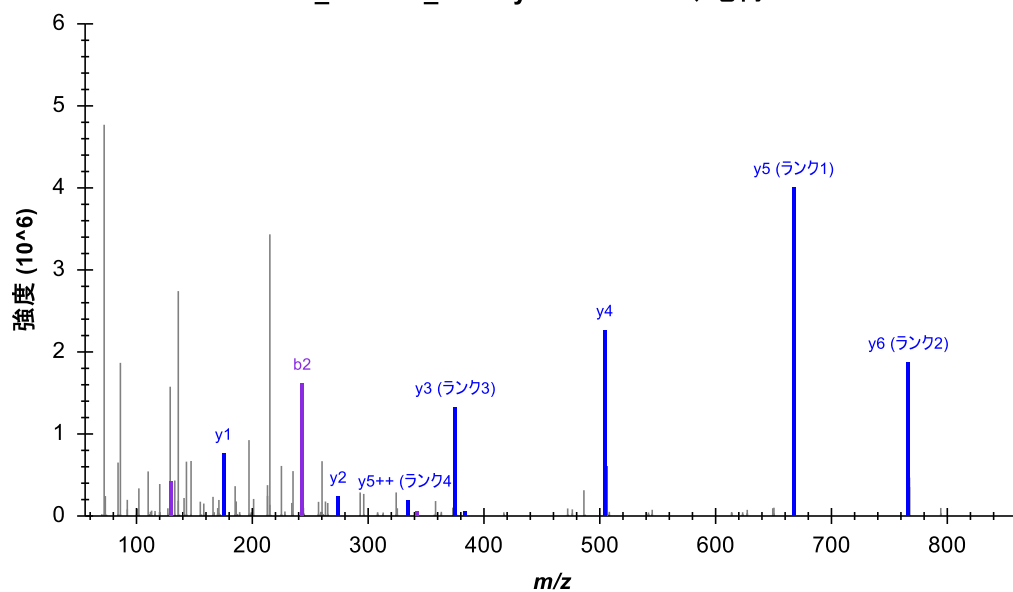


ペプチドを [ターゲット] ビュー内で展開して各プリカーサーを選択する場合、プリカーサーとプロダクトイオンランジションの両方で良好な SN 比 (signal noise ratio) を持つ、高品質なピークがどちらにもあるのが見られ、質量誤差は 5 ppm 未満、idotp 値は 1 近く、および dotp 値は 0.8 以上です:



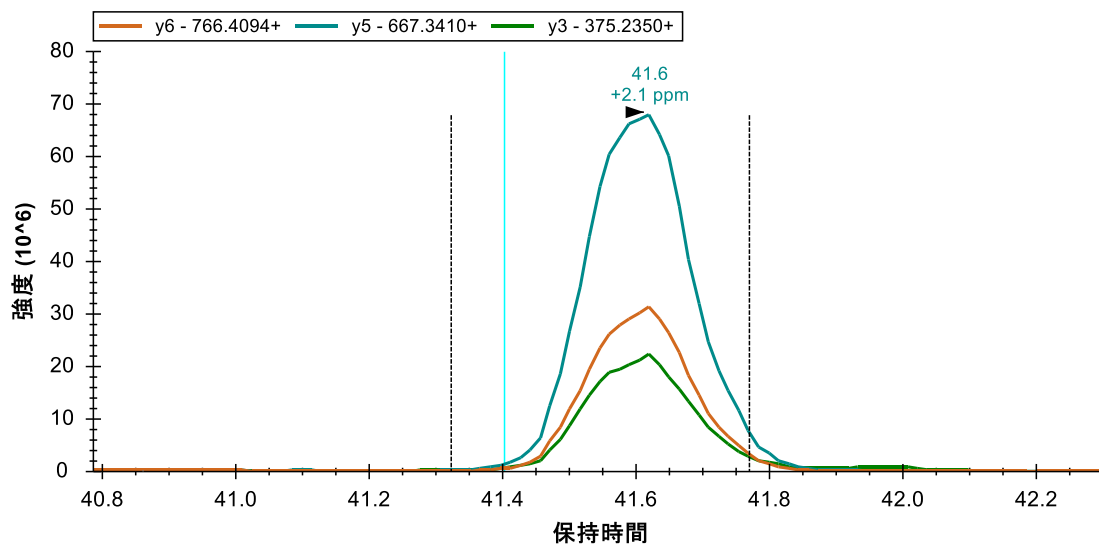
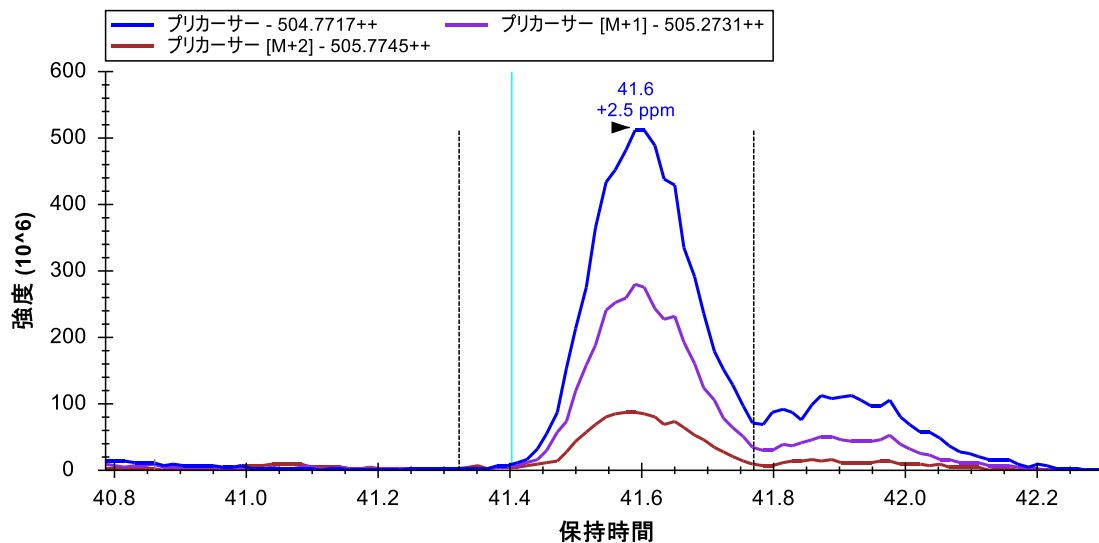
本チュートリアルで検討する価値がある最後のペプチドは、次のペプチド K.ELVYETVR.V です。[ターゲット] 内で選択および展開すると、idotp 値および dotp 値は 0.99 ですが、プロダクトイオンランジションは 3 つしか見られません。[ライブラリー一致] で表示されるスペクトルで 2 番目に高いと見られる y4 トランジションが、なぜ含まれなかったのか不思議に思われるかもしれません:

Dia_Tutorial_Library - ELVYETVR、電荷2

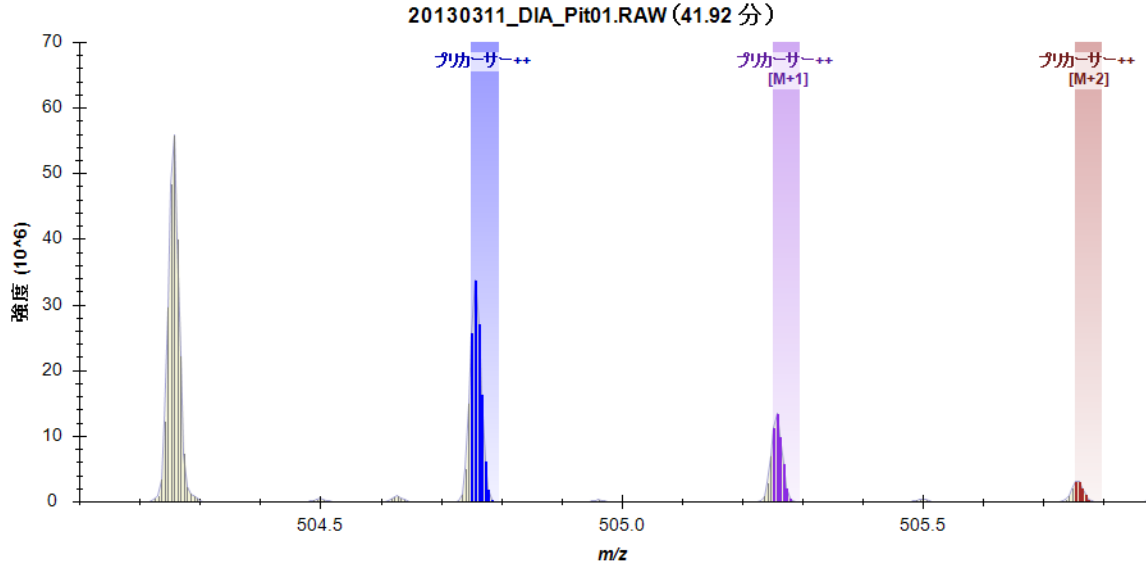


この質問への答えは、[トランジションの設定 - フィルタ] タブでオンにした [除外に対し DIA プリカーサーウィンドウを使用] チェックボックスにあります。当トランジションが除外され、 m/z 504.77 とプロダクト m/z 504.28 は両方とも 500~520 のウィンドウ内に収まってしまうからです。これにより、このペプチドの y3、y5、および y6 のみが残るという望ましくない結果に陥ります。1 ペプチドにつき 5 または 6 トランジションあるのが好ましいと言えるでしょう。

一方でクロマトグラムはかなり良好に見えます。共溶出プリカーサーおよび近隣のシアン ID ラインは、ここでもいつも通りピークの左側にあるためデータ解析の精度は高いと評価できます。



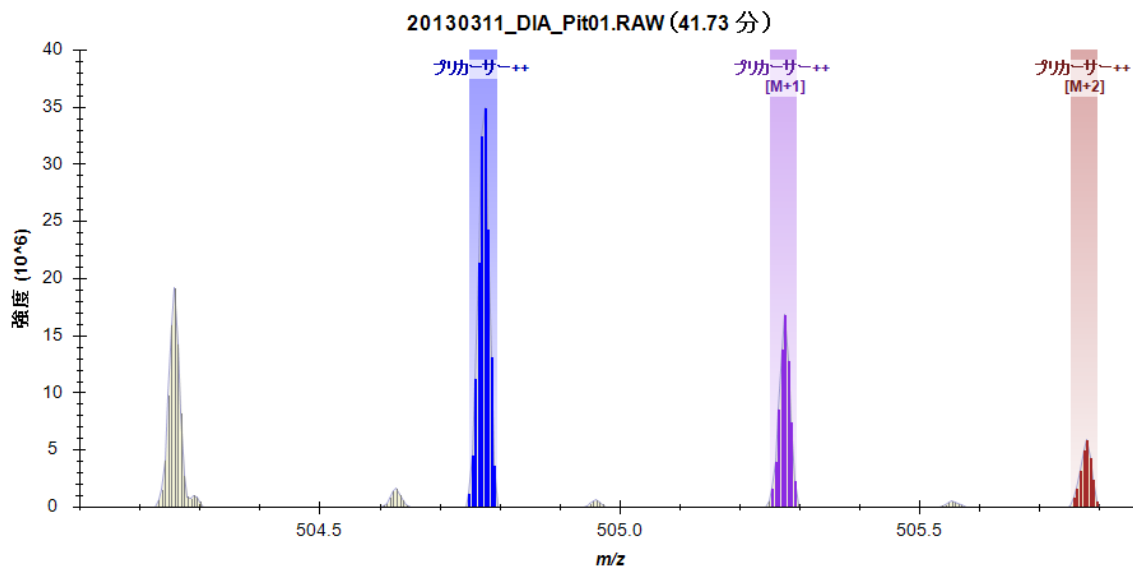
プリカーサークロマトグラムのメインピークから展開する2番目のピークが干渉によるものであるということは、プロダクトイオンクロマトグラムの方に存在していないことから明らかです。同ピークをクリックして[フルスキャン]内のMS1スキャンを表示すると高い精度で判断できます。当信号は、ターゲットペプチドより1 Da 軽いペプチドから生じており、明らかに5 ppmの質量誤差を超えているのが見られます:



セントロイド化した MS spectra を含むファイルおよび非常に狭い抽出ウィンドウを使用した場合、このピークは単に消え去るであろうと思われるかもしれませんが。高い質量分解能の装置を利用したセントロイド化データを Skyline 内で処理することは可能ですが、実際には装置により取得されるのでデータの視認性が悪くなるということを忘れてはなりません。また、セントロイド化アルゴリズムを使っているかいないかは問題ではなく干渉がある時点での m/z レベルでのプロファイルピーク分解能が重要であるという事実を覚えておくことも重要です。これを視覚的に理解するため:

- [フルスキャン] ビュー内左矢印ボタン (←) をクリックして、干渉と真のペプチドピークとの間のトランジションに達するまで、MS1 スキャンを横送りします。

ターゲットペプチドからの信号が優位になり、左側のピークが消えるずっと前にピークを中心が抽出範囲の中心の近くへとシフトし始めるのが見え、2つのペプチドからの信号を重複する場所で分離するのは無理であることがわかります。



クロマトグラム抽出前にセントロイド化を行っても、ターゲットペプチドピークの外側に見えるノイズは削減できますが、目的のピーク内部に共雑するものに関しては改善することはできません。

結論

本チュートリアルでは、DIA 装置メソッドの作成や、シンプルなデータ分析に使用するための、DIA スキームを学習しました。最初は DDA 検索結果からスペクトルライブラリを構築し、ライブラリ内の測定 RT を基に保持時間制限を設定。次に目的のタンパク質と DDA からのスペクトル一致を基に測定対象の一連のトランジションを設定。そして DIA をインポートし、データの Quality check をしました。最終的には、すべての Skyline ドキュメントに記載されているように、目的のペプチドのピーク面積と統計情報が得られます。より詳しく学びたい方のためには他のチュートリアル ([ターゲットメソッドの編集](#)、[既存および定量的実験](#)、[iRT 保持時間予測](#)、[詳細ピーク選択モデル](#)、[検定ライブラリをインポートする](#)、および [Panorama クロマトグラムライブラリ](#)) が用意されています。

Workflow で、DIA の前/後/最中に取得された DDA がすでに用意されている場合には、あらゆる DIA データセットを Skyline 内で分析できるようになります。これは現在のところ、DIA データ分析を始める最も簡単な方法です。しかし、目的のタンパク質のフラグメントイオンの相対量情報および保持時間 (Normalize された) を含むライブラリがすでに構築されている場合は、実際に測定をして情報を得なくともこれらのライブラリを利用して解析することが可能です。DIA 実験のライブラリの構築・利用は高度なトピックであり、別のチュートリアルが必要となります。あるいは、その他の Skyline/Panorama チュートリアルで得られる情報を総合することで理解を深めること

も可能と思われます。本チュートリアルで DIA および Skyline を利用した定量的プロテオミクス分析の包括的ワークフローの 1 つが理解できたと思います。

参考文献

1. Venable, J. D., Dong, M.-Q., Wohlschlegel, J., Dillin, A. & Yates, J. R. Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Nat. Methods* **1**, 39–45 (2004).
2. Gillet, L. C. *et al.* Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, O111.016717 (2012).
3. Egertson, J. D. *et al.* Multiplexed MS/MS for improved data-independent acquisition. *Nat. Methods* **10**, 744–746 (2013).
4. Krokhin, O. V. *et al.* An improved model for prediction of retention times of tryptic peptides in ion pair reversed-phase HPLC: its application to protein peptide mapping by off-line HPLC-MALDI MS. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **3**, 908–919 (2004).
5. Escher, C. *et al.* Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides. *Proteomics Accept.* (2012).
6. Reiter, L. *et al.* mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments. *Nat. Methods* **8**, 430–435 (2011).