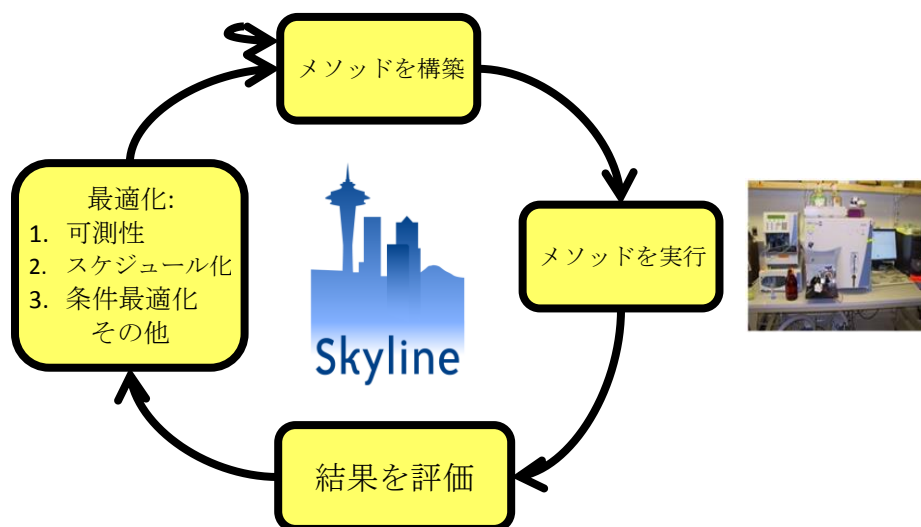


Skyline ターゲットメソッドの最適化

本チュートリアルでは、Skyline を用いた選択的反応モニタリング (SRM) 、または多重反応モニタリング (MRM) の測定メソッドの最適化について説明します。

あるタンパク質に関して、理想的な標的ペプチドが入手できない場合や不明である場合、Skyline では、対象試料中で測定可能なペプチドを探索するための、広範囲なペプチドを測定対象としたメソッドを容易に作成できます。さらにこのメソッドを用いて行った測定結果を Skyline へとインポートすることにより、メソッドを改良し、測定を繰り返してこれを改善していくことも可能です。

これをターゲットメソッド最適化サイクルと呼びます。下図にターゲットメソッド最適化サイクルの手順を示します。



このサイクルを繰り返すことで、同時に 100 以上のタンパク質を対象とした最適なターゲットメソッド構築ができます。また実験目的に沿った最良のペプチド、プロダクトイオン、および装置設定をメソッドに組み込むことができます。

本チュートリアルでは、ターゲットメソッド最適化サイクルを 2 回半行う例を示します。この例に従ってさらにサイクルを繰り返すことで、最適な定量メソッド構築を行うことができます。

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.gs.washington.edu/tutorials/MethodRefine.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で解凍します。

C:\Users\brendanx\Documents

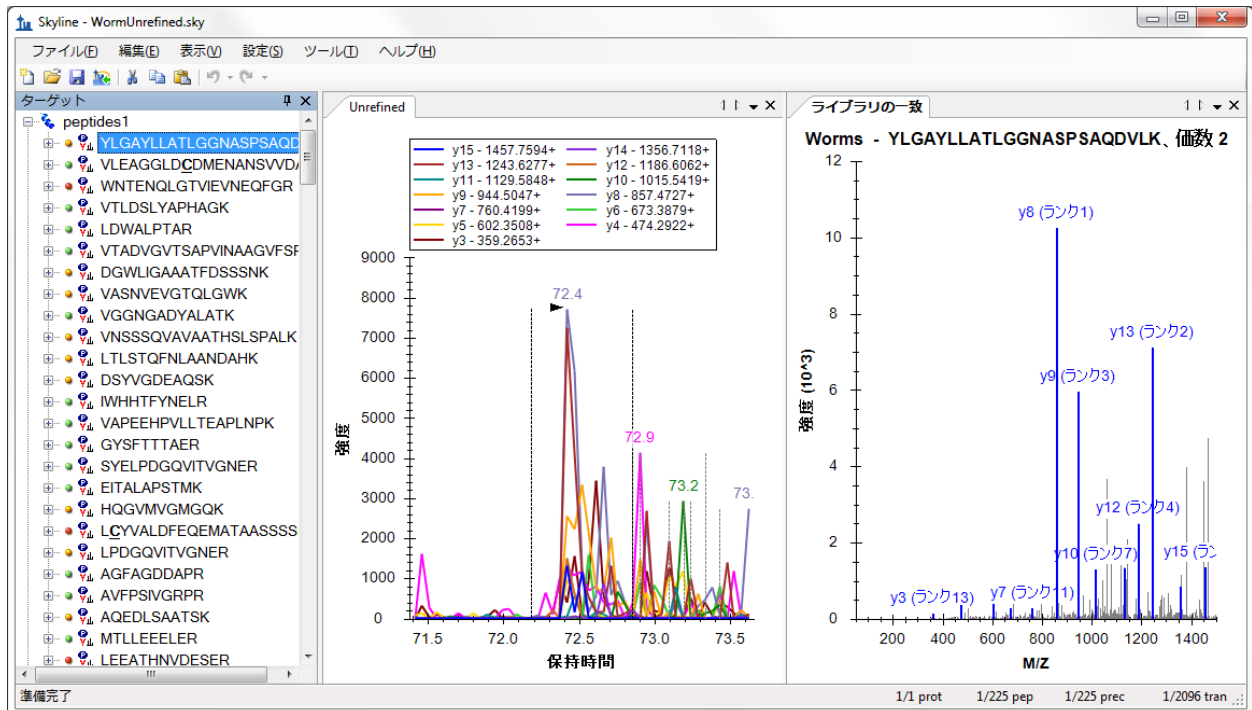
これにより以下の新しいフォルダが作成されます。

C:\Users\brendanx\Documents\MethodRefine

この新しいフォルダの中の WormUnrefined.sky ファイルをダブルクリックして開きます。または、Skyline の[ファイル]メニューの[開く]を利用して開きます。

測定結果

ドキュメント内の最初のペプチド (YLGAYLLATLGGNASPSAQDVLK) を選択します。ライブラリから、MacCoss ラボの装置で測定されたこのペプチドの MS/MS スペクトルおよび、プロダクトイオン y3~y15 についての時間-強度クロマトグラムが表示されます。



注: ライブラリ内の MS/MS スペクトルは、通常イオントラップ型質量分析計を用いた測定結果から得られたものです。

Skyline の左側のペプチドビューでは、ペプチド配列の左に緑、黄、赤の点が表示されています。これらはピーク品質アイコンといい、それぞれの意味は以下の通りです。

- 緑 - すべてのトランジションが共溶出されたピークとなっており、Skyline では最良と選択しています。

- 黄-半分以上のトランジションが共溶出ピークとなっています。
- 赤-半分未満のトランジションが共溶出ピークとなっています。

このライブラリは、39 個の Thermo RAW ファイルをドキュメント内へインポートしたもので構成されています。Skyline 画面右下の数字をご覧ください。ドキュメント内には 225 個のペプチドと 2096 のトランジション(y3 以上の y 系列イオンの全てをカバー)が保存されています。Skyline ドキュメントは、ターゲットメソッド構築において最良のペプチド・トランジションを決定するための情報源です。ペプチドあたりのトランジション数が多いほど、測定されたピークが対象ペプチド由来であるという信頼度が高くなります。この信頼度は、対象ペプチドの各トランジションにおけるピーク強度と、ライブラリ上にある同一ペプチドのスペクトル^{1,2}との類似度（内積を用いた相関）から得られます。

未最適化メソッド

ペプチドを測定するのに必要なトランジションリストを作成するには、以下の手順を実行します。

- [ファイル]メニューで、[エクスポート]を選択して[トランジションリスト]をクリックします。
- [複数メソッド]を選択します。
- [サンプル注入あたりの最大トランジション数]に「59」と入力します。

[トランジションリストをエクスポート]フォームが以下のように表示されます。

- [OK] ボタンをクリックします。
- 次のフォーム内の **MethodRefine** フォルダに移動します。
- [ファイル名] フィールドに「worm」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

Windows Explorer で MethodRefine フォルダを開くと、39 個の新しい CSV ファイル（worm_0001.csv～worm_0039.csv）がフォルダ内に含まれていることがわかります。それぞれのサイズは約 4KB で、Thermo 社 TSQ 用未スケジュール化メソッドにインポートできる 59 以下のトランジションのリストが含まれています。

ここでは 59 という中途半端な数がサンプル注入あたりの最大トランジション数に入力されていますが、これは元の測定データと一致したトランジションリストを得るために必要だったためです。すなわち、元の測定では、60 のトランジションが使用されていましたが、Skyline には、許可されるトランジション数が最大数未満であるというバグがありました（バグはすでに修正されています）。

複数の測定結果をインポートする

測定結果ファイルのインポート方法を習得するには、別の ZIP ファイル（36MB）をダウンロードする必要があります。この ZIP ファイルには、MacCoss ラボでデータ収集された 39 個の Thermo RAW ファイル（非圧縮で 161MB）が含まれています。これは、上記セクションでエクスポートしたトランジションリストを測定したものです。

ダウンロードした元の MethodRefine.zip ファイルには、データキャッシュファイル WormUnrefined.skyd が入っており、Skyline で必要とされるすべてのデータが含まれています。既存のデータキャッシュファイルを引き続き利用する場合、以下のセクションはスキップして構いません。

自身でデータを再インポートするには、以下の ZIP ファイルをダウンロードします。

<https://skyline.gs.washington.edu/tutorials/MethodRefineSupplement.zip>

続いて前セクションで使用したフォルダへこのファイルを解凍します。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\MethodRefineSupplement

Skyline で以下の手順を実行して、以前にキャッシュしたデータを削除します。

- **[編集]** メニューで、**[結果を管理]** をクリックします。
- **[削除]** ボタンをクリックします。
- **[OK]** ボタンをクリックします。

クロマトグラムチャートとピーク品質アイコンの両方が、Skyline インターフェイスから削除されます。

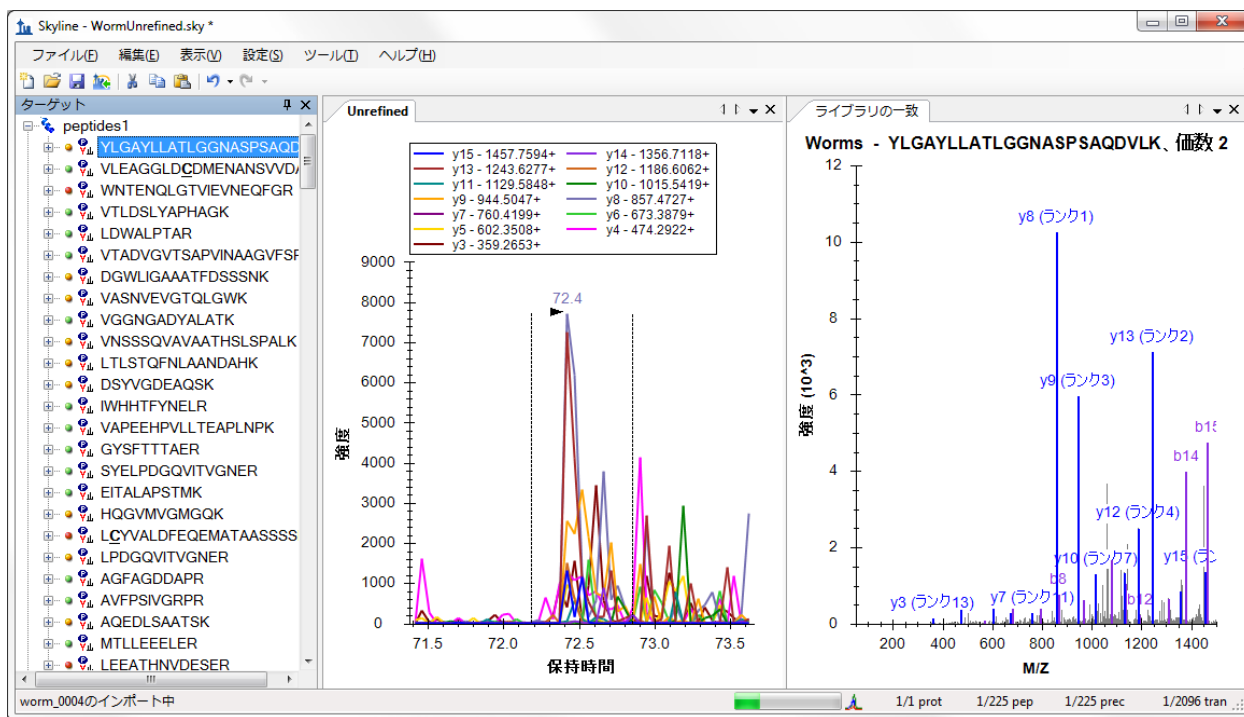
- **[ファイル]** メニューで **[保存] (Ctrl+S)** をクリックします。

これで、元のデータをインポートする準備が整いました。すべてを一度にインポートする必要はありません。大規模かつ未最適化状況のドキュメントからトランジションリストを取得するには時間がかかるため、一部分のみをインポートできる本機能はデータチェックに活用できます。このチュートリアルでは、データを 2 つのバッチに分けてインポートします。

まず、次の手順を実行します。

- **[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。
- **[新しい繰り返し測定を 1 つ追加]** を選択します。
- **[名前]** フィールドに「Unrefined」と入力します。
- **[OK]** ボタンをクリックします。
- MethodRefineSupplement フォルダを開きます。
- 「worm_0001.RAW」ファイルをクリックします。
- 「worm_0015.RAW」ファイルをシフト・クリックして、最初の 15 個のファイルを選択します。
- **[開く]** ボタンをクリックします。

Skyline が、これらの 15 個のファイルのインポートを開始します。インポートの進行状況が、Skyline ウィンドウ下部にあるステータスバーに表示されます。また、ピーク品質アイコンが、以下のようにペプチドビュー内のペプチドの横に再度表示されます。



Skyline がデータをキャッシュしている間も、結果の再確認が可能です。ドキュメントを修正し始めることも可能ですが、このチュートリアルでは、以下の手順に従って先に 39 個の結果ファイルすべてのインポートを完了してください。

- [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。
- [既存の繰り返し測定にファイルを追加]を選択します。
- [OK] ボタンをクリックします。
- MethodRefineSupplement フォルダに移動します。
- 「worm_0016.RAW」ファイルをクリックします。
- 「worm_0039.RAW」ファイルをシフト・クリックして、残りのすべてのファイルを選択します。
- [開く] ボタンをクリックします。

インポートが完了すると、次のセクションを開始する準備が整います。データキャッシュファイルは、削除される前の元のものと同じです。

手動最適化

ドキュメントを最適化する 1 つ目の方法として、各ペプチドを視覚的に確認して、Skyline が提供する豊富な情報に基づいて、どのトランジションを取捨選択するかを決定する方法がありま

す。これは、ASMS 2009 ポスターで発表したもので、このチュートリアル **Skyline** ドキュメントが元々最適化された際に使用された方法です。各ペプチドを視覚的に確認し、ライブラリスペクトルに良好に一致するピークを持つものについて、3つの最良のトランジションを選択するのにかかった時間は、1時間未満でした。

このチュートリアル **Skyline** ドキュメントを見てみると、最初のペプチドに関して、**Skyline** が現在ズームインしているピークよりも、良いピークを見過ごしていないかどうか疑問に思われるかもしれません。この疑問に答えるには、以下の手順を行ってズームアウトします。

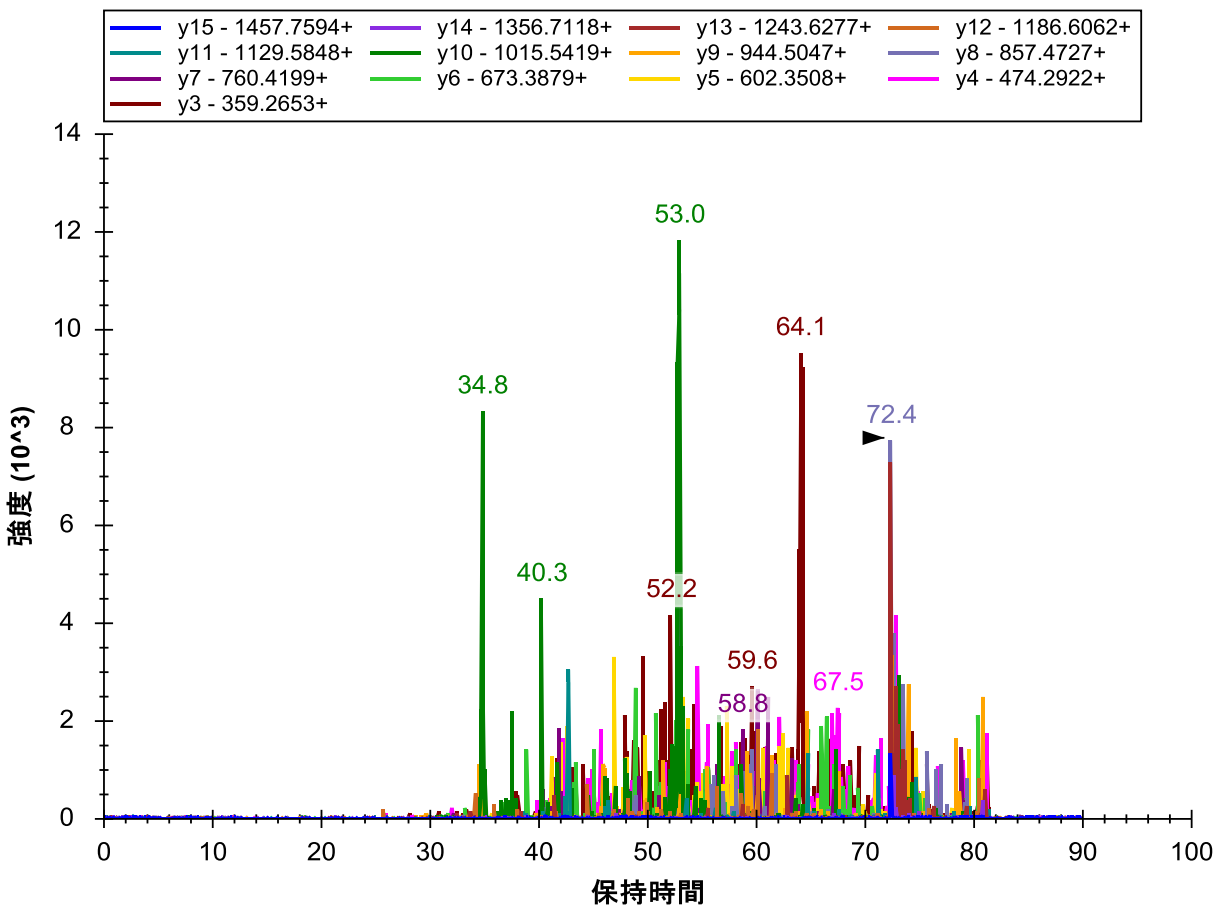
- **[ビュー]** メニューで、**[自動ズーム]** を選択して **[なし]** (Shift+F11) をクリックします。

以下のキーボードショートカットは覚えておくと便利です。

- **ビュー / 自動ズーム / 最良ピーク** - F11
- **ビュー / 自動ズーム / なし** - Shift+F11

これらの機能を利用すると、選択したピークの拡大図と測定した各トランジションの保持時間範囲の全体図との間を、素早く切り替えることが可能です。

ドキュメント内の最初のペプチドのトランジションの保持時間範囲の全体図は、以下の通りです。



一見ノイズの多いデータであるように見えます。より詳細に見るには、保持時間の標識がある大きなピークの周辺のボックスをクリック・ドラッグします。

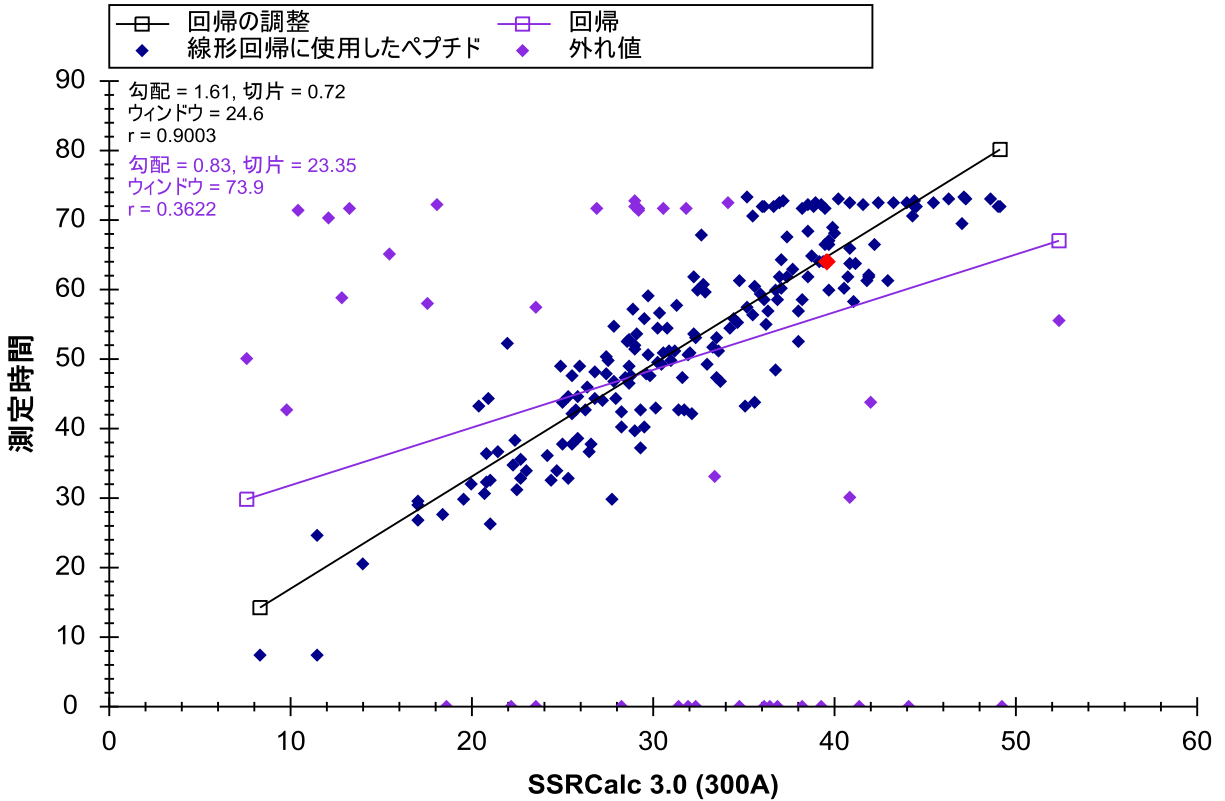
いずれにおいてもこのペプチド由来のものではないことが確認できたら、消去キーを押して当該ペプチドをドキュメントから消去します。

保持時間予測

これはクロマトグラムピークをみてペプチドの予測保持時間についての見解を得る場合にも有用です。Sequence-Specific Retention Calculator (SSRCalc) 3.0³をSkylineに統合することで、保持時間予測が可能となりました。SSRCalcスコアと測定されたペプチドの保持時間との線形回帰直線を見るには、以下の手順を行います。

- [ビュー]メニューで、[保持時間]を選択して[線形回帰] (Shift+F8) をクリックします。

Skylineに、以下のようなグラフが表示されます。

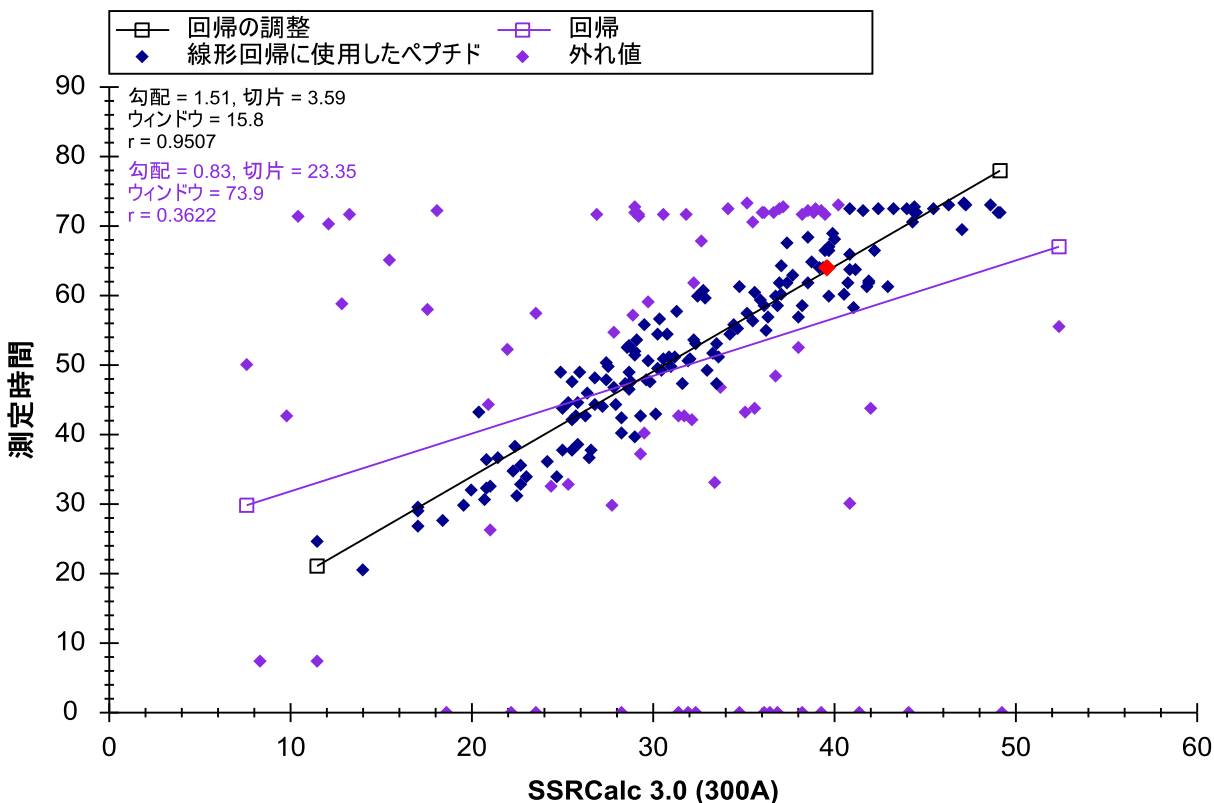


回帰直線上に、赤色のポイントが表示されています。このポイントは、現在選択されているペプチドに対する SSRCalc スコアおよび測定時間を表しています。選択ペプチドは、Skyline ドキュメントのツリーで異なるペプチドを選択すると変更されます。

初期設定では、閾値として相関係数 $r = 0.9$ が採用されており、閾値が満たされるまで回帰からポイントが削除され外れ値の標識が付けられます。なお。閾値の調整は、以下の手順で行います。

- グラフを右クリックして、[閾値を設定] をクリックします。
- [閾値] フィールドに「0.95」と入力します。
- [OK] ボタンをクリックします。

Skyline が再度線形回帰を行い、より多くのペプチドを外れ値としてマークしてグラフを以下のように変更します。



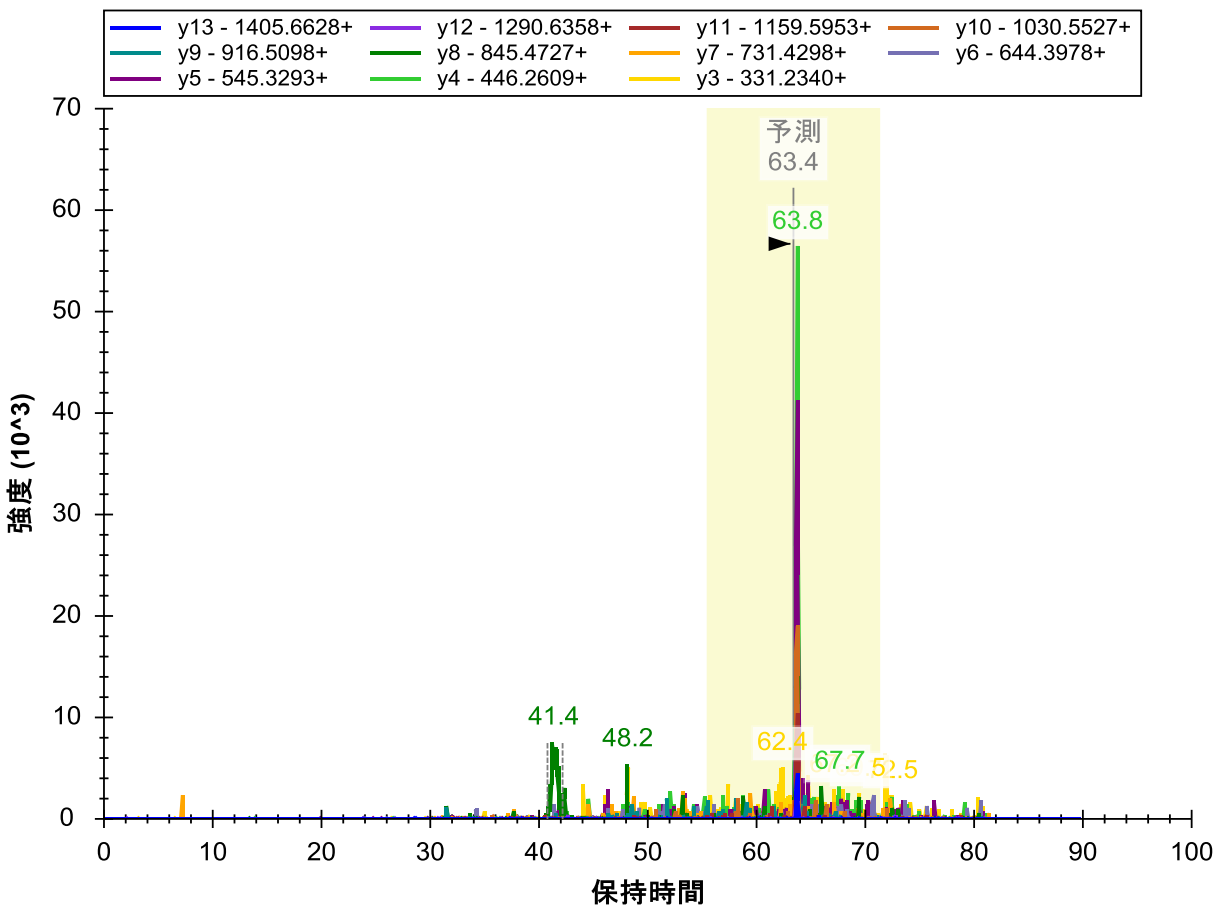
以下の手順を行うことにより、保持時間予測のための新たな線形方程式を作成することも可能です。

- グラフを右クリックして、**[回帰を作成]** をクリックします。

Skyline に**[保持時間回帰を編集]** フォームが表示されます。このフォームには、補正済みの回帰データ (145 のペプチド) および同一勾配、切片、時間枠のみを含む、保持時間回帰グラフからの情報が事前入力されています。Skyline が提示する時間枠 (当該回帰の残差から得られる標準偏差の 4 倍値) には 145 のペプチドの約 95% が含まれているはずですが。

Skylineにより、相関係数 r が 1 に最も近くなるような計算式が選択されます。現在選択できるのは、孔径100または300オングストロームの逆相系の粒子充填型カラムを用いた測定を学習データとしてトレーニングさせたSSRCalc 3.0のみです。MacCoss labでは、孔径90オングストロームの充填材を使用しているため、SSRCalc 3.0 (100Å) により最も適した計算結果が得られます。Skyline により提示される値を受け入れる場合は、**[OK]** ボタンをクリックします。

下図のように、クロマトグラムにペプチドの予測保持時間が追加されます。

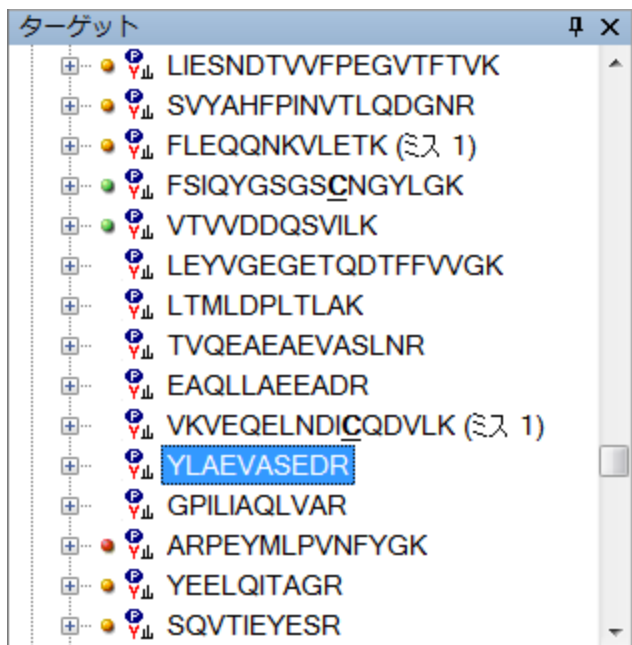


保持時間予測値周辺の影がついた部分は、[保持時間回帰を編集] フォームで選択したウィンドウ幅（16.2分）を示します。影がついた部分の外側にあるピークはすべて、保持時間が予測値から標準偏差の2倍以上外れたものです。

データの欠落

このドキュメントの手動修正へと戻る前に、多くのはずれ値が x 軸上にあることに注目してください。これらのペプチドのピークは測定結果から発見できなかったために、はずれ値とみなされたということを意味します。マウスのカーソルが手の形に変わるまで左端の方に移動させ左クリックすることで、この理由を調べることができます。

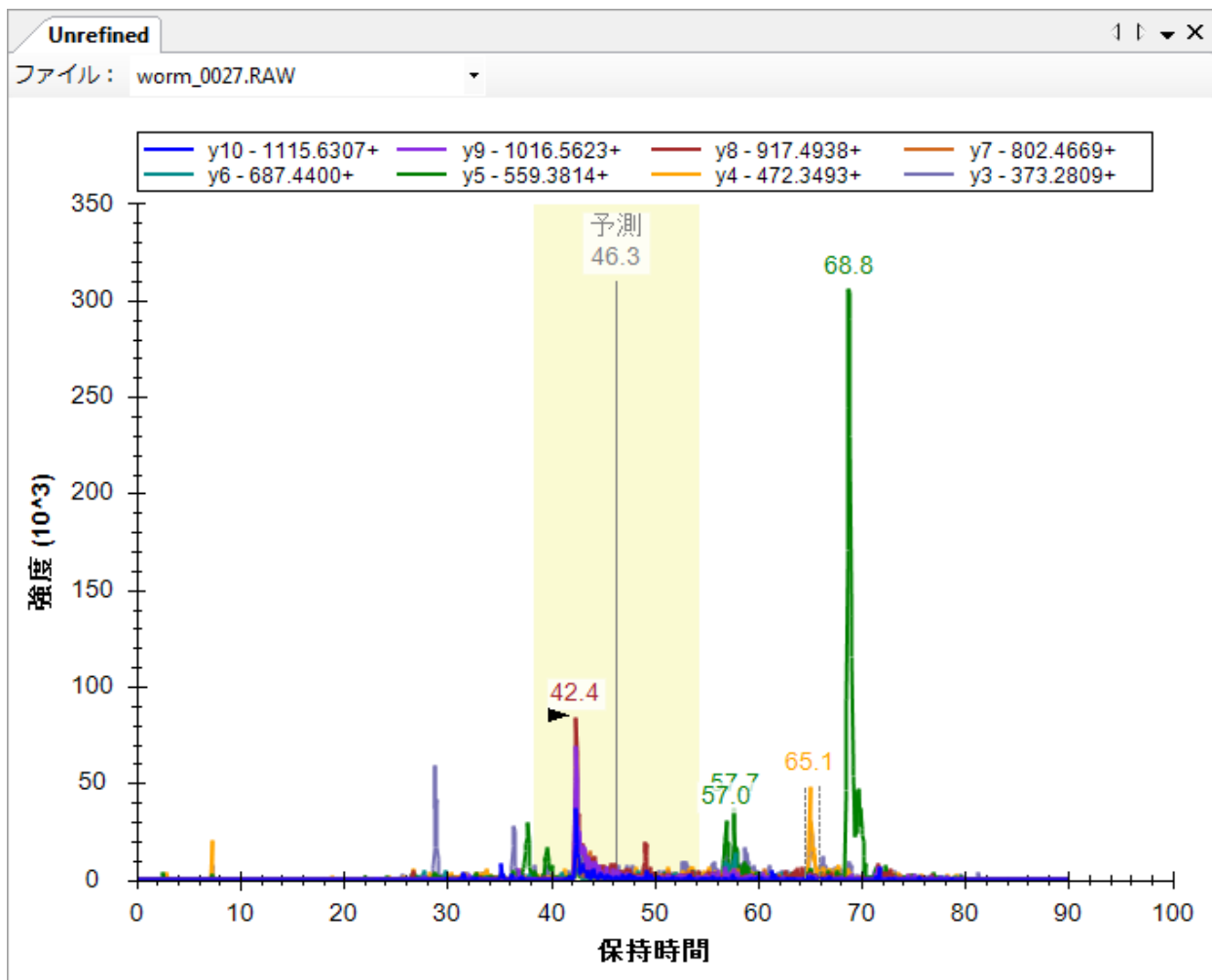
クリックしたポイントが赤でハイライト表示されます。Escape キーを押してペプチドビューに戻り、下へスクロールして選択したペプチド (YLAEVASEDR) を表示させます。以下のように表示されるはずですが。



7つのペプチドには、ピーク品質アイコンが表示されていません。これは、このドキュメントにインポートした RAW ファイルの中には、これら 7 つのペプチドの測定値が存在しないということを表しています。最初に RAW ファイルをインポートしたとき、39 のトランジションリストと 39 の RAW ファイルがありました。いったい何が起こったのでしょうか？

Skyline を用いてもう少し説明しましょう。データが欠落している上記のペプチド VTVVDDQSVILK をクリックします。

クロマトグラムグラフが以下のように表示されます。



上部に追加された、[ファイル] 選択リスト付きのツールバーに注目してください。このリストをクリックすると、worm_0027.RAW および worm_0028.RAW の両方がこのペプチドの測定値を含んでいると表示されます。

将来、1回のサンプル注入で1つのペプチドを2度測定する必要があるかもしれませんが、現在のところ、[ファイル] リストを示すクロマトグラムグラフは、どこかに不具合があることを例示しています。原因としては、Skyline 上で同じ測定ファイルから別個の測定ファイルとしてインポートされるケースや、今回のように、2つの出力ファイルに同じトランジションリストが繰り返し出力され、誤ってもう一つのトランジションリストが削除されたメソッドで測定を行っていたケースが考えられます。ペプチドビューを上方向にスクロールすると、これが worm_0015.RAW と worm_0016.RAW にも起こっているのが分かります。

測定値のないこれらのペプチドをここで消去することも可能ですが、このチュートリアルの後半で行う単一最適化操作の一環として消去を行うことも可能です。ここでは、ホームキーを押して、保持時間回帰直線を閉じます。

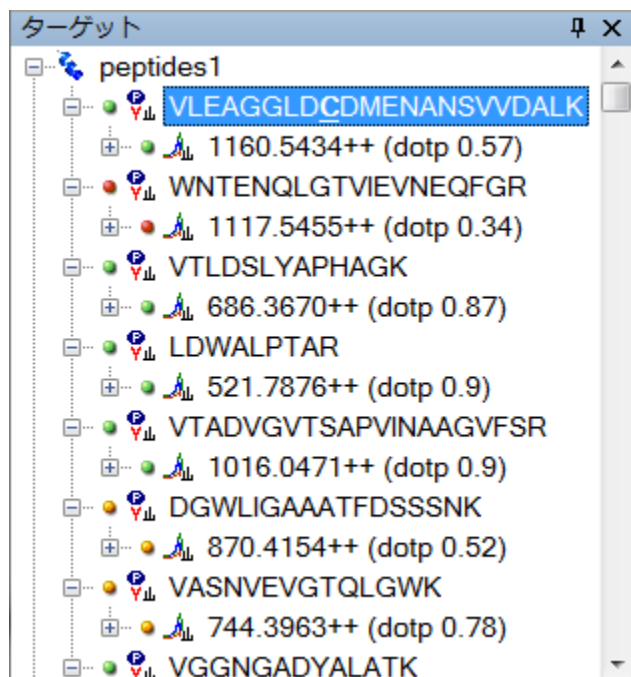
測定可能なペプチドおよびトランジションを選択する

Skyline を用いればメソッドを自動で最適化することが可能です。しかし、測定ペプチドやトランジションを手動で選択する方法を理解しておくことは重要です。手動での確認は、以下の手順で行います。

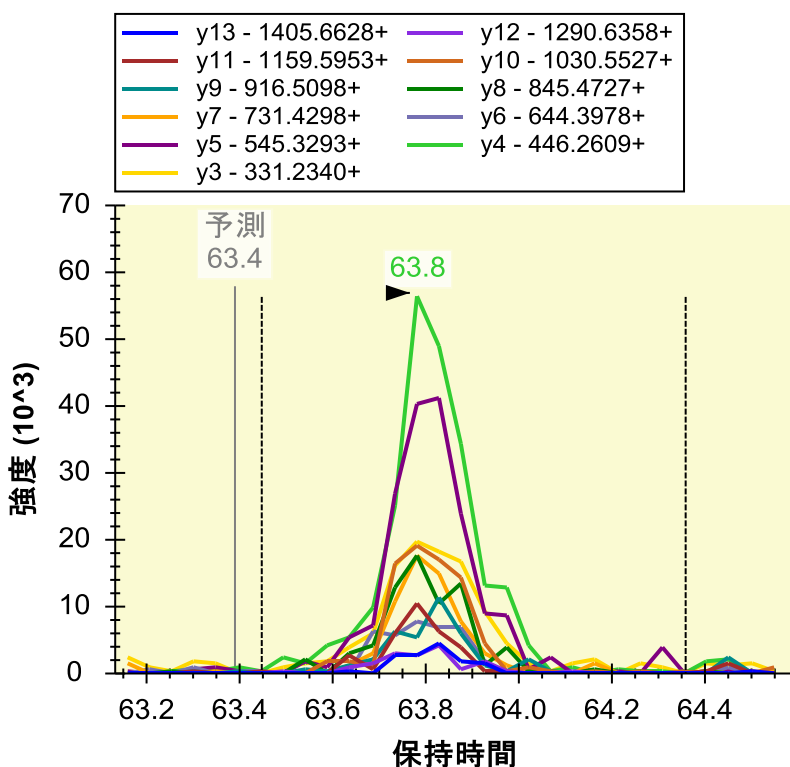
- ドキュメント内の最初のペプチドを選択します。
- **F11** を押してクロマトグラムビュー内の最良ピークにズームインします。
- **[編集]** メニューで、**[すべて展開]** を選択して **[ペプチド]** をクリックします。

この最後の操作により、ペプチドビュー内に「dotp」値が表示されます。dotp 値は、SRM により測定されたピーク面積値と MS/MS ライブラリにおけるピーク強度の内積類似度測定^{4,5}です。この値が 1.0 に近いほど、相関性が高いといえます。

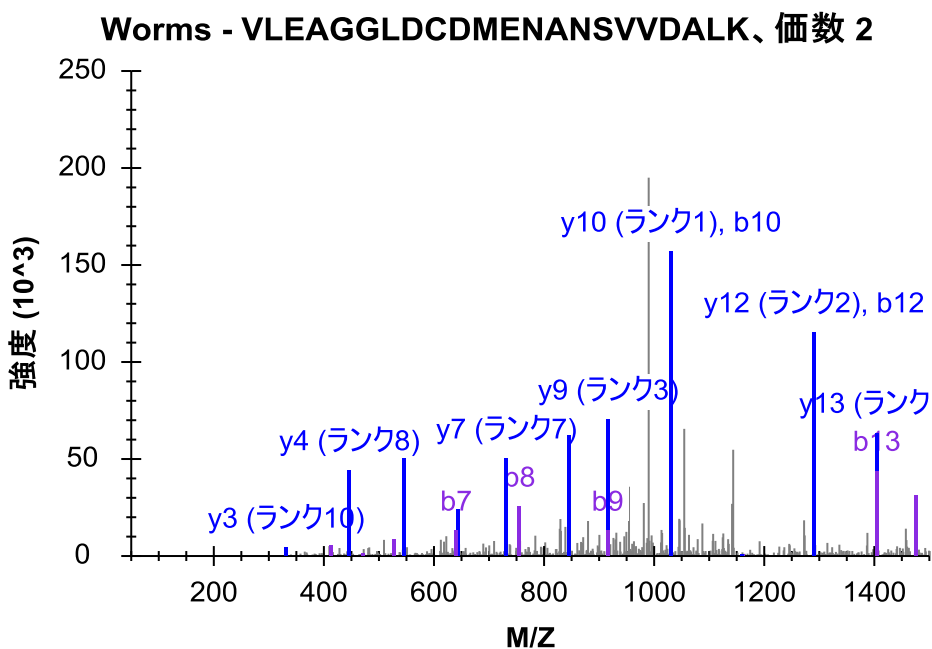
ペプチドビューは以下のように表示されます。



選択したペプチドはピーク品質アイコンが緑色であることから、プロダクトイオン(y1-y11)のピーク全てがほぼ同じ時間に観測されているとわかります。しかし、dotp 値 (0.57) はあまりよくありません。



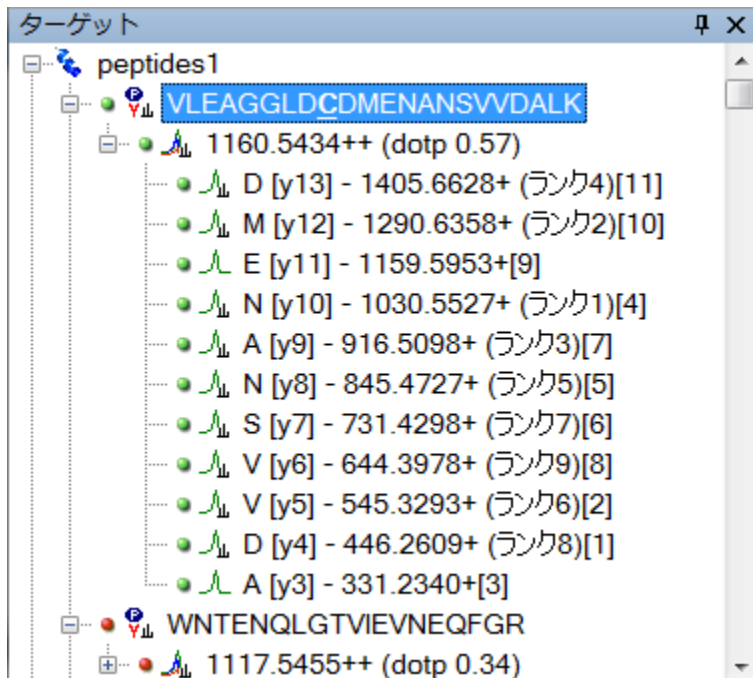
ライブラリの MS/MS スペクトルを見てみると、dotp 値がよくない原因が理解できます。



ライブラリの MS/MS スペクトル内で最も強度が高いピーク 2 つに、 y -および b -イオン (y_{10} 、 b_{10} および y_{12} 、 b_{12}) 両方の注釈が付いていることに注目してください。SRM 測定に使用した

Thermo TSQ では一般的に b-イオンはあまり生成しません。そのため、この今回の測定系では b10 および b12 イオンは検出されないと考えます。

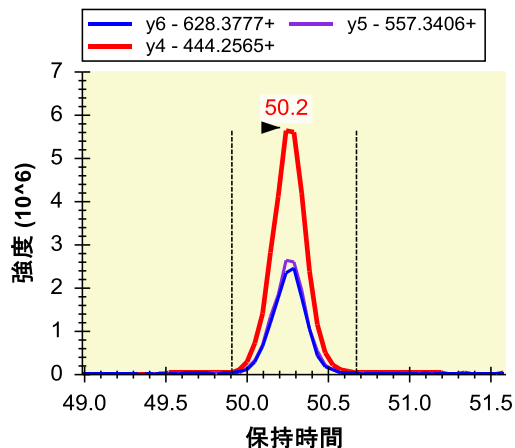
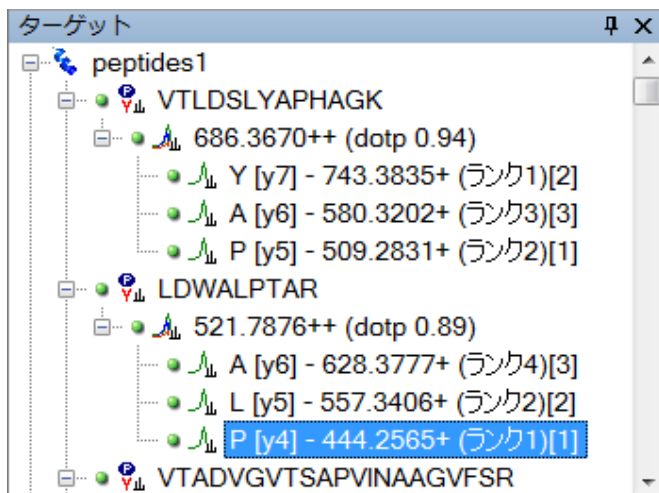
トランジションの詳細を見るためプリカーサーイオンの m/z=1160.5434++を展開します。



左側の()に囲まれた数字はライブラリ内の MS/MS スペクトルにおける強度のランクを示します。右端の[]に囲まれた数字は実際に SRM 測定をした結果から得られる各プロダクトイオンのピーク面積のランクを示します。このランクは、実測値とライブラリ内の MS/MS スペクトルがどの程度一致しているかを判断する指標となります。今回は、Delete キーを押してこのペプチドを消去してください。

次のペプチド (WNTENQLGTVIEVNEQFGR) は明らかに測定が上手く行えていません。なぜなら、ピーク品質アイコンが赤色であり、また dotp 値も 0.63 と非常に小さいからです。これも消去してください。

その次の 3 つのペプチドは、測定可能ペプチドの非常に良い例です。なぜなら、3 つのペプチド全てでピーク品質アイコンが緑色であり、また dotp 値も 0.98 以上と非常に高いからです。各ペプチドに対して 3 つのトランジションを組み込むとして、まずは 1 つ目のペプチドについて考えてみましょう。当該ペプチドを展開して、ライブラリ内の MS/MS スペクトルと SRM 測定の結果が一致していて、かつ強度が高い 3 つのプロダクトイオンを選択し、それ以外の候補をすべて消去します。2 つ目のペプチドでは、ライブラリ内の MS/MS スペクトルにおけるランク 4 のピークはランク 3 とほぼ同一の結果であり、また SRM 測定のランク付けでもトップ 3 に入っていることに注目してください。組み込むトランジションは以下のように考えられるはず



3つ目のペプチドとそのトランジションを見てみると、y3 イオンが SRM 測定結果の中で 3 番目に大きいピーク面積を持つことが分かります。しかし 4 番目にランク付けされた y13 イオンもターゲットとして用いるのに十分なピーク面積を持ちます。強度が高い 4 つのピーク以外をすべて消去して、Shift+F11 を押してズームアウトすると、y3 イオン・y13 イオンの測定はどちらもノイズなどによる影響が少ないことが見て取れます。一般的にトランジションを組む際プロダクトイオンの強度が同じであるなら、できるだけ長い配列を持つイオンを選択しメソッドを構築する方が、より高い選択性を持つ測定が行えます。そのため、今回は y13 イオンをプロダクトイオンとして選択し、トランジションを組むほうがよいでしょう。以上からこのチュートリアルでは、y14、y13、および y11 イオンをプロダクトイオンとして選択します。

同様の方法を続けて、次の 2 つのペプチドを消去します。さらに、その次のペプチドに対して、高強度、低ノイズで、高い選択性のトランジションを選択します。Skyline 最適化フォームを利用して、この作業を再開することも可能です。

自動最適化

Skyline では、ここまで手動で行ってきたメソッド最適化を簡単な操作で自動的に行うことが可能です。

- [編集] メニューで、[調整] を選択して [詳細] をクリックします。
- [結果] タブをクリックします。
- [最大トランジションピークランク] フィールドに「3」と入力します。
- [大きいプロダクトイオンを選択する] チェックボックスをオンにします。
- [結果のないノードを削除] を選択します。
- [線形回帰の目標 R 値] フィールドに「0.95」と入力します。
- [最小ドット積] フィールドに「0.95」と入力します。
- [OK] ボタンをクリックします。

これにより 72 個のペプチド、216 トランジションが組みれます。以下の作業で自動最適化がうまくいっているかどうかを、クロマトグラム内で確認します。

- **[編集]** メニューで、**[すべて折り畳む]** を選択して **[ペプチド]** をクリックします。
- ホームキーを押します。
- 最後のペプチドに到達するまで下向き矢印キーをします。

しかし、ここまでの操作ではペプチド選択に対する閾値の設定が少し厳しすぎるかもしれません。よって、最初の自動最適化での閾値を少し低く設定するために、初期自動最適化と手動での確認を組み合わせた半自動化の方法の手順を追加します。

- **[編集]** メニューで **[元に戻す] (Ctrl+Z)** をクリックします。
- **[編集]** メニューで、**[最適化]** を選択して **[詳細]** をクリックします。
- **[結果]** タブをクリックします。
- **[最大トランジションピークランク]** フィールドに「6」と入力します。
- **[結果のないノードを削除]** を選択します。
- **[線形回帰の目標 r 値]** フィールドに「0.9」と入力します。
- **[最小ドット積]** フィールドに「0.9」と入力します。
- **[OK]** ボタンをクリックします。

この設定では測定対象として 110 個のペプチドが選択され、ピークの品質を示す指標となる dotp 値を計算するのに十分なトランジション数が組みれます。最終的な最適化を手動で行うことができます。

効率的なデータ測定をスケジュールする

編集中の Skyline ドキュメントは、2009 年春に MacCoss lab での実際の実験に使用されました。しかし当時は Skyline に **[最適化]** フォームはなく、dotp 値の計算もできませんでした。したがって、メソッド最適化サイクルのために、当時は手動で測定対象ペプチドを 86 個に削減しました。以下は、当時我々が行ったのと同じ手順です。

- **[編集]** メニューで **[元に戻す] (Ctrl+Z)** をクリックします。
- **[編集]** メニューで、**[結果を管理]** をクリックします。
- **[削除]** ボタンをクリックします。
- **[OK]** ボタンをクリックします。

これで、すべての未最適化の結果およびクロマトグラムが削除されます。

- **[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。
- **[ディレクトリ内にある複数回注入された繰り返し測定を追加]** を選択します。
- **[OK]** ボタンをクリックします。
- **[フォルダの参照]** フォームの **[OK]** ボタンをクリックします。

- 共通プリフィックス「**Unscheduled0**」を削除するか尋ねるフォームが現れますので、**[削除しない]** ボタンをクリックします。

これにより Skyline は、MethodRefine フォルダ内の 2 つのフォルダ (**Unscheduled01** および **Unscheduled02**) から、スケジュール化されていない 2 種の測定結果ファイルを新たにインポートします。各フォルダには 2 つの RAW ファイルが含まれており、これらの RAW ファイルには、最初最適化で選択されなかった全ての測定ペプチドに対して、3 つのスケジュール化されていないトランジションのクロマトグラムが記録されています。

現在のドキュメントには、これらの RAW ファイル内で検出されなかった多数のトランジションも含まれています。検出されたトランジションのみへドキュメントを削減するには、以下の手順を行います。

- **[編集]** メニューで、**[調整]** を選択して **[結果のないものを削除]** をクリックします。

これにより、86 個のペプチドと 255 のトランジションが残ります。

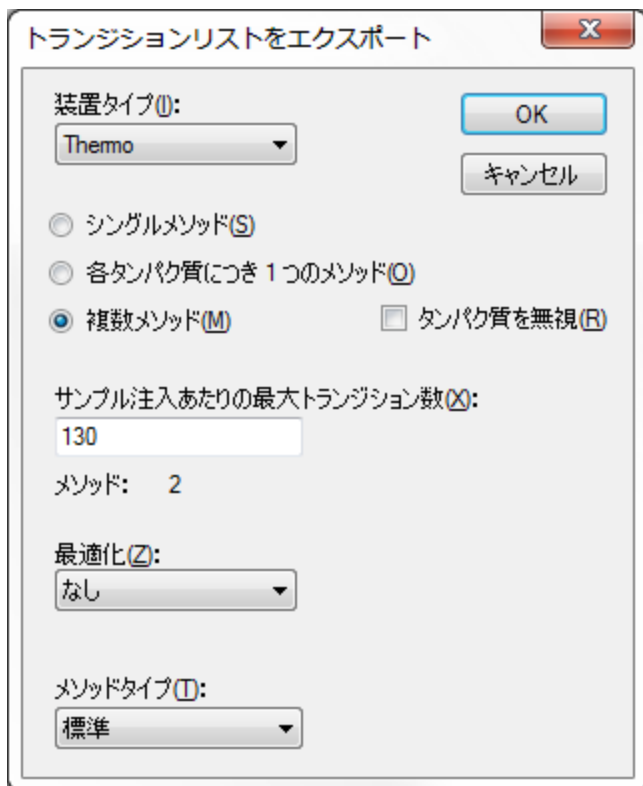
保持時間を測定する

これらのペプチドは 2 回より 4 回別々に注入した方がよいかもしれません。しかし、メソッド最適化の第 2 フェーズの目的は、スケジュール化に必要な予測保持時間を決定することです。したがって、1 サイクルの時間を長くし、時間軸におけるデータポイントを少なくすることによって、必要な注入回数を削減することにしました。

以下の操作により、我々が測定に使用したものと同様のトランジションリストを作成可能です。

- **[ファイル]** メニューで、**[エクスポート]** を選択して **[トランジションリスト]** をクリックします。
- **[サンプル注入あたりの最大トランジション数]** に「130」と入力します。

[トランジションリストをエクスポート] フォームは以下のように表示されるはずです。



- [OK] ボタンをクリックします。
- [ファイル名] フィールドに「Unscheduled」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

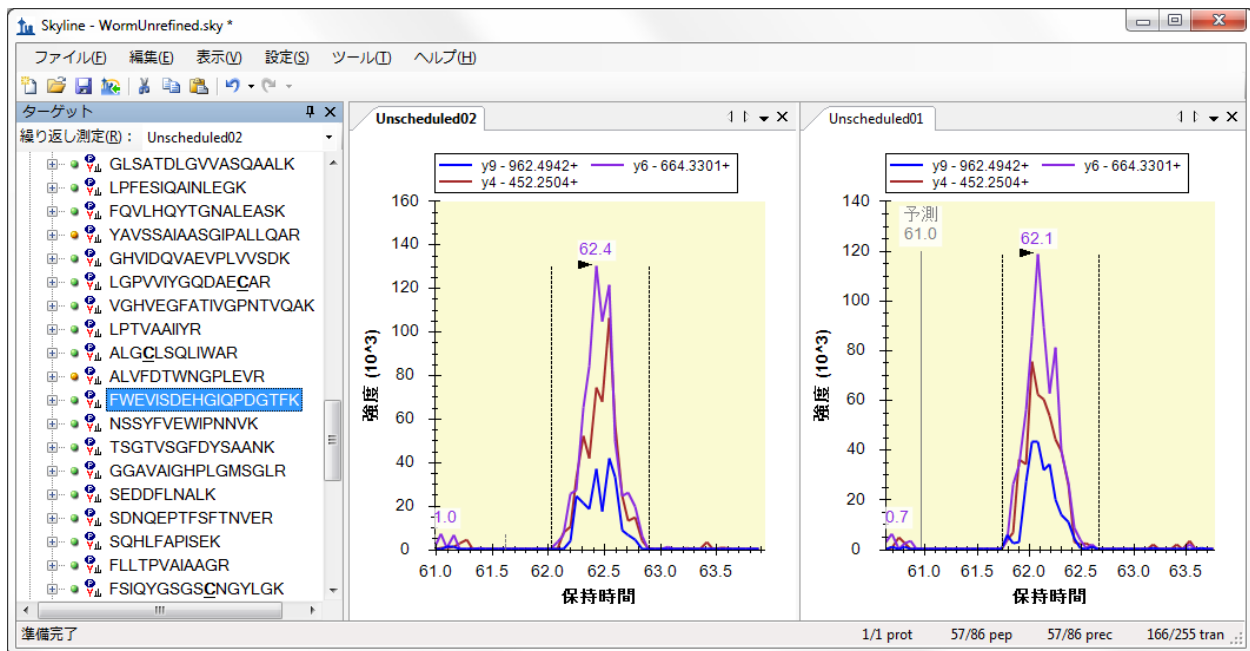
MethodRefine フォルダを調べてみると、2つのトランジションリスト CSV ファイル（Unscheduled_0001.csv および Unscheduled_0002.csv）が見つかります。これらは、先ほどインポートしたファイルのように、新しいデータの収集に利用可能です。

保持時間情報を再確認する

保持時間情報が得られたかを再確認するには以下を行います。

- [MS/MS スペクトル]チャートを閉じます。
- [ビュー] メニューで、[配置] を選択して [タイトル] (Ctrl+T) をクリックします。
- 下向き矢印キーを使用してペプチドを選択します。

2つの CSV ファイルから作成されたクロマトグラムが、以下のように表示されます。

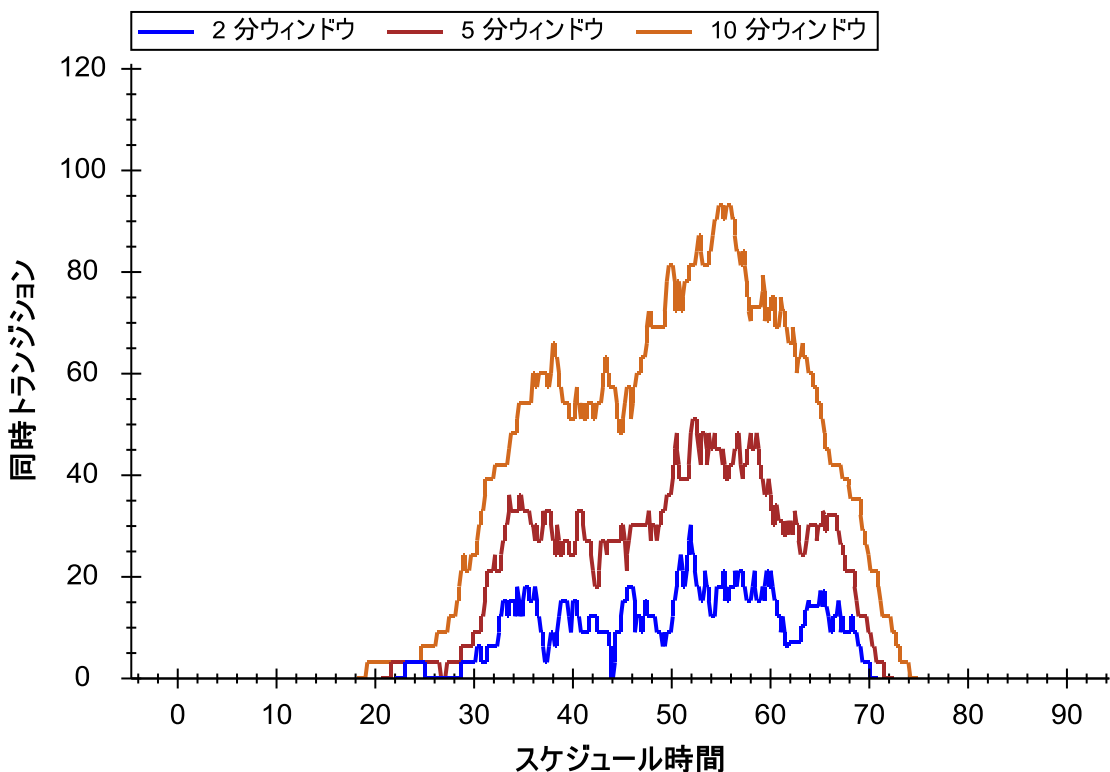


Shift+F11 を押すと取得データの全範囲が表示されます。その後 F11 を押すと、ピークのズームに戻ります。

これらの予測された保持時間を前提として、以下を行うことで、トランジションをスケジュール化する方法の概要を理解することが可能です。

- [ビュー] メニューで、[保持時間] を選択して [スケジュール] をクリックします。

Skyline に以下のようなグラフが表示されます。



このグラフより、測定中のある時間（横軸）において同時に測定する必要のあるトランジション数（縦軸）が、トランジションの測定時間ごとに分かります。1 トランジションの測定時間が長くなるほど、より多くのトランジションを同時に測定する必要が発生します。今回の場合は、各トランジションの測定時間を5分に設定すると、最大で約60のトランジションを同時に測定する必要があります。使用する装置のスピードに応じて1 トランジションあたりの測定時間を設定することにより、1回の測定で各ペプチドの全トランジションで溶出曲線を描くのに十分なデータを取得することができるでしょう。

スケジュール化されたトランジションリストを作成する

各トランジションの測定時間は、クロマトグラフィーの再現性を考慮して決定します。ペプチドの保持時間の変動に対して、短すぎる測定時間を設定すると、ピークの端が欠けてしまう、またはピークが検出できないといった可能性があります。スケジュール化されたトランジションリストを作成する前に、測定間における保持時間の変動幅を理解しておくことが大切です。

最大数のトランジションが同時測定される場合であっても、ペプチドの溶出曲線を描くのに十分なデータが得られるサイクル時間となるように測定時間を決定する必要があります。我々はこの実験で測定時間を4分とすることでこれを達成しました。同一のことは行うには、以下の手順を実行します。

- **[保持時間]** ビューを閉じます。
- **[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。
- [時間枠] フィールドに「4」を入力します。

[ペプチド設定] フォームは以下のように見えるはずですが。

The screenshot shows a dialog box titled "ペプチド設定" (Peptide Settings). It has a close button (X) in the top right corner. Below the title bar are five tabs: "消化" (Digestion), "予測" (Prediction), "フィルタ" (Filter), "ライブラリ" (Library), and "修飾" (Modification). The "予測" tab is active. Inside the dialog, there is a section for "保持時間予測(B):" (Retention Time Prediction) with a dropdown menu showing "WomUnrefined" and a small icon to its right. Below this is a checked checkbox labeled "保持時間の実測値があれば使用する" (Use if measured retention time is available). Underneath is a section for "時間枠(D):" (Time Frame) with a text input field containing the number "4" and the unit "分" (minutes). At the bottom of the dialog are two buttons: "OK" and "キャンセル" (Cancel).

- [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] を選択して [トランジションリスト] をクリックします。
- [シングルメソッド] を選択します。
- [メソッドタイプ] リストで [スケジュール] を選択します。

[トランジションリストをエクスポート] フォームは以下のように表示されます。

トランジションリストをエクスポート

装置タイプ(I): Thermo

OK
キャンセル

シングルメソッド(S)
 各タンパク質につき1つのメソッド(O)
 複数メソッド(M) タンパク質を無視(R)

最大同時トランジション数(X):

メソッド: 1

最適化(Z): なし

メソッドタイプ(I): スケジュール

エネルギー勾配を追加(E)
 トリガーと参照を追加(N)

- [OK] ボタンをクリックします。
- 表示される [スケジュールデータ] フォームで [平均保持時間を使用] を選択します。
- [OK] ボタンをクリックします。
- [ファイル名] フィールドに「Scheduled」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

MethodRefine フォルダ内に、新たにスケジュール化された SRM トランジションリストファイル (Scheduled.csv) が作成されます。当該ファイルを Excel で開くと、4 分間の測定の開始・停止時間が D 列および E 列に追加されていることが確認できます。

	A	B	C	D	E	F	G
1	686.367	743.3835	26.7	39.01	43.01	1	VTLDSLYAPHAGK
2	686.367	580.3202	26.7	39.01	43.01	1	VTLDSLYAPHAGK
3	686.367	509.2831	26.7	39.01	43.01	1	VTLDSLYAPHAGK
4	521.7876	628.3777	21.1	54.29	58.29	1	LDWALPTAR
5	521.7876	557.3406	21.1	54.29	58.29	1	LDWALPTAR
6	521.7876	444.2565	21.1	54.29	58.29	1	LDWALPTAR
7	1016.047	1389.748	37.9	62.81	66.81	1	VTADVGVTAPVINAAGVFSR
8	1016.047	1130.632	37.9	62.81	66.81	1	VTADVGVTAPVINAAGVFSR
9	618.8146	909.4676	24.4	29.32	33.32	1	VGGNGADYALATK
10	618.8146	781.409	24.4	29.32	33.32	1	VGGNGADYALATK
11	618.8146	319.1976	24.4	29.32	33.32	1	VGGNGADYALATK

複数繰り返し測定結果を確認する

ここまでの操作で SRM メソッド最適化サイクルを開始する準備が完了しました。我々はペプチドのターゲットモードでの測定で生じる以下のような問題を明らかにするため、次の実験において複数の繰り返し測定を行いました。

- ピーク面積の変動
- 保持時間の変動
- 潜在的な干渉

このメソッドを用いた 5 回の繰り返し測定の結果を確認するには、以下の手順を実行します。

- **[編集]** メニューで、**[結果を管理]** をクリックします。
- **[すべて削除]** ボタンをクリックします。
- **[OK]** ボタンをクリックします。

これにより、スケジュール化されていない繰り返し測定およびクロマトグラムグラフが削除されるはずですが。

- **[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。
- **[ファイル内の 1 回注入された繰り返し測定を追加]** (初期設定) を選択します。
- **[OK]** ボタンをクリックします。
- ファイル「Scheduled_REP01.RAW」をクリックします。
- 「Scheduled_REP05.RAW」ファイルをシフト・クリックして、5 つのファイルを選択します。
- **[開く]** ボタンをクリックします。
- 共通プリフィックスを削除するか尋ねるフォームの中で、**[共通プリフィックス]** フィールドに「Scheduled_」が含まれるよう編集します。
- **[削除]** ボタンをクリックします。

5 回の繰り返し測定ごとにタブが作成され、データのインポートが開始されます。Skyline ウィンドウ下部のステータスバーに、進行状況が表示されます。

インポートが完了すると、スケジュール化されていない測定内で測定された一部のペプチドが、スケジュール化された測定では削除されたことがわかります。以下の手順に従い、測定されたペプチドのみを残してドキュメントを縮小することができます。

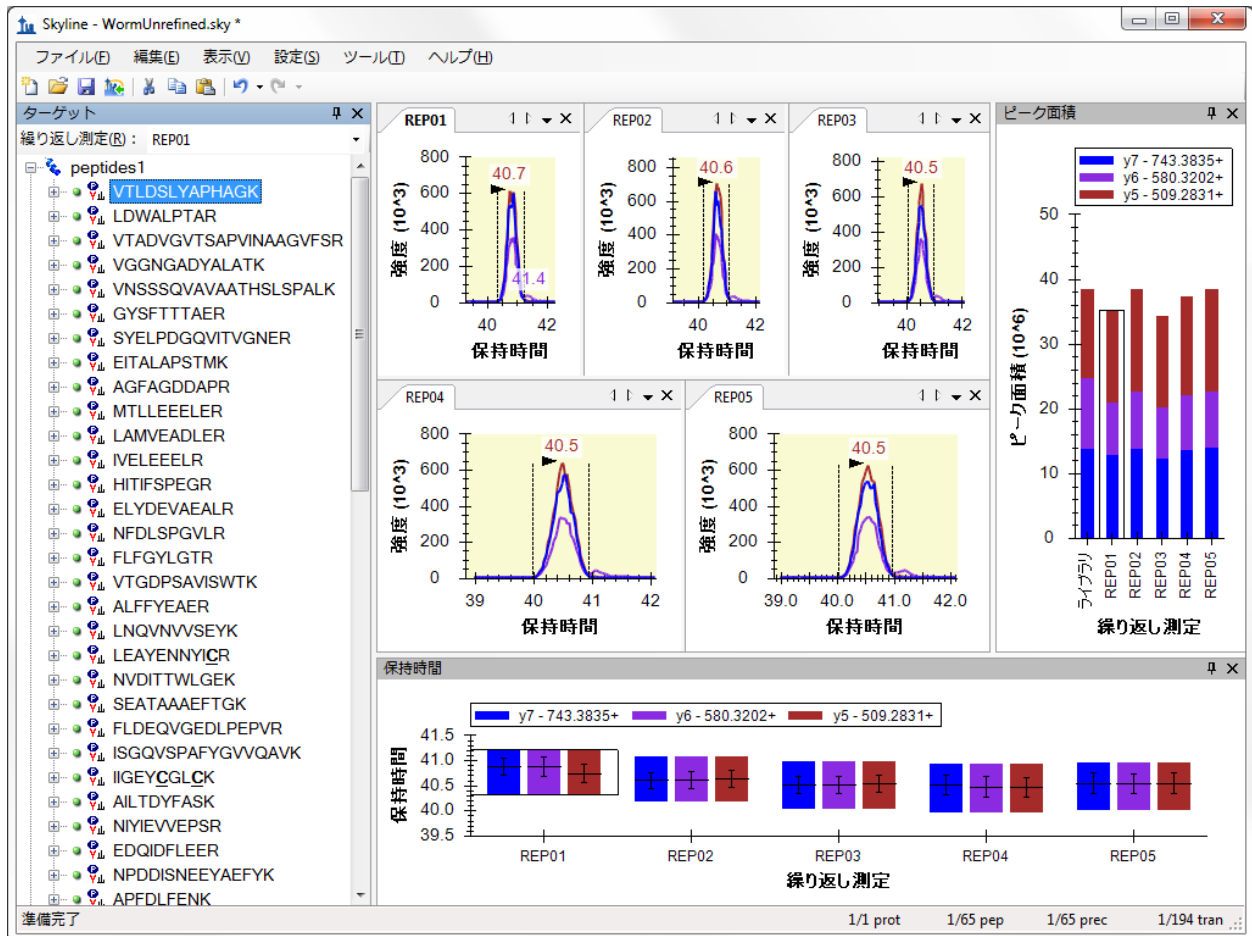
- **[編集]** メニューで、**[調整]** を選択して **[結果のないものを削除]** をクリックします。

これらのデータを確認するには、以下を行います。

- **[ビュー]** メニューで、**[グラフを配置]** を選択して **[タイトル]** (Ctrl+T) 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 **[繰り返し測定比較]** (F8) をクリックします。

- 表示されたウィンドウをドラッグして、Skyline ウィンドウ下部端にある矢印の上にカーソルを置き、リリースします。
- [ビュー] メニューで、[ピーク面積] を選択して [繰り返し測定比較] (F7) をクリックします。
- 表示されたウィンドウをドラッグして、Skyline ウィンドウ右端にある矢印の上にカーソルを置き、リリースします。
- クロマトグラムグラフの1つを右クリックして、クリックします。

Skyline ウィンドウが以下のように見えるまで、スプリッターおよびウィンドウサイズを調整します。



ここで下向き矢印キーを使用すると、これらのペプチドについて収集したデータを確認することが可能です。複数の繰り返し測定により最適化した SRM メソッドの詳細については、その他のチュートリアルで説明いたします。

まとめ

この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を作成し、繰り返し測定を伴う定量研究用にそれらを最適化する Skyline の強力なツールについて紹介しました。チュートリアルにおいて 2 回以上のメソッド最適化サイクルを行ったことで、Skyline を自身のプロテオミクス研究を展開するのに役立てることができるはずです。今回行ったこと以外に、衝突エネルギー（CE）といった装置パラメータの最適化、定量精度改善のための標識付き内部標準ペプチドの導入、または校正曲線の実行なども Skyline を用いて行うことができます。その他の Skyline チュートリアル・Skyline 機能も利用して、ターゲットプロテオミクス実験に Skyline を最大限活用してください。

参考文献

1. Prakash,A. *et al.* Expediting the development of targeted SRM assays: Using data from shotgun proteomics to automate method development. *J Proteome. Res.* 2009.
Ref Type: In Press
2. Sherwood,C.A. *et al.* Correlation between γ -type ions observed in ion trap and triple quadrupole mass spectrometers. *J. Proteome. Res.* **8**, 4243-4251 (2009).
3. Krokhin,O.V. Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-Å pore size C18 sorbents. *Anal. Chem.* **78**, 7785-7795 (2006).
4. Stein,S.E. & Scott,D.R. Optimization and Testing of Mass-Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification. *JASMS* **5**, 859-866 (1994).
5. Tabb,D.L., MacCoss,M.J., Wu,C.C., Anderson,S.D., & Yates,J.R., III Similarity among tandem mass spectra from proteomic experiments: detection, significance, and utility. *Anal. Chem.* **75**, 2470-2477 (2003).