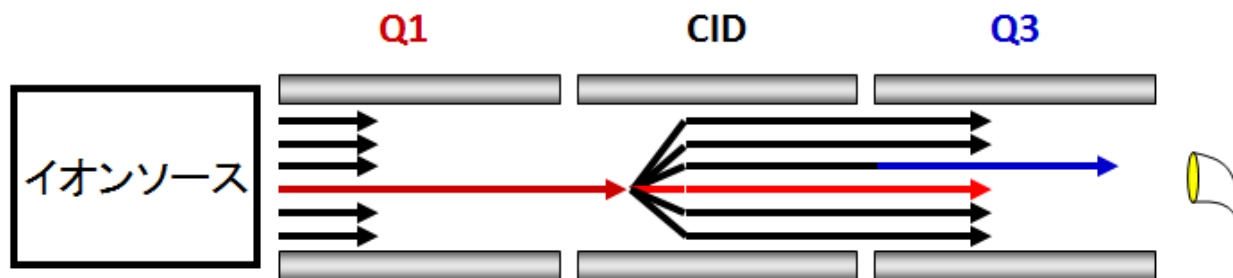


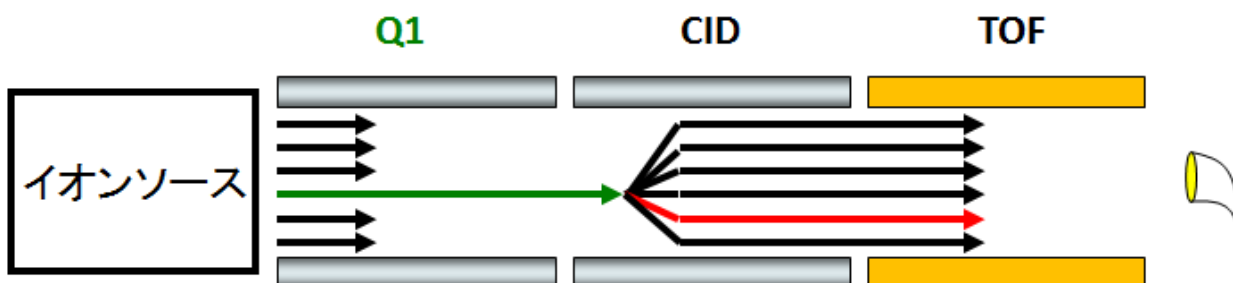
Skyline ターゲット MS/MS (PRM)

Skyline では、イオントラップや 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もとづく、定量を実施するための複数メソッドをサポートできるようになりました。これまでのトリプル四重極質量分析計での Selecte Reaction Monitoring (SRM、選択反応モニタリング) におけるサポートと同様に、Skyline では、AB SCIEX、Agilent、Thermo-Scientific、および Waters の質量分析計ベンダー4 社の装置において、引き続き、これらの新たな分析メソッドについてもサポートしていきますし、さらに、Bruker の Q-TOF 装置も加わえ、これらの高分解能および低分解能の質量分析装置にしても柔軟にサポートしています。

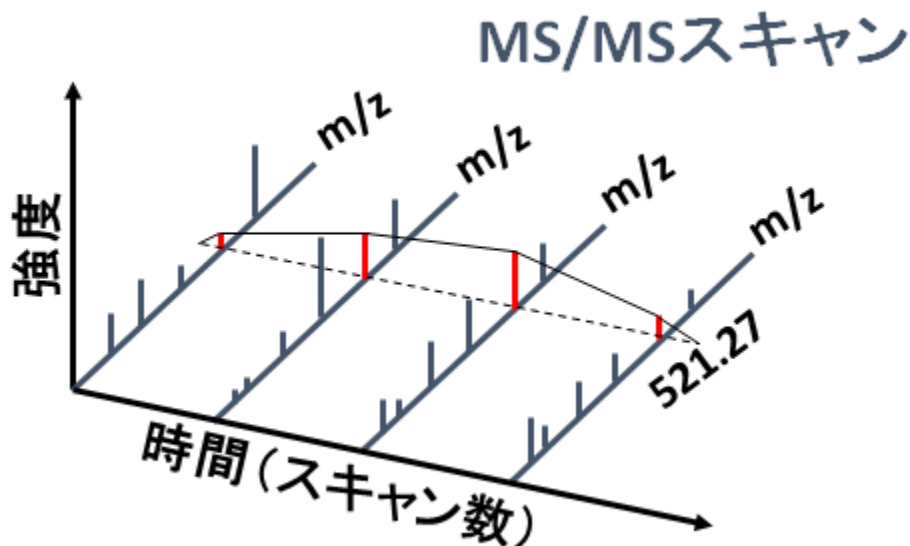
このチュートリアルでは、Skyline を使用してターゲット MS/MS データを分析する方法を学びます。これは、Parallel Reaction Monitoring (PRM、並列反応モニタリング) として知られており、pseudo-SRM および MRM-HR™ とも呼ばれている方法です。これらの別名により示唆される通り、ターゲット MS/MS はトリプル四重極質量分析計における SRM と非常によく似たフルスキャン測定によるメソッドです。



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に対し、スキャンすることで、それぞれのトランジションにおける強度を経時的に収集していくように、ターゲット MS/MS はプリカーサーイオンのリストに基づくスキャンで、それぞれのプリカーサーイオンに対するフル MS/MS スキャンのデータを収集していきます。



Skyline により、この分析法で取得された生のスキャンデータから、各々のクロマトグラムが抽出されます。



その結果、抽出されたクロマトグラムにより、これまでに慣れ親しんできた Skyline のユーザーインターフェイス内で、トリプル四重極質量分析計での SRM データのような定量的データが得られます。

トリプル四重極質量分析計を使用できない場合の手段として、このターゲット MS/MS はその代わりとして使用することが可能です。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場合があります。収集されたスキャンデータから統合されたクロマトグラムのピークを確認することでペプチド検索結果の検証にも役立てることが可能です。また、ターゲット MS/MS は、広くフルスキャン型の装置のデータ確認に使用することができますし、Data Dependent Acquisition (DDA) でのペプチド-スペクトルマッチングによるペプチド同定のパイプラインの結果の確認 (Quality Control) にも利用することも可能です。しかし、この Quality Control アプローチについては個別のチュートリアルで説明いたします。この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のための、ターゲット MS/MS の利用について見ていきます。

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/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。

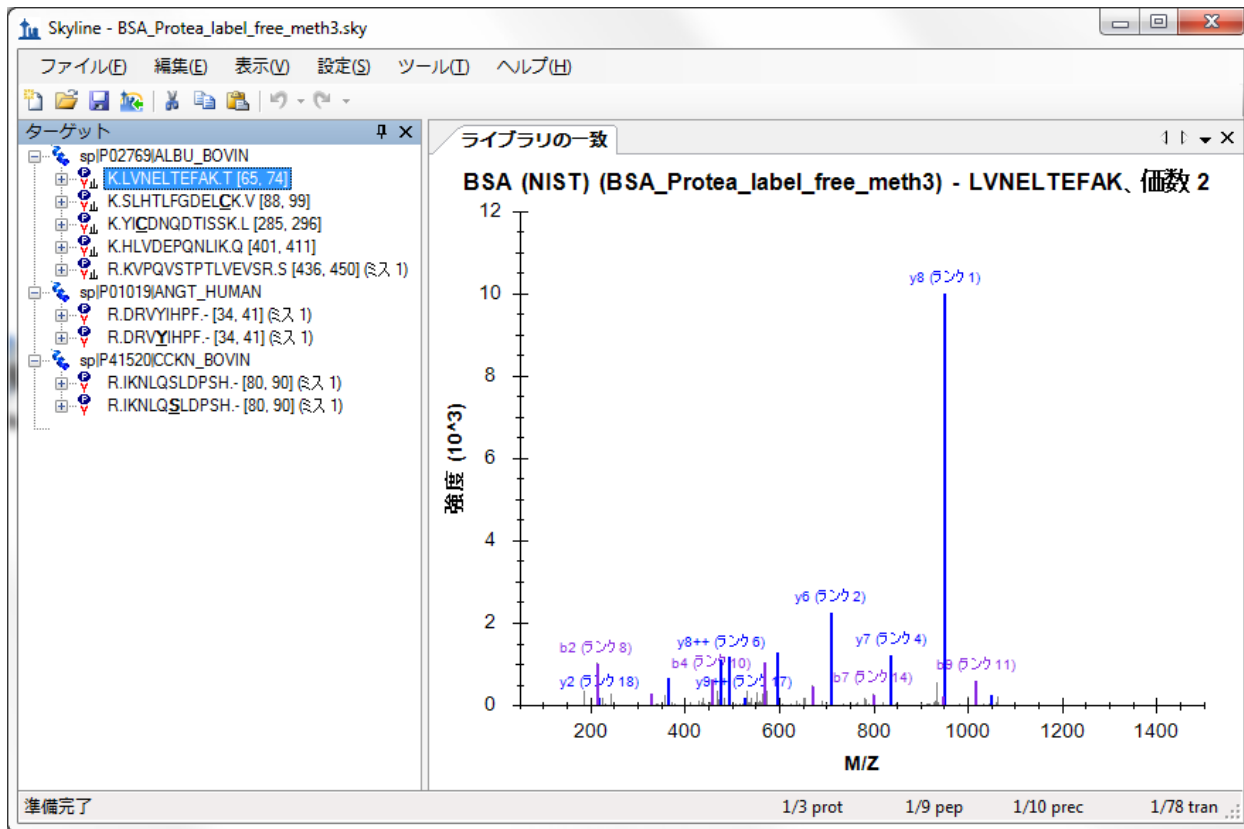
C:\Users\brendanx\Documents

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

この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 の Explorer 内で新たに作成された、「TargetedMSMS」フォルダから、その中の「Low Res」というサブフォルダに移動します。低分解能の Thermo LTQ でのターゲット MS/MS データの分析のチュートリアルで使用する 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。

Skyline のドキュメント内の一つ目のペプチドを選択します。Skyline では、以下のようになっているはずです。



これは比較的小さなドキュメントです。合計 78 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が、ステータスバーの右下のインジケータに示されています。これらの複数のプリカーサーは、NIST より公開されているライブラリのウシ血清アルブミン (BSA) の MS/MS ライブラリスペクトルと関連付けられたものと、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を受けたヒトとウシのペプチド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、Skyline のメソッド編集機能などの数々の入門チュートリアルおよび取扱説明ビデオが別に準備されています。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のメソッドの編集方法として 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。

ターゲット MS/MS 用の Skyline ドキュメントを構成する

Windows Explorer を利用すると、この Skyline ドキュメントの中の同一の「Low Res」フォルダ内に、2 つの Thermo の Raw ファイルを見つけることができます。これらのファイルには、下記のメソッドにより上述のターゲット MS/MS のアプローチで、低分解能の LTQ の装置により取得された MS1 および MS/MS スキャンのデータが含まれています。

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、このようなターゲット MS/MS のメソッドを、Thermo-Scientific、Bruker Daltonik、および AB SCIEX の装置用にエクスポートすることが可能です。Agilent の装置および Thermo Q Exactive については、Isolation List と呼ばれるものをエクスポートすることが可能であり、Waters については、現在準備中です。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は、フルスキャンデータの分析用のドキュメントをあらかじめ設定しておく必要があります。

現在の Skyline ドキュメントをこのチュートリアルで準備されている Thermo の Raw ファイルの分析用に設定するには、以下の手順を実行します。

- [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。

このドキュメントは、まだフルスキャンデータからのクロマトグラム抽出向けに設定されていません。SRM データについては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っています。

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): プリカーサーイオンの分析装置タイプ(E):

ピーク(K): 分解能(O): m/z

同位体標識濃縮度(B):

MS/MS フィルタ(S)

取得メソッド(C): プロダクトイオンの分析装置タイプ(M):

単離スキーム(L): 分解能(O): m/z

保持時間のフィルタ

MS/MS IDから 数分以内のスキャンのみを使用

予測されるRTから 数分以内のスキャンのみを使用

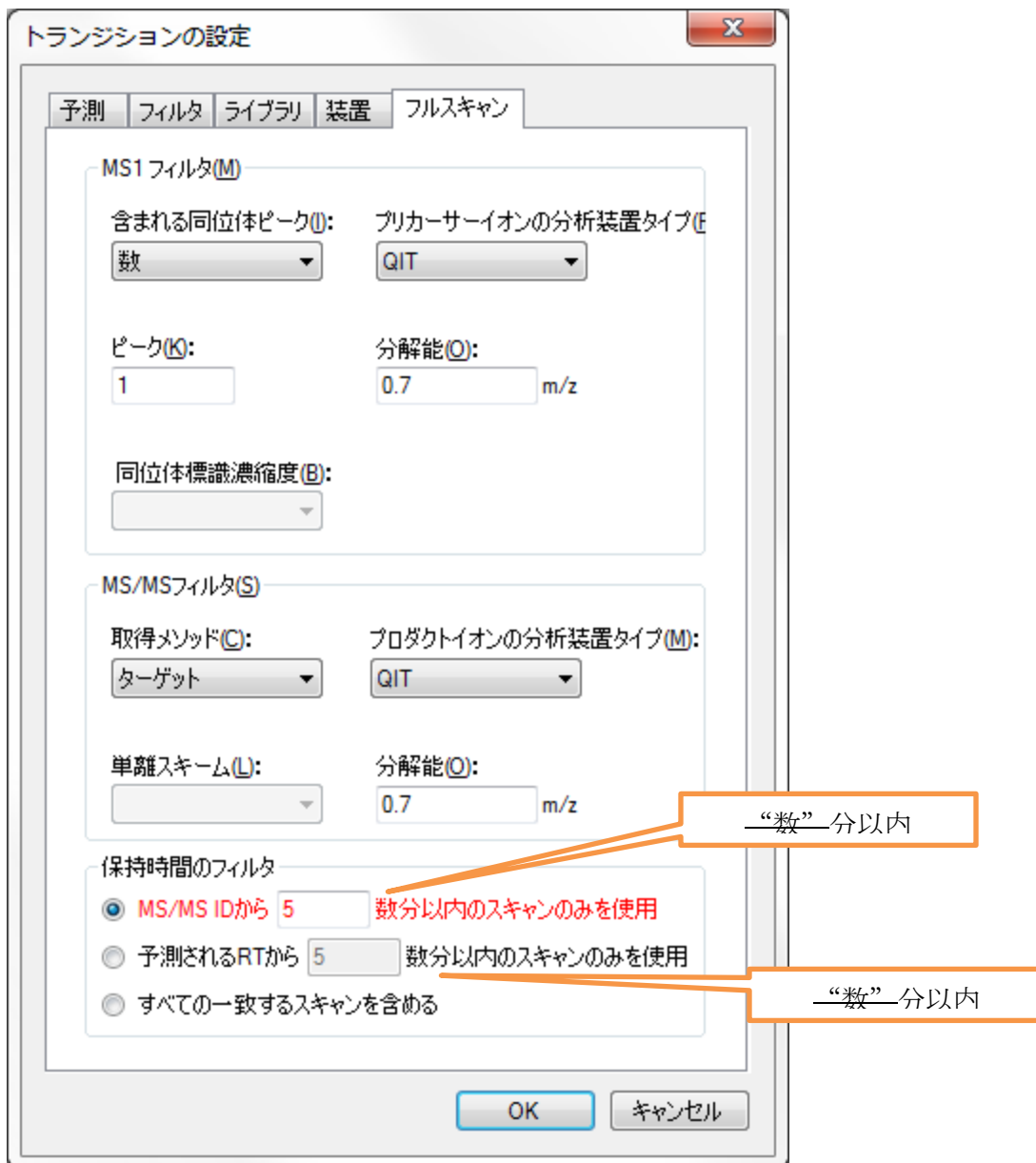
すべての一致するスキャンを含める

OK キャンセル

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 フィルタで、[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。
- [プリカーサー質量分析装置] ドロップリストから、「QIT」を選択します。
- MS/MS フィルタの [取得メソッド] ドロップリストから「ターゲット」を選択します。
- [プロダクトイオンの分析装置タイプ] ドロップリストから「QIT」を選択します。

[フルスキャンタブ] タブは次のようになっています。



注: 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マスキングクロマトグラムが MS1 スキャンから抽出され、すべてのフラグメントイオンのマスキングクロマトグラムが MS/MS スキャンから抽出されます。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 フィルタが無効であるドキュメントを使用しなければなりません。Skyline はデフォルトの設定では、[保持時間フィルタ] 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カーソルを持ってくると、ヒント「このドキュメントのスペクトルライブラリに、ドキュメント内のペプチドの保持時間情報がありません。」と表示されます。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ことを意味していますが、MS/MS ID の検索結果の情報が十分ではない場合には、Skyline による全グラジエントマスキングクロマトグラムの抽出が必要です、との警告が継続して出されます。しかし今回のチュートリアルでは、ターゲッ

ト MS/MS スキャンから検索されたペプチドのデータをインポートします。以下を行うことで、マスクロマトグラムの抽出範囲をもう少し絞ります。

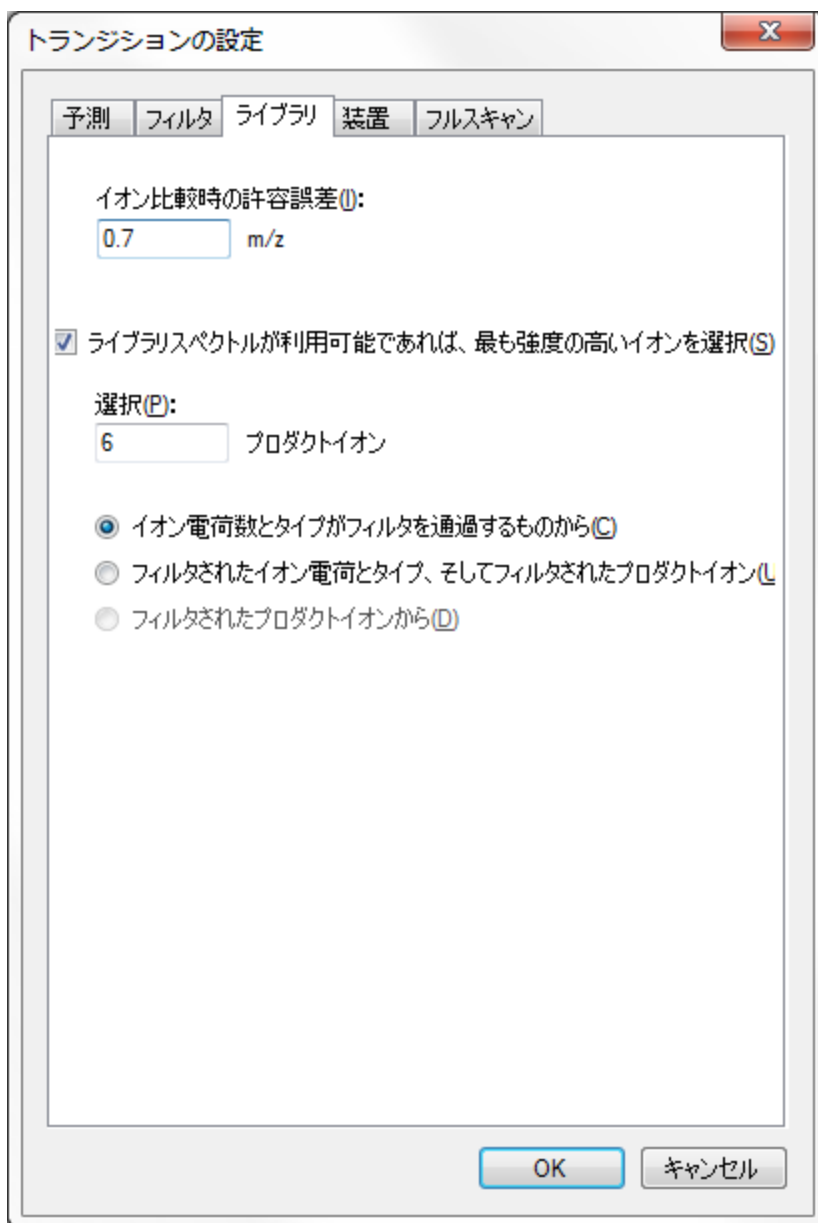
- 抽出範囲を「5」分から「2」分に変更します。

これにより、Skyline のファイルサイズを大幅に削減し、インポート時間を高速化することでマスクロマトグラムのピークを選択の時間を改善できます。

MS/MS ライブラリスペクトルにおけるマッチングが Skyline より抽出されるクロマトグラムに正しく反映されるようにするには、フルスキャン設定の MS/MS 分解能とライブラリイオン比較時の許容誤差を合わせる必要があります。このデータセットについては、以下の手順を実行します。

- [ライブラリ] タブをクリックします。
- [イオン比較時の許容誤差] フィールドに、「0.7」と入力します。

[ライブラリ] タブは次のようになっています。



ここで、ライブラリイオンをマッチさせる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。この設定に関しては、高分解能データの取扱いにおいては、やや複雑になる可能性があります。なぜなら、クロマトグラムを抽出するウィンドウは m/z により異なるからです。今後、チェックボックスを追加してこれら 2 つの設定を強制的に合わせていくことを検討中ですが、現時点では通常 0.05~0.01 の間の値が高分解能データに最も適しています (MS/MS 質量分析装置の分解能設定により異なります)。

MS1 フルスキャンの設定は、測定結果ファイルの MS1 スキャンデータからモノアイソトピックのプリカーサーイオンのピークを抽出してきますので、Skyline 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か確認する必要があります。以下の手順でこれを確認することが可能です。

- [フィルタ] タブをクリックします。
- フィールド [イオンの種類] で、カンマを1つ追加してその後に「p」とタイプします (プリカーサーという意味)。

[フィルタ] タブは次のようになっています。

- [OK] ボタンをクリックします。

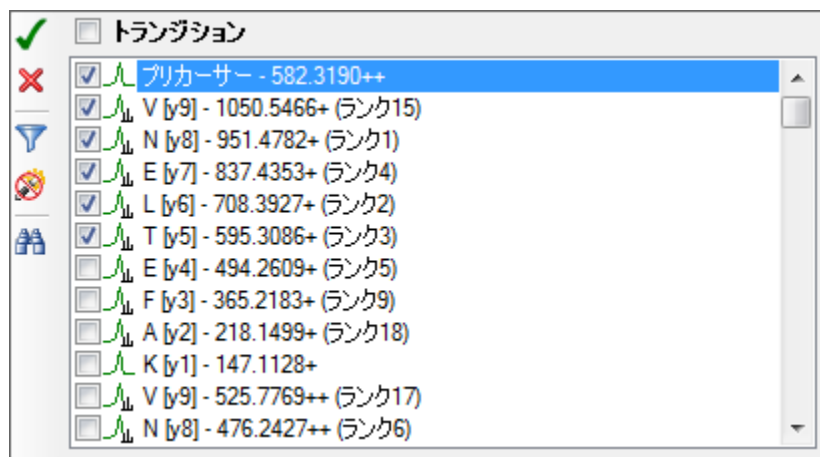
各ペプチドプリカーサーアイテムにプリカーサートランジションが含まれていることを確認するには、以下のことを行います。

- [編集]メニューで[すべて展開]を選択して、[プリカーサー] (Ctrl+W) をクリックします。

残念ながら、このドキュメント内ではすべてのプリカーサーが手動で編集されていますので、[フィルタ]タブでの変更に対応してトランジシヨントランジシヨ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ヨ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++」上にマウスカーソルを上を持っていき、右側のドロップダウンの矢印をクリックします。
- 現れた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ヨンにチェックを入れます。

フォームは以下のように見えるはずですが。



- 緑のチェックボタン (入力) 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も、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、フルスキャンターゲット MS/MS データで作業できるよう設定されました。また、これで、LTQ 装置のターゲット MS/MS メソッドのとして、エクスポートできます。

ターゲット MS/MS メソッドのエクスポート

メソッドのエクスポートは、そのメソッドを使用する装置制御用コンピュータ上で、Skyline ドキュメントから行うのが一番です。なぜなら、ほとんどの装置ベンダーはメソッド編集ソフトウェアの設計にあたり、その他の設定環境内での動作は考慮されていないからです。Skyline では、これらのベンダーのライブラリを使用して、用意されたプレートメソッドに必要な変更を行わなければなりません。一部のケースにおいては、ベンダーのソフトウェアを別のパソコン上に設定して、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 ドキュメントを別のパソコン上で編集し、その後で、メソッドエクスポートのために装置制御用コンピュータに Skyline ドキュメントを移した方が良いです。

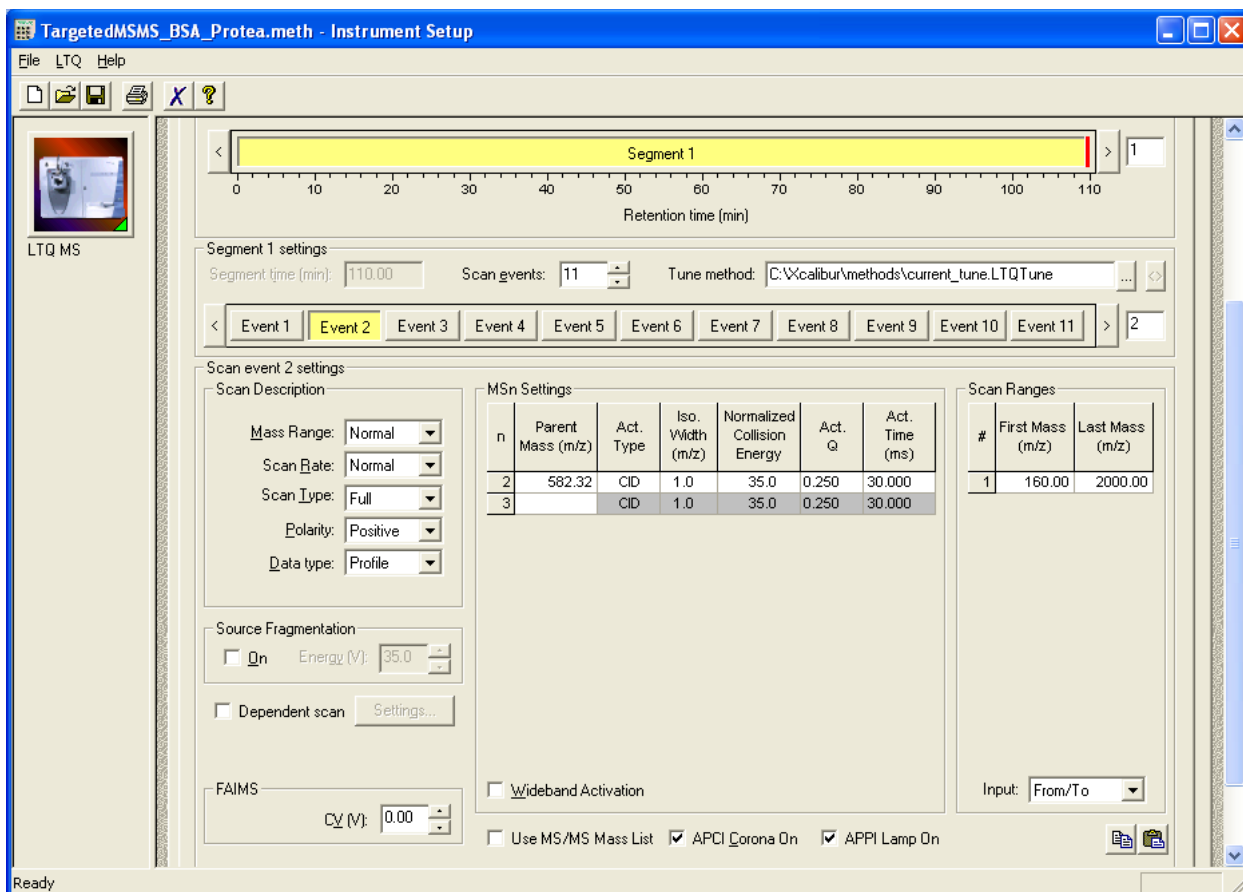
したがって、現在のドキュメント用に Thermo LTQ メソッドをエクスポートするには、まず Thermo LTQ 向けの装置制御コンピュータへとドキュメントを移し、その後以下の手順を実行します。

- [ファイル]メニューで、[エクスポート]を選択して[メソッド]をクリックします。
- [装置]タイプリストはデフォルトで「Thermo LTQ」に設定されているはずですが。
- [シングルメソッド]を選択します。
- [メソッドタイプ]ドロップダウンリストで、「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。
- LTQ の装置制御用のコンピュータ上でこれを行っている場合、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。
LTQ の装置制御用のコンピュータ上ではない場合、このチュートリアル用に作成した「TargetedMSMS」フォルダの中の「Low Res」サブフォルダに移動します。
- LTQ の装置制御用のコンピュータ上でこれを行っている場合、テンプレートメソッドをダブルクリックします。
LTQ の装置制御用のコンピュータ上ではない場合、このチュートリアルで用意した「TargetedMSMS_template.meth」ファイルをダブルクリックし、選択します。

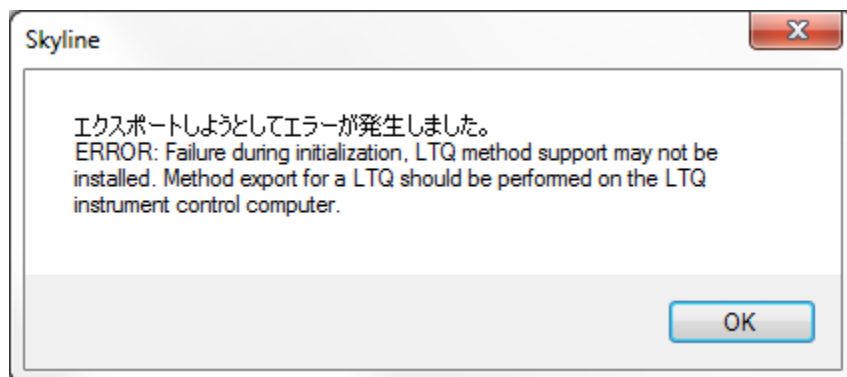
[メソッドをエクスポート]フォームは以下のように見えるはずですが。

- [OK] ボタンをクリックします。
- [Thermo LTQ メソッドをエクスポート] フォーム内で、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、この操作により、新たに指定した「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に以下のような画面が表示されます。



または、Skyline に以下のエラーメッセージが表示されます。



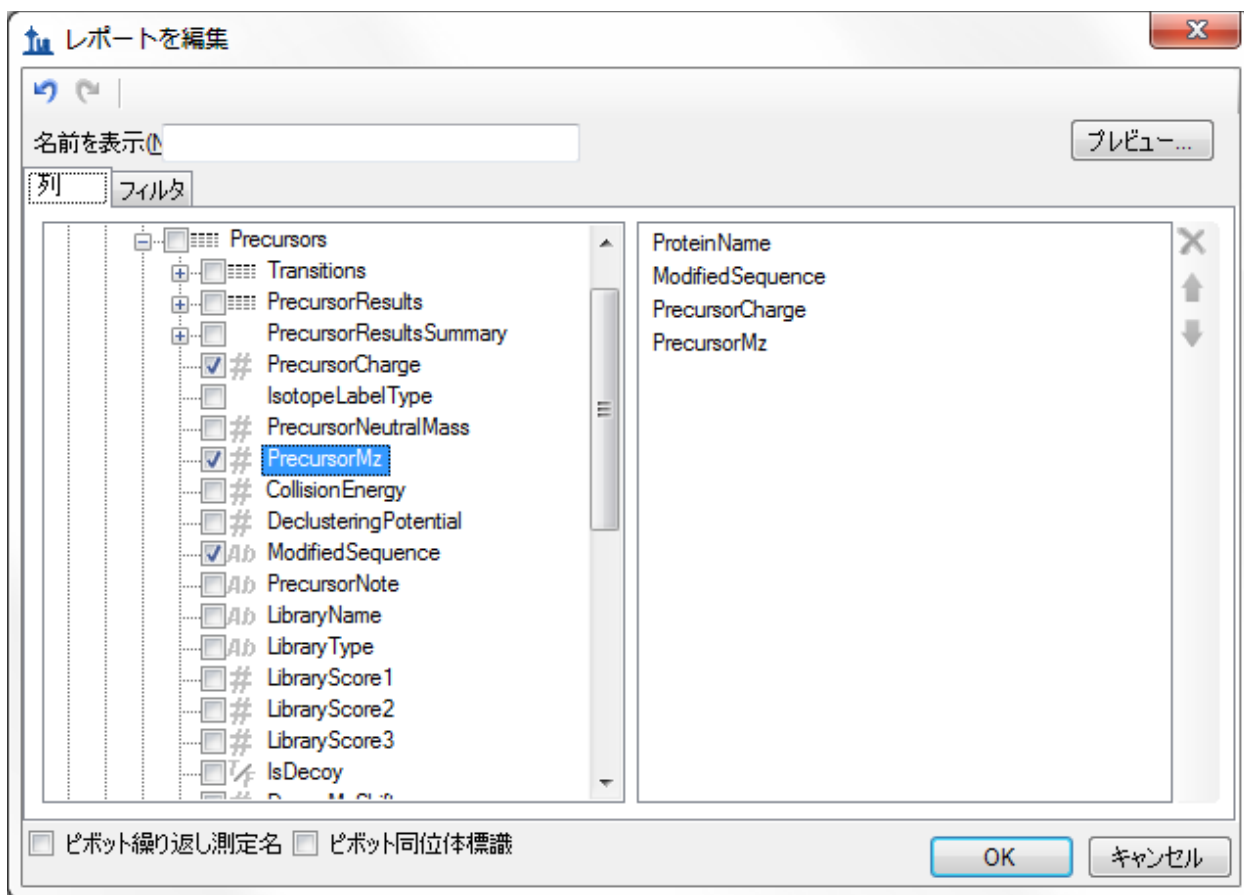
[OK] ボタンをクリックしてこのチュートリアル継続しますが、類似の手順は Thermo LTQ、Bruker TOF および AB SCIEX TOF の装置制御用コンピュータ上でも活用でき、将来的には Agilent および Waters TOF の装置制御用コンピュータでもできるようになる予定です。または、ファイル>エクスポート>Agilent TOF および Thermo Q Exactive 装置の Isolation List から行うことができます。

このように数の少ないドキュメントにおいては、ドキュメント内の特定のプリカーサーの m/z について MS1 スキャンを 1 つおよび MS/MS スキャンを 10 設定する必要があるのみでしたので、

上記のようなメソッドは手動で作成してください。この目的のためプリカーサー m/z 値を含むレポートを生成するには、以下の手順を実行します。

- [ファイル]メニューで、[エクスポート]を選択して[レポート]をクリックします。
- [レポートをエクスポート]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]で[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。
 - ProteinName
 - Peptides.Precursors.ModifiedSequence
 - Peptides.Precursors.Charge
 - Peptides.Precursors.Mz

[レポートを編集]フォームは以下のように見えるはずです。



- [プレビュー]ボタンをクリックします。
- [レポートをプレビュー]フォームで、「PrecursorMz」列ヘッダーをクリックします。

[レポートをプレビュー]フォームは以下のように見えるはずです。

	ProteinName	ModifiedSequence	PrecursorCharge	PrecursorMz
▶	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

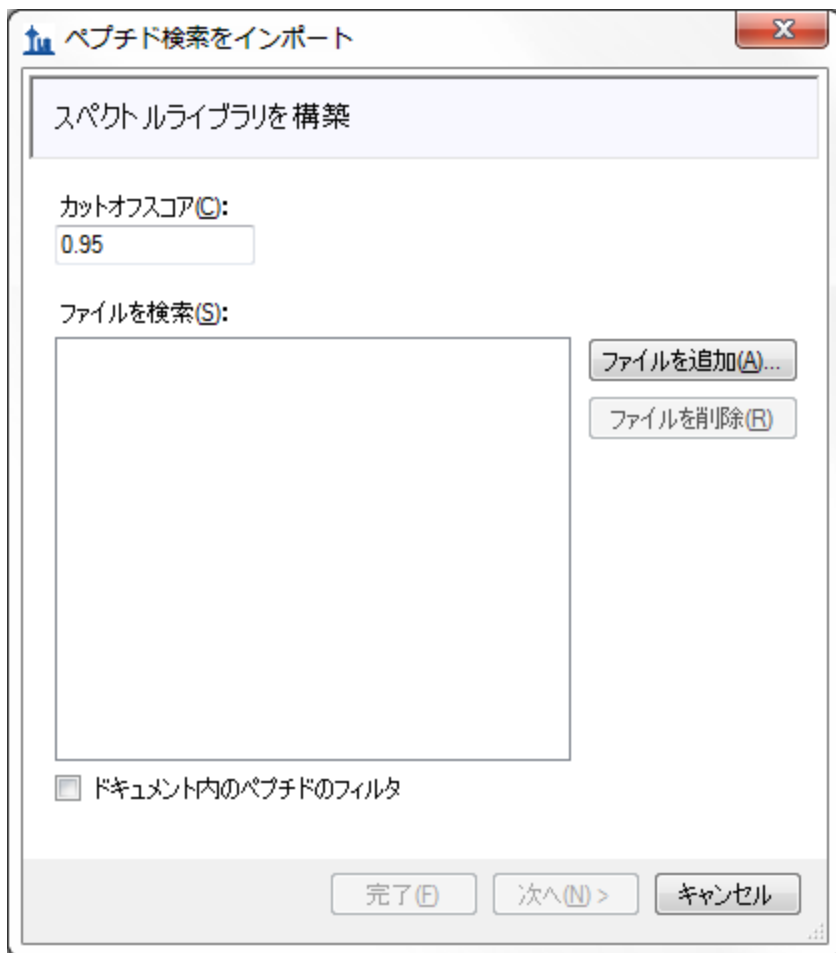
このフォームにはプリカーサー m/z 値が表示されていますので、現在直接メソッドエクスポートをサポートしていない装置であっても、このドキュメントのターゲット MS/MS メソッドの設定に時間はかからないはずで、実際のところ、今回のチュートリアルで実施しているデータの元のメソッドはこの方法で作成しました。注: SRM のように、ターゲット MS/MS (または PRM) 実験がスケジュールによるデータの取得に高く依存するようになると、スケジュール化するためのアルゴリズムが非常に重要となります。

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このドキュメント用にインポートするには、以下の手順を実行します。

- 開かれているすべてのウインドウフォームが無くなり、Skyline のメインウインドウだけが残るまで、Esc キーを押します。
- [ファイル] メニューで、[インポート] を選択して [ペプチド検索] をクリックします。

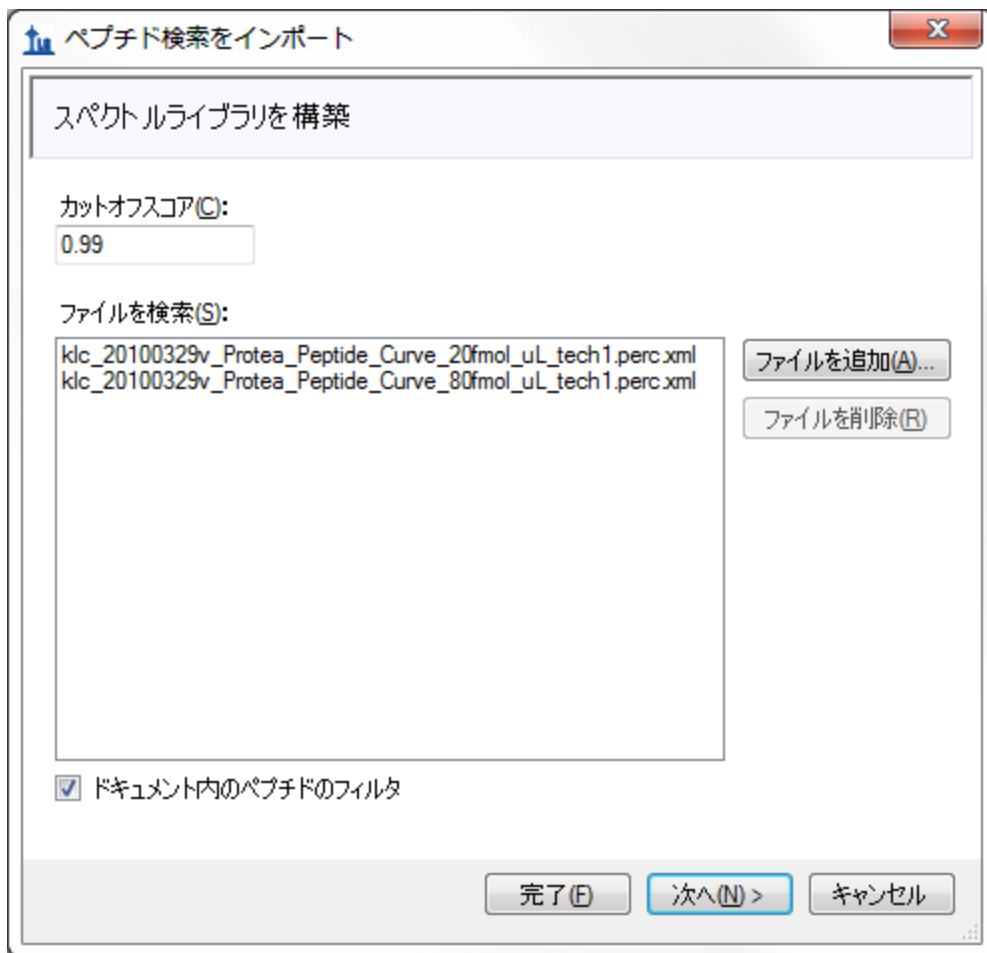
Skyline に以下のようなウィザードフォームが表示されます。



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。これを行うには、以下の手順を実行します。

- [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のフィルタ] 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。
- [ペプチド検索をインポート] 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 キーを押し下げながら、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] の [開く] ボタンをクリックします。

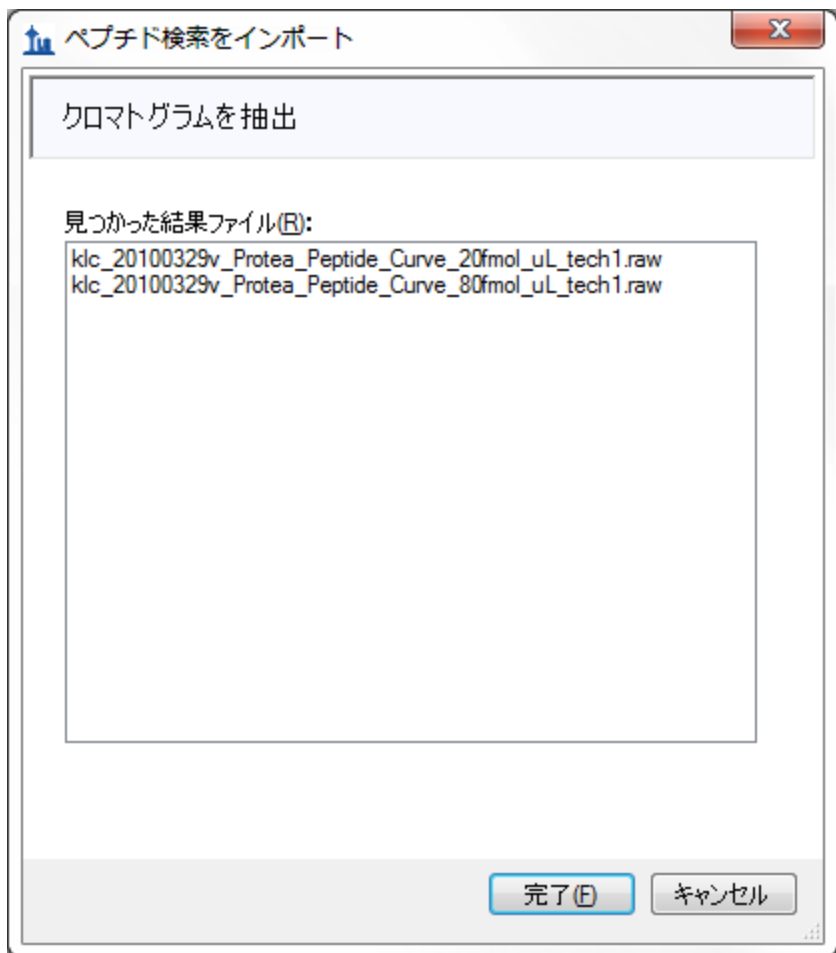
フォームは以下のように見えるはずです。



- [次へ] ボタンをクリックします。

Skyline が、ターゲット MS/MS の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、これを行いながら進行状況フォームを表示します。Skyline はこの手順を完了すると、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。このケースでは、一致する Thermo の Raw 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、それらを探すよう指示が出ます。

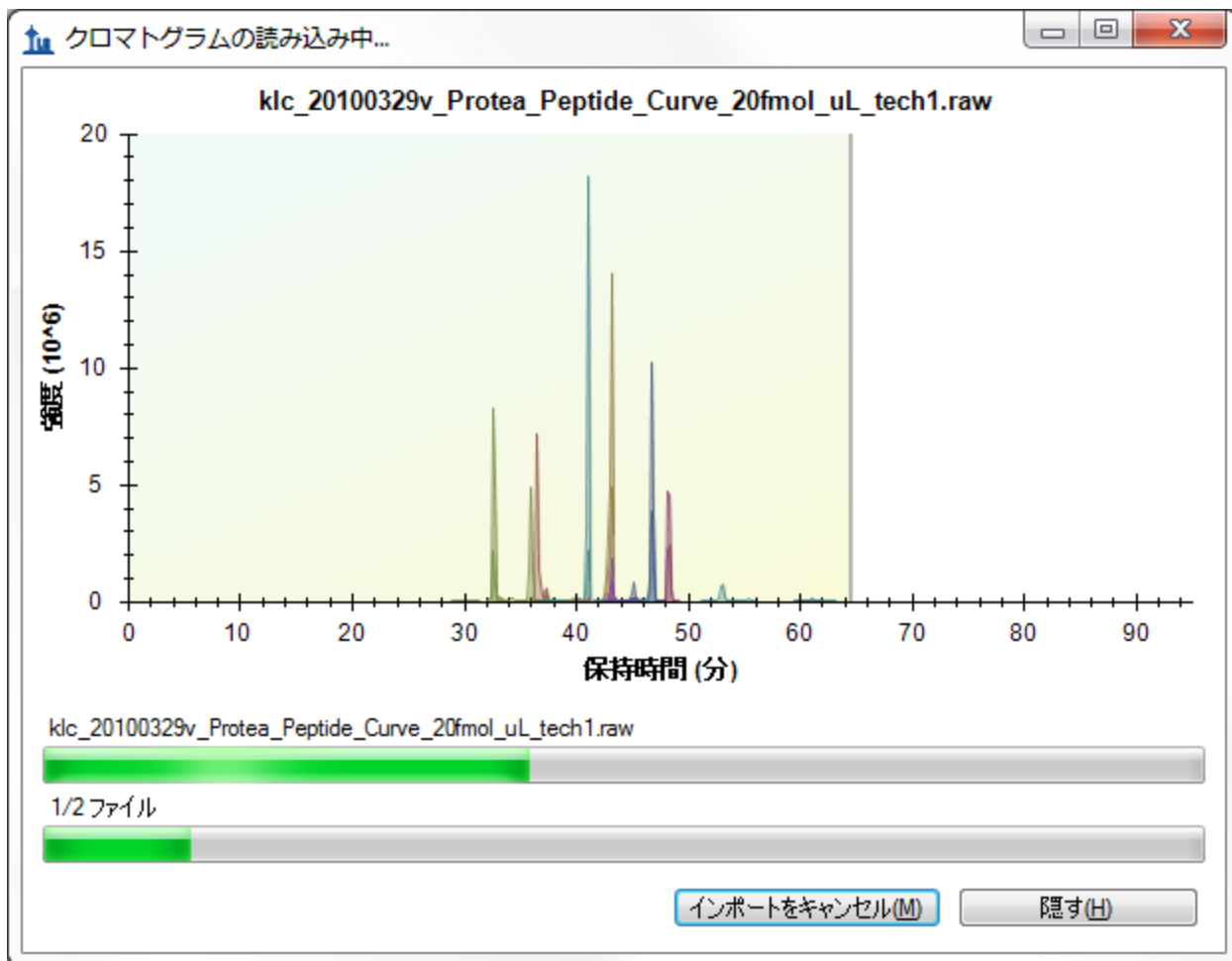
ウィザードフォームは以下のように見え、クロマトグラム抽出のために Skyline が使用するファイルが表示されているはずです。



このウィザードには、MS1 フルスキャンフィルタチュートリアルで表示されているように、その他の手順が含まれる場合があります。しかし、ドキュメントには、すでにペプチド修飾およびフルスキャンの設定が含まれており、ドキュメントに一致するもののフィルタペプチド ID のみを選択すること可能であるため、Skyline 上ではクロマトグラムの抽出作業以外に何もすることはありません。。

- ウィザードフォーム内の [完了] 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どうか尋ねるフォームの中の、[削除] 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中] 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。

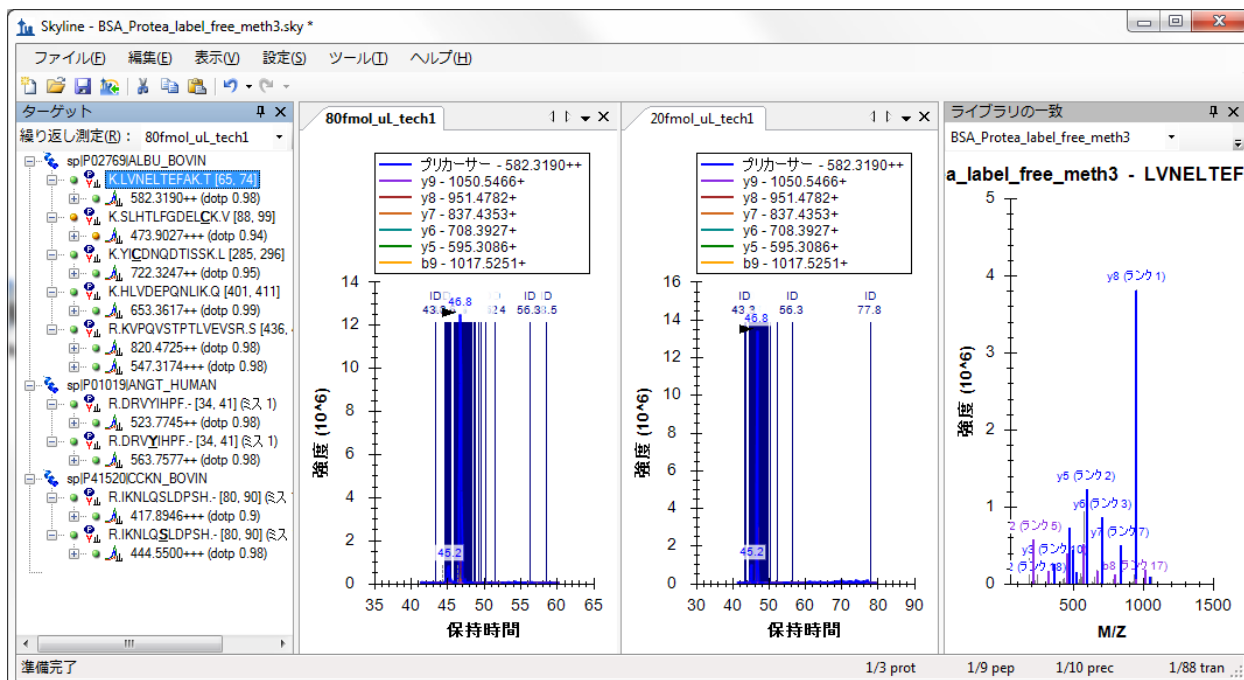


データを再確認する

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、以下の作業で抽出されたクロマトグラムを表示するための準備することができます。

- [表示] 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。
- [編集] メニューで、[すべて折り畳む] を選択して [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見えるはずですが。



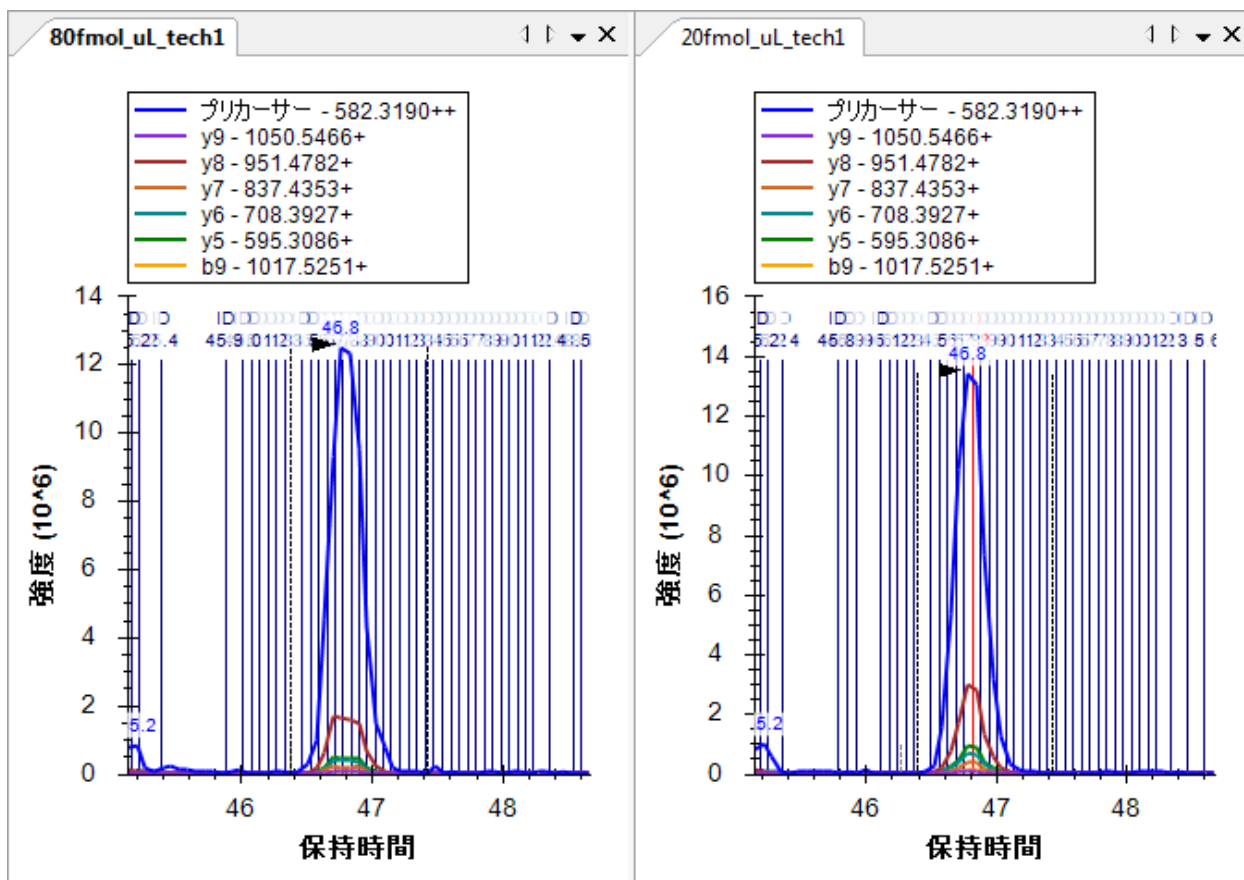
この表示でクロマトグラムを確認するのは、スペクトル ID が多数あるため、やや困難である可能性があります。これらには、青い垂直ライン、「ID」の文字および同定されたスペクトルの分単位での時間が注釈付けられています。選択したクロマトグラムピークが、その頂点を示す黒の矢印ポインタ付きで、これらの ID の真ん中に現れます。

選択したペプチドのそれぞれのクロマトグラムのピーク強度 (1.4 x 10⁷) が、4:1 で希釈した割に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 ペプチドを同一のバックグラウンドとして使用したからです。

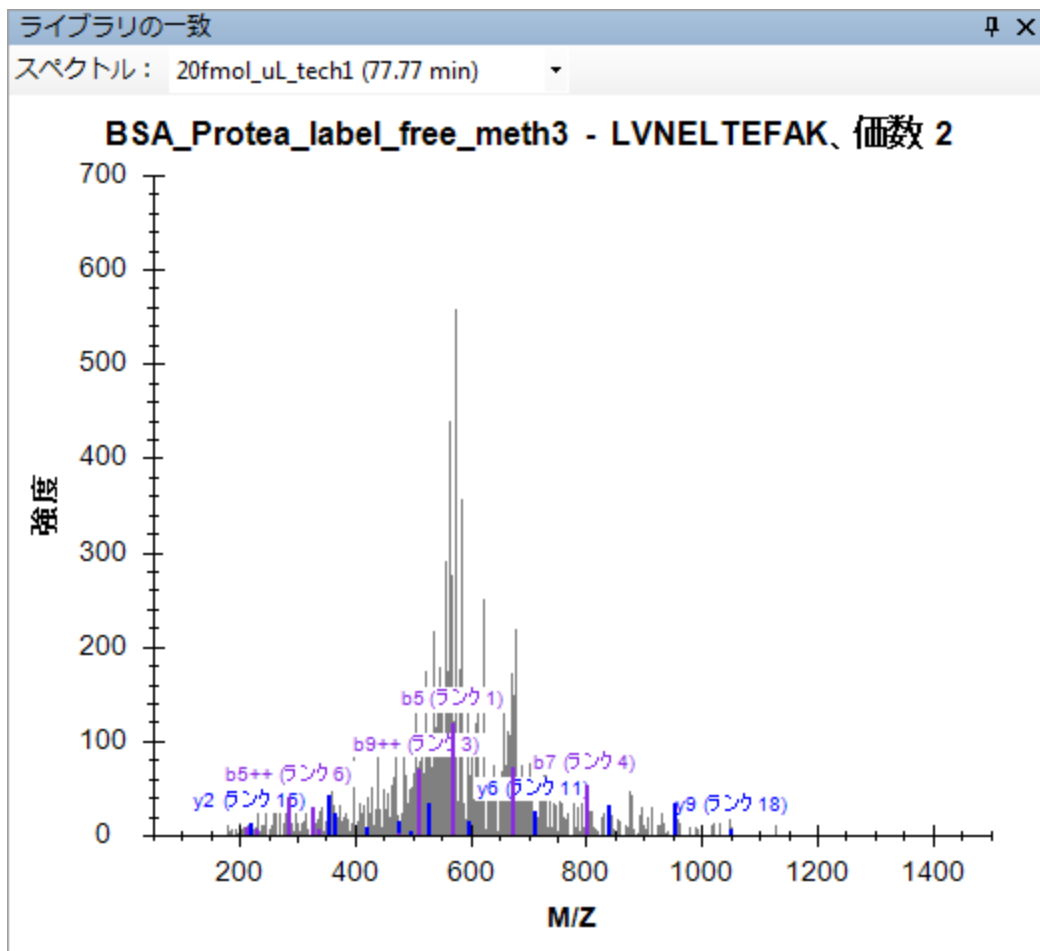
このフルクロマトグラムビューが Skyline で表示されている場合、以下を行ってクロマトグラムの積分ピークへとズームインします。

- [表示] メニューで、[オートズーム] を選択して [最良ピーク] (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見えるはずです。



ここでは、ターゲットペプチドとして同定されたスペクトルが個別のラインとしてラインが表示されます。よく見てみると、20fmol サンプルのクロマトグラムピークの真ん中に赤いラインが見られます。これは、現在 [ライブラリの一致] ビューに表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ラインをクリックするか、[ライブラリの一致] ビューで上部のドロップダウンリストをクリックして、リストを選択することで、その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、クロマトグラムのピークからこの多量に存在するペプチドを含むスペクトルとして同定が可能であるということは、多少驚きに値するかもしれません。ピーク積分の境界付近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ということが分かります。




検索に関しては、3つのタンパク質と Uniprot の FASTA ファイルを逆配列化したものに対し、実施しています。

- [ライブラリの一致] ビューの右上角の「X」をクリックして、ビューを閉じます。

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かもかもしれませんので、以下を行います。

- クロマトグラムグラフを右クリックし、[ペプチド同定回数] を選択して [一致] をクリックして外します (チェックがオンの場合)。

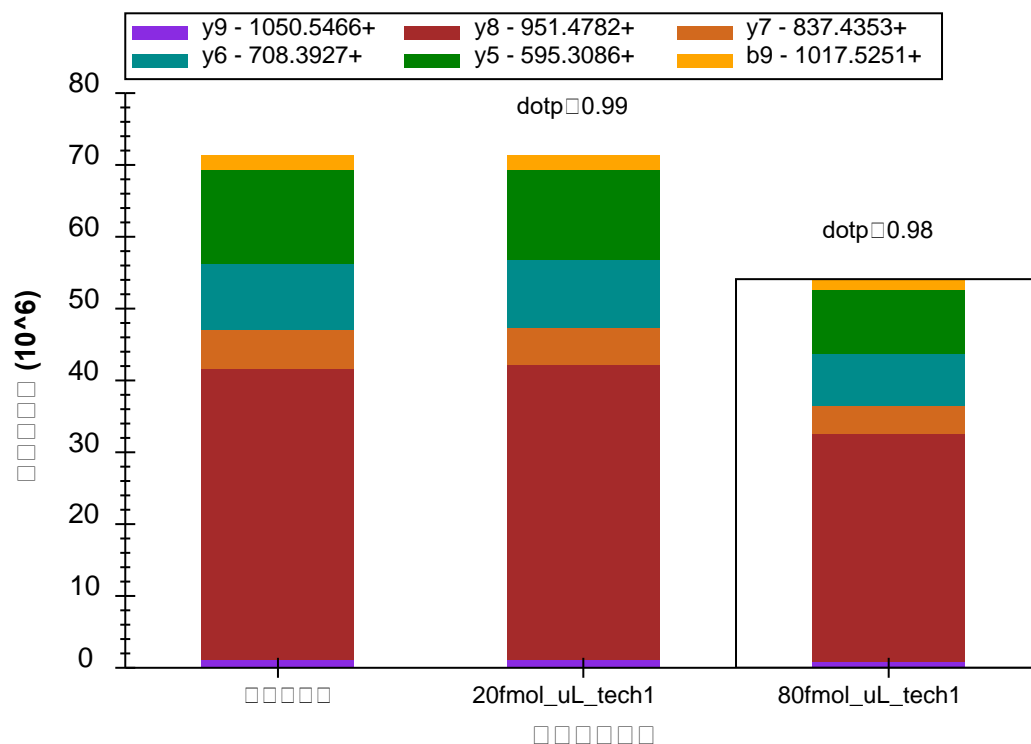
[ターゲット] ビューに注目してみると、すべてのターゲットペプチドを確認できます。これで MS/MS スペクトルが一致し、小さなスペクトル付きのアイコンが下に表示されます。最低ドット積スコア (「dotp」と標識) は、0.84 であることが分かります。これにより、プリカーサー「417.8946+++ (dotp 0.84)」の、測定済みのプロダクトイオンピーク面積とライブラリスペクトル内の断片イオン強度との間の相関度スコアが提供されます。[ターゲット] ビューには有効な繰り返し測定、すなわち「20fmol_ul_tech1」のドット積スコアのみが表示されています。タブテキストが太字であり、[ターゲット] ビュー上部のドロップリスト内で選択されているため、

有効な繰り返し測定であることが分かります。「80fmol_ul_tech1」繰り返し測定のドット積スコアを見るには、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当該測定を選択してください。

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、以下を行います。

- [表示]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]メニューで、[トランジション]を選択して[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見えるはずです。

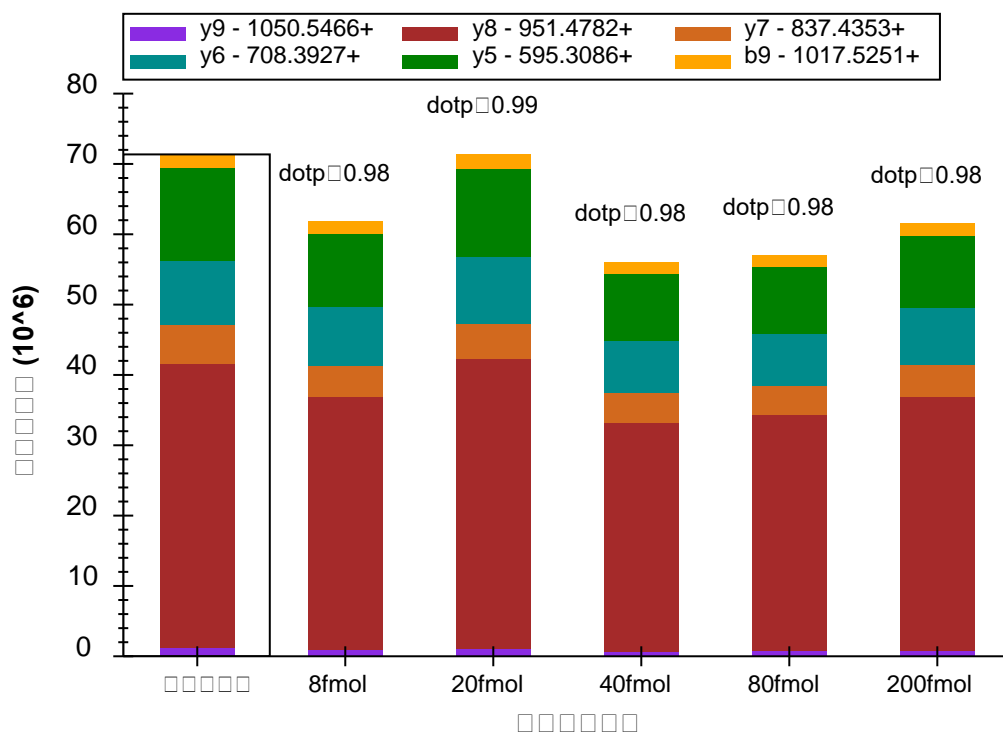


そのように見えない場合は、以下の手順を実行する必要があります。

- [ピーク面積]グラフを右クリックし、[正規化]を選択して[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て、[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て、[ドット積を表示]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再確認して、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サンプル内で比較的安定していることを確認可能です。BSA ペプチドの一部は 20 fmol サンプルでより高いピーク面積を示し

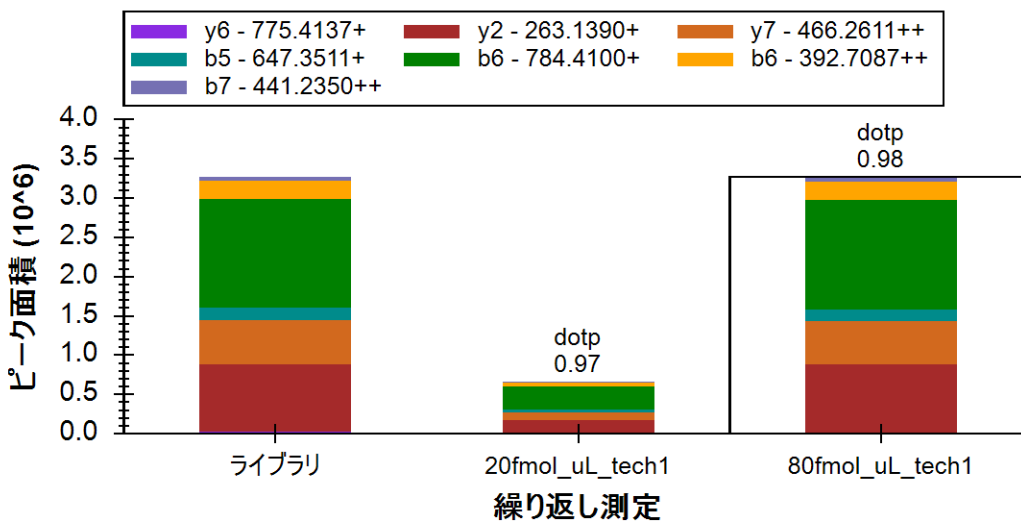
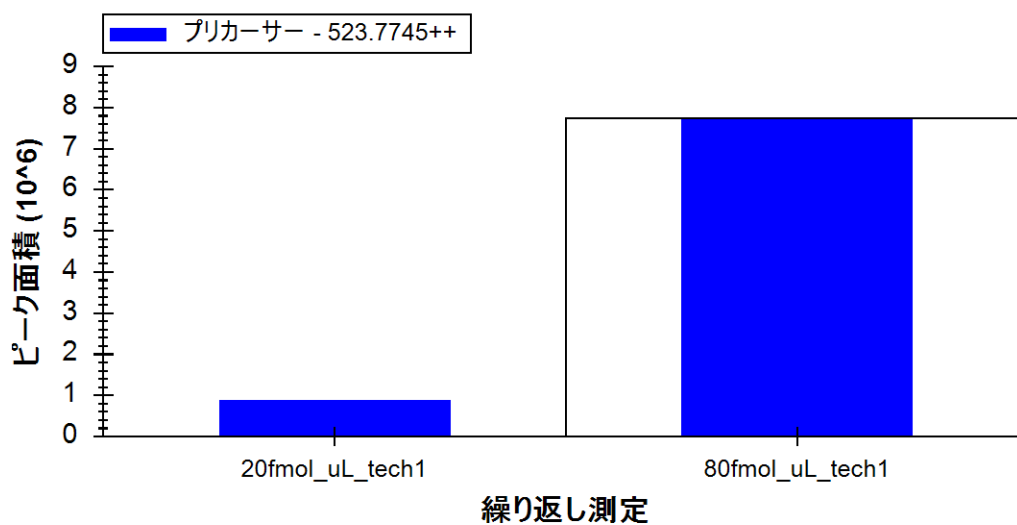
ており、また一部は 80 fmol サンプルでより高くなっていますが、これは単に測定値のばらつきによるものです。全 5 ポイントにおける希釈曲線については、上記 LVNELTEFAK ペプチドのピーク面積グラフは以下のようになります。



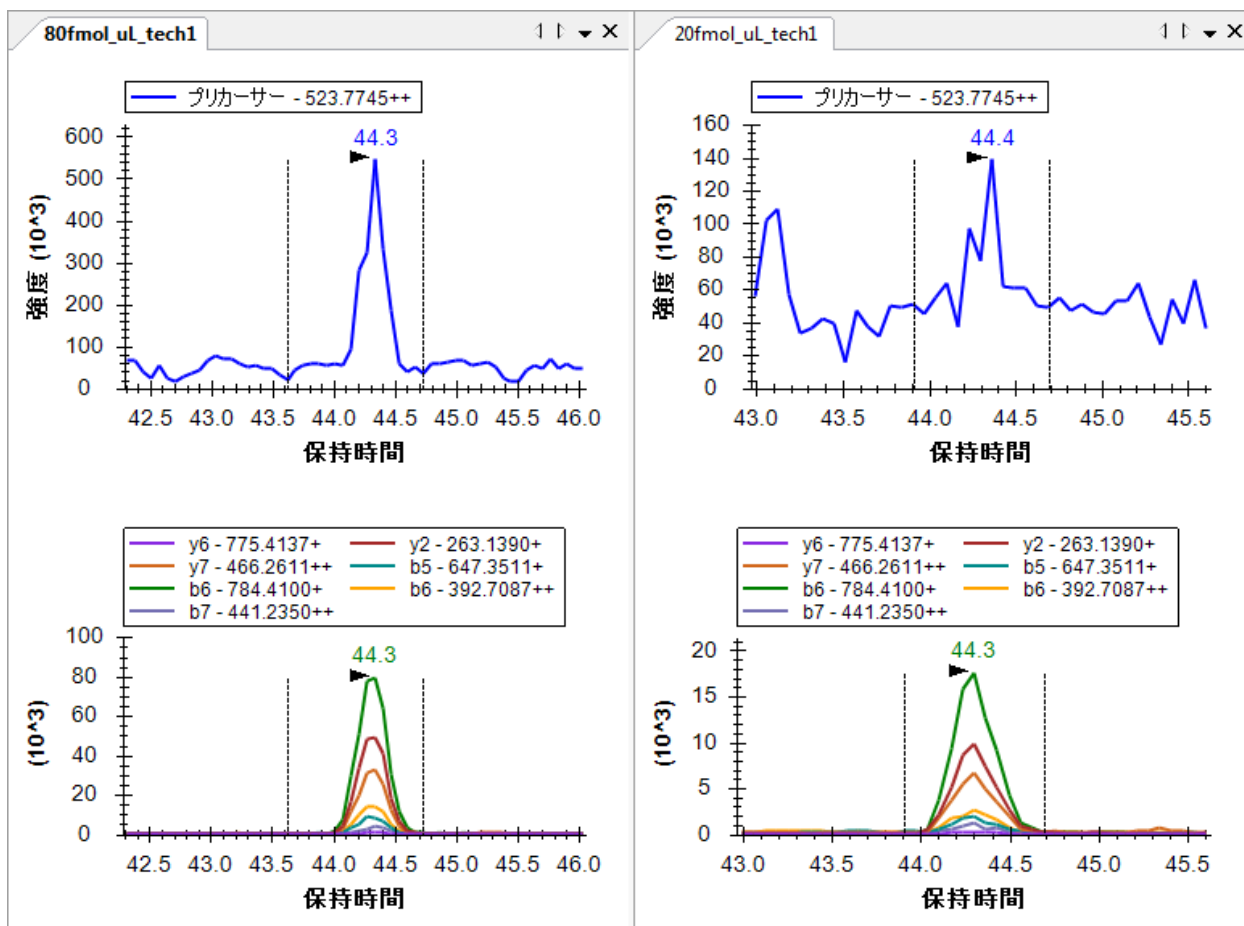
次に、ヒューマンのペプチド DRVYIHPF に注目してみましょう。ここでは、サンプル名 80 fmol および 20 fmol により示唆されるように 4:1 の濃度比が見られると予測されます。Skyline が実際に行った測定値の詳細を見るには、以下を行います。

- [ピーク面積] グラフを右クリックし、[トランジション] を選択して [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、[トランジション] を選択して [グラフを分割] をクリックします。

[ピーク面積] グラフは以下のように見えるはずです。



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ないのですが、MS1 スキャンから抽出されたプリカーサーイオンについては、80 fmol 面積は約 6×10^6 および 20 fmol 面積はほぼ 4×10^6 、または 3:2 の比率です。クロマトグラムグラフに注目して、この相違の原因を解釈してみます。



20 fmol 繰り返し測定内のピーク積分境界をプロダクトイオンクロマトグラムグラフ内のピークへとリセットする場合、下部グラフペインの x 軸の下をクリック・ドラッグします。プロダクトイオンのピーク面積はあまり変更されませんが、プリカーサーのピーク面積は約 0.8×10^6 にまで落ち込みます。または、80 fmol ピーク面積の $\frac{1}{4}$ にかなり近くなります。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は、ここでも注目に値します。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。

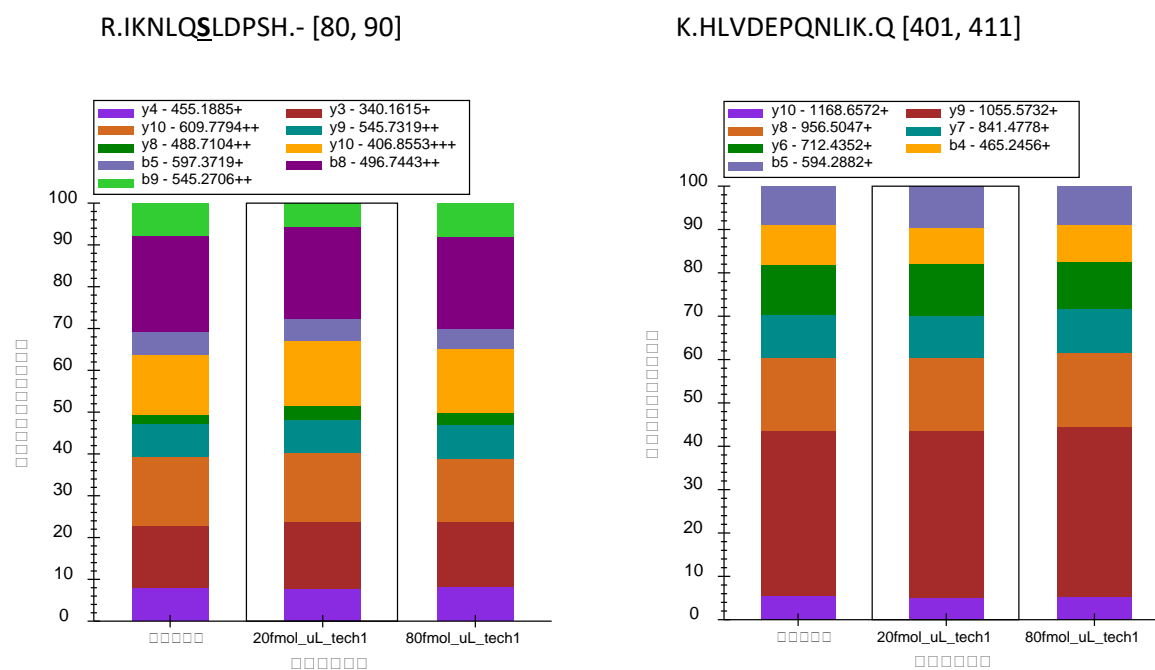
ここで、ドキュメント内の最後の 4 つのペプチドをすべて再確認すると、すべての 4 つのペプチドのフォームに、80 fmol サンプルと 20 fmol サンプルとの間の強度比として、順に、予測通り約 4:1 が表示されていることも確認できます。（このデータは希釈シリーズから 2 ポイントを選んだものです。このチュートリアルではサイズを考慮して、2 ポイントのみで行っています。）

低分解能 LTQ は、MS/MS スキャン¹から抽出されたフラグメントイオンクロマトグラムを使用した定量実験を行うにあたり、十分な装置であることが、このデータおよびその他の実験で示されています。

また以下を行って、繰り返し測定の間での相対イオン存在量が比較可能です。

- [ピーク面積] グラフを右クリックし、[トランジション] を選択して [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、[正規化] を選択して [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再確認して、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、およびライブラリスペクトル断片強度に非常に似ていることを確認可能です。



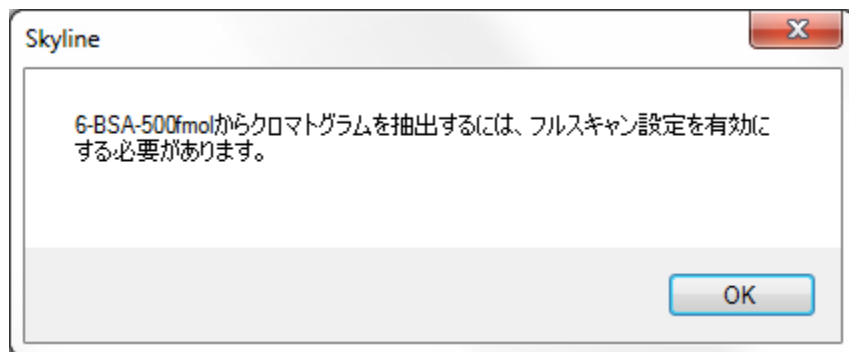
高分解能質量スペクトルで作業する

この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 消化上で実行され Agilent 6500 Series Q-TOF で測定された全希釈シリーズです。このデータをこの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、高分解能スキャン内のすべてのピークをセントロイド化しました。しかしながら、Skyline フルスキャンフィルタは、プロファイルスキャンでも同じように良好に動作します。

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て、作成済みのチュートリアルフォルダの「TOF」サブフォルダの中の「BSA_Agilent.sky」ファイルを開きます。

高分解能ターゲット MS/MS 用の Skyline ドキュメントを構成する

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 ドキュメントです。しかし現在、その設定では SRM データのインポートのみが許可されている設定です。この時点で、このチュートリアルに含まれているフルスキャン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。

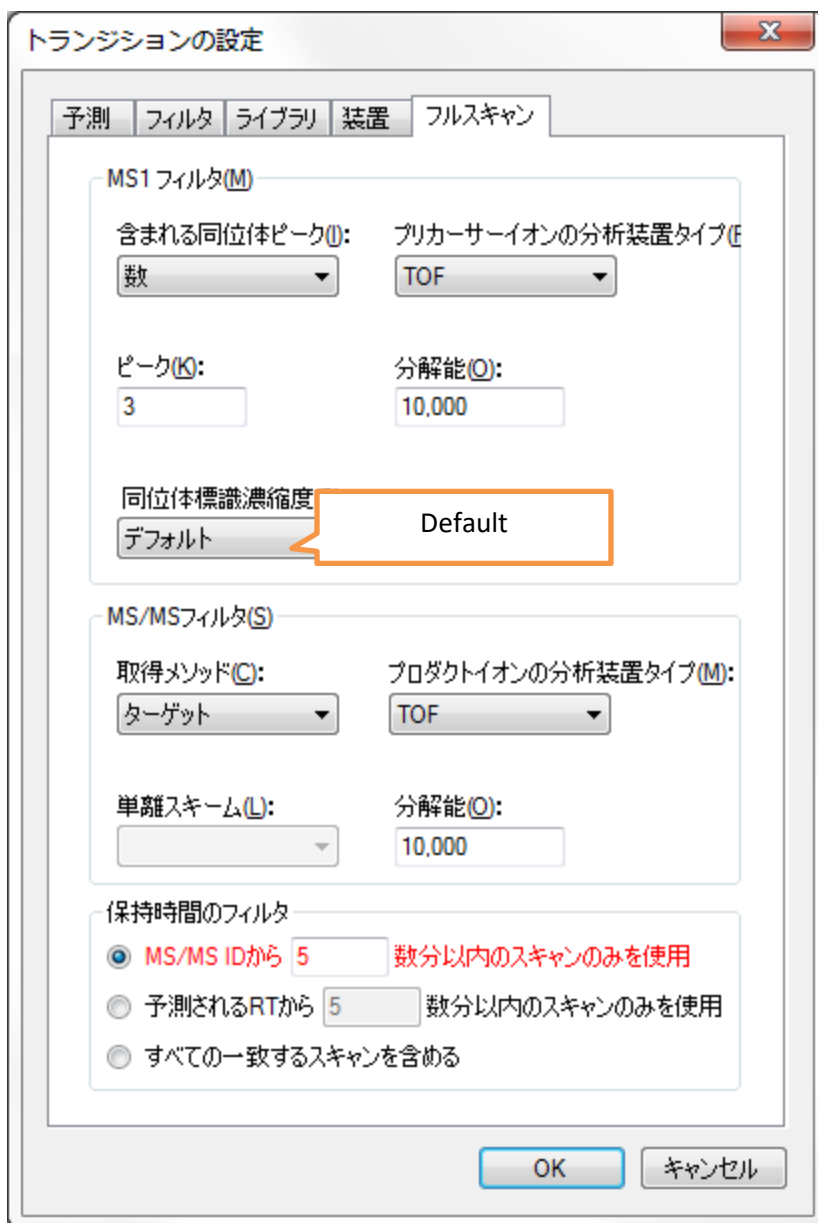


実際にこれを行う場合、元に戻す (ctrl+Z) を利用してドキュメントを元の状況に戻します。

以下を行って、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ターゲット MS/MS 実験と互換性を持たせることが可能です。

- [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 フィルタで、
 - [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。
 - [ピーク] フィールドに「3」と入力します。
 - [プリカーサーイオン分析装置タイプ] ドロップリストから、「TOF」を選択します。
- MS/MS フィルタで、
 - [取得メソッド] ドロップリストから「ターゲット」を選択します。
 - [含まれる同位体ピーク]
 - [プロダクト質量分析装置] ドロップリストから、「TOF」を選択します。

[フルスキャンタブ] タブは次のようになっています。



このデータセットには、インポートすべきペプチド検索結果はありません。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 は全グラジエントクロマトグラムを抽出します。なぜなら、MS/MS ID の情報が欠けているからです。以下を行うこともできます。

- [保持時間のフィルタ] の [すべての一致するスキャンを含める] オプションをクリックします。

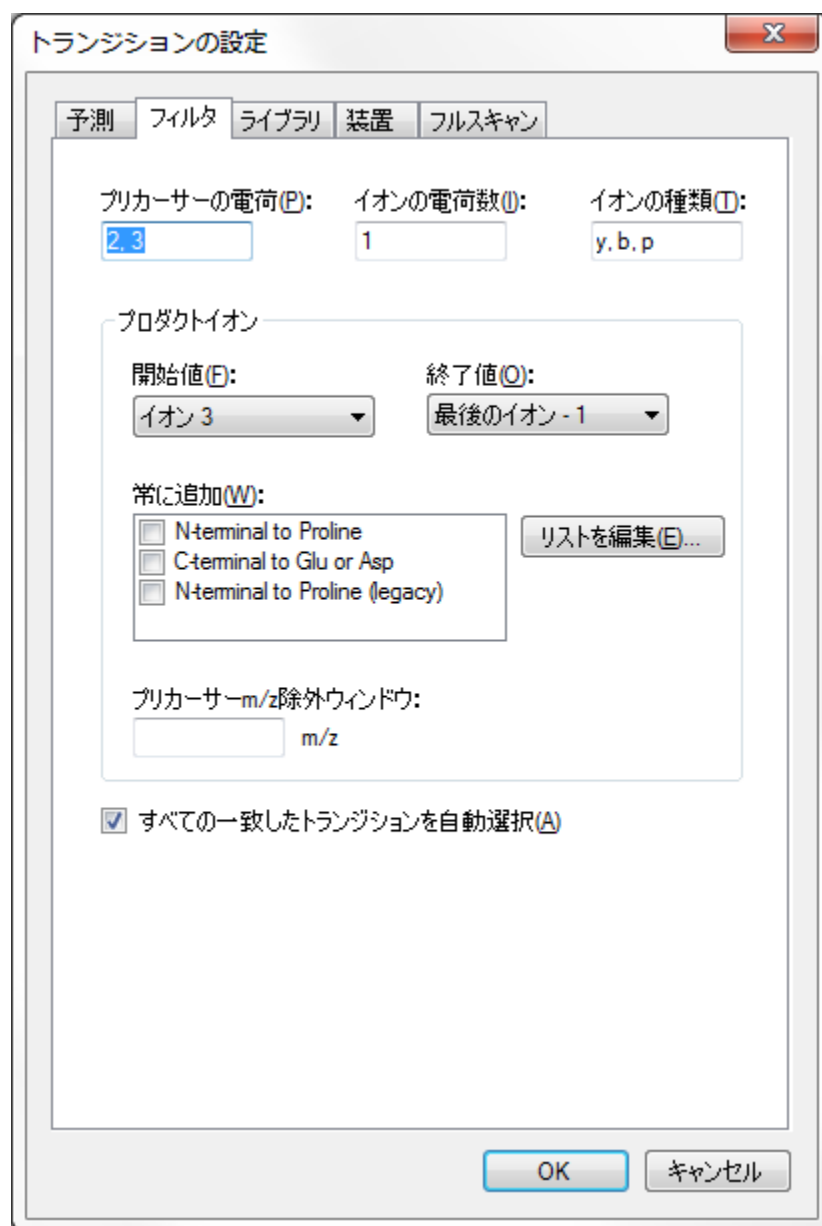
また、Skyline にこのオプションが赤で表示され、マウスマウスカーソルを赤いテキストの上にホバリングさせると、ヒント「全グラジエントクロマトグラムはインポートには時間がかかり、ディ

スク容量を消費するうえ、ピークを選択が効果的にできない可能性があります。」が現れます。しかし、他に選択肢はない状況ですので、この設定を単一のファイルに対してのみ使用します。

またこのデータセットには MS1 スキャンも含まれていますが、ここでもプリカーサートランジションがドキュメント内に含まれています。プリカーサートランジションを追加するには、

- [フィルタ] タブをクリックします。
- フィールド [イオンの種類] で、カンマを 1 つ追加してその後にプリカーサーの「p」をタイプします。

[フィルタ] タブは次のようになっています。

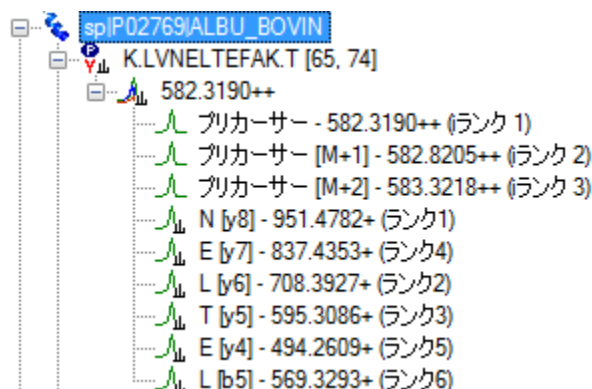


- **[OK]** ボタンをクリックします。

各ペプチドプリカーサーアイテムにプリカーサートランジションが含まれているよう徹底させるには、以下を行います。

- **[編集]** メニューで **[すべて展開]** を選択して、**[プリカーサー]** (Ctrl+W) をクリックします。

この場合、すべてのペプチドに 3 つのプリカーサートランジション (M、M+1、および M+2) が含まれているのが見られます。これは、高分解能 MS1 スキャンでのみ可能です。これは以下のように見えるはずですが。



トランジションが自動的に追加されます。なぜなら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。

また、Skyline が 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のが見られます。プリカーサー同位体ピークは、予測同位体分布に従い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pekトルにおける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

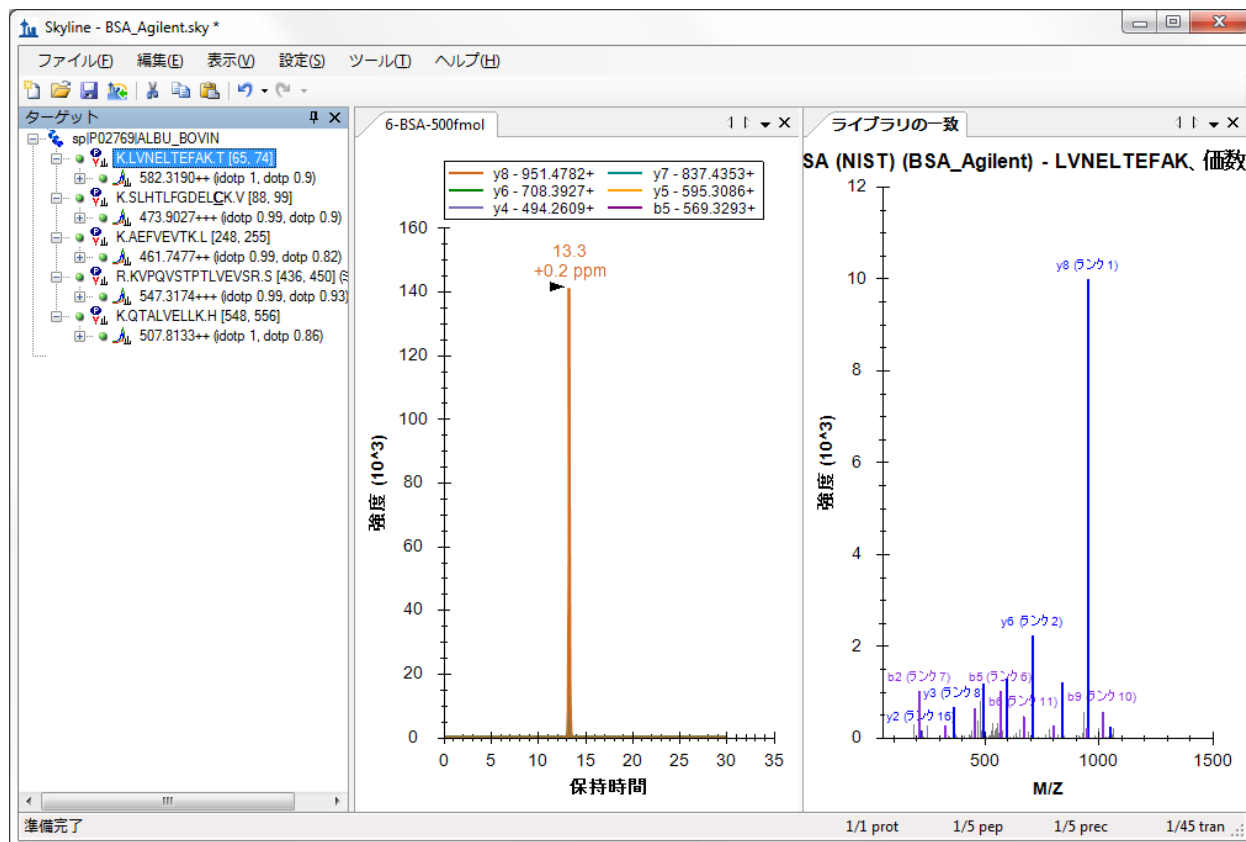
希釈シリーズでの最高濃度の実行をドキュメントにインポートするには、以下の手順を実行します。

- **[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。
- **[結果をインポート]** の **[OK]** ボタンをクリックします。
- 「6-BSA-500fmol.d」 ファイルをクリックします。
- **[結果ファイルをインポート]** の **[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、以下を行って抽出されたクロマトグラムを表示する準備を整えることができます。

- [ターゲット] ビュー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] を選択して [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見えるはずです。



まず、クロマトグラムグラフ内のクロマトグラムが 30 分勾配全体を覆っているのにお気づきになるとと思います。

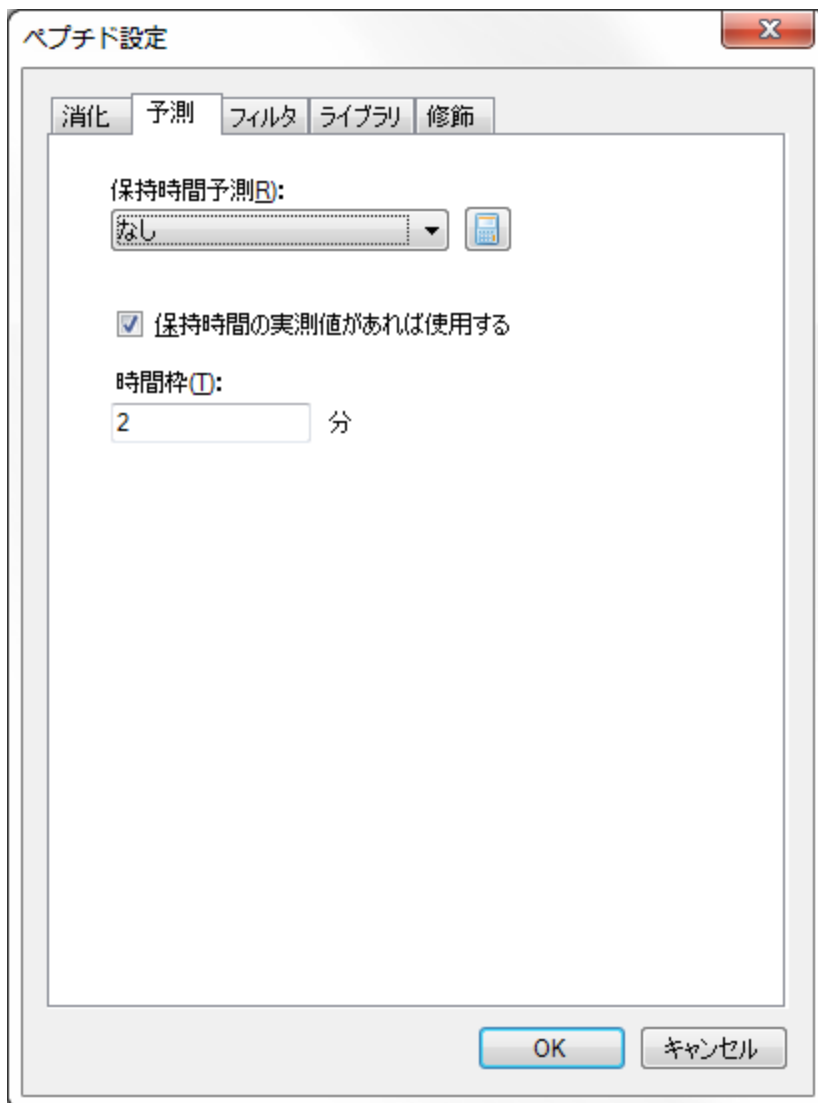
[ターゲット] ビューにズームインすると、新たに 2 つの Orthogonal ドット積値である、idotp および dotp が、プリカーサー同位体分布およびプロダクトイオン強度に追加されているのが見られます。この一番濃い濃度のデータについては、クロマトグラムピークと予測相対強度との間の非常に良好な相関度が、これらの値により示されています。



その他の5つの濃度ポイントの全グラジエントクロマトグラムのインポートを回避するには、以下を行います。

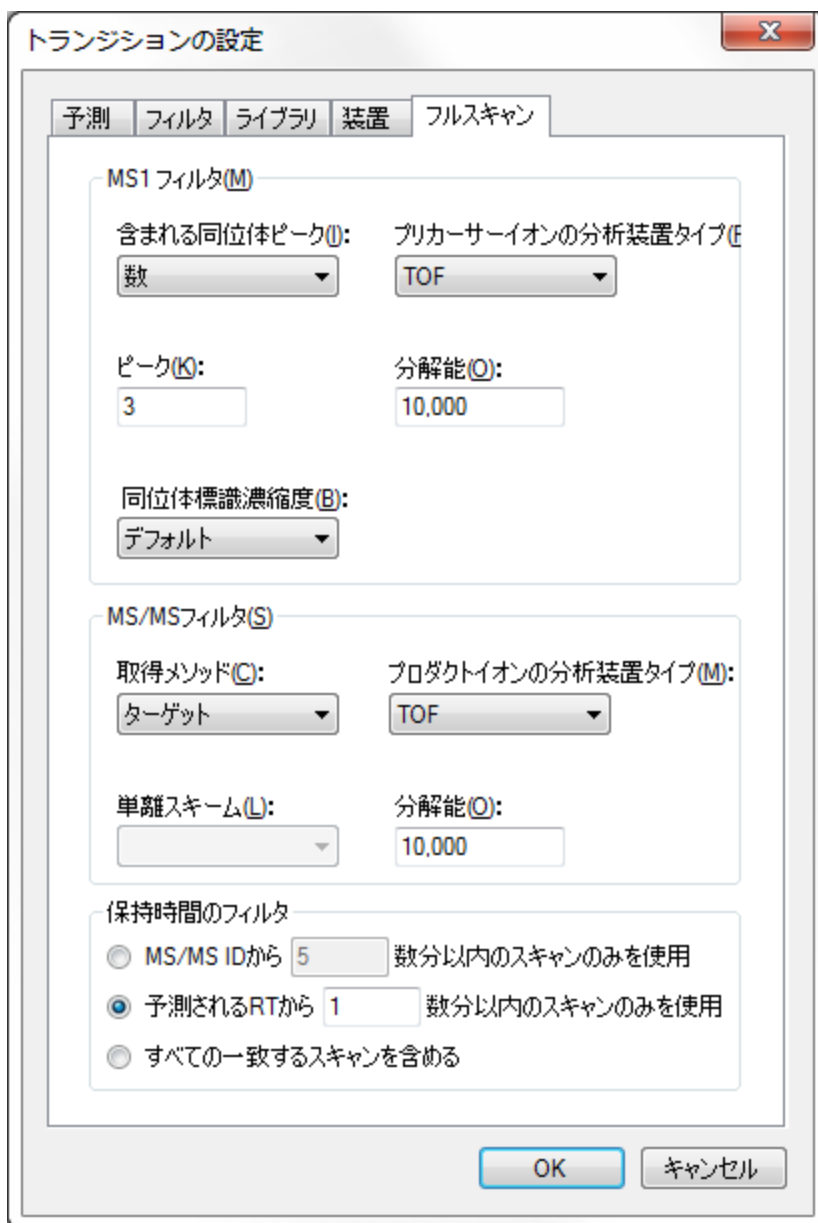
- [設定]メニューで[ペプチド設定]をクリックします。
- [予測]タブをクリックします。
- [測定された保持時間があれば使用する]チェックボックスをオンにします。
- [時間枠]フィールドに「2」を入力します。

[ペプチド設定]フォームは以下のように見えるはずです。



- [OK] ボタンをクリックします。
- [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] タブで、[保持時間のフィルタ] ボックスで、[予測 RT の 5 分以内のスキップのみを使用] オプションを選択します。
- 時間を「5」分から「1」分に変更します。

[トランジション設定] の画面は次のようになります。



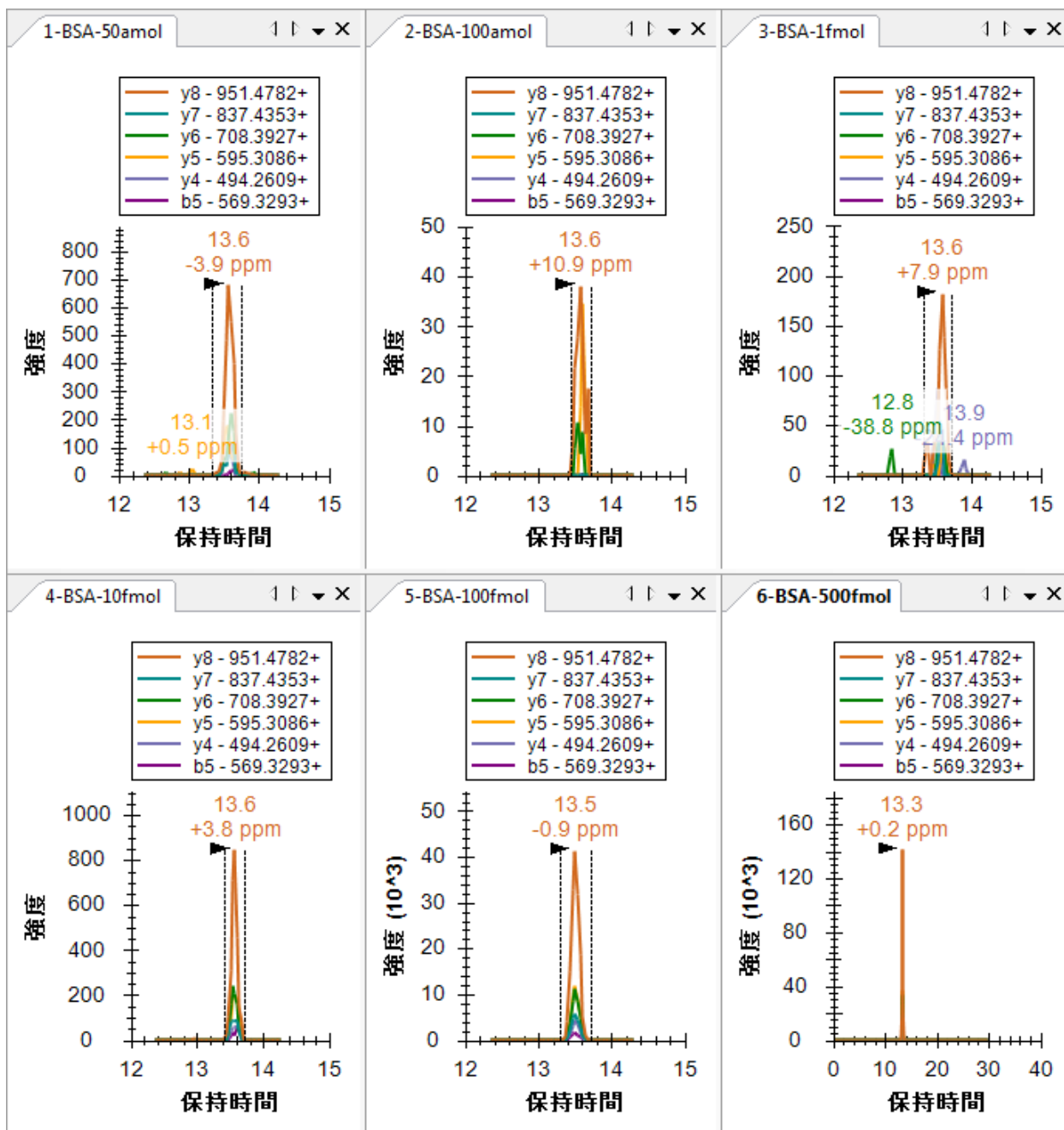
このデータセットから残りの生データファイルをインポートするには、以下の手順を実行します。

- [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。
- [予測 RT に用いる繰り返し測定を選択]で「6-BSA-500fmol」にチェックを入れ、[OK]ボタンをクリックします。
- [結果をインポート]の[OK]ボタンをクリックします。
- 「1-BSA-50amol.d」ファイルをクリックします。
- Shift キーを押しながら、「5-BSA-100fmol.d」ファイルをクリックします。
- [結果ファイルをインポート]の[開く]ボタンをクリックします。

データがインポートされたら、またはインポート中に、以下を行ってクロマトグラムグラフを配置します。

- [ピーク面積] ビューの右上角の「X」をクリックして、ビューを閉じます。
- [編集] メニューで、[結果を管理] (Ctrl+R) をクリックします。
- 「6-BSA-500fmol」 がリストの最後尾になるまで、[下へ] ボタンを 5 回をクリックします。
- [結果を管理] の [OK] ボタンをクリックします。
- [表示] メニューで、[グラフを配置] を選択して [グループ化] をクリックします。
- [ペインのグループ化] フィールドに、「6」と入力します。
- [並べ順] ドロップダウンリストで、「ドキュメント」を選択します。
- [グループにまとめたグラフの配置] の [OK] ボタンをクリックします。

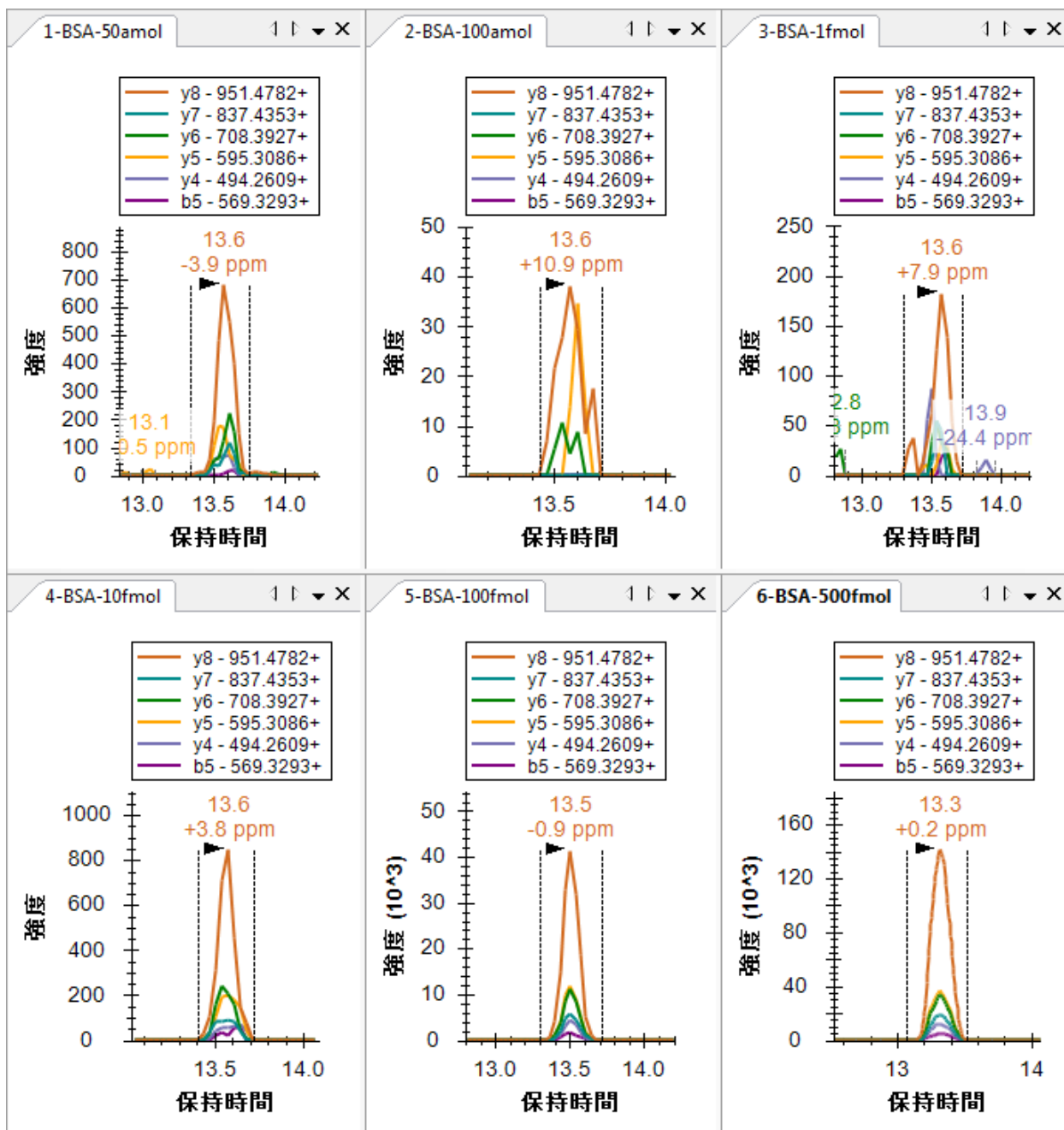
クロマトグラムグラフは以下のように見えるはずです。



新しくインポートしたクロマトグラムの長さはわずか2分ですが、6-BSA-500fmol クロマトグラムの長さは30分のままであるのが分かります。すべてグラフ上で選択したピークにズームインするには、以下を行います。

- [表示]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。

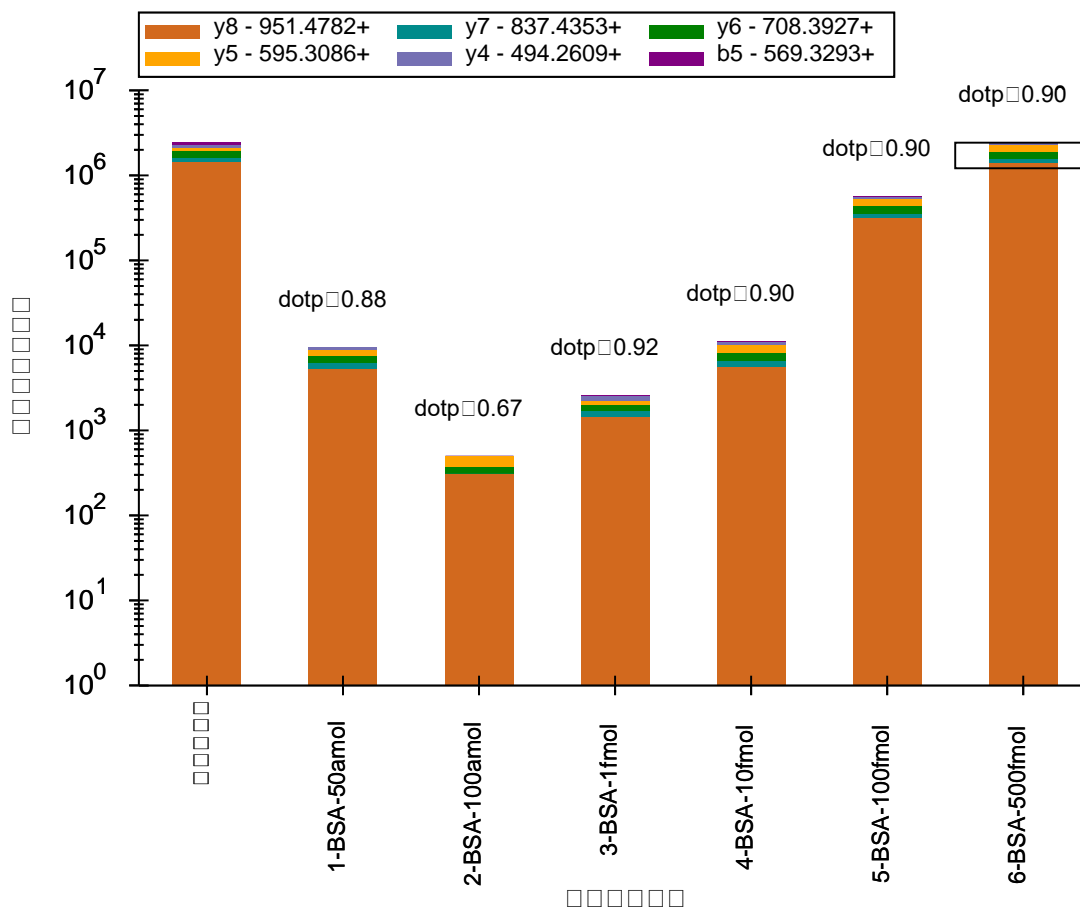


6つのクロマトグラムグラフから分かることとして、100 amol サンプル (40) より 50 amol サンプルの方が、強度が高く (700) ピークグループの形状が優れていることが挙げられます。すべてのピークの保持時間は非常に似通っており、Skyline が 100 amol サンプルで誤ったピークを選択したという可能性は低くなります。また高分解能データについては、ピーク保持時間の注釈の下に質量誤差値が Skyline で表示され、予測 m/z 値とピーク内のポイントの加重平均との間の偏差が示されます。上図には、高強度のデータは低強度のデータより正確となる傾向があるという全般的なトレンドがかなりはっきりと示されており、これはノイズにより生じる強度比の変動が原因であると思われます。

50 amol サンプルの強度の問題についてより深い洞察を得るには、以下を行います。

- [表示]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。
- [ピーク面積]グラフを右クリックして、[対数目盛り]をクリックします。

これにより [ピーク面積] グラフは以下のように見えるはずです。



このビューでは 50 amol サンプルが、100 amol サンプルより 10 fmol サンプルの方に、より近く一致していることが示されています。4つのその他のペプチドを再確認すると、2つ

(SLHTLFGDELCK および KVPQVSTPTLVEVSR) において、50 amol サンプルの総ピークが実際に 10 fmol サンプルより強度が高く、その他の2つについてはピークが小さいことが分かります。明らかに、このサンプルの濃度は実際には 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つのペプチドの事例から、実際の濃度はこれらの濃度の間のいずれかの値であったと思われるが、その他の3つのペプチドによりそのケースが弱まっています。

また、サンプルが数値プリフィックス (1, 2, 3 ... 6) で示される回数 (順番) で実際に測定されたかどうかのチェックも、行う価値があります。これを達成するには、以下を行います。

- [ピーク面積] グラフを右クリックし、[次数] を選択して [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、サンプルは示されている次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削減します。

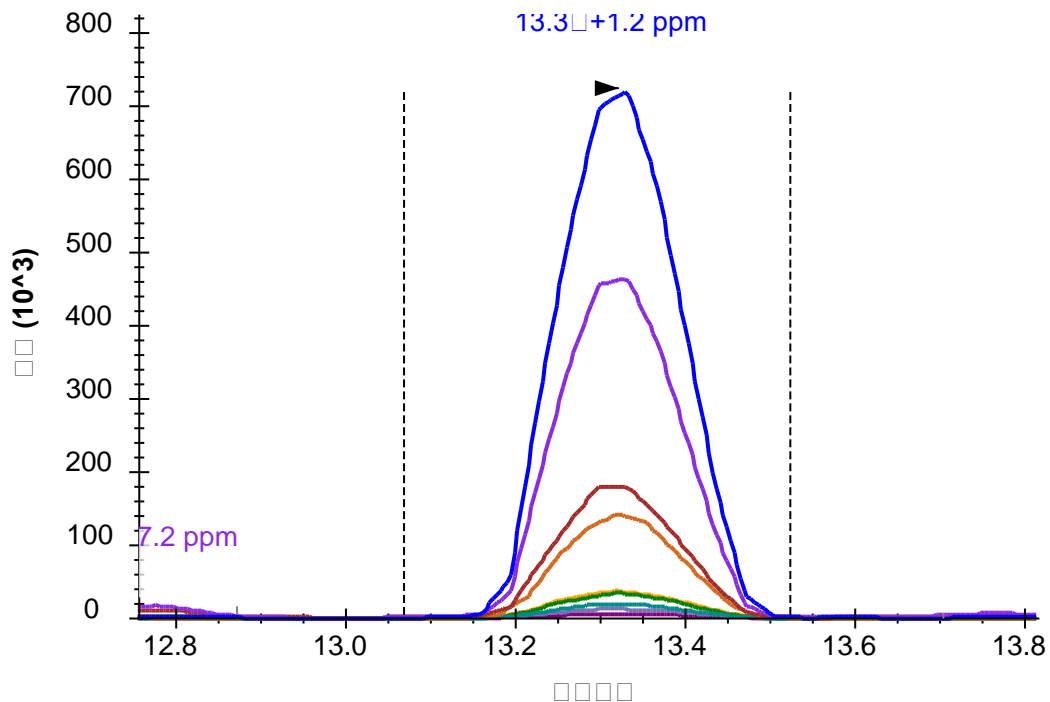
Skyline を利用して、濃度曲線データの品質についての洞察を非常に素早く得ることができます。

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 ピークを閲覧するには、以下を行います。

- [表示] メニューで、[トランジション] を選択して [すべて] (Shift+F10) をクリックします。
- [表示] メニューで、[トランジション] を選択して [グラフを分割] をクリックします。

クロマトグラムグラフは以下のように見えるはずです。

K.LVNELTEFAK.T (500 fmol)

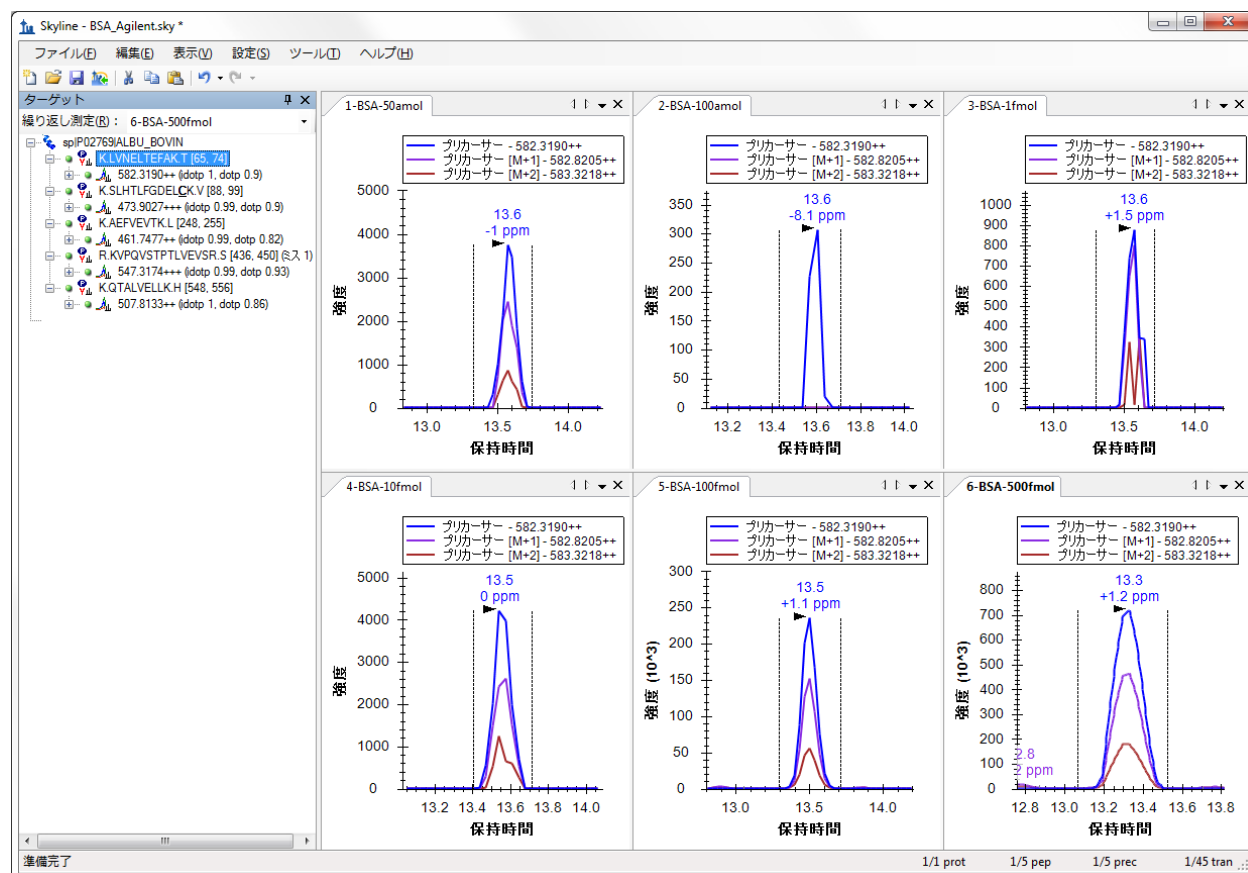


これまでのように、最高強度のプロダクトイオン (y8) はモノアイソトピックプリカーサーの強度の約 1/5 (1.4×10^5 v. 7.2×10^5) に達しており、M+2 ピークでさえも y8 ピークより強度が高くなっています。

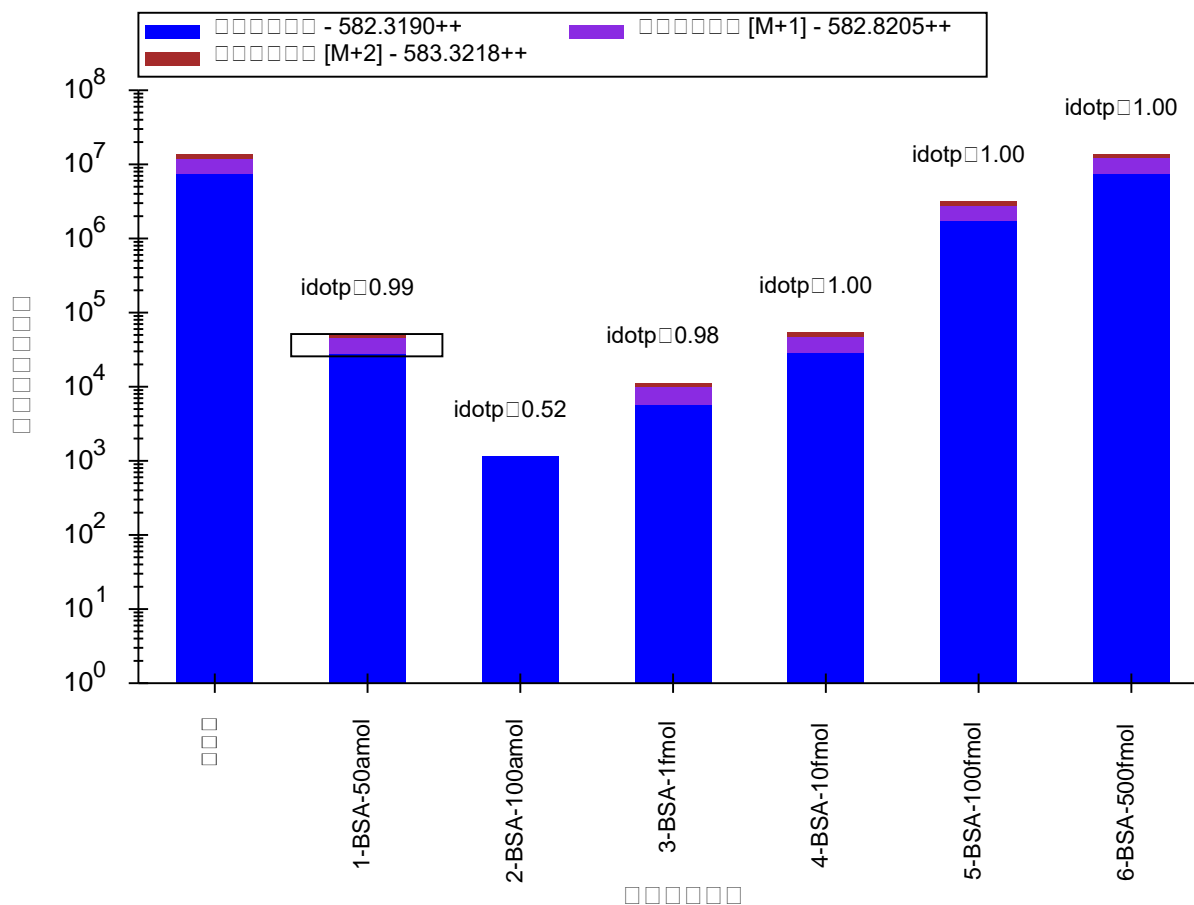
プリカーサーピークのみを見るには、以下を行います。

- [表示] メニューで、[トランジション] を選択して [プリカーサー] (Alt+F10) をクリックします。

これにより Skyline は以下のように見えるはずですが。



[ピーク面積] グラフは以下のように見えるはずですが。



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たものと非常に似通っていることが分かります。

結論

このチュートリアルでは、ターゲット MS/MS 実験実行用に 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 様の実験を、イオントラップおよび Q-TOF 装置といったフルスキャン装置上で実行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、診断の各試験向けに、フルスキャン装置上でこの技術を利用することが可能です。ターゲット MS/MS メソッドをエクスポートする方法（現在 Thermo および AB SCIEX については準備中、スケジューラ化されたメソッドには非対応）、および 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 値のリストを得る方法について学びました。また、測定結果のデータ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 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見られるようになり、MS1 スキャンまたは MS/MS スキャンいずれかの情報のみを表示するよう選択可能

です。または、それ以外の Skyline による、クロマトグラム、グラフ、レポートの詳細については、トリプル四重極での SRM 実験またはチュートリアルを参考にしてください。

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