Skyline iRT保持時間予測

ペプチド保持時間を予測することは、ターゲットプロテオミクスにおいて長く関心が寄せられています。早くはバージョン0.2においてSkylineは、「[ターゲットメソッドの調整](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=tutorial_method_refine)」チュートリアルで説明されている通り、その非修飾シークエンスを前提として、ペプチド保持時間を予測する方法の1つとしてSSRCalc疎水性カルキュレータ1を積分しました。バージョン0.5までにSkylineは、ターゲット実験の定期的取得において最新鋭となった内容をサポートしました。ここの技法もまた「[ターゲットメソッドの調整](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=tutorial_method_refine)」チュートリアルで説明されていますが、これには、複数繰り返し測定実験に使用するシステム上でスケジュール化されていない、すべてのターゲットペプチドを最初に測定する工程が含まれます。スケジュール化されていない注入の保持時間は、その後、クロマトグラフィーの変更が必要ない限り、すべての後続の取得をスケジュール化するために使用されます。

スケジュール化されていない測定技術は、クロマトグラフィーに変更が導入されるといつでも、単一研究所の複数装置を共有・使用する内部研究所メソッドによる変更なのか、または単一装置中期実験の列の変更であるかに関わらず、スケジュール化された各メソッドについて潜在的に多くの質量分析実行を必要とするという欠点があります。MacCoss labの実験では、5つの未スケジュール化実行には、45を超える繰り返し測定のシングルルメソッド取得の780のトランジションを、スケジュール化することが必要でした。NCI-CPTACの検証作業グループにより実施された最新の研究において、6つの未スケジュール化実行には、150～200を超える注入実験のシングルメソッド取得の750のトランジションをスケジュール化することが必要でした。この研究では11の研究所で14の装置を使用しました。また、一部の研究所で列変更を必要となる多くの注入を行いました。以前測定したペプチド保持時間を保存して、研究所や装置が異なってもまたは勾配が変更されも、校正実行1つで再利用でできる技術があれば、ターゲット実験で使用するスケジュール化メソッドの作成が大いに簡素化されることは、明らかである思われます。

より正確に保持時間が予測できると、予測された保持時間がピーク同一性検証のためのよりパワフルなツールとなります。例えば、平均から得た2つの標準偏差が5分である場合、その数値が1分である場合よりも、多くのピーク候補を信頼できるようになります。

iRT標準2は当社と協力関係にあるBiognosys（<http://www.biognosys.ch/>）により提案され、Skylineのバージョン1.2でサポートされていますが、これにより、予測精度と保持時間可搬性の両方が高いレベルで提供されます。このチュートリアルでは、30分勾配で実験的に測定した保持時間をiRT値として保存して、これらの値を利用して90分勾配のターゲットメソッドをスケジュール化します。また、iRTを利用して保持時間予測でのエラーを削減することで、ピーク同定の信頼度が増加する様子についても見ていきます。さらには、データ依存性取得（DDA）実験から構築されたスペクトルライブラリ内のペプチド保持時間をiRT値に変換します。これを使用することで、繰り返しになりますが1回の校正注入で、発見実験からスケジュール化されたターゲット実験へと直接移行できます。

# 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/iRT.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\iRT

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。このフォルダの中のファイル「iRT-C18 Standard.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内で [**ファイル**] メニューの [**開く**] メニューをクリックしてください。

# iRTカルキュレータを校正する

このチュートリアルでは、Biognosysペプチド標準混合（<http://www.biognosys.ch/products/rt-kit.html>）を利用してBiognosysが定義したiRT-C18標準を使って作業しますが、iRT自体はあらゆる標準ペプチドを利用してあらゆるペプチドに適用可能であるというのが基本概念であり、測定が容易であると同時にほとんどの勾配をカバー可能です。開いたドキュメントに変更を行う前に、[**ファイル**] メニューで [**名前を付けて保存**] をクリックして、新しいコピーを「iRT-C18 Calibration.sky」の名前で作成したiRTフォルダに保存します。

ここでこのチュートリアルを開始するには、自分の装置で所望の標準ペプチドを測定したかのように、新しいiRTカルキュレータを校正する準備をします。以下を行ってください。

* [**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。
* [**結果をインポート**] の [**OK**] ボタンをクリックします。
* このチュートリアル用に作成したiRTフォルダにリストされている、最初の2つの.rawファイルを選択します。
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_1\_30min-5-35.raw
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_2\_30min-5-35.raw
* [**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ようSkylineから指示されたら、[**削除**] 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 [**タイル**]（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 [**ペプチド比較**]（Ctrl+F8）をクリックします。

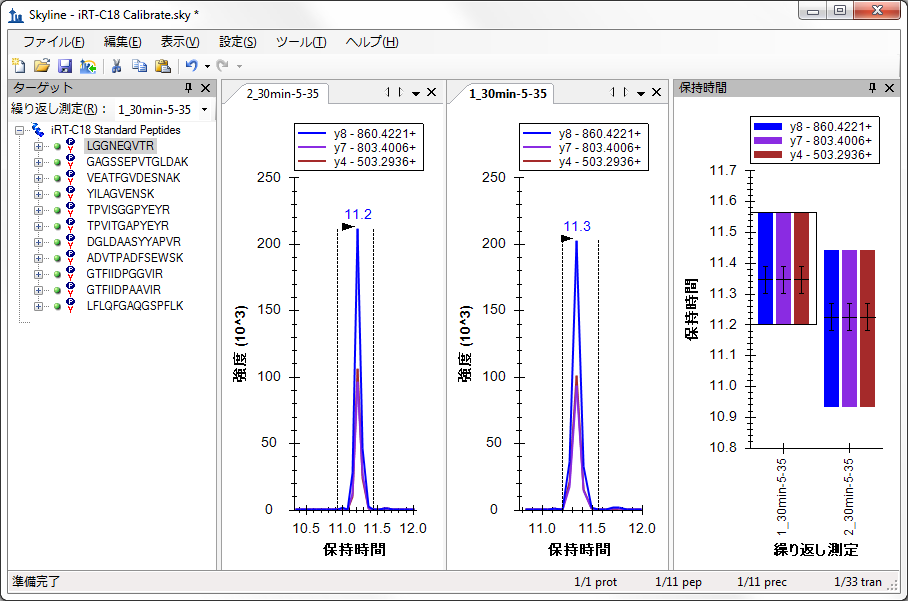
Skylineに、以下のようなグラフを示す [**保持時間**] ビューが表示されます。



これにより、各ペプチドが30分勾配を超えると平均していつ溶出するかを、最高レベルで見ることができます。以下を行って、引き続きデータを再確認します。

* [**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**] をクリックします。
* タイトルバー内をクリックして [**保持時間**] ビューをSkylineウィンドウの右端へとドッキングさせ、以下のように、右隅近く、アイコンの内側に入るまでマウスのカーソルをドラッグします。  
  
* ドキュメント内の最初のペプチドLGGNEQVTRを選択します。

Skylineは以下のように見えるはずです。

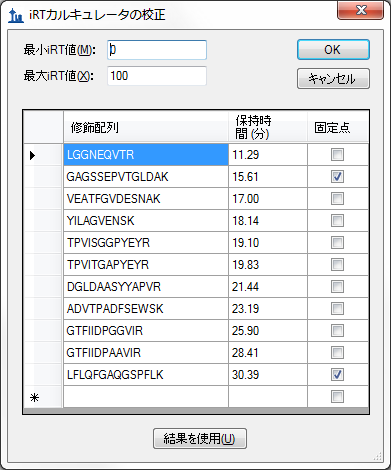


下向き矢印キーを使用してBiognosys標準混合内の11のペプチドをそれぞれ再確認して、積分が正しく表示されているか、およびどちらの繰り返し測定も同様の保持時間で積分ピークを示しているかを確認します。自動積分はこれらのペプチドについてかなり良好に動作しますので、手動で変更を行う必要はありません。このチュートリアルでは、2つの繰り返しのみが含まれます。ご自身で新しいiRTカルキュレータを実際に校正していた場合、ペプチドの平均保持時間の推定を改善するには、より多い数値を使用したのではと思われます。保持時間カルキュレータを校正するため [**結果を使用**] するようSkylineに要請すると、各ペプチドについてのあなたの測定値の平均値が使用されます。そしてこれらの値の精度は、あなたのペプチドの真の保持時間平均の推定値として、測定値の数の平方根に比例します。

校正データの品質を検証するに、以下の手順を実行して新しいiRTカルキュレータを作成し校正します。

* [**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。
* （[**保持時間カルキュレータ**]）ボタンをクリックして、メニュー内の [**追加**] をクリックします
* [**iRTカルキュレータを編集**] の [**名前**] フィールドに、「iRT-C18」と入力します。
* [**作成**] ボタンをクリックします。
* [**iRTデータベースを作成**] フォームで、このチュートリアル用に作成したiRTフォルダに移動します（必要な場合）。
* [**ファイル名**] フィールドに、「iRT-C18」と入力します。
* [**保存**] ボタンをクリックします。
* [**iRTカルキュレータを編集**] の [**校正**] ボタンをクリックします。
* [**iRTカルキュレータを校正**] の [**結果を使用**] ボタンをクリックします。
* ペプチドGAGSSEPVTGLDAKをもつ行の [**固定点**] チェックボックスをオンにします。

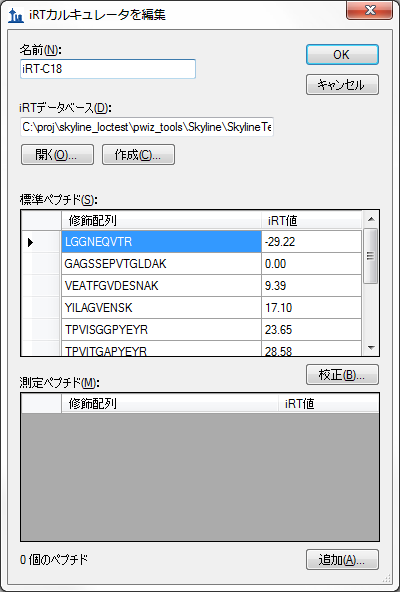
[**iRTカルキュレータを校正**] は以下のように見えるはずです。



* [**OK**] ボタンをクリックします。

注：これは、単にBiognosysがiRT-C18スケールを定義した方法です。ご自身のスケールを定義する場合、固定点を最初および最後の溶出ペプチドとして残して構いませんし、その他のペプチドを選択して使用しても構いません。固定点およびスケールの選択はある程度恣意的なものです。ユーザーはいつでも独立して、相対的に保持時間スケールを定義して、その後、そのスケールへと残りのiRT値をマッピングできます。

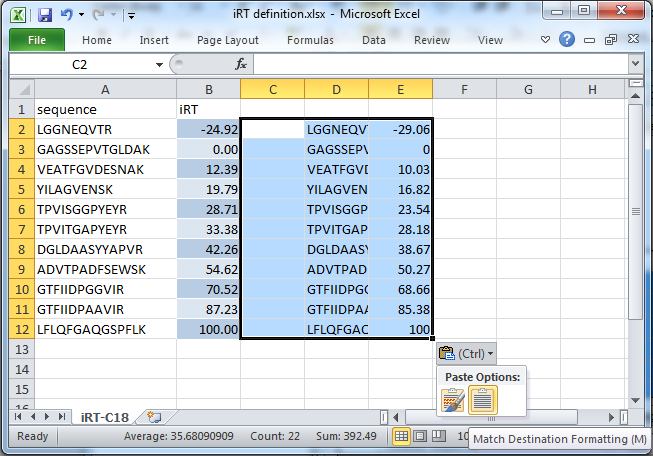
[**iRTカルキュレータを編集**] フォームは以下のように見えるはずです。



以上です。測定データを持つ新しいiRTカルキュレータを校正し終わりました。しかしこのケースではBiognosysのチームが、おそらく2つ以上の繰り返し測定を利用して、彼らの標準混合をすでに校正していました。したがってこのチュートリアルでは、この校正を正準なものに置き換えますが、まずは2つがどれだけ近いかを以下を行って見てみます。

* [**標準ペプチド**] グリッドをクリックします。
* Ctrl+Aを押してすべての行を選択します。
* Ctrl+Cを押して、選択したセル内のテキストをコピーします。
* Windows Explorer内で、このチュートリアル用に作成したiRTフォルダに移動します。
* iRTフォルダの中の「iRT definition.xlsx」ファイルをダブルクリックします。
* スプレッドシートのセルC2を選択します。
* Ctrl+Vを押して、コピーしたセルを貼り付けます。
* Ctrlキーを押して放し、Mキーを押して移動先のフォーマットを一致させます。

スプレッドシートは以下のように見えるはずです。



新しく計算されたiRT値が定義値に合理的に近いことが分かりますが、当該定義内で提供される値を利用して最良の結果を得るべきです。これには、次の手順を実行します。

* Excel内のセルA2-B12を選択します。
* Ctrl+Cを押してそれらをコピーします。
* [**iRTカルキュレータを編集**] フォームに戻ります。
* Ctrl+Vを押して、定義値を貼り付けます。

可視ペプチドの時間が定義値へと変わるのが見られます。

* [**iRTカルキュレータを編集**] の [**OK**] ボタンをクリックします。
* [**ペプチド設定**] の [**OK**] ボタンをクリックします。

定義値と測定したペプチドとの間の相関度を見るには、以下の手順を実行します。

* [**保持時間]** ビューのタイトルバーをダブルクリックして、ロック解除します。
* [**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るはずです。



グラフの左上角に、ピアソンの相関係数0.9991が見られます。X-軸の下にiRT-C18が見られない場合は、以下を行う必要があります。

* [**保持時間**] グラフを右クリックし、**[カルキュレータ**] を選択して [**iRT-C18**] をクリックします。

2つのインポートされた繰り返し測定をそれぞれ個別にグラフ化したこの回帰を見るには、以下を行います。

* [**保持時間**] グラフを右クリックし、[**繰り返し測定**] を選択して [**シングル**] をクリックします。

2つの繰り返し測定のクロマトグラムグラフのタブををクリックすると、切片値が1\_30分-5-35の15.15および2\_30分-5-35の15.04から変更されているのが見られます。差は非常にわずかですが、この種の再確認をより複雑なデータセットで行いたいと思われるかもしれません。

# 新しいターゲットペプチドにiRT値を追加する

これで完全に校正されたiRT-C18カルキュレータが得られますが、標準外のペプチドのiRT値なしでは、これはほとんど利用価値がありません。このセクションでは、SRM実験の実験結果に基づき、最初のターゲットペプチドを自分のカルキュレータに追加します。新しいペプチドで作業を始める前に現在のファイルを保存し、その後以下の手順を実行して、新しいターゲットペプチドのiRT値の計算を可能にするドキュメントを作成します。

* [**ファイル**] メニューで [**開く**] をクリックします。
* 作成したiRTフォルダの中のファイル「iRT Human.sky」をダブルクリックします。
* Endキーを押して、[**プチドビュー**] の下部にある挿入要素を選択します。
* [**ファイル**] メニューで、[**インポート**] を選択して [**ドキュメント**] をクリックします。
* ファイル「iRT-C18 Standard.sky」をダブルクリックします
* 上記手順を抜かして結果をこのドキュメントに保存した場合、これらの結果をどうするかSkylineからメッセージが出ます。この場合、[**結果情報を削除**] を選択して [**OK**] ボタンをクリックします。
* スクロールダウンして「iRT-C18標準ペプチド」リストがドキュメントの最後に追加されているか確認します。

[**プチドビュー**] は以下のように見えるはずです。



このドキュメントを「iRT Human+Standard.sky」として保存し、その後もう一度「iRT Human+Standard Calibrate.sky」として保存します。

## iRT取得メソッドを作成する

ご自身の装置上でデータを収集して新しいiRT値を計算していた場合、そのデータを取得するのための装置メソッドが必要であったと思われます。Skylineウィンドウの右下角をご覧いただくと、このドキュメントが現在1231のトランジションを含んでいることが分かりますが、これらすべてをスケジュール化せずに測定するとしたら複数の注入が必要となるでしょう。しかし以下の2つの事実を活用して、これをより扱いやすくすることができます。

1. ドキュメントは、安定同位体標識参照ペプチドを測定するよう設定されています。
2. 保持時間値にのみ関心があり、定量的測定は対象外です。

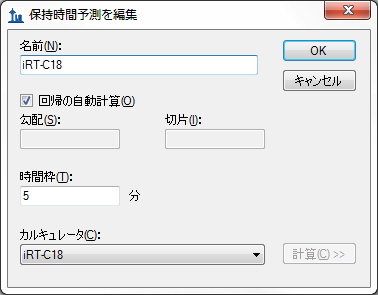
トランジションの数をほぼ半分にカットするには、以下の手順を実行してこのドキュメントから重いプリカーサーを削除します。

* [**編集**] メニューで、[**調整**] を選択して [**詳細**] をクリックします。
* [**標識タイプを削除**] フィールドで「重い」を選択します。
* [**OK**] ボタンをクリックします。

トランジションが632に削減されたのが見られます。メソッドをエクスポートしてこれらの新しいペプチドの保持時間を測定する前に、新しいiRT-C18カルキュレータの使用を指定する必要があります。それによりSkylineが、すべてのメソッドにおいて標準ペプチドのトランジションを含めるべきであると、認識するようになります。これを行うには、以下の手順を実行します。

* [**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（すでに有効になっていない場合）。
* [**保持時間予測**] フィールドで「<追加…>」を選択します。
* [**保持時間予測を編集**] の [**名前**] フィールドに、「iRT-C18」と入力します。
* [**カルキュレータ**] フィールドで、新しいカルキュレータ「iRT-C18」を選択します。
* [**回帰を自動計算**] チェック ボックスをオンにします。
* [**時間ウィンドウ**] フィールドに「5」を入力します。

フォームは以下のように見えるはずです。

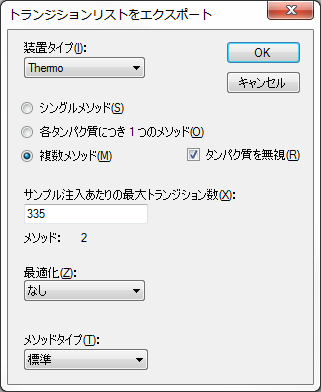


* [**OK**] ボタンをクリックします。
* [**保持時間予測**] フィールドに新しい予測「iRT-C18」が含まれていることを確認します。
* [**ペプチド設定**] の [**OK**] ボタンをクリックします。

スケジュール化されていないトランジションリストをエクスポートして新しいターゲットペプチドを測定するには、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**] 選択肢をクリックします。
* [**タンパク質を無視**] チェックボックスをオンにします。
* [**サンプル注入あたりの最大トランジション数**] に「335」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 は以下のように見えるはずです。



* [**OK**] ボタンをクリックします。
* [**トランジションリストをエクスポート**] 保存フォームの [**ファイル名**] フィールドに、「iRT Human+Standard Calibrate」と入力します。
* [**保存**] ボタンをクリックします。

ターゲットペプチドの新しいiRT値を計算するため、Biognosys標準混合からのペプチドを持つ新しいターゲットペプチドを測定する、2つのトランジションリストを生成しました。標準は注入のたびに測定されるということが重要です。またSkylineは、繰り返し測定ごとに複数注入を使用するスケジュール化されたメソッドについても、あなたに代わって自動的にこれを扱います。

ご自身の実験については、装置メソッドへと直接エクスポートすることを選択して、手動でトランジションリストを読み込ませるのを回避しても良いでしょう。また、より小さい最大トランジションレベルを選択しようと思われるかもしれません。有効な保持時間測定を得るため十分に認識できるピークのみを求めているのですから、それは正しい選択であるといえますが、335カウントはかなり挑戦的です。このデータを生成したBiognosysチームはすでに、これらのターゲットペプチドに十分熟知しています。このタスクでよく見られる値は、このチュートリアルのはじめに述べた実験で使用されているとおり、100～150であると思われます。

生成されたCSVファイル「iRT Human+Standard Calibrate\_0001.csv」および「iRT Human+Standard Calibrate\_0002.csv」をExcel内で開くと、Thermo TSQ装置の通常のトランジションリストが見られます。それぞれの下部に、iRTカルキュレータ内にリストされている標準ペプチドを測定するためのトランジションが見られます。

## データをインポートおよび再確認する

チュートリアルフォルダには、今作成したものに似た、トランジションリストの取得データを持つファイルが含まれています。実際のところ、チュートリアルのiRT校正セクションへとインポートを行いました。ヒューマンペプチドのクロマトグラムを無視するよう選択したのです。ファイルを現在のドキュメントへと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。
* [**新しい繰り返し測定**] 選択肢をクリックします。
* [**結果をインポート**] の [**OK**] ボタンをクリックします。
* このチュートリアル用に作成したiRTフォルダにリストされている、最初の2つの生ファイルを選択します。
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_1\_30min-5-35.raw
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_2\_30min-5-35.raw
* [**開く**] ボタンをクリックします。

iRT-C18カルキュレータがこれらの新しいペプチドをどのようにスコアリングしているか見るには、以下の手順を実行します。

* ドッキングを解除し線形回帰を表示するよう設定した [**保持時間**] グラフを右クリックし、[**カルキュレータ**] を選択して [**iRT-C18**] をクリックします。

データがインポートを終了すると、以下のようなグラフが表示されます。



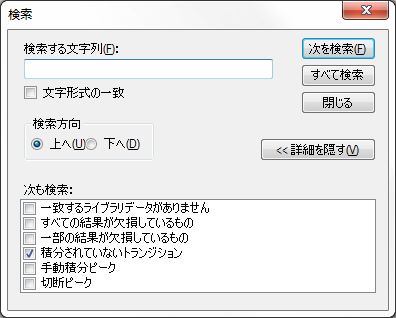
グラフの左側の紫色のポイントのクラスタは、これらのペプチドが今だ校正されたiRT値を持っていないことを示します。 しかし、iRT値を計算する前にピーク積分を再確認することは、良い考えであると思われます。自分自身のiRT値を実際に校正する場合、すべてのペプチドについて非常に慎重に行ってください。

これらの最初のスケジュール化されていない注入を使用してスケジュール化されたメソッドを作成し、iRTへと変換する前に、複数の繰り返し測定で測定して平均保持時間の推定値を改善できるようにしたいと、思われるかもしれません。シングル測定だけの場合、基本統計により、平均で5%のペプチドが平均の2倍の標準偏差を持つようになることが示されています。

しかしこのチュートリアルでは、シングル測定のみを使用して積分の大まかなチェックのみを実行します。Skylineにより積分の問題が発見されたペプチドを再確認するには、以下の手順を実行します。

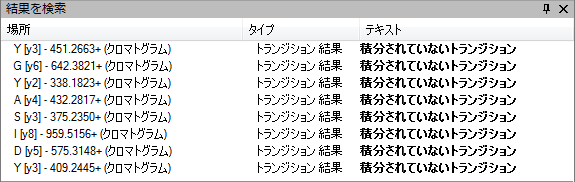
* [**編集**] メニューで [**検索**] (Ctrl+F) をクリックします。
* [**検索対象**] フィールドがクリアされていることを確認します。
* [**詳細を表示**] ボタンをクリックします。
* [**次も検索**] リストで、[**積分されていないトランジション**] チェックボックスをオンにします。

[**検索**] フォームは以下のように見えるはずです。



* [**すべて検索**] ボタンをクリックします。
* [**閉じる**] ボタンをクリックします。

Skylineウィンドウの下部に、8つの積分されていないトランジションを示す [**結果を検索**] ビューが表示されるはずです。



これらのピークを含むペプチドを再確認するには、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、[**自動ズーム**] を選択して [**最良ピーク**]（F11）をクリックします。
* [**結果を検索**] ビューの各行をダブルクリックします。

これらのいくつかは干渉を受けたトランジションであり、最も強度の強いトランジションの1%未満（面積あたり）の信号を有します。

Skylineはそのようなトランジションを排除しますので、最終的な定量メソッド用にどのトランジションを保持するかの決定が容易になります。しかしこの決定がすでに行われている場合は、含まれているすべてのトランジションを一定に積分するよう、Skylineを強制したほうが良いでしょう。これを行うには、以下の変更を実行します。

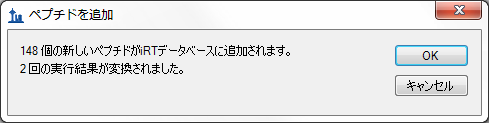
* [**設定**] メニューで、[**すべて統合**] をクリックします。

## iRT値を計算する

ここで、このドキュメント内のターゲットペプチドのiRT値を計算するには、以下の手順を実行します。

* [**保持時間**] ビューの線形回帰グラフを右クリックし、[**カルキュレータ**] を選択して [**現在値を編集**] をクリックします。
* [i**RTルキュレータを編集**] フォームにiRT-C18カルキュレータが表示されますので、[**追加**] ボタンをクリックしてボタンの下に表示されるメニュー内の [**結果を追加**] をクリックします。

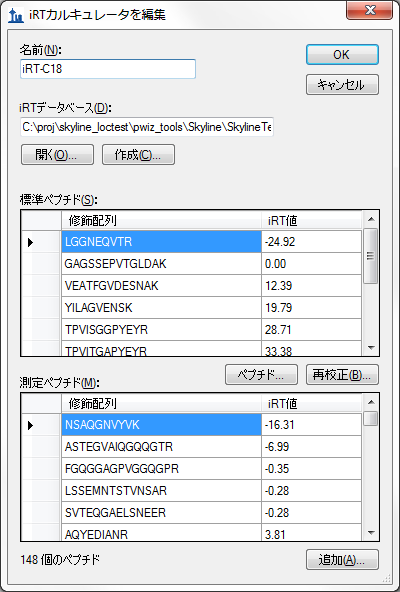
Skylineに以下の情報メッセージが表示されます。



注: 2つの実行のiRT値を生成するにあたりSkylineは各実行について分離線形回帰を実行しました。各実行の線形回帰を利用して、その実行のペプチドのiRT値が計算されます。複数実行に同一のペプチドが含まれている場合、Skylineはこれらの最後に計算されたiRT値の平均をとります。これは、物理的な保持時間を平均化して開始する場合とは非常に異なり、実行ごとの勾配の変動が認められています。

* [**OK**] ボタンをクリックします。

[**iRTカルキュレータを編集**] 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。

[**保持時間**] ビューは以下のように変更されるはずです。



30分勾配で取得されたデータを使用して、147の新しいヒューマンペプチドのiRT-C18値を校正し終わりました。

# iRTを使用して新規取得をスケジュール化する

次に、iRTを利用してどのように、既存メソッドを新しいクロマトグラフィー設定や変わりゆく勾配長さに適用し、たった1回の校正実行の後で、比較的小さな時間ウィンドウでスケジュール化された取得を開始できるか、を探索していきます。

これをあなた自身の研究所で行った場合、元の「iRTStandard.sky」ファイルを開いて、そのメソッドをエクスポートし、その後そのメソッドを標準混合が注入された完全に準備済みのサンプル上で取得するのではないでしょうか。チュートリアルフォルダに、まさにこの方法で作成した生データファイルが含まれています。上記で測定されたのと同じサンプルが新しい列と90分勾配を持つ質量分析計へと注入されましたが、標準ペプチドが測定されたのみです。

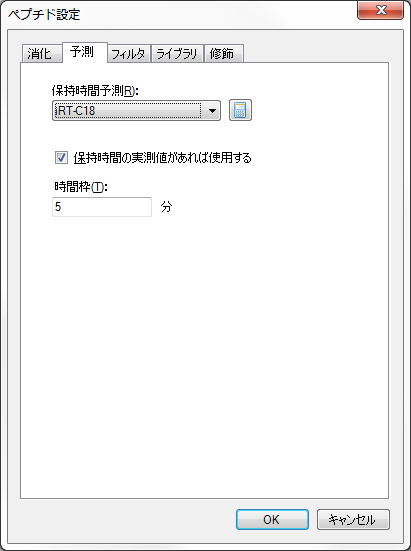
継続する前に以下を行います。

* [**ファイル**] メニューで [**保存**] (Ctrl+S) をクリックします。
* [**結果を検索**] ビューを閉じます。

作成したメソッドを新しい列および90分勾配に対して再校正するには、以下の手順を実行します。

* [**ファイル**] メニューで、先に保存した（Alt-F, 2）「iRT Human+Standard.sky」ファイルをクリックします。
* [**編集**] メニューで [**検索**] (Ctrl+F) をクリックします。
* [**詳細を隠す**] ボタンをクリックします。
* [**検索対象**] フィールドに「NSAQ」と入力します。
* [**次を検索**] ボタンをクリックします。
* [**閉じる**] ボタンをクリックします。
* 消去キーを押して、その他のドキュメント内で消去したペプチドを消去します。
* [**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。
* [**保持時間予測**] ドロップダウンリストで、作成した「iRT-C18」予測を選択します。
* [**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。
* [**時間ウィンドウ**] フィールドに「5」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。
* [**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。
* このチュートリアル用に作成したiRTフォルダの中のファイル  
  「A\_D110913\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_90min-5-40\_TRID2215\_01.raw」  
  をダブルクリックします。

データがインポートを終了すると、[**保持時間**] 回帰グラフが以下のように表示されます。



ここでは標準ペプチド時間が約15分～65分の範囲にあるのが見られ、この実行でターゲットペプチドは測定されませんでした。しかし、この新しい勾配でそれらを測定する準備が整っています。

# iRT予測を使用してスケジュール化されたメソッドエクスポートする

スケジュール化されたメソッドを作成する前に、以下を行って、潜在的なスケジュールパラメータの下でトランジションを測定する方法についてより良く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。

[**保持時間**] ビューが変更され、以下のようなグラフが表示されるはずです。



上記グラフ内に3つのすべてのラインが表示されない場合、以下を行います。

* グラフを右クリックして、[**プロパティ**] をクリックします。
* [**グラフプロパティをスケジュール**] の [**時間ウィンドウ**] フィールドに、「2、5、10」と入力します。
* [**OK**] ボタンをクリックします。

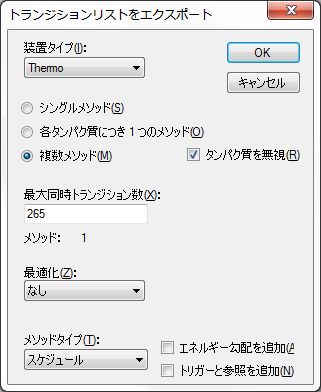
このグラフから、ウィンドウサイズのスケジュールへの効果を見ることができます。時間ウィンドウが小さいほど、任意の時間内に同時に測定可能なトランジションは少なくなり、これにより特定のドウェル時間を前提とする1回注入でより多くのトランジションを測定可能です。ターゲットペプチドのパーセントのピーク全体を囲い込むのに必要なウィンドウサイズは、以下の関数により近似されます。

「z」は内の標準偏差の数についての極めて重要な値であり、その中で所望のパーセントが正規分布、すなわち95% = 1.96に同調します。予測が完全でありピーク幅または保持時間に変動がない場合、必要なウィンドウサイズはピーク幅と同じです。予測が完全であっても、ピーク幅または保持時間の変動により、必要なウィンドウサイズが広がります。最後に、予測エラーによりサイズはさらに広がります。保持時間を予測する最新鋭のメソッドでさえ、スケジュール化された取得より前にターゲットシステム上でスケジュール化されていないシングル測定は完全ではないという事実は、注目に値します。平均保持時間を予測しようとしているのですから、すべてのペプチド約5%は、そのシングル測定におけるそれらの平均から、少なくとも2つの標準偏差となります。

iRTメソッドにより、このチュートリアルのターゲットペプチドは、5分ウィンドウ内で、90分勾配上で測定可能となるはずです。上記グラフによりこれは、シングルサイクルにおける測定が約265トランジションを超えなくとも実行可能であることが、示されています。 10msのドウェル時間では、これにより最大2.6秒のサイクル時間が生成されます。スケジュール化された取得を使用して、この新しい勾配上でこのドキュメントの1223のトランジションを測定するシングルメソッドを作成するには、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。
* [**メソッドタイプ**]フィールドで、ドロップダウンリストから「スケジュール化」を選択します。
* [**最大同時トランジション**] フィールドに「265」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見えるはずです。



または単に「シングルメソッド」オプションを選択可能ですが、当該フォームに「[**メソッド**]:1」が表示されるという事実により、5分ウィンドウを持ち常時測定される同時トランジションが265未満の1回注入においてトランジションを測定可能であることが確認されます。これは定量的測定としてはそれでも少し高いですが、2つの注入内の多くのトランジションの半分を測定する必要がある335よりは改善されています。希望する場合、この数を135に下げることが可能であり、これには2回の注入が必要であることがSkylineにより示されています。または、注入を3回にすると90に下げることができます。しかし、継続する前に必ず265に設定し直してください。

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

Windows Explorer内で、これにより本チュートリアル用のiRTフォルダの中にファイル「iRT Human+Standard\_0001.csv」が作成されていることを、検証可能です。Excel内で、このファイルに1223のトランジションすべてが含まれていることを検証可能であり、開始時間と終了時間を5分間離してスケジュールできます。

# スケジュール化されたデータを再確認する

今しがた作成したもののようなメソッドから取得したデータを再確認するには、まず以下を行って90分勾配校正データを削除します。

* [**編集**] メニューで、[**結果を管理]**（Ctrl+R）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。

ここで、スケジュール化されたメソッドと共に取得されたデータを、以下を行ってiRTを利用してインポートします。

* [**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。
* このチュートリアル用のiRTフォルダの中のファイル「A\_D110913\_SiRT\_HELA\_11\_sMRM\_150selected\_90min-5-40\_SIMPLE.raw」をダブルクリックします。

データ読み込み中に、以下を行って [**保持時間**] ビューを [**線形回帰**] に戻すことが可能です。

* [**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。

データが読み込みを終了すると、[**保持時間**] ビューに以下のようなグラフが表示されます。



このグラフから、6つの異常値ペプチドがあることが即座に分かります。これは、現在のデータ内の誤った積分ピークにより、またはiRT値が計算された校正データ内の誤った積分ピークにより引き起こされた可能性があります。この場合、問題は30分勾配上でのiRT校正の間に Skylineにより自動的に選択されたピークにあります。あなたが見ているデータは、上記で生成したスケジュール化されたメソッドにより実際に収集されたものではないことに、留意することが重要です。その場合、異常値ペプチドのクロマトグラムには ここで検知されたピークが含まれることさえないでしょう。このデータは、このチュートリアルでは割愛しましたが、校正データをより綿密に再確認した後に作成されたスケジュールメソッドにより収集されました。

1つの異常値ポイントのみが実際に、凡例で「異常値」と指定されている紫色となっているのはなぜかと思われている場合、それは相関係数閾値が、これだけ相関度の高いカルキュレータ用にうまく設定されていないからです。以下を行って相関閾値を変更可能です。

* [**保持時間**] グラフを右クリックし、[**閾値を設定**] をクリックします。
* [**閾値**] フィールドに「0.998」と入力します。
* [**OK**] ボタンをクリックします。

[**保持時間**] グラフは以下のように見えるはずです。



ここで各異常値ポイントをクリックして、Skylineによりペプチドビューから選択が行われるようにします。Escを押してメインウィンドウに焦点を戻して、Ctrl+Cを押してペプチド標識をコピーします。これらを別のエディタで収集して、後に再確認することが可能です。またはSkylineの2番目のインスタンスを、先に作成した「iRT Human+Standard Calibrate.sky」ファイル上で開くことが可能です。その後 **[検索**] フォームを利用してこれらの2つのペプチドを再確認可能です。

EVVEEAENGR  
LLADQAEAR

どちらのケースも、校正データ内の関心対象のペプチドのように、自信をもって同定できるものを見つけるのは非常に困難です。これは、校正実行をできる限り慎重に行うべきなのはなぜなのかを説明する良い事例です。

ここで、このより正確なデータに基づき、本ドキュメントのすべてのペプチドのiRT値を再計算可能です。これには標識を付けた参照ペプチドを利用して、確実に正しいピークが選択されるようにします。上記で概説する校正手順を繰り返し、指示があった場合は [**既存値を置換**] を選択します。しかしこのチュートリアルでは、以下を行って誤って校正されたペプチドを削除可能です。

* [**保持時間**] グラフを右クリックして、[**異常値を削除**] をクリックします。

6つの異常値がグラフから削除され、ペプチドの数が2つ減り156となります。



上記グラフの「予測」という名の線形方程式は、このドキュメント内の標準ペプチの測定済み時間を利用して、iRT値ごとに、Skylineにより自動的に計算されることに、留意してください。これは、[**保持時間予測を編集**] の [**回帰を自動計算**] チェックボックスをオンにした場合に、そうするよう指示があったからです。

ここでペプチドビュー内をクリックし、下向き矢印キーを利用してペプチドクロマトグラムを再確認します。 Skylineに以下のようなグラフが表示されます。

****

標準を除くすべてのペプチドに軽いおよび重いプリカーサーペアがあるのが見られ、概して、各ピークでスケジュール化されていないデータより多くのポイントが見られます。また、「予測」と標識が付けられた注釈の中のピークの予測時間が、Skylineに示されているのも見られます。

この場合、データは1回注入からのものですが、ここでも [**回帰を自動計算**] 設定により、各注入の分離回帰の計算がSkylineにより行われます。これは、すべてのペプチドを測定するため複数のスケジュール化注入を必要とするドキュメントについてさえも行われる場合があり、より正確に定量化されるようにしたい場合は、これについてもその可能性があります。そのようなドキュメントのメソッドのエクスポートでは、各メソッドにおける標準ペプチドのトランジションがSkylineにより含められます。この自動回帰機能により、すべての注入について線形方程式を1つだけ計算するよりも正確な保持時間予測が得られ、それにより、「予測」注釈がより強力なペプチド同一性検証ツールとなります。

# MS/MSスペクトルからiRT値を計算する

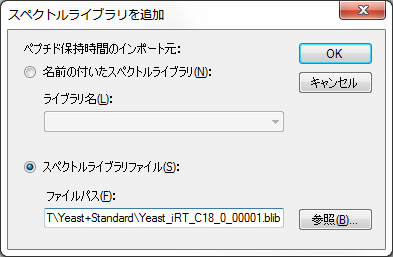
サンプル化と同定を十分に信頼できる高濃度のiRTカルキュレータの標準ペプチドを含む、データ非依存性取得（DDA）実行を収集する場合、結果として生じるデータを使用して、SRMデータで行ったのとほとんど同じ方法でiRT値を計算可能です。これらのiRT値は平均して精度に劣ります。なぜならこれらは、ペプチド溶出ピークのあらゆる場所で起こる可能性があるスキャン時間に基づいているからです。しかしスキャンベースのiRT値は、DDA発見実験からスケジュール化されたSRMへの直接のトランジションに対して利用可能であり、当該プロセスにおける装置時間をかなり節約します。

このチュートリアルのiRTフォルダ内に、サブフォルダ「Yeast+Standard」が見られますが、これにはスペクトルライブラリ「Yeast\_iRT\_C18\_0\_00001.blib」が含まれています。このスペクトルライブラリは、Biognosys RT標準混合を追加した酵母溶解物の、2つのDDA実行上のSEQUESTペプチド検索結果から構築されました。 以下に見られるように、iRTデータベース内にペプチドを十分に有しているようになると、インポートするデータ内に常に標準ペプチドを含める必要がなくなります。しかし、Skylineにより構築されるBiblioSpecライブラリフォーマットを使用する必要があります。その他のフォーマットでは個別の質量分析実行の個別の保持時間を維持できませんので、クロマトグラフィーが同一である保持時間での回帰の実行が不可能となります。

以下を行って、このライブラリ内で一致しているペプチドスペクトルのiRT値を追加可能です。

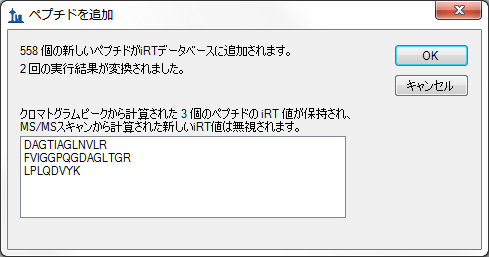
* [**保持時間**] グラフを右クリックし、[**カルキュレータ**] を選択して [**現在の設定を編集**] をクリックします。
* [**iRTカルキュレータを編集**] の [**追加**] ボタンをクリックして、[**スペクトルライブラリを追加**] をクリックします。
* [**スペクトルライブラリを追加**] の [**スペクトルライブラリファイル**] 選択肢の1つをクリックします。
* [**参照**] ボタンをクリックします。
* 「iRT」フォルダの「Yeast+Standard」サブフォルダをダブルクリックします。
* 「Yeast\_iRT\_C18\_0\_00001.blib」ファイルをダブルクリックします。

[**スペクトルライブラリを追加**] 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。

Skylineに以下のようなフォームが表示されます。



Skylineでライブラリ内の両方のDDA実行について有効な回帰を計算可能であったことが、当該フォームにより示されます。これらの回帰を利用して、558の新しいペプチドのiRT値が計算されました。ここでもiRT値は、回帰計算した線形形質転換を利用して、各実行ごとに個別に計算されます。両方の実行に現れるペプチドにより2つのiRT値が生成され、それらは平均化されます。またSkylineで3つのペプチドが見つかりますが、それらについては、クロマトグラムピークを基にiRT値がすでに分かっていますので、飛ばして先に進みます。

* [**OK**] ボタンをクリックします。

これで [**iRTカルキュレータを編集**] フォームには、[**測定済みペプチド**] リスト内に705のペプチドがあることが表示されているはずです。

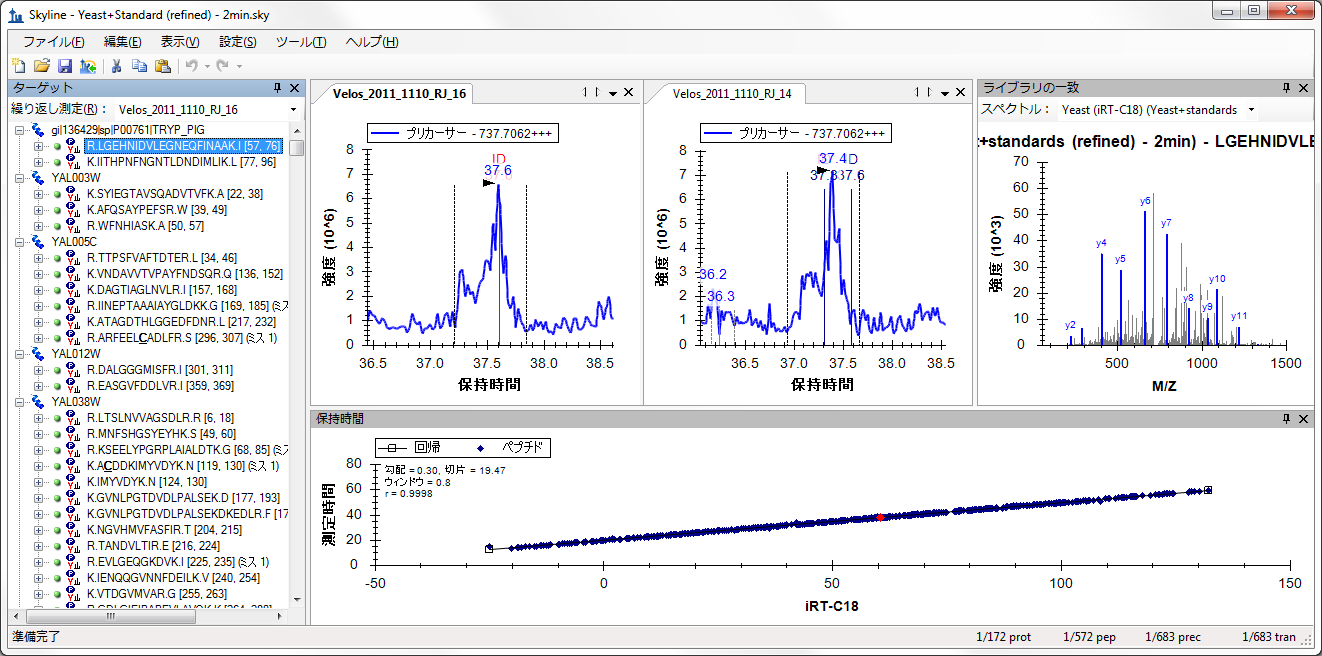
* [**OK**] ボタンをクリックします。

# MS/MSスキャン時間をクロマトグラムピーク時間に変換する

ここで、MS/MSスキャン 時間を基に計算したiRT値を使用して、これらのペプチドのSRM取得をスケジュール化可能です。その後、SRMデータを利用してクロマトグラムピーク時間に基づくより正確なiRT値を得ることができます。しかしSkyline MS1フィルタを利用して、クロマトグラムピーク時間を元のDDA実行から直接抽出することもできます。MS1フィルタドキュメントにデータをインポートするための設定の詳細については、[MS1フィルタリング](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=ms1_filtering)チュートリアルをご覧ください。このチュートリアルでは以下を行って、すでに作成されデータがインポートされているドキュメントについて軽く触れ、スペクトルライブラリの作成に使用する2つのDDA実行について見ていきます。

* [**ファイル**] メニューで [**開く**]（Ctrl+O）をクリックします。
* 「iRT」フォルダの「Yeast+Standard」サブフォルダに移動します。
* 「Yeast+Standard (refined) - 2min.sky」ファイルをダブルクリックします。
* ペプチドビュー内の最初のペプチドを選択します。

Skylineウィンドウは以下のように見えるはずです。



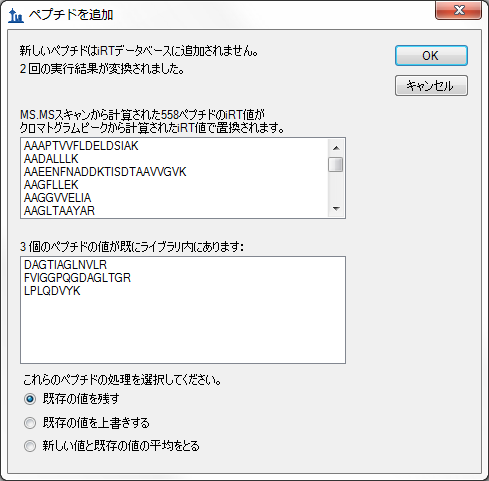
[**保持時間**] ビューのタイトルバーをダブルクリックすると、グラフがより見やすくなります。また、ライブラリスペクトルから計算されたiRT値による測定時間の回帰の相関係数は0.9998であることが分かります。ですので、クロマトグラムピークの使用とMS/MSスキャン時間の使用の対比からは、期待するほどのものは得られないと思われます。一方このデータセットは、両方の実行でピークが明確であった両方の実行で検知されたペプチドのみを保持するよう、手動で調整済みです。スペクトルライブラリデータを使用してペプチドの初期正準iRT値を計算する場合に、検知基準を課することを検討しても良いでしょう。

このファイルで見られるクロマトグラムは、当該スペクトルライブラリの構築に使用されたDDA実行のMS1スキャンから抽出されたものです。また、同定済みMS/MSスキャンが記録された時間も見ることができます。これらは、クロマトグラムグラフ内で「ID」により注釈付けされています。繰り返しになりますが、このデータプロセスメソッドの利用方法、その利点の詳細については、[MS1フィルタ](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=ms1_filtering) チュートリアルで学ぶことができます。

MS/MSスキャン時間を使用して計算されたiRT値をこのドキュメント内のクロマトグラムピー時間を使用して計算されたiRT値へと変換するには、以下の手順を実行します。

* [**保持時間**] グラフを右クリックし、[**カルキュレータ**] を選択して [**現在の設定を編集**] をクリックします。
* [**iRTカルキュレータを編集**] の [**追加**] ボタンをクリックして、[**結果を追加**] をクリックします。

Skylineに以下のようなフォームが表示されます。



それを指示するため、以前のセクション内で追加した558のiRT値が置換されます。クロマトグラム ピーク時間を使用しているため、酵母およびヒューマンサンプルで共有されている3つのペプチドを置換する、または2つの平均を使用するオプションもあります。

* [**OK**] ボタンをクリックして、変更を受け入れます。

# その他のiRTカルキュレータ編集オプション

合理的に優れたiRT値を持つ705のペプチドが揃いました。しかもこれらの計算のためには、最大2回までの繰り返し測定しか行っていません。これらの初期ケースにおいては、iRT-C18カルキュレータ定義で指定されたペプチド標準混合を含むデータセットを使用しました。しかしこれは必須ではありません。これで、利用中のiRTデータベースに共通して十分にペプチドを有しているあらゆるデータセットから、新しいiRT値を計算できるようになりました。Skylineでは、相関度0.99以上の回帰を生成する共通のペプチドが使用されますが、それらが20以上存在する場合に限ります。

SkylineのiRTサポートの試験では、上記のようなスペクトルライブラリおよびSkylineドキュメントは、PeptideAtlas3内の公開データから作成されました。このデータセットには20を超える繰り返し測定が含まれ、1000以上のiRT値が生成されましたが、明らかにこのチュートリアルに含めるには大き過ぎました。

また、[**iRTカルキュレータを編集**] の [**追加**] ボタンをクリックすると、Skylineが表示するメニューに作業 [**iRTデータベースを追加**] が含まれることに気付かれたかもしれません。このメニュー項目を利用して、既存のiRTデータベースを現在のカルキュレータへと統合可能です。データベースで同一標準ペプチドが使用される場合、これらは、あるデータベースをその他に変換する回帰を実行するために使用されます。そうでなければ、その他のデータソースと同様、Skylineは、相関度0.99以上の回帰をを生成する2つのデータベースにより共通して所有されているペプチドを使用しますが、それらが20以上存在する場合に限ります。

[**iRTカルキュレータを編集**] の [**開く**] ボタンをクリックすると、既存のiRTデータベースを使用できますが、これはおそらく他の人から受け取ったものと思われます。

また [**iRTカルキュレータを編集**] の [**ペプチド**] ボタンを利用して、標準ペプチドをデータベースに含まれるあらゆるペプチドへと変更できるほか、[**再校正**] ボタンを利用してiRTスケールを変更できます。

# 結論

このチュートリアルではSkylineのiRT向けサポートを利用して、実験的に測定したペプチド保持時間を保存し、SRM取得スケジュールおよび事後取得ペプチド同一性検証に利用できるようにする、標準的な方法を学びました。多くの場合、単一の校正注入で、 測定するペプチドのiRT値を保存している限り、トランジションをいくつでもスケジュールすることができます。また正確な保持時間予測により、iRT予測がシークエンスベースの予測より強力なペプチド同一性確認のツールとなります。Skylineサポートにより、iRTメソッドが使いやすく、iRT値を生成しやすくなります。iRT値を、標準ペプチドのあらゆるスケールおよびあらゆるセットに基づき計算可能です。一連のペプチド内在性を特定の実験に対する標準として利用可能ですが、一定して測定可能であり、予測を試みる勾配範囲のほとんどに広がっている場合に限ります。また、Skylineにより、データベースが共通のペプチドを有している場合のiRTデータベースの統合が容易になります。また、Biognosys RTキットを利用するBiognosysチームにより初期定義された標準iRTスケールである、iRT-C18についても学びました。ご自身の実験にこのキットを利用可能です。またはSkylineによりiRT-C18スケールを使いやすくできますが、標準ペプチドをそのスケールへと校正した一連のペプチドに変更します。なぜなら、今では何百もの共通のヒューマンペプチドおよび酵母ペプチドが完了しているからです。

# 参照文献

1. 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* **3, 908-919 (2004).**

2. Escher, C. *et al.* Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides. *Proteomics (accepted)* (2012).

3. Deutsch, E. W., Lam, H. & Aebersold, R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep* **9**, 429-434 (2008).