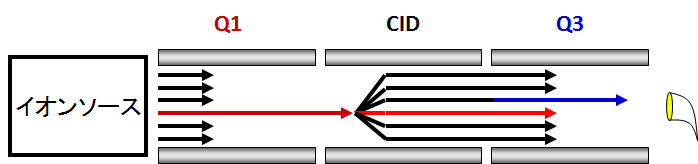
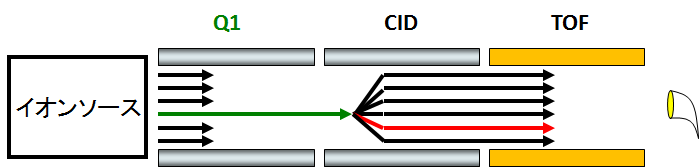
SkylineターゲットMS/MS（PRM）

Skylineは、イオントラップおよびQ-TOF装置といったフルスキャン質量分析計の生データファイルから、クロマトグラフィーベースの定量的測定を抽出する複数メソッドをサポートできるようになりました。元のトリプル四重極質量分析計の選択反応モニタリング（SRM）サポートと同様、Skylineは引き続き、以下のオリジナルの質量分析計ベンダー4社の装置の分析の新メソッドをサポートします。AB SCIEX、Agilent、Thermo-Scientific、およびWatersです。さらには、高および低分解能の質量分析装置の両方を扱える柔軟なアプローチを利用する、Bruker Q-TOF装置もサポートします。

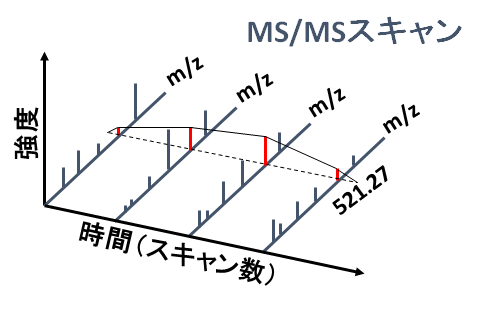
このチュートリアルでは、Skylineを使用してターゲットMS/MSデータを分析する方法を学びます。これはまた、並列反応モニタリング（PRM）として知られており、疑似SRMおよびMRM-HR™とも呼ばれています。これらの別名により示唆される通り、ターゲットMS/MSはトリプル四重極質量分析計によるSRMの実践に非常によく似たフルスキャンメソッドです。



SRMがプリカーサーおよびプロダクトイオンペアによるスキャンで、経時的に1サイクルの各単一強度測定を収集するように、ターゲットMS/MSはプリカーサーイオンの独立したリストのデータによるスキャンで、経時的に1サイクルの各フルMS/MSスキャンを収集します。



Skylineにより時間強度クロマトグラムが、このやり方で取得された生スキャンから抽出されます。



その結果生じるクロマトグラムにより、慣れ親しんできたSkylineユーザーインターフェイス内で、トリプル四重極実験のSRMデータに類似する定量的データが得られます。

トリプル四重極装置を使用できない場合、ターゲットMS/MSを代わりに使用することが可能です。しかし、高分解能MS/MSのフィルタリングは従来のSRMと比べて選択性に優れている場合があり、収集されたスキャンをペプチド検索内で処理して、積分クロマトグラムピークの検証に役立てることが可能です。またターゲットMS/MSは、パイプラインに一致するペプチドスペクトルのMS/MSスペクトルのデータ依存性取得（DDA）に主に使用される場合に、さまざまなフルスキャン装置で実行する品質管理に利用することも可能です。しかし、この品質管理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。

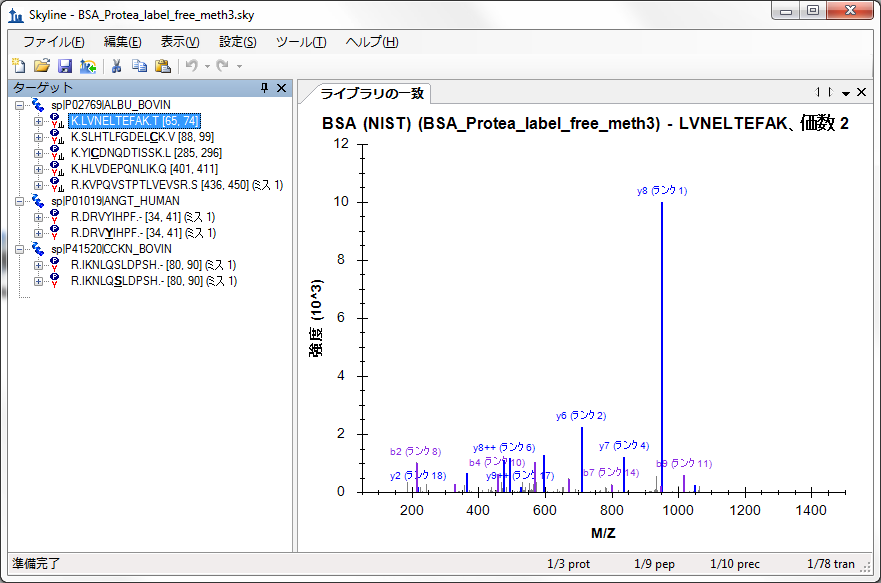
C:\Users\brendanx\Documents

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必要なすべてのファイルが含まれています。Windows Explorer内で新しい「TargetedMSMS」フォルダを見つけ、その中の「Low Res」サブフォルダに移動します。低分解能Thermo LTQのターゲットMS/MSデータの分析に使用するSkylineプロジェクトを開くには、ファイル「BSA\_Protea\_label\_free\_meth3.sky」をダブルクリックします。

ドキュメント内の最初のペプチドを選択します。Skylineは以下のように見えるはずです。



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ターゲットを伴う10個のペプチド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角のインジケーターに示されています。複数のプリカーサーが、ウシ血清アルブミン（BSA）の公開NISTライブラリのMS/MSライブラリスペクトルに関連付けられています。また、非修飾かつリン酸化の形態で測定された、その他の2つのペプチド（1つはヒューマン、1つはウシ）がありますが、MS/MSライブラリスペクトルは見られません。

Skyline内でこの種のドキュメントを作成するのに慣れていない場合、Skylineのメソッド編集機能については、数々の入門チュートリアルおよび取扱説明ビデオで説明されています。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エディタとしてSkylineに慣れていらしゃると仮定して、既存のドキュメントから始めます。

# 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生ファイルがあるのも見られます。これらのファイルには、以下のようなメソッドにより上述のターゲットMS/MSアプローチを使用して、低分解能LTQ装置上で取得されたMS1およびMS/MSスキャンが含まれています。

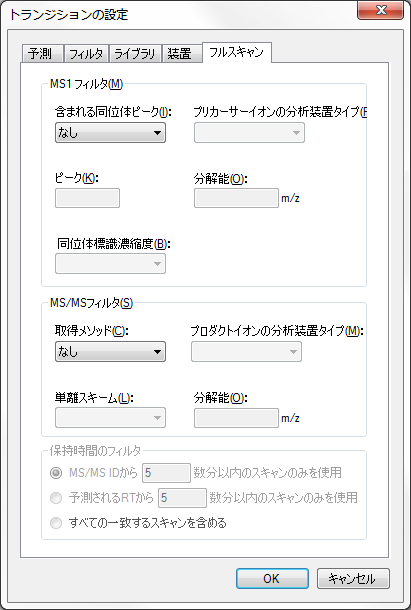
1. MS1スキャン
2. MS/MSスキャン – 親*m/z* 582.32
3. MS/MSスキャン – 親*m/z* 473.90
4. MS/MSスキャン – 親*m/z* 722.34
5. MS/MSスキャン – 親*m/z* 653.36
6. MS/MSスキャン – 親*m/z* 820.47
7. MS/MSスキャン – 親*m/z* 547.32
8. MS/MSスキャン – 親*m/z* 523.77
9. MS/MSスキャン – 親*m/z* 563.76
10. MS/MSスキャン – 親*m/z* 417.89
11. MS/MSスキャン – 親*m/z* 444.55

Skylineを利用してこのようなターゲットMS/MSメソッドを、Thermo-Scientific、Bruker Daltonik、およびAB SCIEX装置向けにエクスポート可能です。Agilent装置およびThermo Q Exactiveについては、単離リストと呼ばれるものをエクスポート可能であり、Watersについては対応準備中です。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、フルスキャンデータ分析用のドキュメントを構成する必要があります。

現在のドキュメントをこのチュートリアルで用意したThermo生ファイル分析用に構成するには、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。

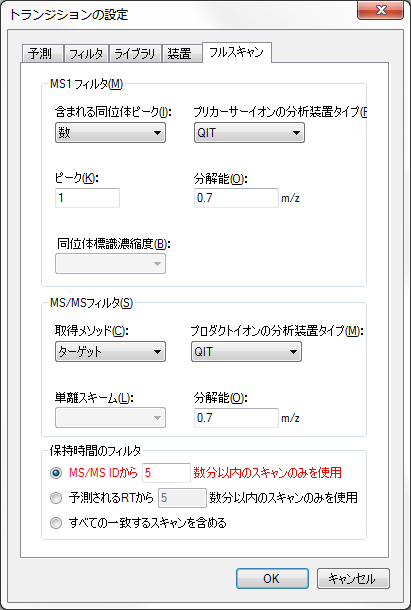
このドキュメントは、まだフルスキャンデータからのクロマトグラム抽出向けに設定されていません。SRMデータについては問題なく動作しますが、フルスキャンデータファイルのインポート用に作成するには一部変更が必要です。[**フルスキャン**] タブは以下のように見えます。



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、さらにSkylineへ少し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 [**プリカーサー一致**] ドロップリストから「シングル」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クロマトグラムがMS1スキャンから排他的に抽出され、すべての断片イオンクロマトグラムがMS/MSスキャンから排他的に抽出されます。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はデフォルトで [**保持時間フィルタ**] 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ホバリングすると、ヒント「このドキュメント内のスペクトルライブラリには、このドキュメントのいずれのペプチドのいずれの保持時間も含まれません」が表示されます。この設定はクロマトグラムを抽出する期間を狭めることを意図しているのですが、スペクトルライブラリを変更しない限り、有用なMS/MS IDが欠けているためSkylineによるフル勾配クロマトグラムの抽出の再分類が必要です、との警告が継続して出されます。しかしここでは、この実験ターゲットMS/MSスキャンを検索することから派生したペプチド検索データをインポートします。以下を行って、クロマトグラム抽出の範囲をもう少し絞ります。

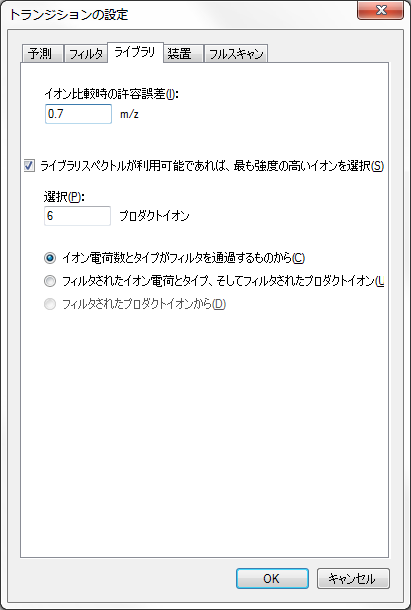
* 抽出範囲を「5」分から「2」分に変更します。

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してクロマトグラムピークの選択を改善できます。

MS/MSライブラリスペクトル一致がSkylineで抽出されるクロマトグラムに正しく対応するよう徹底させるには、フルスキャン設定のMS/MS分解能をライブラリイオン比較時の耐性に一致さ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。
* [**イオン比較時の耐性**] 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。

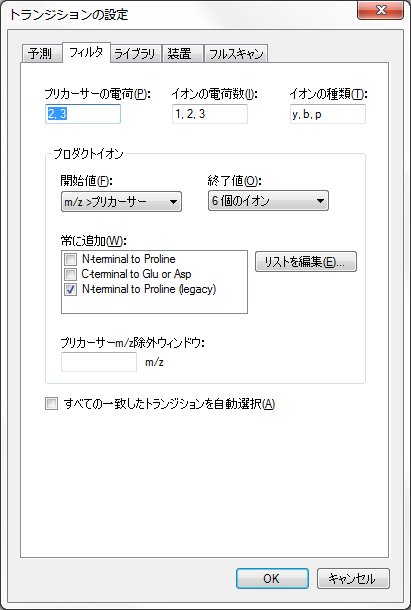


ここで、ライブラリイオン一致ウィンドウはクロマトグラム抽出ウィンドウと同一です。 これは、高分解能データによりやや複雑となる可能性があります。なぜなら、クロマトグラム抽出ウィンドウはm/zにより異なるからです。今後、チェックボックスを追加して2つの設定を強制的に一致させることを検討中ですが、現時点では通常0.05～0.01の間の値が高分解能データに最も適しています（MS/MS質量分析装置の分解能設定により異なります）。

なぜならMS1フルスキャン設定により結果ファイル内のMS1スキャンからシングルモノアイソトピックプリカーサーピークが抽出されますので、ドキュメントにプリカーサーイオンのトランジションアイテムが含まれているか必ず確認することになると見られるからです。しばしば、以下の手順でこれを徹底可能です。

* [**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。

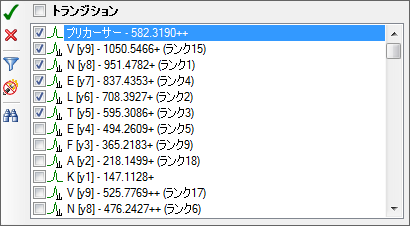
各ペプチドプリカーサーアイテムにプリカーサートランジションが含まれているよう徹底させるには、以下を行います。

* [**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。

残念なことに、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、Skyline内で、[**フィルタ**] タブでの変更に対応してトランジショントランジションを変更することができません。以下のように、プリカーサートランジションを手動で追加しなければなりません。

* 最初のプリカーサー「582.3190++」上にマウスカーソルをホバリングして、標識の右側のドロップダウン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ョンを確認します。

フォームは以下のように見えるはずです。



* 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、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構成されました。またこれは、LTQ装置のターゲットMS/MSメソッドのエクスポートにも使用可能です。

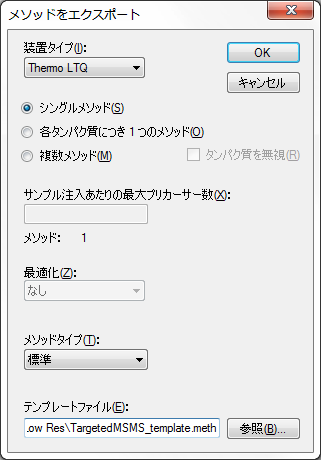
# ターゲットMS/MSメソッドのエクスポート

メソッドのエクスポートは、そのメソッドを実行しようとする装置制御コンピュータを使用して、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、その他の設定内での良好な動作は考慮してないからです。Skylineはこれらのベンダーのライブラリを使用して、用意されたテン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。一部のケースでは、ベンダーのソフトウェアをパーソナルコンピュータ上に設定して、装置制御PC上の環境を模倣可能ですが、これは推奨されません。Skylineドキュメントをパーソナルコンピュータ上で編集して、その後、最終的なメソッドエクスポートのために装置制御コンピュータに転送する方が、はるかに良い方法です。

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転送し、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。
* [**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に移動します。  
  LTQ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。

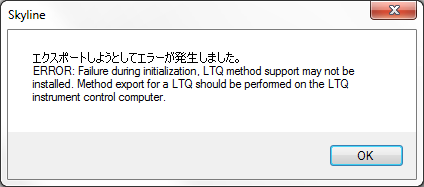


* [**OK**] ボタンをクリックします。
* [**Thermo LTQメソッドをエクスポート**] フォーム内で、メソッドを保存するフォルダに移動します。
* [**ファイル名**] フィールドに、「TargetedMSMS\_BSA\_Protea.meth」と入力します。
* [**保存**] ボタンをクリックします。

実際にこの手順をThermo LTQ上で行った場合、この操作は成功し、指定した新しい「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。

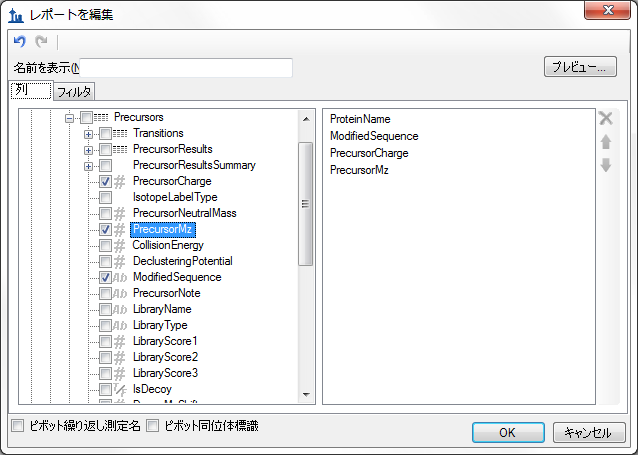


[**OK**] ボタンをクリックしてこのチュートリアル継続しますが、類似の手順はThermo LTQ、Bruker TOFおよびAB SCIEX TOFの装置制御コンピュータに有効であり、将来的にはAgilentおよびWaters TOFの制御コンピュータにも有効であることに留意してください。または、ファイル > エクスポート > Agilent TOFおよびThermo Q Exactive装置の単離リストを利用可能です。

しかしこのように小さ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すので、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。

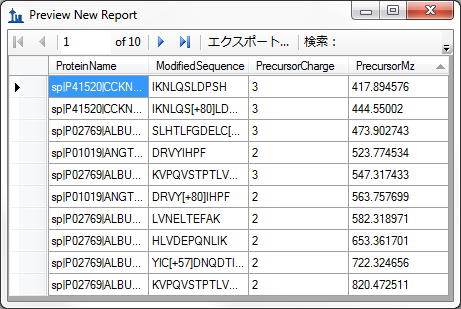
* [**ファイル**] メニューで、[**エクスポート**] を選択して [**レポート**] をクリックします。
* [**レポートをエクスポート**] で [**リストを編集**] ボタンをクリックします。
* [**レポートを編集**] で [**追加**] ボタンをクリックします。
* [**レポートを編集**] フォームで以下のフィールドを追加します。
  + ProteinName
  + Peptides.Precursors.ModifiedSequence
  + Peptides.Precursors.Charge
  + Peptides.Precursors.Mz

[**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。



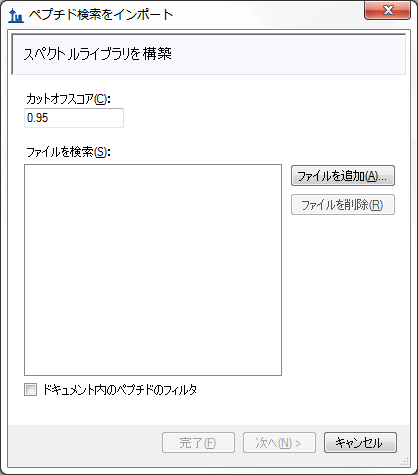
このフォームにはプリカーサー*m/z*値が表示されていますので、現在直接メソッドエクスポートをサポートしていない装置であっても、このドキュメントのターゲットMS/MSメソッドの設定に時間はかからないはずです。実際のところ、検査を試みようとしているデータの元のメソッドはこの方法で作成されました。注: しかしSRMのように、ターゲットMS/MS（またはPRM）実験がスケジュール化取得に高く依存するようになると、それをスケジュールするSkyline内のアルゴリズムが急速に非常に重要となります。

# フルスキャンデータをインポート・検査する

Thermo LTQ上で収集したペプチド検索結果と2つの生データ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。

* すべてのフォームが棄却されSkylineのメインウィ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。

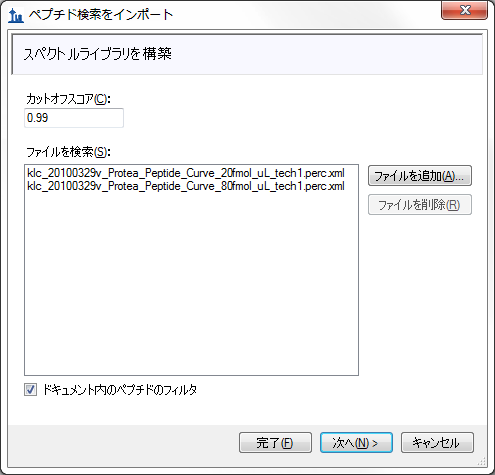
Skylineに以下のようなウィザードフォームが表示されます。



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保持します。
* [**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。

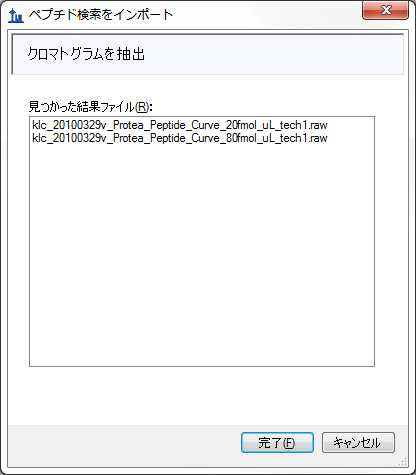
フォームは以下のように見えるはずです。



* [**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ドキュメントの周りに生データ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生ファイルが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。

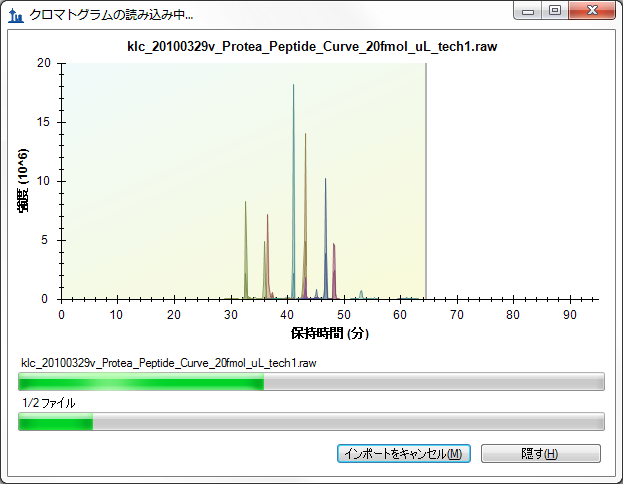
ウィザードフォームは以下のように見え、クロマトグラム抽出のためにSkylineが使用するファイルが表示されているはずです。



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のみを選択可能であるため、抽出クロマトグラムを除きこのドキュメント向けには何も残っていないことがSkylineにより正確に決定されます。

* 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。

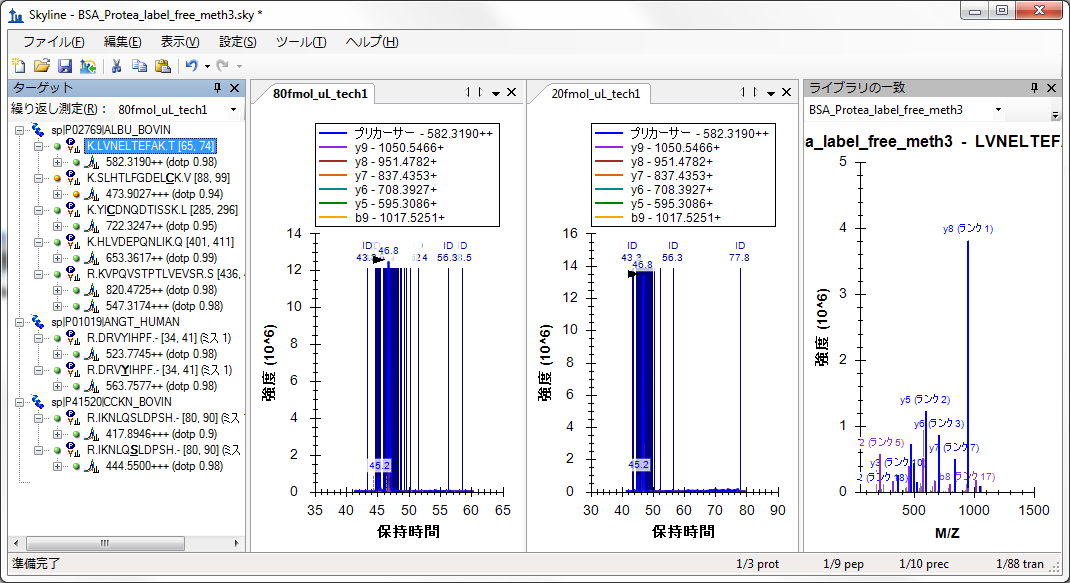


# データを再確認する

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。

* [**ビュー**] メニューで、[**グラフを配置**] を選択して [**タイル**]（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。



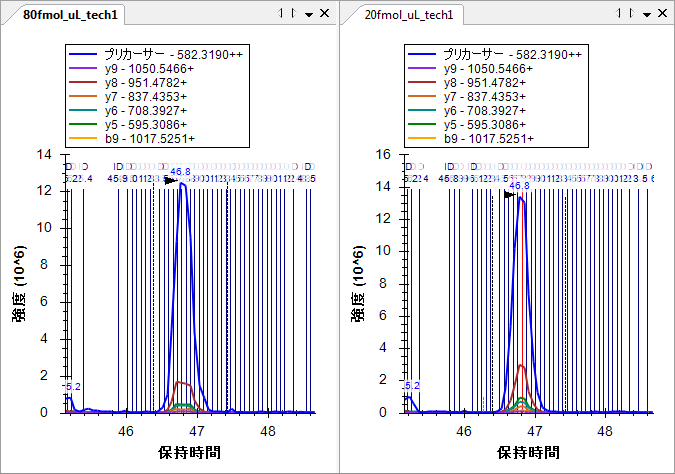
このビューでクロマトグラムを見るのは、スペクトルIDが多数あるため、やや困難である可能性があります。これらには、青い垂直ライン、「ID」の文字および同定されたスペクトルの分単位の時間が注釈付けされています。選択したクロマトグラムピークが、その頂点を示す黒の矢印ポインタ付きで、これらのIDの真ん中に現れます。

クロマトグラムピーク強度（1.4 x 107）は、期待していたより4:1希釈のもの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ペプチドを定数バックグラウンドとして使用したからです。

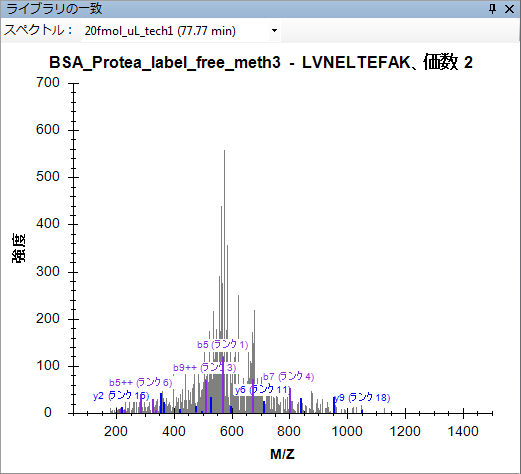
このフルクロマトグラムビューがSkylineで表示されている場合、以下を行ってクロマトグラムの積分ピークへとズームインします。

* [**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の個別の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と、[**ライブラリ一致**] ビューでその他のスペクトルを見られます。または、[**ライブラリ一致**] ビューで上部のドロップダウンリストをクリックして、スペクトル時間の長いリストから選択してください。ペプチド検索エンジンが、明確なクロマトグラムピークからこの豊富なペプチドを含むスペクトルをどれほど同定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。ピーク積分境界を超えるスペクトルを見てみると、信号対ノイズ比が非常に低いということが分かります。



また、予測される3つのタンパク質を含むFASTAファイル上の未特定の開裂により検索が実行され、その後Uniprot FASTA全体が反転されました。

* [**ライブラリ一致**] 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検査しづらい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ID時間**] を選択して [**一致**] をクリックします（チェックがオンでない場合）。

[**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右下角に表示されます。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。

* [**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。
* [**ビュー**] 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。フル5-ポイント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。



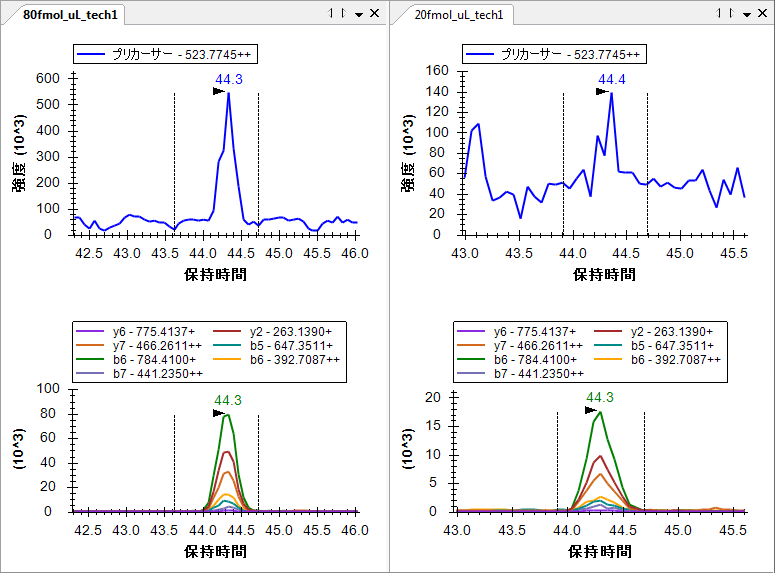
次に、ヒューマンペプチドDRVYIHPFに注目してみましょう。ここでは、サンプル名80 fmolおよび20 fmolにより示唆されるように4:1の濃度比が見られると予測されます。Skylineが実際に行った測定値の詳細を見るには、以下を行います。

* [**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 x 106、および20 fmol プロダクトイオンは合計約0.7 x 106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 x 106および20 fmol面積はほぼ4 x 106、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 x 106にまで落ち込みます。または、80 fmolピーク面積の¼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ポイントのみを含めました。）

低分解能LTQは、MS/MSスキャン1から抽出された断片イオンクロマトグラムを使用する定量的実験を実行するにあたり、完全に容認可能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。

R.IKNLQ**S**LDPSH.- [80, 90] K.HLVDEPQNLIK.Q [401, 411]

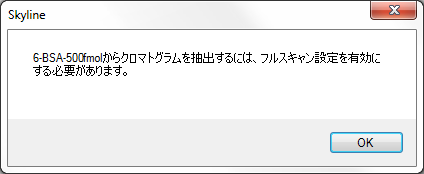
# 高分解能質量スペクトルで作業する

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ます。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と、以下のエラーメッセージが表示されます。

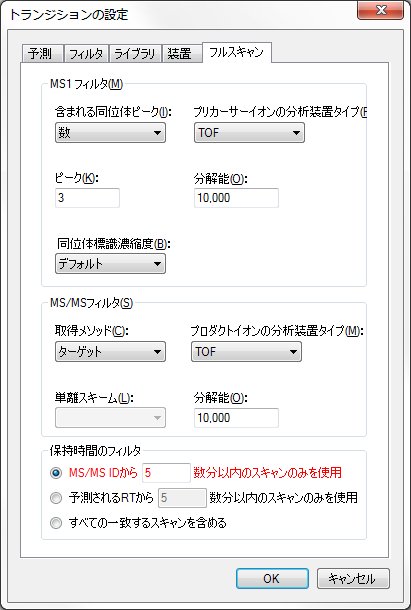


実際にこれを行う場合、元に戻す（ctrl+Z）を利用してドキュメントを元の状況に戻します。

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。
* MS/MSフィルタの [**プリカーサー一致**] ドロップリストから「シングル」を選択します。
* [**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もありません。設定をこのままにしておくと、Skylineはフル勾配クロマトグラムを抽出します。なぜなら、MS/MS IDが欠けているからです。以下をおこなって、これを明示的に選択することもできます。

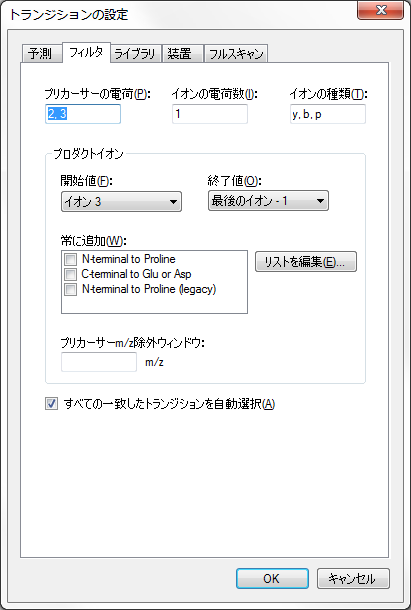
* [**保持時間のフィルタ**] の [**すべての一致するスキャンを含める**] オプションをクリックします。

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「フル勾配クロマトグラムはインポートに時間がかかりり、ディスク容量をより多く消費し、ピーク選択の有効性が低下します。」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。

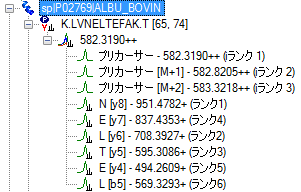


* [**OK**] ボタンをクリックします。

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。



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が直交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ペク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をインポート・検査する

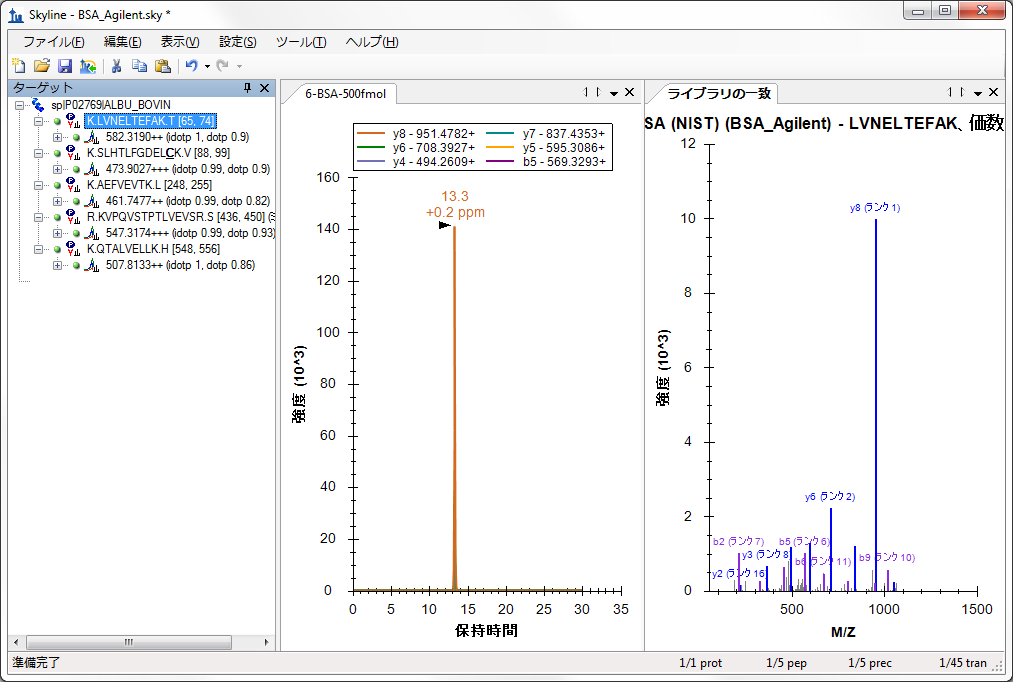
希釈シリーズの最高濃度の実行をドキュメントにインポートするには、以下の手順を実行します。

* [**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。

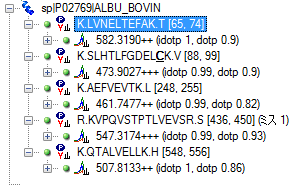
* [**ペプチド**] ビュー内の最初のペプチド（K.LVNELTEFAK.T [65, 74]）を選択します。
* [**編集**] メニューで、[**すべて折り畳む**] を選択して [**プリカーサー**]（Ctrl+Shift+W）をクリックします。
* [**ライブラリ一致**] ビューの右上角の「X」をクリックして、ビューを閉じます。

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思います。

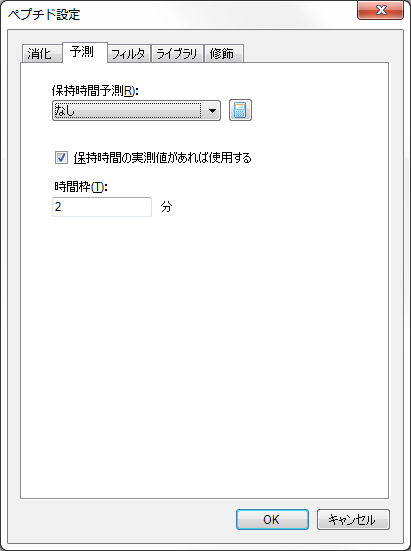
[**ペプチド**] ビューにズームインすると、2つの直交ドット積値、idotpおよびdotpが、順に、プリカーサー同位体分布およびプロダクトイオン強度に追加されているのが見られます。この最高濃度については、クロマトグラムピークと予測相対強度との間の非常に良好な相関度が、これらの値により示されています。



その他の5つの濃度ポイントのフル勾配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。

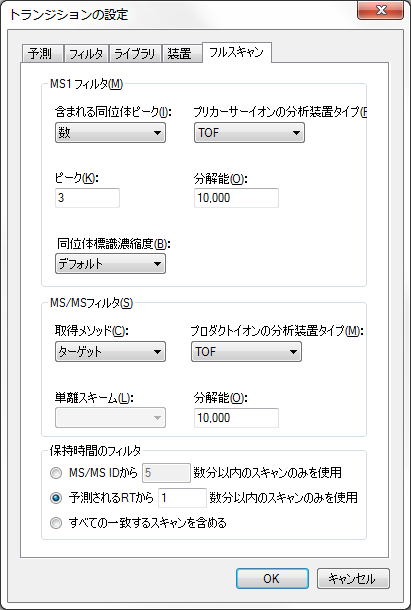
* [**設定**] メニューで [**ペプチド設定**] をクリックします。
* [**予測**] タブをクリックします。
* [**測定された保持時間があれば使用する**] チェックボックスをオンにします。
* [**時間枠**] フィールドに「2」を入力します。

[**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。
* [**保持時間のフィルタ**] ボックスで、[**予測RTの5分以内のスキャンのみを使**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。



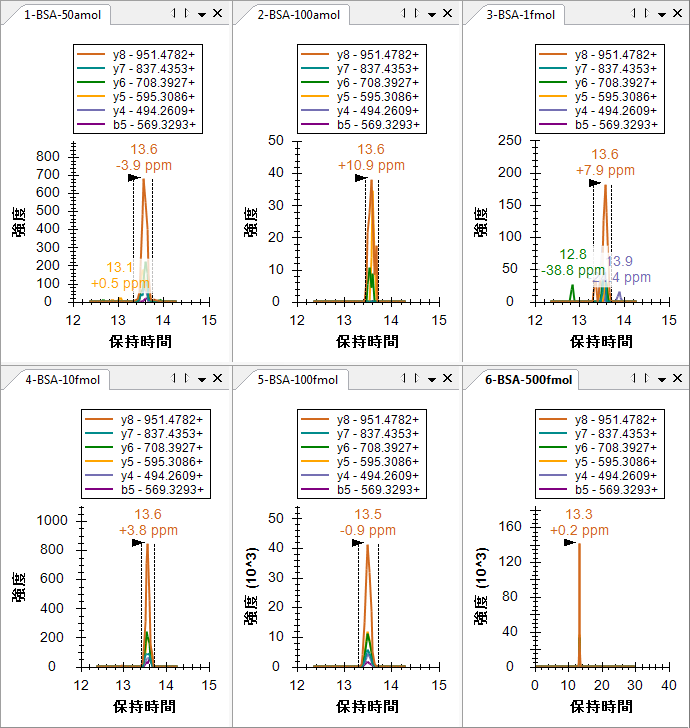
このデータセットから残りの生データファイルをインポートするには、以下の手順を実行します。

* [**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。
* [**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キーを押し下げながら、「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。
* [**ビュー**] 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。
* [**グループペイン**] 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。

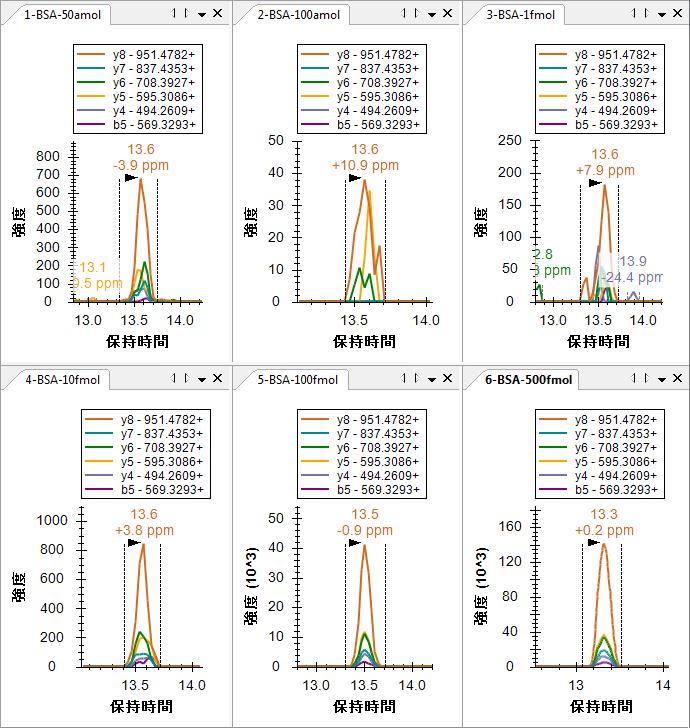
クロマトグラムグラフは以下のように見えるはずです。



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。

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

これにより、クロマトグラムは以下のようになります。

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。

* [**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。
* [**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（SLHTLFGDEL**C**K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ますが、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）で示される次数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。

* [**ビュー**] 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。
* [**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)

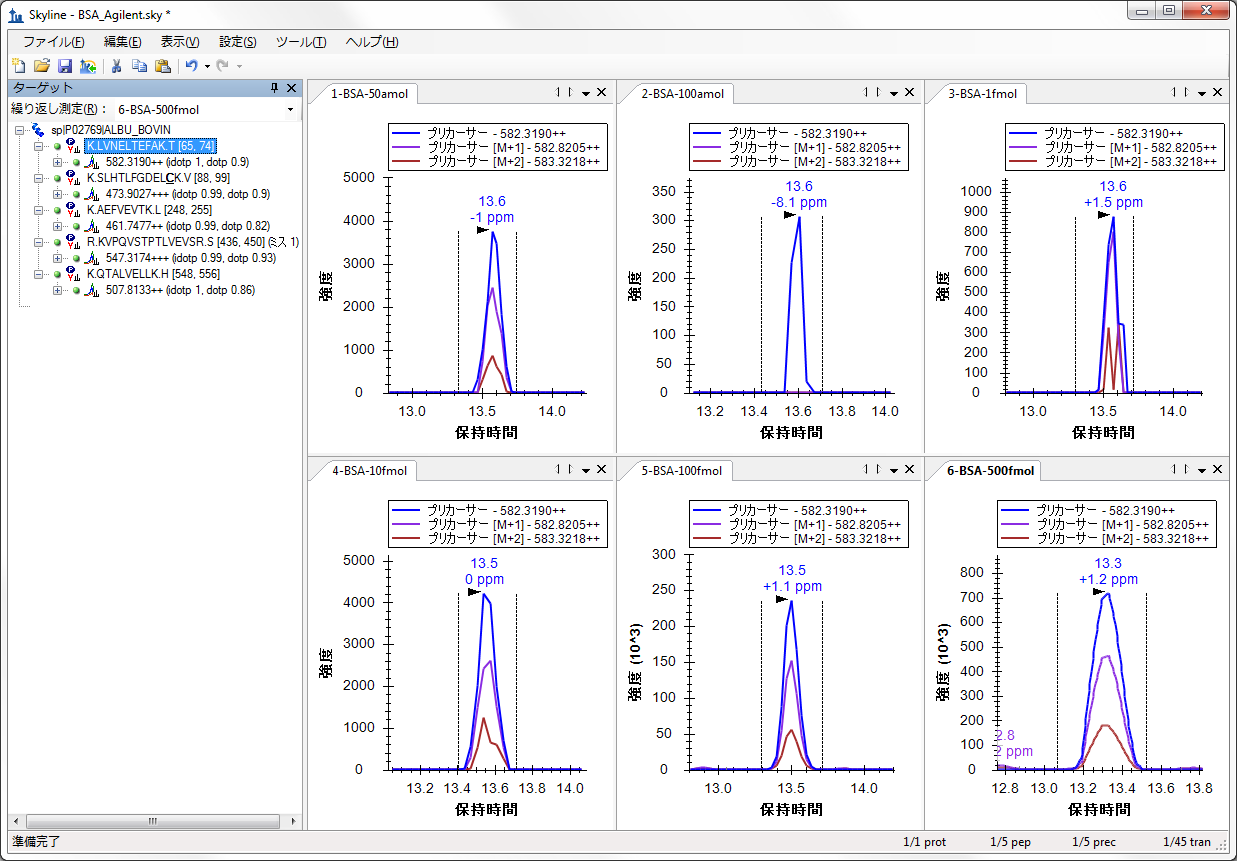


これまでのように、最高強度のプロダクトイオン（y8）はモノアイソトピックプリカーサーの強度の約1/5（1.4 x 105 v.7.2 x 105）に達しており、M+2ピークでさえもy8ピークより強度が高くなっています。

プリカーサーピークのみを見るには、以下を行います。

* [**ビュー**] 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。



[**ピーク面積**] グラフは以下のように見えるはずです。



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、スケジュール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。ネイティブ結果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、データ理解支援のためSkylineが提供しているクロマトグラム、概要グラフ、レポートについては、トリプル四重極SRM実験またはチュートリアルを通じて熟知するものとします。

# 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