

Skyline によるターゲットメタボロミクス解析

Skyline ターゲットプロテオミクス環境で、Skyline ドキュメントにインポートした代謝物測定 Raw データも解析可能です。本来プロテオミクスの使用目的で開発された Skyline ですが、メタボライト（代謝産物）をはじめとする小分子を扱う作業にも利用ができるようになっています。実際 Skyline を利用したさまざまなタイプのデータ解析（SRM、MS1 フィルタ DIA、ターゲット MS/MS、など）のためのチュートリアルも用意されています。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 MRM 検定構築を例にしながら、メタボライトなどの小分子をターゲットとする Skyline の利用をについて説明します。

します。

Skyline は、ターゲット定量的質量分析研究のための装置（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います。Agilent、SCIEX、Bruker、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することが可能です。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、装置間の比較および複数施設間での共同研究や比較も可能になります。

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/SmallMolecule.zip>

この中のファイルを、コンピュータ上のフォルダで解凍します:

C:\Users\bspratt\Documents

これにより新しいフォルダが作成されます:

C:\Users\bspratt\Documents\SmallMolecule

このフォルダには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。ここで Skyline を起動すると、新しいドキュメントが表示されます。

トランジションリストのインポート

メタボライト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、空白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: [ファイル]>[インポート]>[トランジションリスト]メニュー項目は、非プロテオミクスデータには対応しておらず、どの列がメタボライトに対応するか判別できません。]

最初に各プリカーサーおよびプロダクトの電荷状態、イオン組成または質量 (m/z) を、Skyline で指定する必要があります。プロダクトイオン情報がない場合、入力値はプリカーサーターゲットの数値と認識されます。質量の同じプリカーサーから対応するプロダクトが複数存在する場合は、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。

イオン組成についての注意

プロテオミクスの場合はプロトン化によるイオン化が一般的です。そのため電荷ペプチドを説明するのに必要とされるものは、その配列および電荷状態に簡略化されます。そのため Skyline では必要に応じて、陽子（電子が1つ取れた水素）を化学式に追加するだけですみます。しかしながらメタボライトなどの多くの低分子の場合、イオン化はナトリウム獲得、水素損失、など様々な可能性が考えられます。Skyline が採用する最も信頼性が高い方法はイオンの組成を利用するものです。例えば単一電荷分子がナトリウム獲得によりイオン化される場合、Skyline インターフェイスで提示するイオン組成にナトリウム原子を追加することになります。（注: トランジションリストをプリカーサーおよびプロダクト両方の m/z 値の観点から完全に説明することも可能ですが、イオン組成の情報すなわち化学式なしでは Skyline は同位体分布を提供できません）。

トランジションリストの挿入

メタボライトをターゲットとする Skyline ドキュメントを作成するには以下の手順を実行します:

- Excel 内で「SMTutorial_TransitionList.csv」ファイルを特定して開きます。
- [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 に [挿入] フォームが以下のように表示されます:

挿入

トランジションリスト

	ペプチド	プリカーサー m/z	プロダクト m/z	タンパク質名	タンパク質の説明
*					

ペプチド(P)
 小分子(M)

起動されたら、以下の手順で小分子フィールドを受け入れるよう変更します:

- フォーム下部の [小分子] を選択します。

フォームは以下ようになります:

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	プロダクト名	プリカーサー公式	プロダクト公式	プリカーサー m/z	プロダクト m/z	プリカーサー電荷	プロダクト電荷	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
*												

ペプチド(P)
 小分子(M)

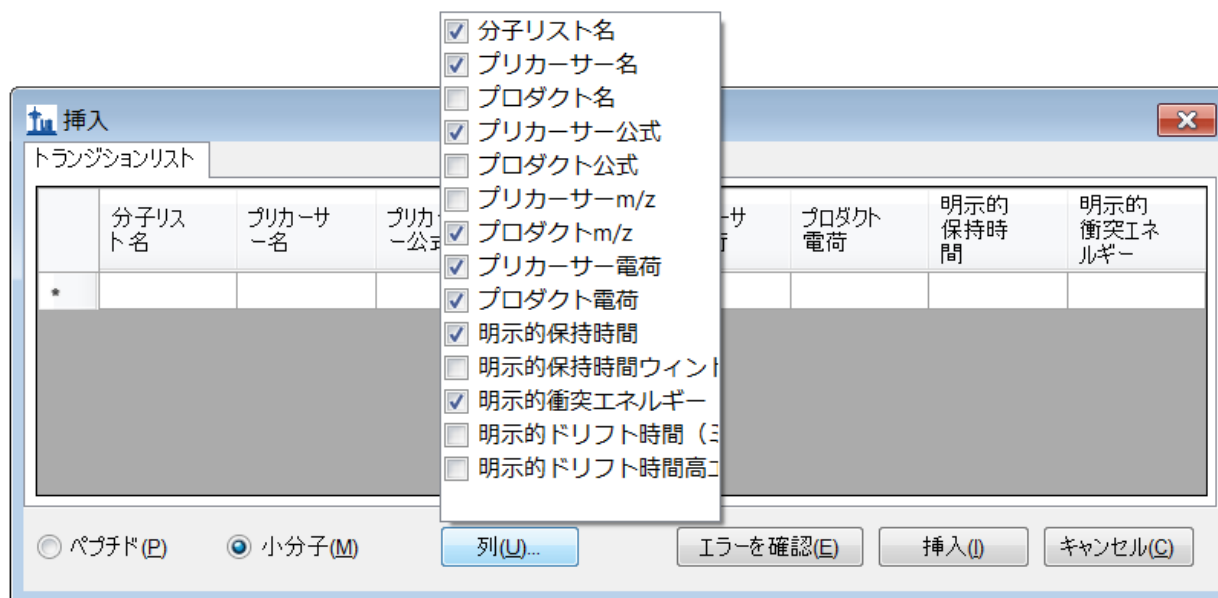
トランジションリストスプレッドシートに、以下の値が見えます:

Molecule List Name	Precursor Name	Precursor Formula	Precursor Charge	Precursor RT	Precursor CE	Product m/z	Product Charge
Amino Acid	Methionine	C5H12NO2S	1	2.5	15	104.07	1
Amino Acid	d3-Methionine	C5H9H'3NO2S	1	2.5	15	107.09	1
Amino Acid	Isoleucine	C6H14NO2	1	3.05	15	86.096	1
Amino Acid	Leucine	C6H14NO2	1	3.13	15	86.096	1
Amino Acid	d3-leucine	C6H11H'3NO2	1	3.13	15	89.1	1
Amino Acid	Phenylalanine	C9H12NO2	1	3.27	15	120.08	1
Amino Acid	13C6-Phenylalanine	C3C'6H12NO2	1	3.27	15	126.11	1
Amino Acid	Arginine	C6H15N4O2	1	2.01	15	116.07	1
Amino Acid	13C5-Arginine	C1C'5H15N4O2	1	2.01	15	121.11	1
Amino Acid	Ornithine	C5H13N2O2	1	1.1	15	70.07	1
Amino Acid	Ornithine	C5H13N2O2	1	1.1	15	116.07	1
Amino Acid	d2-ornithine	C5H11H'2N2O2	1	1.1	15	72.07	1
Amino Acid	d2-ornithine	C5H11H'2N2O2	1	1.1	15	118.07	1
Organic Acid	creatine	C4H10N3O2	1	1.1	15	90.06	1
Organic Acid	d3-creatine	C4H7H'3N3O2	1	1.1	15	93.06	1
5'-methylthioadenosine	MTA	C11H16N5O3S	1	3.4	15	136.1	1
5'-methylthioadenosine	d3-MTA	C11H13H'3N5O3S	1	3.4	15	136.1	1
S-adenosyl methionine	SAM	C15H23N6O5S	1	3	15	250.11	1
S-Adenosyl homocysteine	SAH	C14H21N6O5S	1	3	15	136.08	1
Polyamine	Spermidine	C7H20N3	1	3.59	15	129.15	1
Polyamine	Spermine	C10H27N4	1	3.82	15	112.112	1

[挿入] フォーム内に追加の列ヘッダーがあるのが見えますが、列の順序はスプレッドシート内のフォームとは同一ではありません。これは簡単に修正できます:

- [列] ボタンをクリックして、スプレッドシートに表示されていない列のチェックをオフにします。

これにより、列選択メニューは以下のように表示されます:



次に、以下の手順で [挿入] フォーム内の列を再並べ替えします:

- 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一致する順序へと移動させます。

[挿入] フォームは以下のように表示されます:

	分子リスト名	プリカーサー名	プリカーサー公式	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
▶▶								

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、以下の手順を実行します:

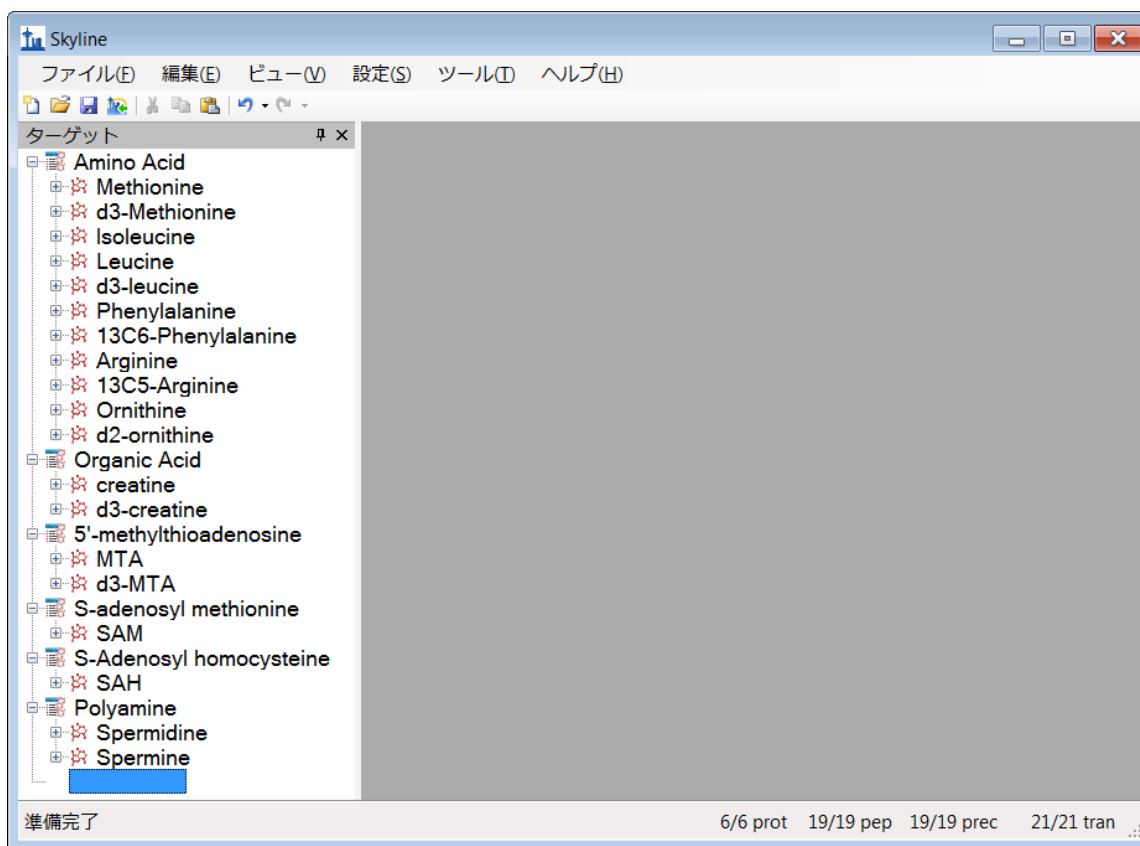
- ヘッダーを含む最初の行を除く、スプレッドシートのコンテンツを選択します。
- ツールバーの [コピー] ボタンをクリック。
- Skyline に戻ります。
- キーボードの Ctrl-V を押して貼り付けます。
- [エラーを確認] ボタンをクリック。

注: 誤ってヘッダーの行をコピーした場合、または列順序が違う場合は、この時点で誤りが認識できません。誤りがない場合、「挿入」フォームは以下のように見えます:



- [挿入] ボタンをクリック。

これで Skyline ドキュメントは以下のように見えます:



ターゲットの一部は、例えばメチオニンと d3-メチオニンといった、重同位体標識のが存在することがあります。単一ペプチド元素内の同位体標識プリカーサーを Skyline でグループ化する

ることに慣れている場合、上記を小分子の機能欠損と見なしてしまう可能性があるので注意が必要です。

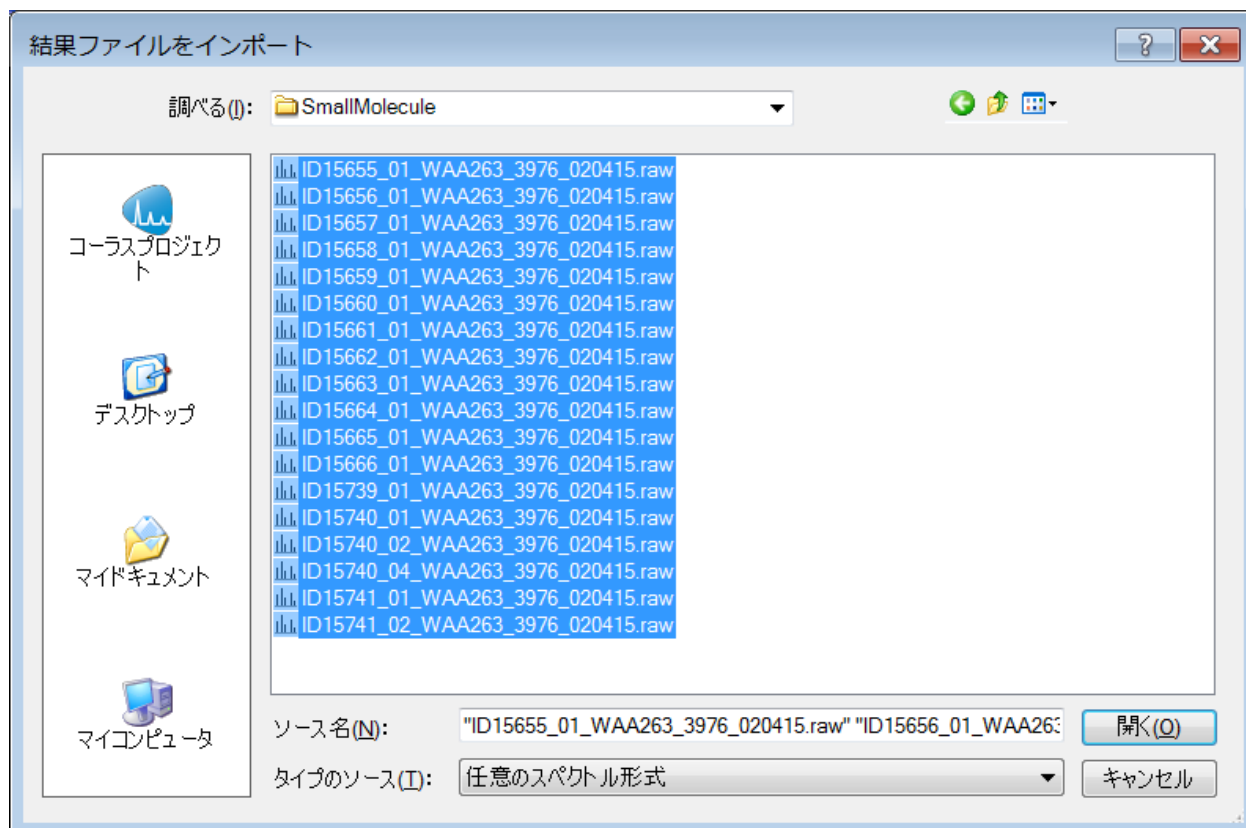
この時点で、装置メソッド、プリカーサー単離リスト（PRM用）、またはトランジションリスト（SRM用）のいずれかをエクスポート可能です。この手順の実行方法の詳細については、[ターゲットメソッドの編集](#)、[定量実験](#)、または[ターゲット MS/MS（PRM）チュートリアル](#)をご覧ください。

Raw Data File のインポート

本チュートリアルでは、エクスポートされた MassLynx 装置メソッドを利用して取得した raw データを、Waters Xevo TQS 装置からインポートします。これを行うには、以下の手順を実行します。

- [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、「Amino Acid Metabolism.sky」として作成したチュートリアルフォルダ内に保存します。
- [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] フォーム内の [OK] ボタンをクリックして、1 回注入された繰り返し測定をインポートします。
- 最初にリストされた項目をクリックし Shift キーを押し下げながら最後の項目をクリックして、チュートリアルフォルダ内の 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見えます：



- [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聞かれた場合は、[削除しない] ボタンをクリックします。

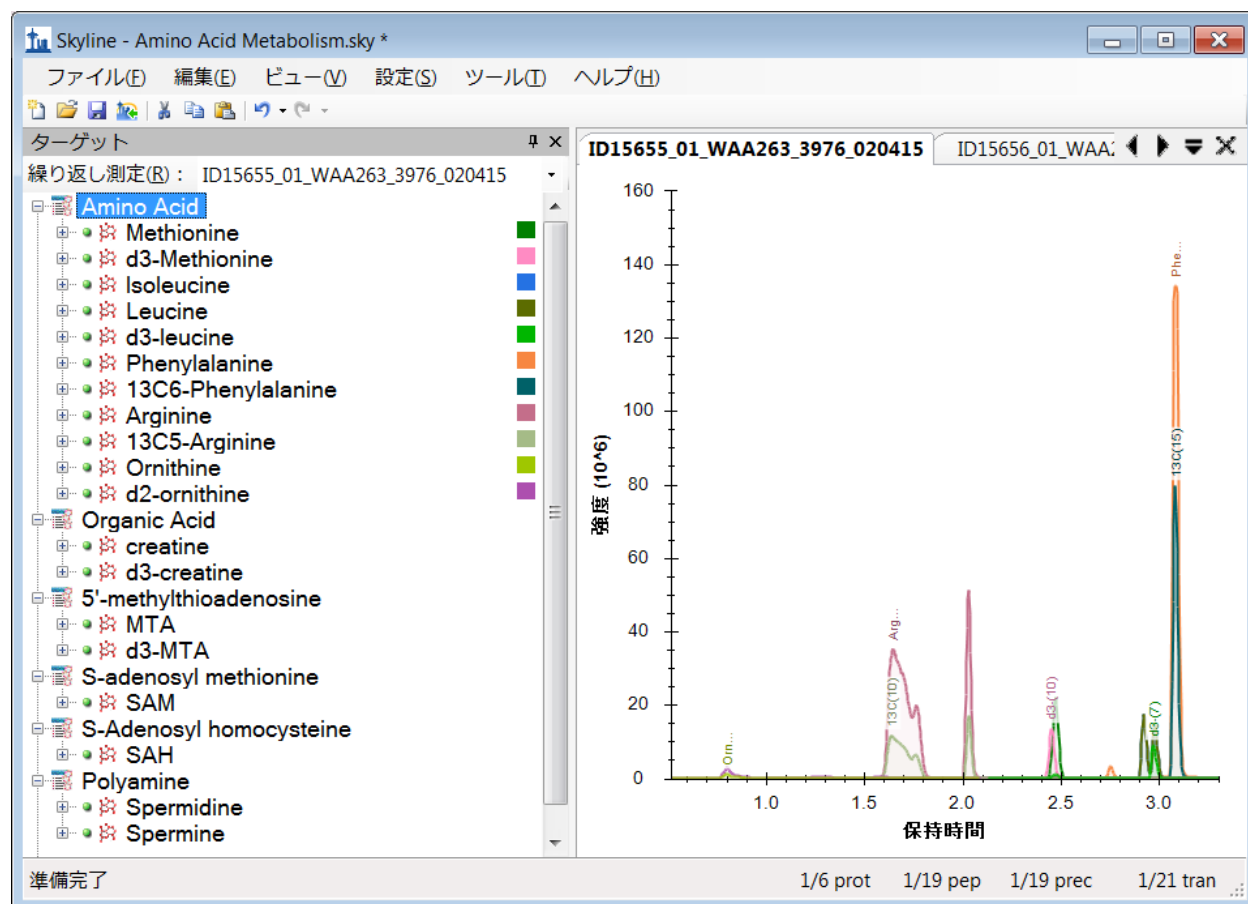
当該ファイルは、特定のアミノ酸欠乏条件下のがん細胞株の代謝物データです。メチオニン、アルギニン、または両方を3時間欠乏させて代謝にどのような変化が生じるのかを調べています。¹

ファイル名および条件は以下の通りです:

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

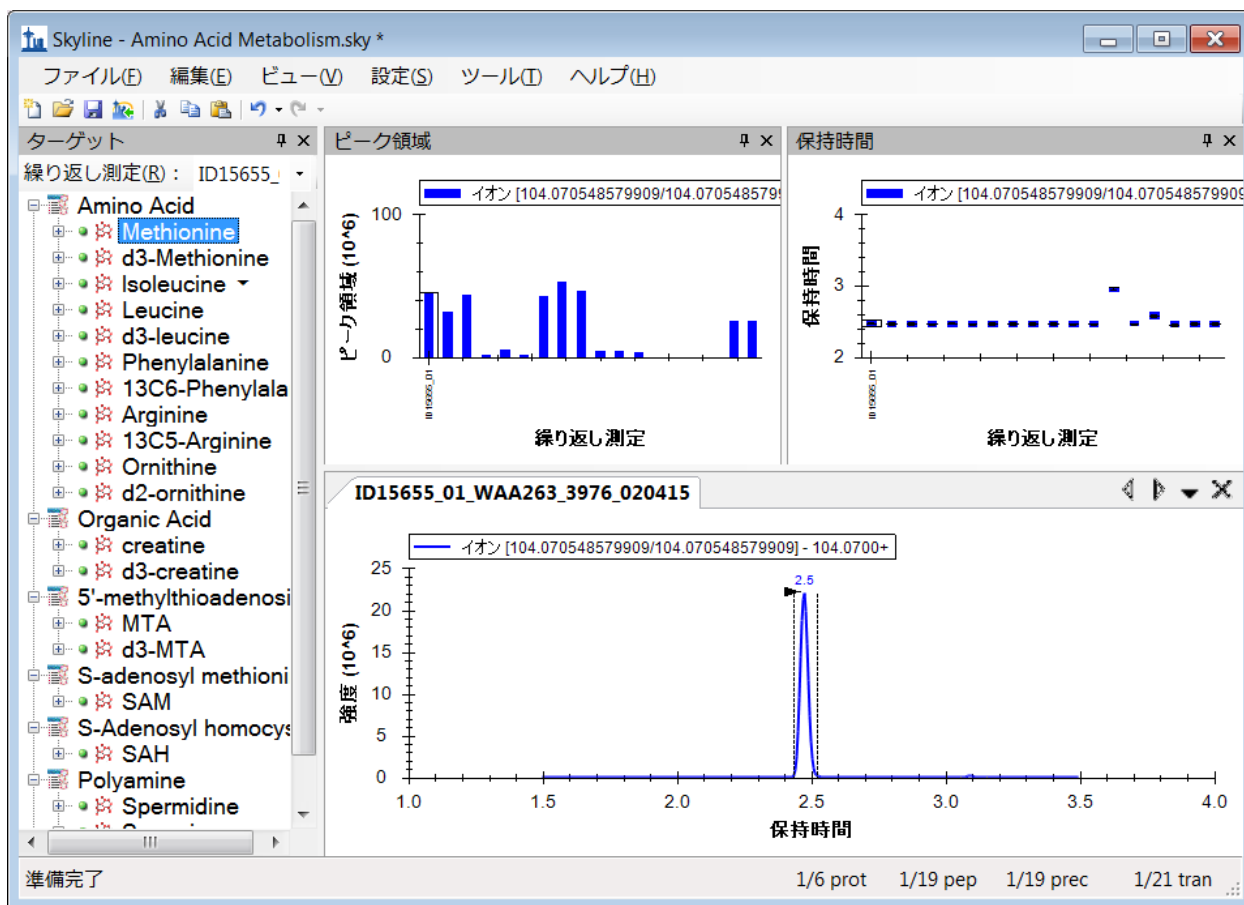
当該ファイルは瞬時にインポートされ、Skyline ウィンドウはこのように見えます:



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、以下の手順を実行します:

- [ビュー] メニューで、[ピーク領域] を選択して [繰り返し測定比較] 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 [ピーク領域] 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重ね合わせます。
- [ターゲット] ビュー内の最初のターゲット「Methionine (メチオニン)」を選択します。

Skyline ドキュメントは以下のように見えます:



本チュートリアルでは、プリカーサーイオン組成およびプロダクトイオン m/z を指定したメタボライトのターゲットメタボロミクスデータの解析を紹介しました。代謝学研究でよく見られるように得られた複数の測定データセットをインポートし、既存の Skyline 機能を利用して、データ解析を行うのは今後急速に発展することが期待されるメタボロミクス分野で必要不可欠な解析技術となるでしょう。

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).