

Skyline MS1 フルスキャンフィルタ

Skyline の使用で質量分析計（マスペクトロメトリー）の生データはドキュメントにインポートされ、視覚的に表示されます。測定対象となるペプチドとその MS/MS トランジションの設定、その最適化および積分境界の選択（もしくは修正）も可能です。Skyline は SRM（selected reaction monitoring: 選択反応モニタリング）または MRM（multiple reaction monitoring: 複数反応モニタリング）と呼ばれるマスペクトロメトリーデータの定量解析ソフトとして開発されたのですが、新たに MS1 スペクトルの時間-強度クロマトグラムが抽出できるように機能が拡張され、DDA（data dependent acquisition: データ依存的取得）モードで計測されたデータのペプチド定量データも使用できるようになりました。

Skyline MS1 フルスキャンフィルタ¹は、DDA モードで測定した（ターゲット分析ではなく Discovery based の）プロテオミクスデータセットのインポートを対象としています。生データのインポート後に Skyline の機能を利用し、複数の測定データファイルのプリカーサーイオンの定量が可能となります。Skyline はデータの視覚化が非常に優れており、安定同位体標識を用いない定量法にも応用が可能となっています。

本チュートリアルでは Skyline の MS1 フィルタの効果的な利用に不可欠な項目について説明します。

- MS1 フィルタ用のドキュメント作成
- 生データのインポートと（MS1 フィルタの時の）プリカーサーイオンのピーク選択に必要な（スペクトルライブラリからの）保持時間情報の使用方法
- 複数の測定データの定量のため MS1 フィルタされたペプチドデータを処理する方法

Skyline は質量分析装置を用いたデータ解析のプラットフォームの提供をしており、使用する測定装置（装置メーカー）に依存しない点が大きな特徴（利点）となっています。実際 Agilent、Bruker、SCIEX、島津製作所、Thermo-Scientific、Waters と市場で見かける大手質量分析メーカーをカバーしており、質量分析装置を使用しているほとんどの研究室で使用可能なソフトです。

はじめに

本チュートリアルを始める前に zip ファイルを以下のリンクからダウンロードしてください。

https://skyline.ms/tutorials/MS1Filtering-22_2.zip

この中のファイルを、コンピュータ上のフォルダへ解凍します。

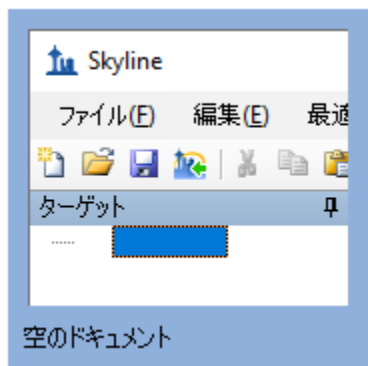
C:\Users\brendanx\Documents

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\MS1Filtering

本チュートリアルを始める前に Skyline をすでに使用していた場合は、Skyline をデフォルト設定に戻してください。デフォルト設定に戻すには、以下の操作を行います。

- Skyline を起動します。
- **開始ページ**で、以下のような**空のドキュメント**をクリックします。

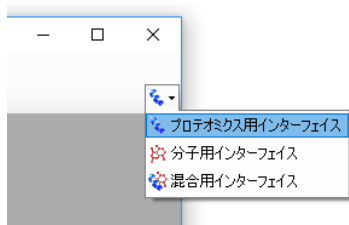



- [設定]メニューで[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで[いいえ]をクリックします。

これで Skyline のドキュメント設定がデフォルトにリセットされました。

本チュートリアルはプロテオミクスに関するものであるため、以下の操作を行うとプロテオミクス用インターフェイスを選択できます。

- Skyline ウィンドウの右上隅にあるユーザーインターフェイス管理をクリックし、[プロテオミクス用インターフェイス]をクリックします。



ウィンドウの右上隅のタンパク質アイコン  が表示されている時はプロテオミクスモードでの動作となります。

この空のドキュメントは多数の方法で編集開始できますが、本チュートリアルではペプチド検索結果の処理、ターゲットペプチドの設定、MS（マスペクトロメトリー）データファイルのインポートという一連の流れをガイドするフォームを使用します。これを Skyline ではウィザードと呼びます。

DDA (data dependent acquisition: データ依存的取得) モードのペプチド検索のインポート

まず DDA データのペプチド検索を行うには[**ペプチド検索のインポート**] ウィザードを使用して、ペプチド検索結果を Skyline ドキュメントに取り込んでください。

以下の操作を行って新しいドキュメントを保存します。

- ツールバーの [**保存**] ボタン(Ctrl+S)をクリックします。
- 本チュートリアル用に作成した MS1Filtering フォルダに移動します。
- [**ファイル名**] フィールドに「MS1FilterTutorial.sky」と入力します。
- [**保存**] ボタンをクリックします。

[**ペプチド検索をインポート**] ウィザードを以下のように開始します。

- [**ファイル**] メニューで [**インポート**] を選択し、[**ペプチド検索**] をクリックします。

以下のようなフォームが表示されます。

ペプチド検索のインポート

スペクトルライブラリ

構築(B) 既存を使用する(U)

開始位置(M):
検索結果 (ライブラリを直接構築)

結果ファイル(R):

ファイル	スコアタイプ	スコアの閾値
------	--------	--------

ファイルを追加(A)...
ファイルを削除(O)

iRT標準ペプチド(T):
なし

あいまい一致を含む(I)

ワークフロー

MS1フィルタを用いたDDA
 DIA
 PRM

完了(F) 次へ(N) > キャンセル

このウィザードを使用して複数のペプチド検索エンジンの1つからスペクトルライブラリを作成します。サポートされている検索パイプラインの詳細については「[ターゲットメソッドの編集](#)」チュートリアルをご覧ください。なお本チュートリアルで使用するファイルは最低限の情報のみを含む縮小版となります。ご注意ください。

以下の操作を行い、検索結果をライブラリに追加します。

- [**ファイルを追加**] ボタンをクリックします。
- 本チュートリアル用に作成した MS1Filtering フォルダにある .group.xml ファイルを両方とも (100803_0001_MCF7_TiB_L と 100803_0005b_MCF7_TiTip3_L) 選択します。
- [**開く**] ボタンをクリックします。

ウィザードフォームは以下のようになります。

ファイル	スコアタイプ	スコアの閾値
100803_0001_MCF7_TiB_L.group.xml	ProteinPilot(言...	0.95
100803_0005b_MCF7_TiTip3.group.xml	ProteinPilot(言...	0.95

- [次へ] ボタンをクリックします。

MS1FilterTutorial.sky ドキュメントに新たにスペクトルライブラリが構築されます（進行状況が表示されます）。新しいスペクトルライブラリが保存された MS1Filtering フォルダに以下の 2 つの新しいファイルが表示されます。

- 最良の一致スペクトルを含むライブラリ（Non-redundant library）
「MS1FilteringTutorial.blib」。
- すべての一致スペクトルを含むライブラリ（Redundant library）
「MS1FilteringTutorial.redundant.blib」。

Ms1FilterTutorial.blib	10/15/2013 10:26 ...	BLIB File	803 KB
Ms1FilterTutorial.redundant.blib	10/15/2013 10:26 ...	BLIB File	1,160 KB

ファイル「MS1FilterTutorial.slc」も表示されます。これはライブラリの読み込み時間を短縮するための Cache ファイルとなります。これは削除可能ですが必要であれば再度作成もできます。

Skyline をすでに使用していてスペクトルライブラリを構築したことがある場合は.sky ファイルと同じ名前のライブラリが作成されます。これはクロマトグラムのドキュメント保存と同じです。クロマトグラムデータ同様に検索結果の追加や削除が可能です。

ライブラリ構築が完了すると以下のように表示されます。

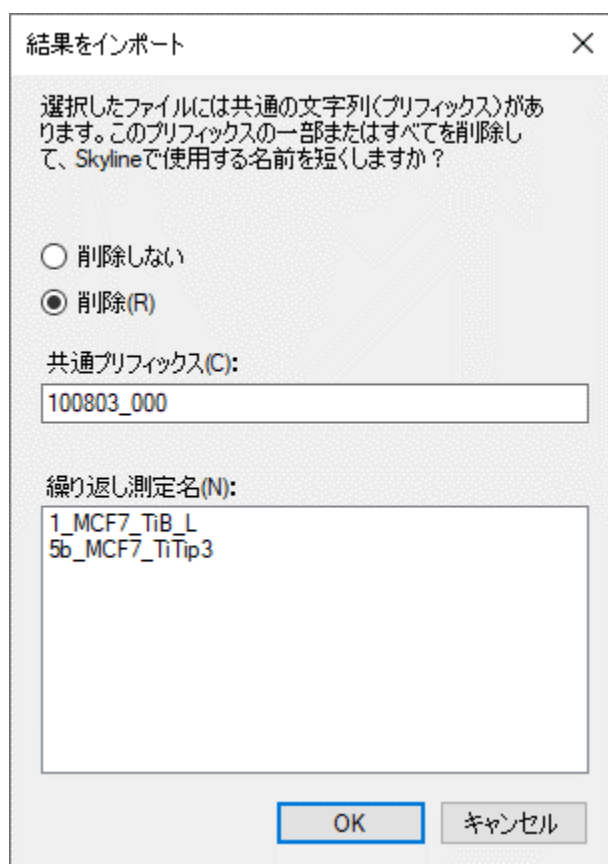


この場合は自動的にライブラリ構築に利用したスペクトルのソースファイルと一致する WIFF データファイルが見つかります。ライブラリには MS/MS スペクトル同定の際に必要なクロマトグ

ラムの保持時間情報 (retention time) が含まれます。クロマトグラム抽出の際に必要なデータファイルが見つからない場合は検索が Skyline 上に表示されます。またライブラリ構築の際にインポートされたペプチド検索ファイル中に保持時間情報が含まれていない場合、同様に Skyline 上に表示されます。ペプチド検索結果ファイルからスペクトルソースファイルや保持時間情報を特定する際にエラーが発生することがありますが、そうした問題のトラブルシューティングについて後述の「ライブラリ保持時間の検証」セクションを参照してください。本チュートリアルを続けるため以下の操作を行います。

- [次へ] ボタンをクリックします。

2 つの WIFF ファイルに共通のプリフィックスをどう取り扱うかを尋ねるフォームが表示されます。



結果をインポート

選択したファイルには共通の文字列(プリフィックス)があります。このプリフィックスの一部またはすべてを削除して、Skylineで使用する名前を短くしますか？

削除しない

削除(R)

共通プリフィックス(C):

100803_000

繰り返し測定名(N):

1_MCF7_TiB_L
5b_MCF7_TiTip3

OK キャンセル

- [OK] ボタンをクリックします。

ウィザードは [修飾を追加] ページに進みます。ここでは、検索結果では見つかったものの、ドキュメントにはないアミノ酸修飾もすべてリストアップされています。場合によっては、Unimod データベースサイトでの検索でアミノ酸、質量の組み合わせが一致する修飾が表示されます。

*Unimod とはコミュニティが支援する、質量分析計用途のタンパク質修飾の総合データベースです (<https://www.unimod.org>)。

本チュートリアルで登場する修飾は、「Phospho (ST)」（Serine もしくは Threonine 残基のリン酸化）、「Phospho (Y)」（Tyrosine 残基のリン酸化）および「Oxidation (M)」（Methionine 残基の酸化）のみです。リストでこれらのチェックをオンにすると、ウィザードは以下ようになります。

ペプチド検索のインポート

修飾を追加

インポートされた検索結果には、次に示す修飾が含まれているようです。ドキュメントに追加したいものを選択してください:

- Acetyl (N-term) = [42]
- Cation:K (DE) = D, E[38]
- Cation:Na (DE) = D, E[22]
- Deamidated (NQ) = N, Q[1]
- Deamidated (R) = R[1]
- Dehydrated (S) = S[-18]
- Gln->pyro-Glu (N-term Q) = Q[-17]
- Methyl (H) = H[14]
- Methyl (R) = R[14]
- Oxidation (D) = D[16]
- Oxidation (K) = K[16]
- Oxidation (M) = M[16]
- Phospho (D) = D[80]
- Phospho (K) = K[80]
- Phospho (ST) = S, T[80]
- Phospho (Y) = Y[80]

すべて選択/選択解除(A)

修飾を追加(M)...

<戻る(B) 次へ(N) > キャンセル

ドキュメントによっては、いくつかの修飾（例: Oxidation (M)）がすでに定義済みで表示が異なる可能性があります。

- [次へ] ボタンをクリックします。

ウィザードが [MS1 フルスキャン設定を行う] ページに進みます。そこで以下の操作を行います。

- [プリカーサーの電荷] フィールドに「2,3,4」と入力します。

このページの他のフィールドはデフォルト設定のままにしてください。ウィザードは以下のようになります。

The screenshot shows a dialog box titled "ペプチド検索のインポート" (Peptide Search Import) with a close button (X) in the top right corner. The main heading is "フルスキャン設定を行う" (Perform Full Scan Settings). Below this, there are several input fields and options:

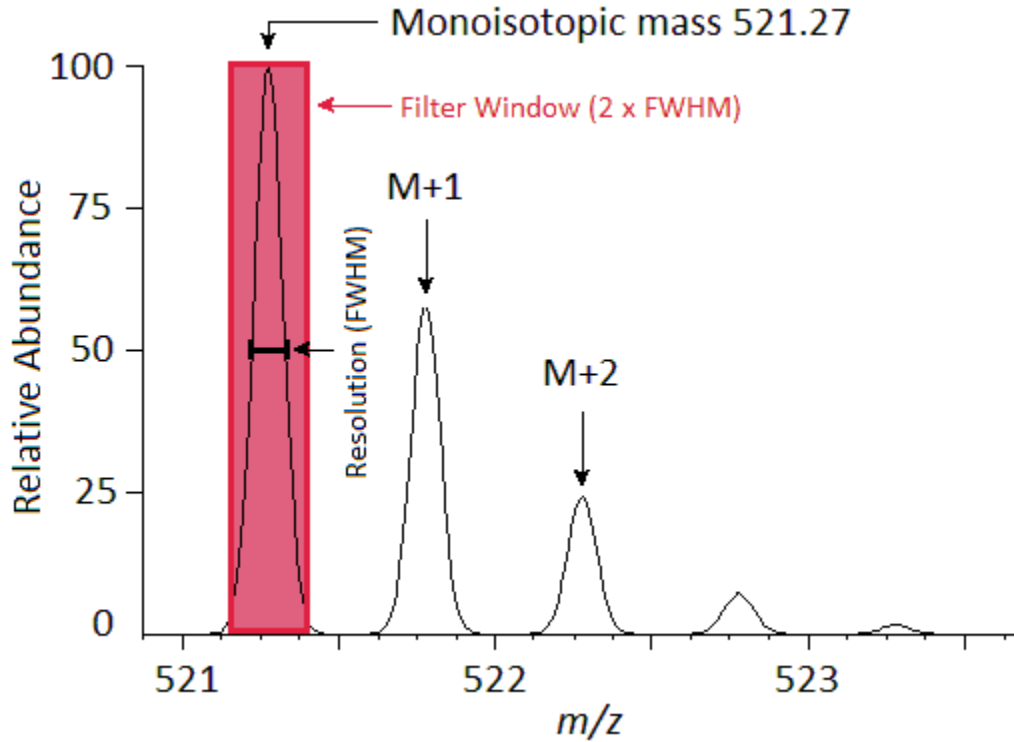
- プリカーサーの電荷:** (Precursor Charge) with a text box containing "2, 3, 4".
- MS1フィルタ(M)** (MS1 Filter) section containing:
 - 含まれる同位体ピーク(I):** (Included Isotope Peaks) with a dropdown menu set to "数" (Number).
 - プリカーサー質量アナライザー(P):** (Precursor Mass Analyzer) with a dropdown menu set to "TOF".
 - ピーク(K):** (Peak) with a text box containing "3".
 - 分解能(O):** (Resolution) with a text box containing "10000".
- An unchecked checkbox labeled **高選択性の抽出を使用します** (Use High Selectivity Extraction).
- 保持時間のフィルタ** (Retention Time Filter) section with two radio button options:
 - のスキャンのみを使用します** (Use only the scan) with a text box containing "5".
 - 一致する全てのスキャンを含める** (Include all matching scans).

At the bottom of the dialog, there are three buttons: "<戻る(B)" (Back), "次へ(N)>" (Next), and "キャンセル" (Cancel).

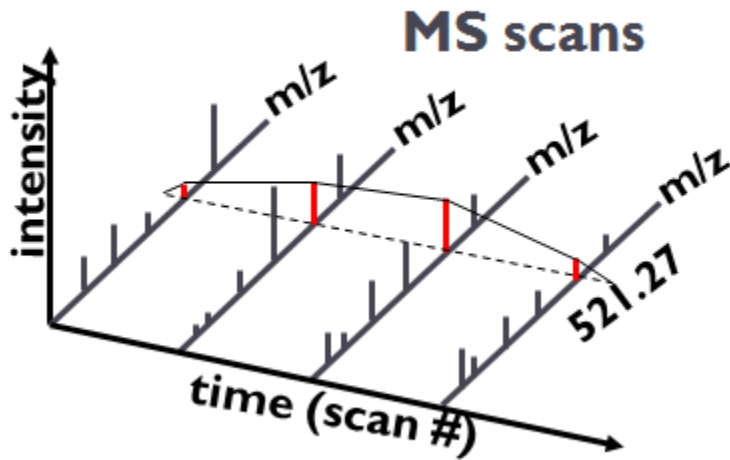
[MS1 フィルタ]セクションのデフォルト設定は以下のようになります。

1. [含まれる同位体ピーク]はドロップダウンリストの「数」。
2. [ピーク]フィールドは「3」。3つの同位体ピーク (M、M+1、および M+2) が、データから選択される。
3. [プリカーサー質量アナライザー]ドロップダウンリストは「TOF」を選択 (装置が QSTAR Elite (Applied Biosystems) の ToF-MS のため)。
4. [分解能]フィールドのデフォルト値は「10,000」。このフィールドで各プリカーサー m/z の MS1 フィルタウィンドウ幅が規定されます。Skyline では、この値を用いて m/z のピーク半値全幅 (FWHM) を予測し、また以下に示すように、その FWHM 値の 2 倍の値をフィルタウィンドウとして使用します。

注：[高選択性の抽出を使用します]チェックボックスをオンにして抽出範囲を FWHM に限定することもできます。夾雑物が多く含まれるような試料での解析には推奨されません。また装置の性能によって分解能も変更できます。



Skyline に表示されるクロマトグラム (Extracted ion chromatogram) は各保持時間における選択されたフラグメントイオン (m/z 521.27) の強度となっています。



[保持時間のフィルタ]セクションが[MS/MS ID のスキャンの中で [5] 分前後のスキャンのもののみを使用]を選択していることに注意してください。つまり ID が 1 つだけのペプチドの場合、その ID ペプチドの保持時間周辺 10 分（前後それぞれ 5 分）のクロマトグラムが抽出されるということです。ID がもし複数あって保持時間が 3 分程度のばらつきを示す場合は、ID ペプチドの保持時間前後に 5 分追加されるため合計で 13 分のクロマトグラムが抽出されることとなります。もし特定のペプチド ID がない場合は他の測定 ID の保持時間との比較が自動的に行われクロマトグラムからの抽出時間範囲が決定されます。

- [次へ] ボタンをクリックします。

ウィザードの [FASTA ををインポート] ページに移動します。SwissProt のヒトタンパク質全エントリの FASTA ファイルをインポートし、既知のペプチドの包括的リストを入手します（この実験では、MCF7（ヒト乳がん細胞）とそのリン酸化ペプチド濃縮物を使用しています）。ファイルサイズの大きさの問題があるため以下の操作で 12 個のヒトタンパク質のみを含むより小さいサイズの FASTA ファイルをインポートします。

- [最大未切断数] ドロップダウンリストで、「2」を選択します。
- [参照] ボタンをクリックします。
- 本チュートリアル用に作成した MS1Filtering フォルダの「11_proteins.062011.fasta」ファイルを選択します。
- [FASTA を開く] の [開く] ボタンをクリックします。

ウィザードは以下ようになります。

ペプチド検索のインポート

FASTAをインポート (必須)

酵素: Trypsin [KR | P] 最大未切断数: 2

FASTAレコードは>で始まり、タンパク質名の後にオプションのタンパク質表記が続きます。

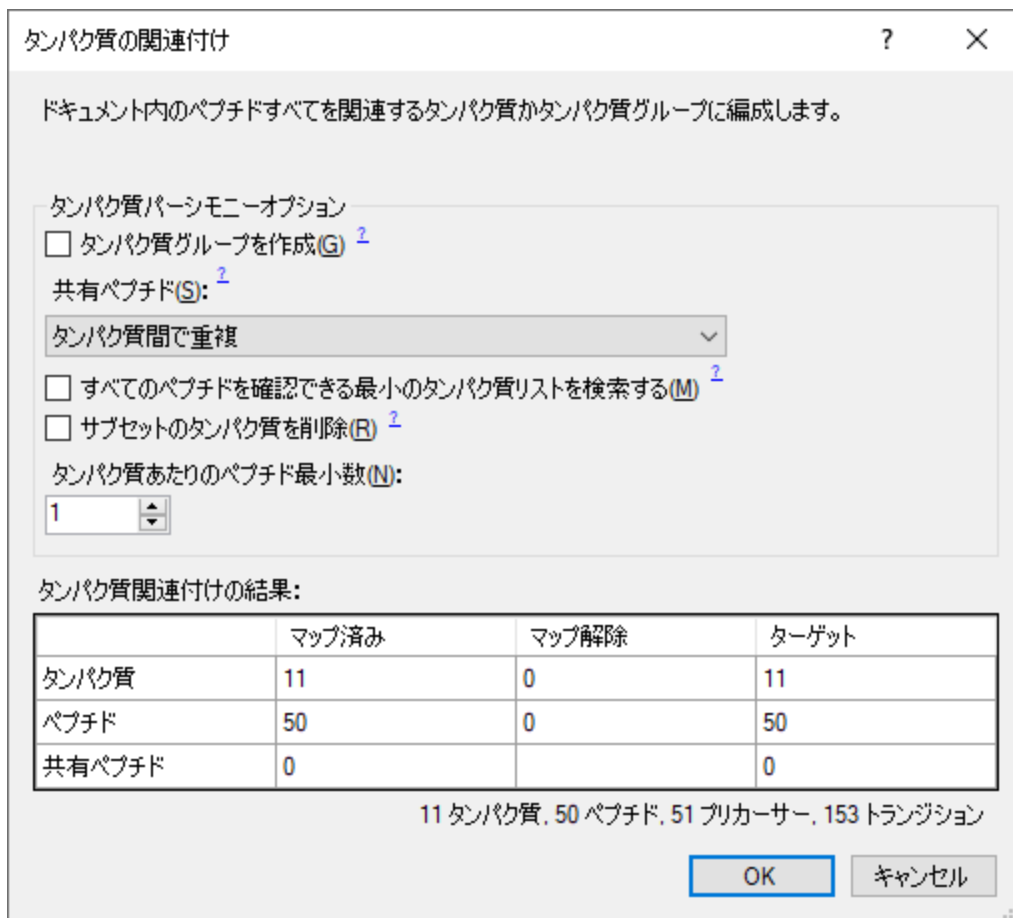
>sp|Q09666|AHNK_HUMAN Neuroblast differentiation-associated protein AHNK OS=Homo sc
MEKEETTRELLLPNWQGGSGSHGLTIAQRDDGVFVQEVTVQNSPAARTGVVKEGDQIVGATI
YFDNLQSGSEVTQLLNTMGHHTVGLKLRKGDSPPEPGQTTWTREVFSSCSSEVVLSGDDEE
YQRIYTTKIKPRLKSESDGVEGDLGETQSRITITVTRRVTAAYTVDTVGTREGAKDIDISSPEF
KIKIPRHELTEISNVDVETQSGKTVIRLPVSGSGAASP TGSAVDIRAGAISASGPELQAGAG
HSKLQVTMPGIKVGSGVNVNAKGLDLGGRRGGVQVPAVDISSLLGGRAVEVQGPSLES
HGKIKFPTMKVPKFGVSTGREGQTPKAGLRVSAPEVSVGHKGGKPGTLIQAPQLEVSVP
ANIEGLEGLKGPQITGSPLEGDLGLKGAQPGHIGVDSAPQIGGSITGPSVEVQAPDI
DVQGGPGSKLNVPKMKVPKFVSVGAKGEETGIDVTLPTGEVTVPGVSGDVSLPEIATGGLE
GKMKGTQVKTPEMIQKPKISMQDVLDSLGSPLKGDIVSAPGVQGDVVKGPQVALKGSR
VDIETPNLEGLTGPRLGSPSGKTGTTCRISMSEVDLVAAPKVKGGVDVTLPRVEGKVKV
PEVDVRGPKVDVSAAPDVEAHGPEWNLKMPKMKMPTFSTPGAKGEGPDVHMTLPKGDISIS
GPKVNVAPDVLNLEGLGKLGKPDVKLPDMSVKTTPKISMVDLHVKGTKVKGEDVTV
KLEGLKGPVVDIAPDVDVHGPDWHLKMPKMKMPKFSVPGFKAEGPEVDVNLPKADVDI
SGPKIDVTAPDVSIEEPEGKLGKPKFKMPKMPKISMPDVLHKGPNVKGEDVDM
PKVESEIKVPDVELKSAKMDIDVDPVEVQGDVHLMKMPKMPKFSMPGFAEGPEVDV
LPKADVDISGPKVGVVDPVNIIEGPEGKLGKPKFKMPKMPKISMPDVLHMKGPV
KGEYDMTVPKLEGDLKGPVDSAPDVEMQGPDVNLKMPKMPKFSMPKSLKGEPEFDV
NLSKANVDISAPKVD TNAPDLSLEGPEGKLGKPKFKMPKMPKSLPDVLDLKGPK
MKNVNDISAPKIEGEMQVDPDIRGPKVDIKAPDVEGQGLDWSLKIPKMPKFSMPKSLK
GEGPEVDVNLPKADVVVSGPKVDIEAPDVSLEGPEGKLGKPKFKMPKMPKISMPDV
DLHLKGPVKGDDVSVKVEGEMKVPDVEIKGPKMDIDAPDVEVQGDVHLMKMPKMPK
KFSMPGFKGEGREVDVNLPKADIDVSGPKVDVEVPDVSLEGPEGKLGKPKFKMPKMPK
PKISMVDVLDNLKGPVLDVSLPEVEGEMKVPDVIKGPVVDISAPDVDVHGPDWHL
KMPKVPKMPKFSMPGFKGEGPEVDVLPKADVDVSGPKMDAEPDVIIEGPDALKLGKPK
MPKISIKPKISIPDVLHLMKMPKMDYDVTVPKVEGKAPDVIKGPVVDIAPDVE
VHGPDWHLKMPKVPKMPKFSMPGFKGEGPEVDVNLKADLVSGPKVDIDVDPVNLKAP
KIDVCKMPCSMNIQTKVIMPRVIGI NII KADKI KTDVIVVSI DVVGGDI VGGEDIVKADVM

参照(O)...
クリア(C)

< 戻る(B) 完了(F) キャンセル

- [完了] ボタンをクリックします。

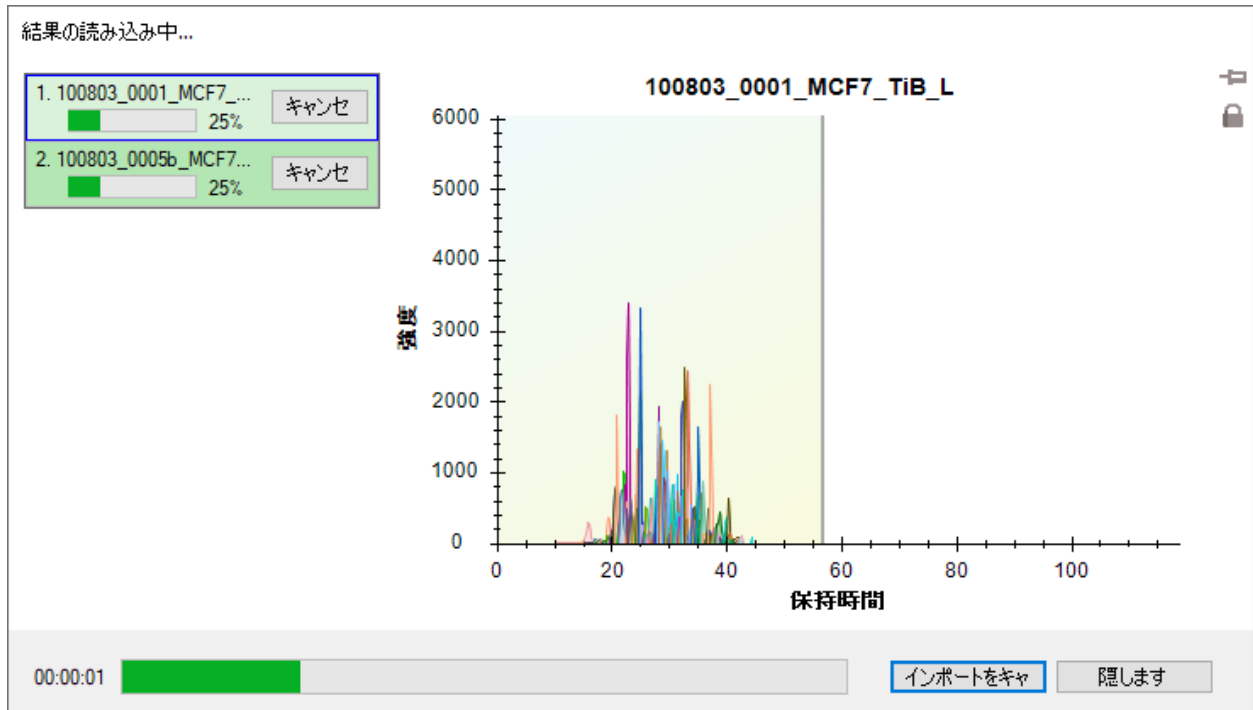
Skyline はコンピュータを使ってこのファイルにある 11 個のタンパク質を消化し、インポートしたペプチド検索結果での一致スペクトルを使って FASTA ファイルから 50 個のペプチドとペプチド価を持つ 51 個のプリカーサーの追加を提案します。



- [タンパク質の関連付け]の[OK]ボタンをクリックします。

Skyline が 2 つの WIFF ファイルのインポートとそこからのクロマトグラムの抽出を開始します。

進行状況は以下のように表示されます。



インポートが完了したらクロマトグラムデータを吟味する前に、まず今回作成したスペクトルライブラリの詳細を見てみましょう。

ライブラリ保持時間の検証

ペプチド検索結果をもとに MS1 フィルタのためのスペクトルライブラリ構築を新たにする場合は作成したライブラリに保持時間情報が含まれていることが必須となりますので、必ず確認してください。[ペプチド検索のインポート]ウィザードを使用するメリットはライブラリ作成に必要な情報が欠けていることを自動的に通知するシステムがある点です。

MS1 フィルタでのピークを選択とピークの推定（もしくは同定）に必要な保持時間情報が作成したライブラリに含まれているかをチェックするため以下の手順を実施します。

- [ビュー]メニューで[スペクトルライブラリ]をクリックします。

ここでライブラリでヒットしたタンパク質の修飾候補リストが表示されます。これらは[ペプチド検索のインポート]ウィザードではドキュメントに追加されてなかった修飾です。

修飾を追加

このライブラリには下記の修飾が含まれているようです。ライブラリで使用するものを選択してください:

- Acetyl (N-term) = [42.0106]
- Cation:K (DE) = D, E[37.9559]
- Cation:Na (DE) = D, E[21.9819]
- Deamidated (NQ) = N, Q[0.984]
- Deamidated (R) = R[0.984]
- Dehydrated (S) = S[-18.0106]
- Gln->pyro-Glu (N-term Q) = Q[-17.0265]
- Methyl (H) = H[14.0156]
- Methyl (R) = R[14.0156]
- Oxidation (D) = D[15.9949]
- Oxidation (K) = K[15.9949]
- Phospho (D) = D[79.9663]
- Phospho (K) = K[79.9663]

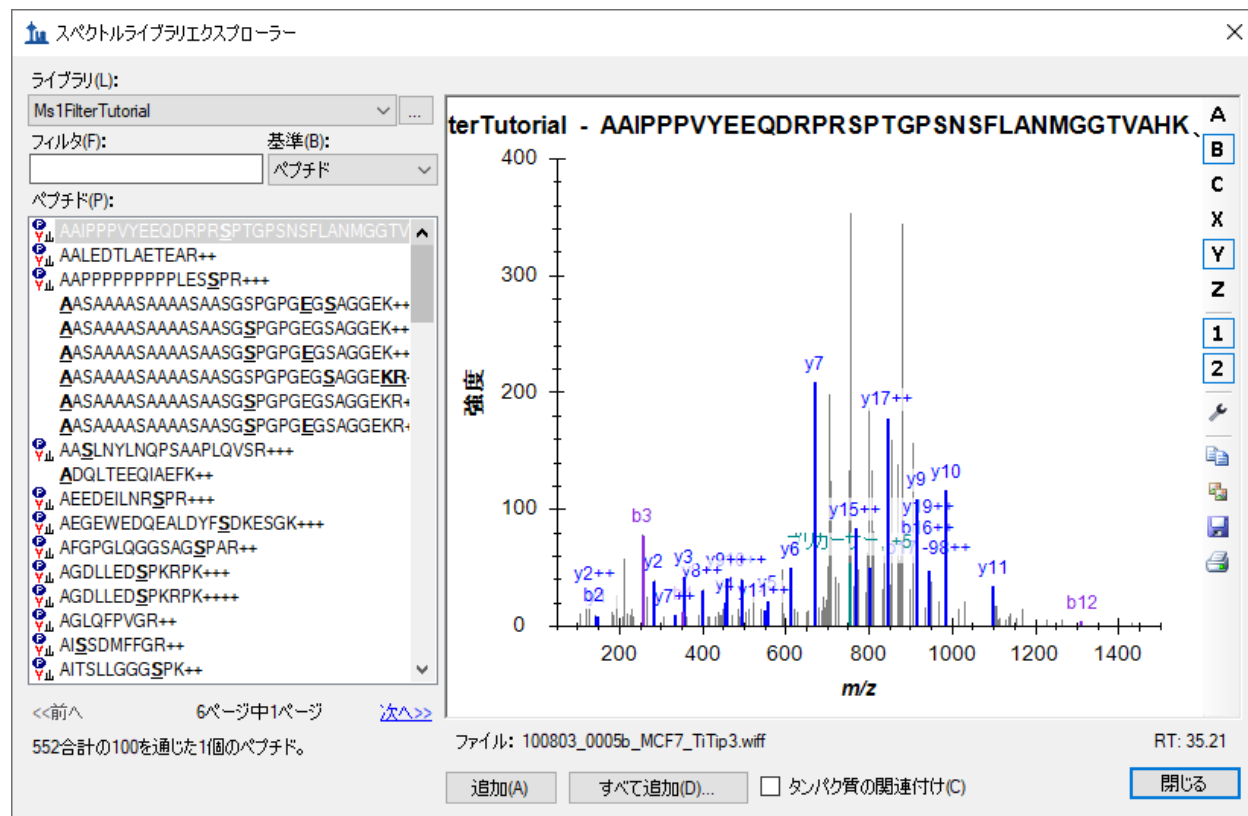
すべて選択/選択解除(A)

ドキュメントに追加(D)... OK キャンセル

[スペクトルライブラリエクスプローラー]でこれらの修飾情報を使用するにしても[スペクトルライブラリエクスプローラー]で(その修飾があるペプチドを)ドキュメントに追加しない限り、これらは“現在のドキュメント”へ反映はされません。タンパク質の修飾は今回のチュートリアルでは問題ではないので次の操作に移行します。

- [OK] ボタンをクリックします。

[スペクトルライブラリエクスプローラー] は以下のように表示されます。



ペプチドリストの中でシーケンス文字列の左側にアイコンの付いていないペプチドは上記リストで選択しなかった修飾を含むペプチドになります。

スペクトルグラフの下に、「ファイル: 100803_005b_MCF7_TiTip3.wiff」および「RT: 35.21」と表示されています。「RT:」は保持時間情報で、この場合は 35.21min となります。また「ファイル: 100803_005b_MCF7_TiTip3.wiff」は表示されている MS スペクトルが Skyline にインポートされたファイルに正しく紐づけされていることを示しています。「ファイル」名とインポートしたファイル名を完全に一致させる必要はありません。Skyline では多くのペプチド検索パイプラインで生の装置データが mzXML、mzML、MGF、MS2 などのフォーマットに変換されます。通常 Skyline は「basename.mgf」と「basename.wiff」との一致、すなわちベース名（ファイル名。この場合は basename と表示されている）の一致を検索します。

パイプラインには柔軟性が必要とされることが多く、「BASENAME.mzML」が「Baseline.RAW」のように大文字と小文字の区別なく一致の検索が行われます。また複数のドット拡張子の処理も含まれています。例えば、「basename.c.mzXML」と「basename.raw」は一致することになります。ただし、「F011852.dat」のように Skyline にインポートするデータファイルとベース名を共有できない場合は、検索パイプラインの見直しを検討するか（別の検索を使用するなど）、Skyline チームと協力してこの問題を解決することを検討してください。また Mascot .dat ファイルについては、別途 Skyline ウェブサイトの「[Mascot 検索で見つからない ID \(Peptide 推](#)

定) 推定」ページを参照することをお勧めします。その他の問題については、Skyline サポート 掲示板 ([ヘルプ] メニューで [サポート] をクリック) に、問題を投稿することをお勧めします。

ここで、下向き矢印キーを押して別のペプチドを選択すると、「ファイル:」値および「RT:」値が変わります。MS/MS スペクトル、そのソースファイルや保持時間を確認したら、以下の操作を行って作成したドキュメントへ戻ります。

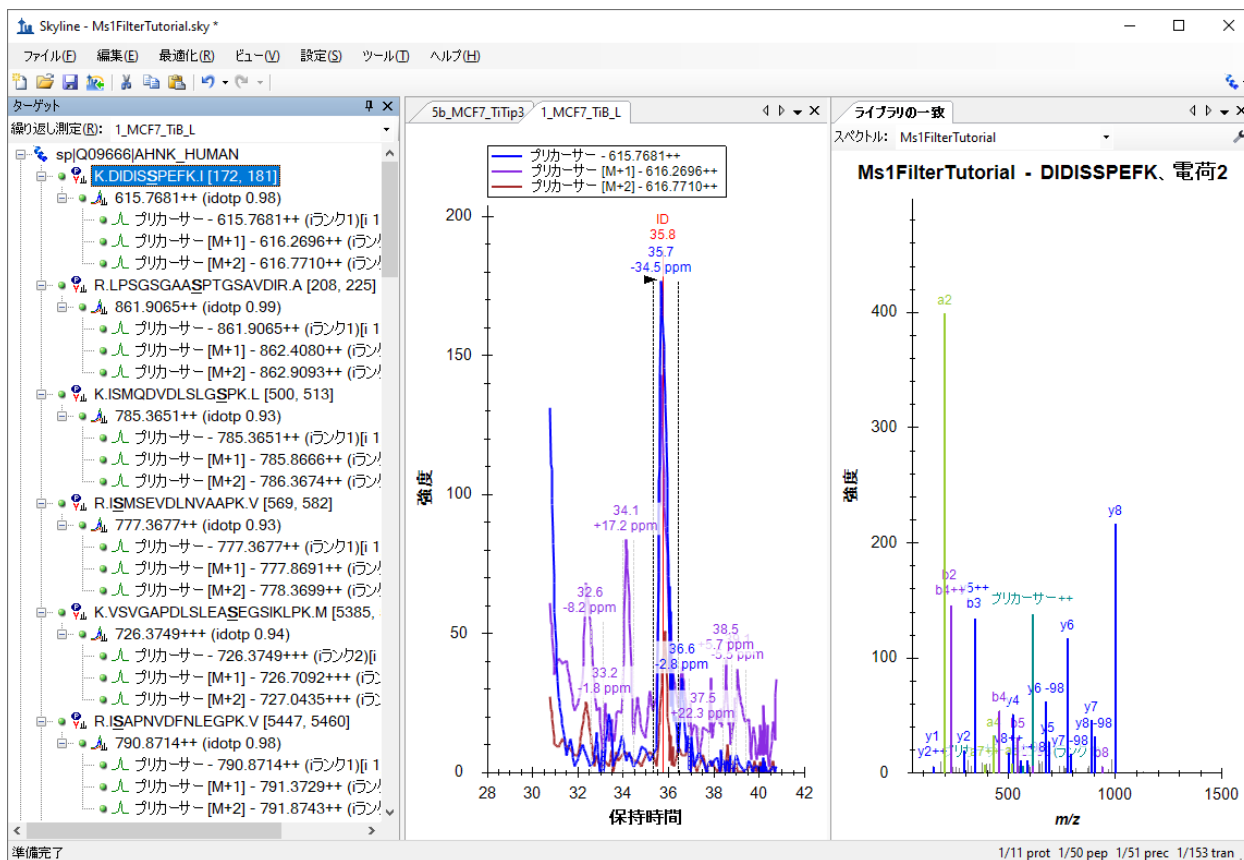
- [スペクトルライブラリエクスプローラー] の [閉じる] ボタンをクリックします。

ターゲットペプチドとそのクロマトグラム、MS スペクトル

Skyline [ターゲット] 表示に 50 個のペプチドが表示されます (ステータスにカウントで表示されます)。

- 一番上に表示されている K.DIDISSPEFK.I (このペプチドはリン酸ペプチド) のシークエンスをクリックすると、MS/MS スペクトルが表示されます。(なお太字の下線付きの残基「S」は、セリン残基がリン酸化されていることを示します)
- [ビュー] メニュー上に MS/MS スペクトルが見られない場合は、[ライブラリー致] をクリックしてください。
- もしターゲットの一致度が悪く、ペプチドの推定配列リストが (下図の画像のように) 十分な数表示されない場合は、[ビュー] メニューで [イオンタイプ] を選択し、[A]、[B]、[Y] および [プリカーサー] のチェックをオンにしてみてください。
- ペプチドの全クロマトグラムが見られない場合は、[ビュー] メニューで [自動ズーム] から [なし] (Shift+F11) をクリックします。
- [編集] メニューで [すべて展開] を選択し、[プリカーサー] をクリックします。

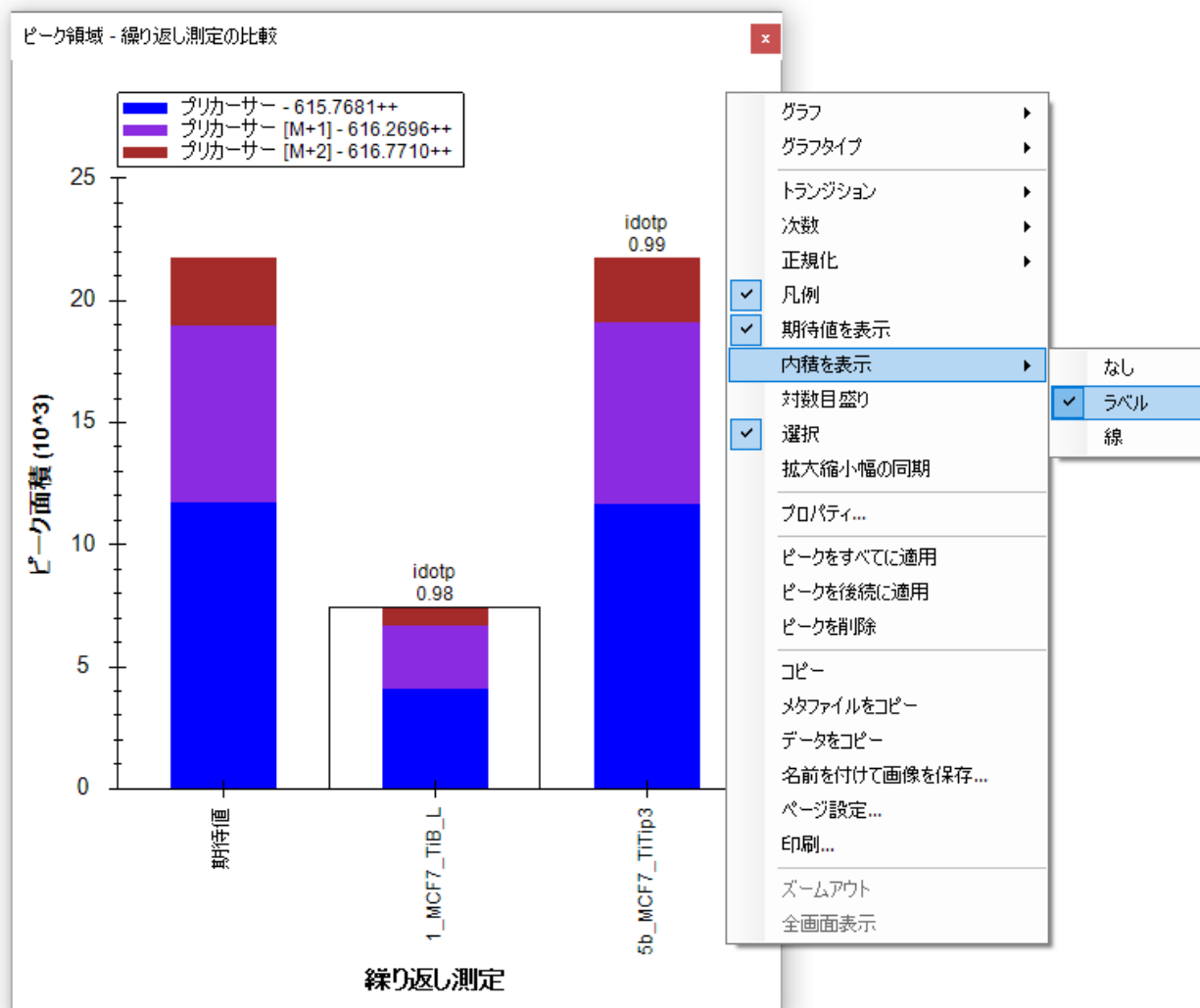
Skyline ドキュメントは以下ようになります。



このドキュメントは MS1 フィルタ向けの設定で、DDA モードでの測定結果 2 件がインポートされています。インポートウィザードで [MS/MS の ID の時間 (5 分) のスキャンのみを使用します] 設定のため、このビューのクロマトグラムの表示時間範囲が約 10 分 (31~41 分) となっています。Skyline ドキュメントを MS1 フィルタ向けに設定しているため、プロダクトイオンである (b-イオンと y-イオンなど) が表示される SRM 測定結果の MS/MS スペクトラにペプチド DIDISSPEFK のプリカーサーイオン - 615.7681++ と同位体イオン ([M+1] - 616.2696++, [M+2] - 616.7710++) が表示されますので注意してください。

有用なサマリーグラフで、測定結果全体でのピーク面積を比較できます。

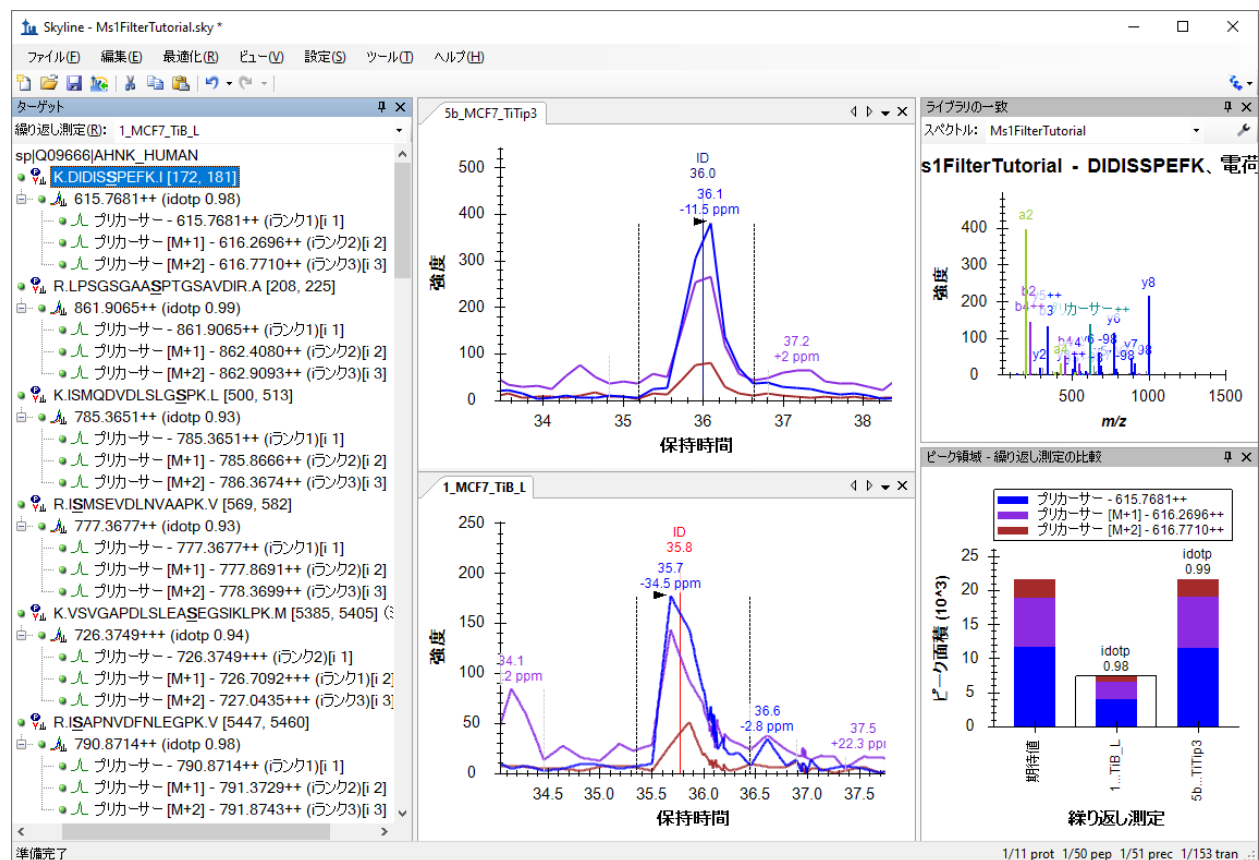
- [ビュー] メニューで [ピーク面積] を選択し、[繰り返し測定の比較] をクリックします。
- [ピーク面積] ウィンドウで右クリックし、[正規化] から [なし] をクリックします。
- [ピーク面積] ウィンドウで右クリックし、[期待値を表示] をクリックします (下記に説明)。
- [ピーク面積] ウィンドウで右クリックし、[内積を表示] を選択し、[ラベル] をクリックします。



以下の操作で[ピーク面積]ウィンドウを好きな場所にドッキングすることができます。

- マウスの左ボタンを押したまま、マウスのカーソルを[ライブラリの一致]へとドラッグします。
- 十字形に並んだ5個のアイコンのセットが表示されたら、マウスを下部アイコンに移動させ、左マウスのボタンから指を離して Skyline ウィンドウの右端で、[ピーク面積]と[ライブラリの一致]を上下に分割表示します。
- [ビュー]メニューで[自動ズーム]を選択し、[最適ピーク] (F11) 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、[タイル] (Ctrl+T) をクリックします。

Skyline ファイルは以下ようになります。



クロマトグラム表示には、すべてのプリカーサーとその同位体イオン M (青)、M+1 (紫)、M+2 (赤茶) の MS1 イオンクロマトグラム (Extracted ion chromatogram) が表示されます。SRM 用に Skyline を使用してきた人は見慣れているかもしれませんが、選択したピークの保持時間の下には質量誤差が新たに表示されます。これはクロマトグラム中のすべての積分ポイントにおける質量誤差の加重平均となります (この場合、M または青線のもの)。質量誤差が表示されない場合はクロマトグラム表示で右クリックして [質量誤差] をクリックします。ここで使用しているデータは (現在では古いバージョンである) QSTAR Elite のものであり質量精度 (Mass Resolution) は最新の高分解能装置で期待できるほどのものではありません。

またイオンクロマトグラム上に ID 注釈 (保持時間) のある縦線が表示されています。ID は表示されている MS/MS スペクトルのクロマトグラム上での保持時間を指し、このターゲットペプチドが信頼性をもって同定されていることを示しています。5b_MCF7_TiTip3 ウィンドウ上の赤線 (ID 35.8) はこれが [ライブラリ的一致] 表示で現在表示されている MS/MS スペクトルのクロマトグラム上での位置 (保持時間) であることを示します。グラフ上部の ID をクリックすると、[ライブラリ的一致] 表示に 5b_MCF7_TiTip3 繰り返し測定の同定されたスペクトルが表示されます。これらは以前インポート時に作成したライブラリに保存されています。また繰り返し測定名および保持時間 (36 分) は (ID をクリックする前に選択された) ライブラリ (この場合は Non-

Redundant library) から得られた最良スペクトルではなく、[ライブラリの一致] 表示の上部にある [スペクトル] ドロップダウンリストからの選択となります。ID をクリックするか [スペクトル] ドロップダウンリストを使用して 2 つの MS/MS スペクトルを比較して見ると、これらの 2 つのスペクトルがかなり類似していることがわかります。

本ドキュメント内の他の 50 個のペプチドをいくつか精査する前に以下の操作を行います。

- [編集] メニューで [すべて折り畳む] を選択し、[ペプチド] をクリックします (Ctrl+shift+D)。

次に [ターゲット] ウィンドウにてキーボードの下向き矢印キーを使用して 1 つずつペプチドを選択します。最初の 3 つのリン酸化ペプチドについては、それぞれ各繰り返し測定で 1 回同定されており、[ライブラリの一致] スペクトルグラフでは、「-98」 (-H₃PO₄) のニュートラルロス (Neutral loss) も複数見られます。

上から 4 番目のペプチド ISMSEVDLNVAAPK には、繰り返し測定 5b_MCF7_TiTip3 のみに ID が付いていることがわかります。繰り返し測定 1_MCF7_TiB_L のピークは、5b_MCF7_TiTip3 の ID の保持時間のアライメントによって選択されました。アライメントされた ID を確認するため次の操作を行います。

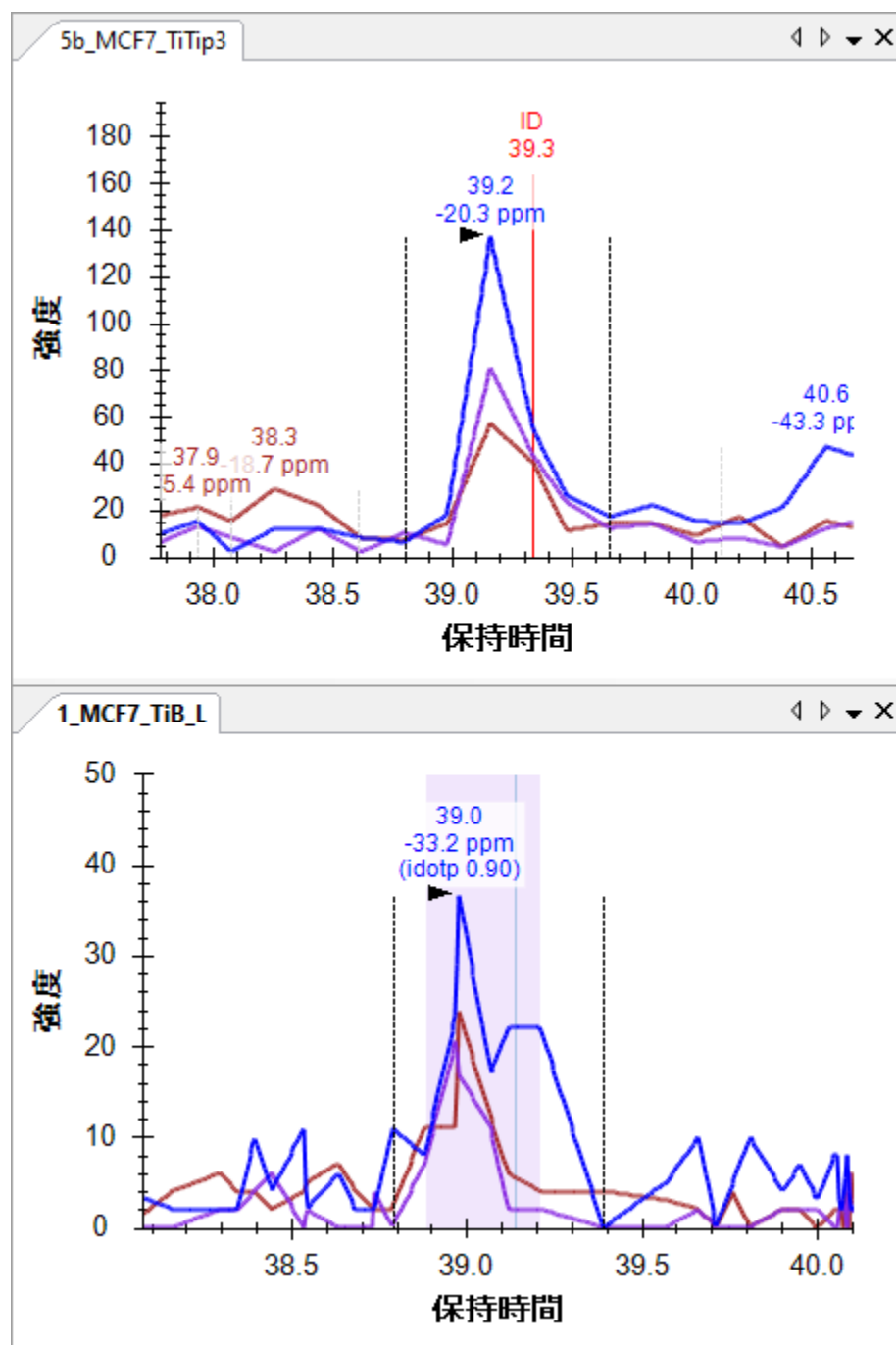
- クロマトグラム上で右クリックし、[ペプチドが同定された回数] を選択して、[調整済み] のチェックがまだオンになっていなければクリックしてオンにします。

繰り返し測定 1_MCF7_TiB_L のピーク積分境界の内側に水色の線が表示されます。このクロマトグラムを見ると

ピークトップが水色の線より左側にあります。これを修正するため以下の操作を行います。

- X 軸の下約 38.8 分から約 39.4 分のところまでドラッグします (下画面紫部分)。

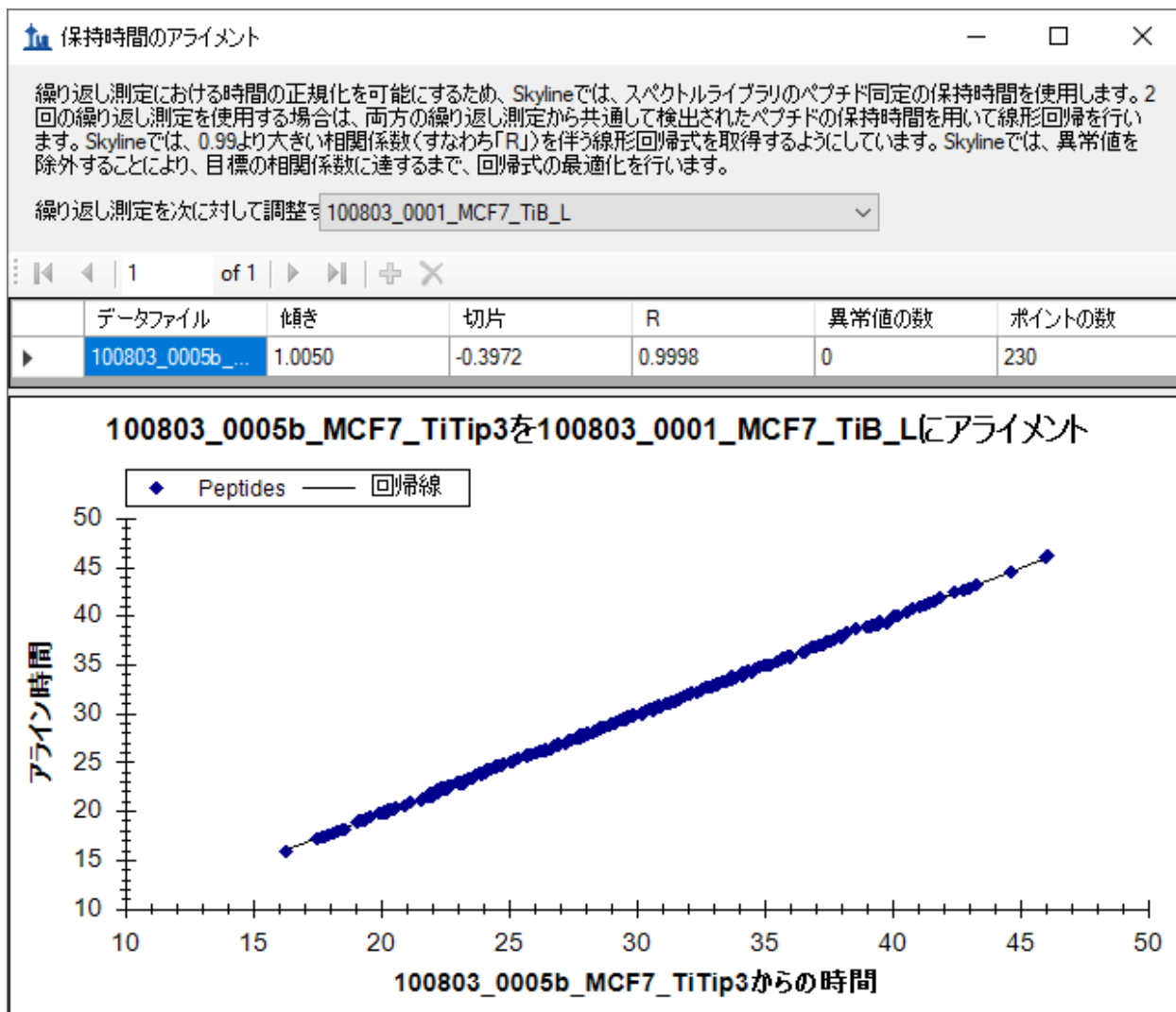
クロマトグラム表示は以下のようになります。



保持時間アライメントがどのように動作しているのかを知るため、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで[保持時間]を選択し、[アライン]をクリックします。

Skyline には以下のようなウィンドウが表示されます。



このウィンドウに保持時間のアライメントに使用した線形回帰の（各測定間での）各ポイントが表示されます。スペクトルライブラリ内の各スペクトルのソースファイルやその他すべてのスペクトルソースファイルからこのような線形回帰が計算されます。測定結果が2つ以上存在する場
合ですが[繰り返し測定]ドロップダウンリストで選択されているもの以外のすべての結果が1
行ずつ表示されます。上図のようにある測定でIDが存在しない場合でもピーク選択改善のため、
計算された一次方程式を用いて、各測定間でのMS/MS ID時間マッピングができます。保持時間
スケール間マッピングに線形回帰を利用する場合は [iRT 保持時間予測](#) チュートリアルをご覧ください。

2回の測定における保持時間の再現性は、傾き 1.005、切片-0.3972、相関係数 (R) 0.9998 のため
かなり良好であることがわかります。当該フォーム上部にあるパラグラフで述べられているよう
に、R が 0.99 未満の場合、Skyline は R が 0.99 より大きい一連のペプチドが見つかるまで自動的
に異常値を破棄し、その後一次方程式が表示されます。

- グラフを右クリックし[プロット]から[残余]をクリックすると、線の 30 秒以内にすべてのポイントが収まるのがわかります。

この回帰は 230 個のポイントに基づき計算されていることに気付かれたかもしれません。ドキュメントには 50 個のペプチドしかないのですが、50 個すべてがどの測定でも同定できたわけではありません。構築したこのライブラリには合計 552 個のペプチドがあり、多くは本ドキュメントで使用されない修飾も含んでいます。つまり、552 個中 230 個のペプチドはどちらのファイルでも同定されたということです。Skyline はこの回帰分析を行うにあたり、2 つの検索結果ファイルどちらにも存在する ID すべてを利用しようとしています。1 回の測定に複数の ID がある場合は保持時間が早い ID が選択されます。これは、保持時間の長いペプチドの方が比較的安定していることを重視しているためです。（ペプチドがカラム洗浄工程で再び溶出される例もあります）。

- [保持時間のアライメント]ウィンドウの右上隅の赤い X 印をクリックしてウィンドウを閉じます。

データの再確認（レビュー）

このように Skyline ではドキュメントにある 50 個のペプチドを以下の手順で素早くすべて確認することができます。そのためには[ターゲット]表示をクリックし、下向き矢印キーを使って各ペプチドを順に選択してください。50 個あるペプチドのうちどれが現在選択されているかは、Skyline ウィンドウ右下にあるステータスバーで確認できます（下図の場合は 4 番目のペプチド（51 個中）、4 番目のプリカーサー（52 個中）、10 番目のトランジション（156 個中）が選択されていることとなります）。

1/11 prot 4/50 pep 4/51 prec 10/153 tran ...

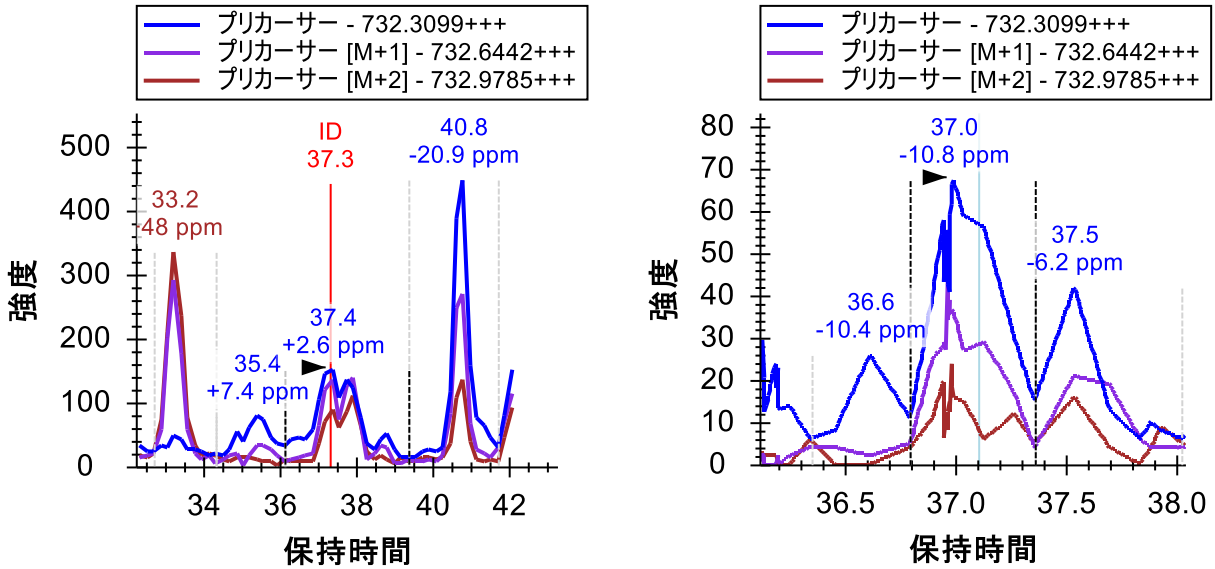
ペプチド ISMSEVDLNVAAPK の下には、ピーク積分が可能なペプチドが 4 つあります（VSVGAPDLSLEA\$EGSIKLPK のように 5b_MCF7_TiTip3 に対して微修正されたものもあります）。両測定で ID のつくペプチドもあれば、1 つの測定でしか ID が見つからないものもあります。Skyline はアライメントを利用して正しいピークを選びます。

クロマトグラフィー環境の基礎知識

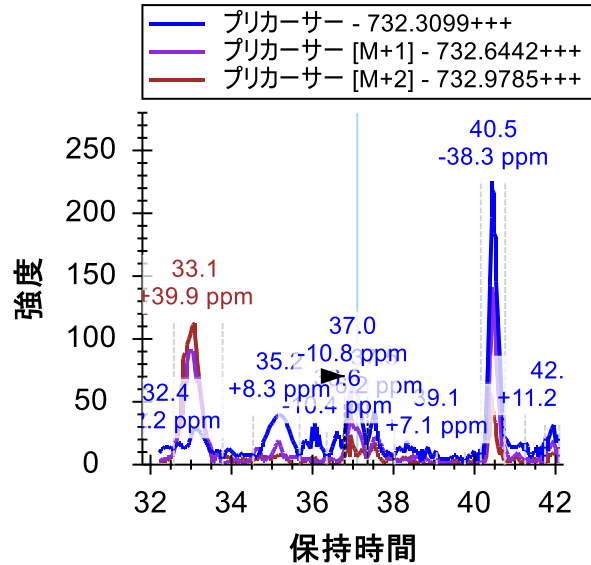
9 番目のペプチド、SSKA\$LG\$LEGEAEAEASSPK については、測定 1_MCF7_TiB_L ではペプチド ID がつかず、ピーク面積積分も多少ずれています。

5b_MCF7_TiTip3

1_MCF7_TiB_L



スクロールホイール（マウスホイール）で（手前にスクロール）、5b_MCF7_TiTip3 のグラフと同じピークが見えるまで、1_MCF_TiB_L のグラフをズームアウトします。



これはクロマトグラフィーデータを扱う際に非常に重要なことです。ターゲットペプチドが一連の測定において毎回同じような時間に溶出すると予想されますが、これは他のペプチドでも同じです。一方で、共溶出の可能性にも注意しましょう。ターゲット（37分）の両側（33分および40.5分）にある2つのピークは実は2つの他のペプチドによるピークとなりますが、もしターゲットペプチドと共溶出した場合には干渉を考慮せねばいけません。また逆に共溶出しない場合でも、他のペプチドの由来で再現性あるピークが、ピーク強度の低いターゲットペプチドの保持時

間判別に役立つことがあります。クロマトグラム抽出範囲内に検出されるペプチドがより多くなるため、MS1 フィルタのような選択性が低いメソッドでは特に効果を発揮します。

以下の操作を行って 1_MC7_TiB_L の積分範囲を修正します。

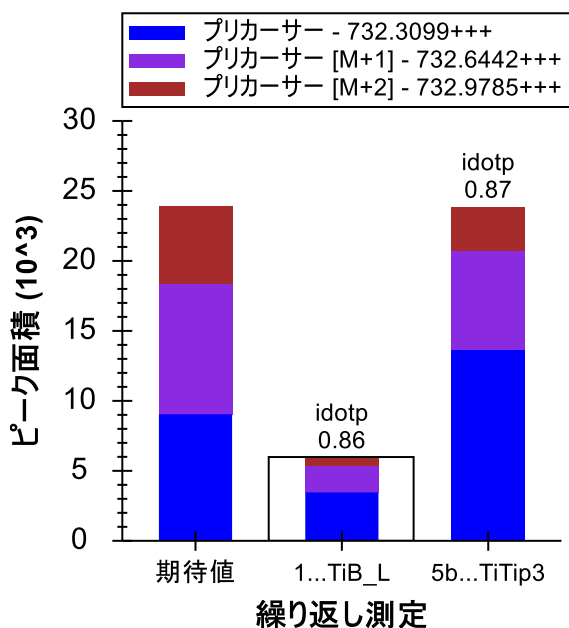
- 保持時間軸の下 36.5 分のところでクリックし、38 分のところまでドラッグします。

ピークの idotp（同位体の内積）値が 0.87 から 0.9 に改善され、また質量誤差もわずかですが -10.8ppm から -9.4ppm に改善されたことが [ピーク面積] グラフで確認できます。

他のペプチドの解析に進む前に、抽出クロマトグラムにより取り込まれた別の 2 つのピークを検討しましょう。40.5 分のピークでは 3 つのプリカーサーチャンネル（M、M+1、M+2）すべてにおいて、良好なシグナルが得られています。ただし、質量誤差を見ると、予測される質量よりも低質量側にずれていることがわかります（-20.9ppm および -38.3ppm）。

- 40.5 分のピークの上にあるラベルをクリックします。

Skyline はこれらのピークを選択し、[ピーク面積] の idotp 値が以前に選択されたピークよりも低い（0.9 および 0.99 に対して 0.86 および 0.87）ことが表示されます。



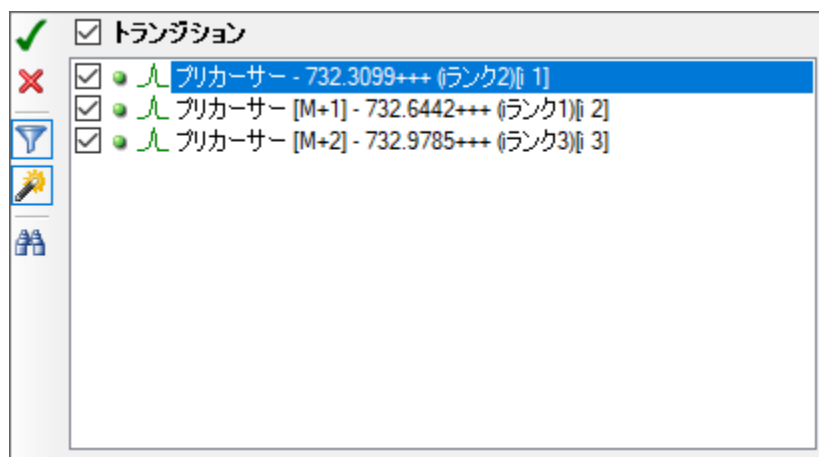
棒グラフ上の [期待値] 分布をみると M+1 ピークと M+2 ピークがターゲットペプチドに対して予測される同位体分布より小さいことがわかります。このピークのペプチドは、約 37 分にも MS/MS ID があるターゲットペプチドより炭素数が少なく ¹³C の取り込み数が小さいためと予想されます。

次に 33 分のピークを見てみると、ターゲットペプチドのモノアイソトピック m/z のシグナルが一切見られません。一方で M+1 と M+2 はターゲットペプチドの M と M+1 の予測同位体分布とよく似た同じ強度のピークがあります。5b_MCF7_TiTip3 の質量誤差は+25.8ppm であり、完全に積分された場合の 1_MC7_TiB_L の質量誤差は+5.6ppm です。40.5 分のピークほど悪くはありませんが、それでも、平均誤差+15.7ppm は 37 分のピークの平均誤差-3.5ppm よりも大きいずれとなっています。

33 分のピーク同位体分布問題を理解するため以下の操作を行います。

- [ターゲット] 表示のペプチドの左側の+アイコンをクリックして展開します。
- マウскарソルを 732.3099+++プリカーサー上に合わせます。
- プリカーサーの右側に表示されるドロップダウン矢印をクリックします。

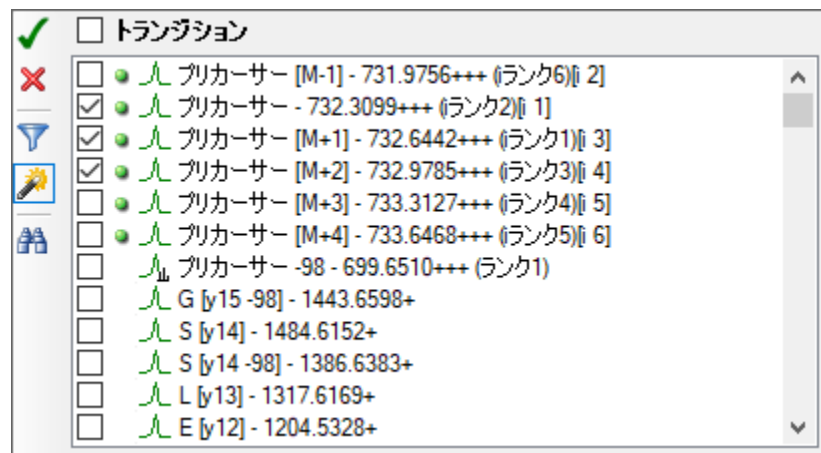
Skyline に以下のようなポップアップが表示されます。



これら 3 つのプリカーサートランジションしか表示されない場合は以下の操作を行います。

- 漏斗型のアイコンをクリックし、トランジションフィルタをオフにします。

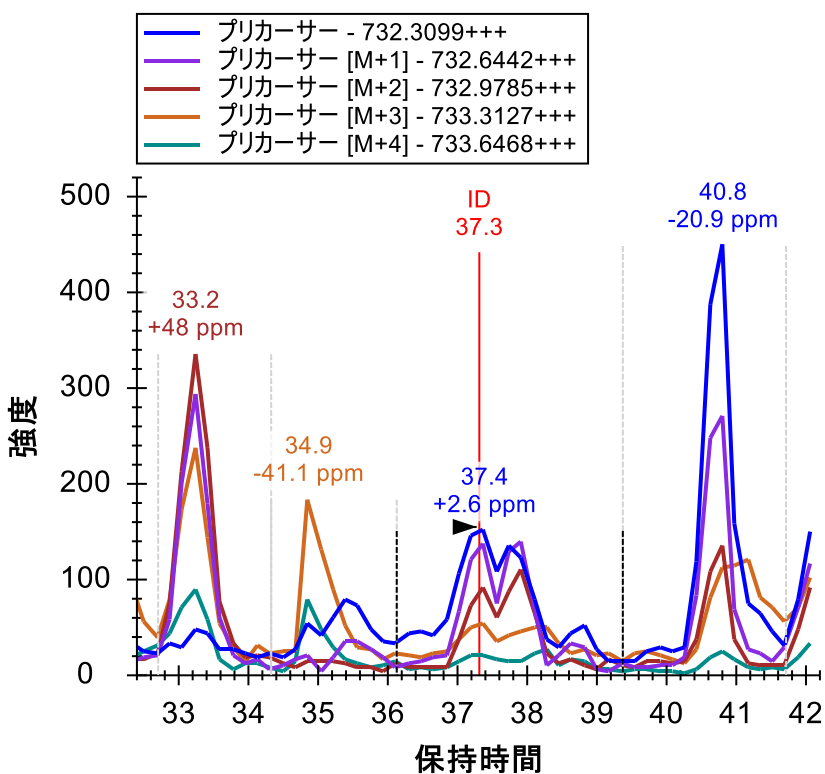
この操作でこのペプチドプリカーサーについて考えられるすべてのトランジションが Skyline に表示されます。



緑の丸はクロマトグラムデータが Skyline に存在するトランジションを意味します。同位体分布があると予測されるピーク（すくなくとも全体の 1%以上のピークとなります）に対してクロマトグラムが自動的に抽出されます。また[M-1]のクロマトグラムも自動的に抽出されますが、干渉を受けていない正しく選択されたピークでは通常この m/z のシグナルは検出されません。

- M+3 トランジションと M+4 トランジションのチェックをオンにします。
- 左上の緑のチェックボタンをクリックするか Enter を押します。

これにより、M+3 と M+4 のクロマトグラムが追加表示され、33 分のピークで 37 分のピークより多くのシグナルが表示されるようになります。Skyline でのあらゆるクロマトグラムデータ解析作業で保持時間再現性がどれだけ重要かは言うまでもありません。



33 分のピークはターゲットに非常によく似た元素組成の別のペプチドであり、モノアイソトピック質量が 1 ダルトン大きい 3 価のペプチド (M+3 のデータから見て) であることがわかります。

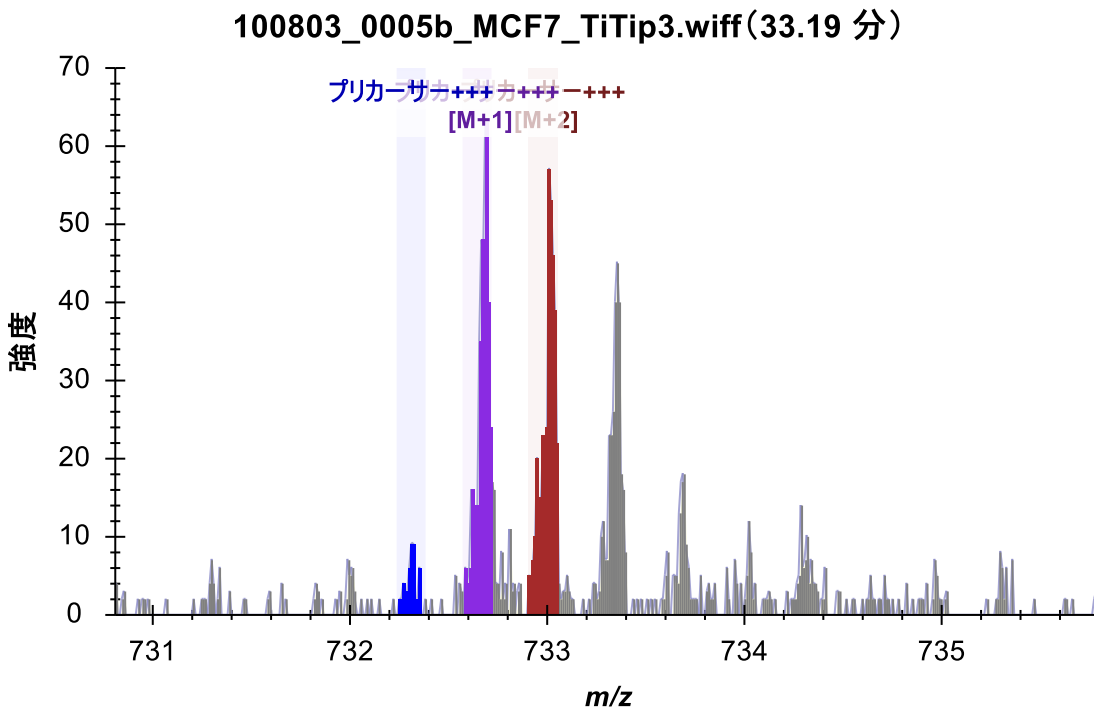
- 元の積分修正へ戻るまで、[元に戻す] ボタン(Ctrl+Z) を 3 回クリックします。

MS1 スペクトル精査

クロマトグラム抽出元の MS1 スペクトルも、単純なポイント&クリックインターフェイスを使って精査できます。これで 33.2 分のピークと 37.4 分のピークの違いも迅速に把握できます。これを行うにあたり、以下の操作を行います。

- マウスカースールを 37.4 分にある 5b_MCF7_TiTip3 クロマトグラフピーク上に合わせます。
- カーソルの下に表示される円をクリックします。

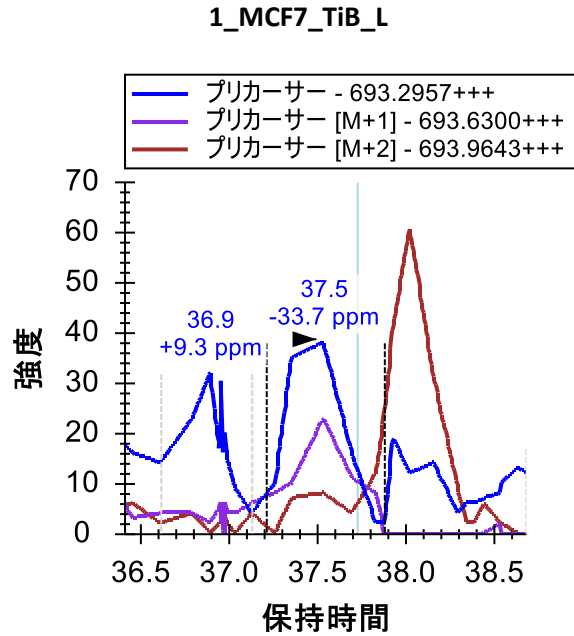
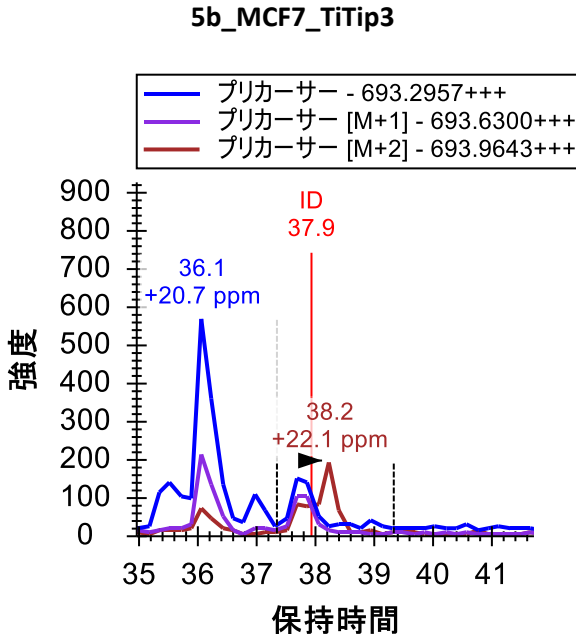
表示が以下のように変化します。



クロマトグラフで観測された違いもこの MS スペクトル上で明確になります。

干渉の検知と理解

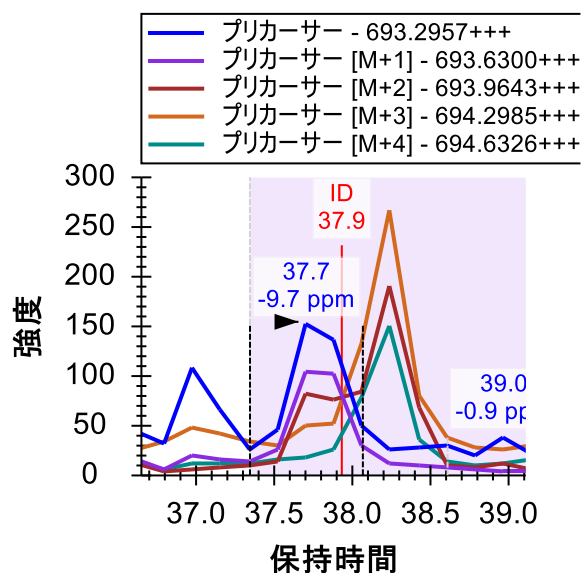
Skyline を利用することで容易に共溶出するペプチドの影響も検出することができます。例えば、二重リン酸化ペプチド（リン酸化部位が 2 か所）ASLGSLEGEAEAEASSPKGK のクロマトグラムの場合、



1_MCF7_TiB_Lではなく MCF7_TiTip3 のペプチドに ID があります。1_MCF7_TiB_Lにあるピークは、5b_MCF7_TiTip3 の ID とのアライメントに基づいて選択されました。M+2 クロマトグラムでは、ピークからその右側までからの干渉はほとんどなさそうであり、最も大きなピークでの質量誤差は-33.7ppm (画面右 37.5 分) となっています。マウスのスクロールホイールを使用して再度ズームアウトすると 36 分のあたりに、質量誤差が+20.7ppm で idotp 値が 0.78 のもの (画面左) と、質量誤差が+27.5ppm で idotp 値が 0.76 の非常に似たピークが含まれています (これは保持時間 ID をクリックしてピークを選択した後に、[ピーク面積] 表示すると見られます)。

5b_MCF7TiTip3 の積分境界では共溶出した夾雑物の M+2 シグナルが含まれているようです。実際このクロマトグラムの他のピークは保持時間が非常に近く手作業で積分 (マニュアル積分) してもそのシグナル排除は不可能に見えます。調べてみると、idotp 値 0.94 および質量誤差-9.7ppm のピーク積分が得られます。

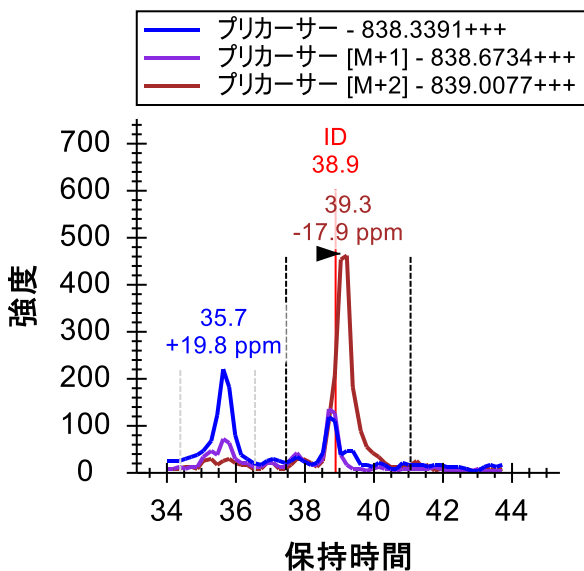
上記 M+3 と M+4 の追加を利用すると、干渉ピークはおそらく質量が 2 Da 大きい 3 価ペプチドであろうと予想できます。



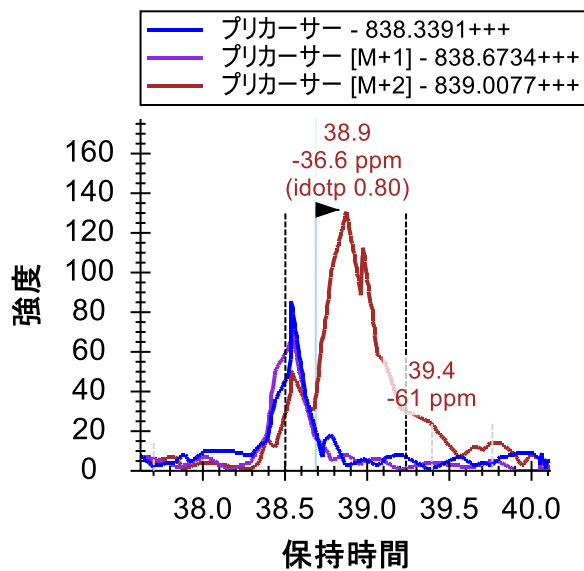
- [元に戻す] ボタンをクリックしてこの変更を元に戻します。

さらに2つのペプチドの下にある AEGEWEDQEALDYFSDKESGK ではより強い干渉が見られ、そのシグナルの排除はさらに難しくなっています。

5b_MCF7_TiTip3

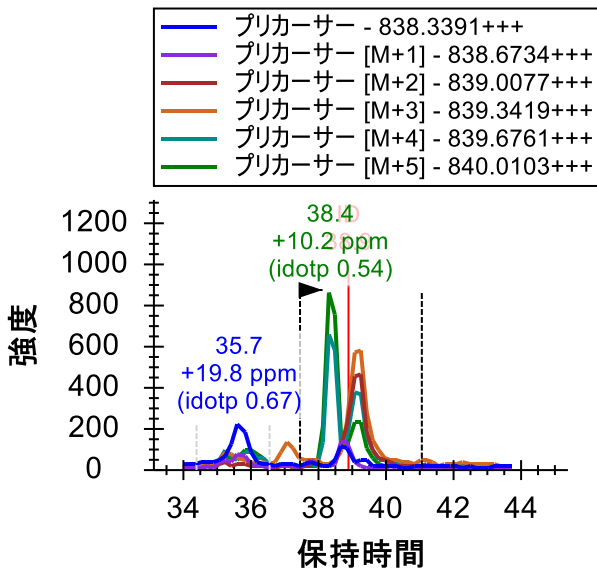


1_MCF7_TiB_L

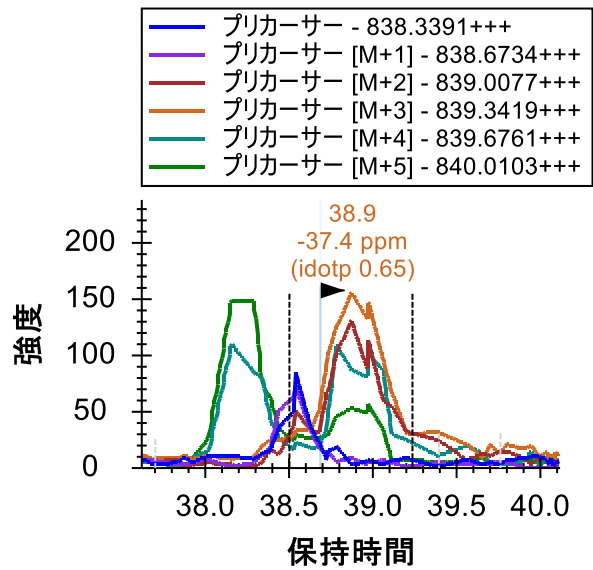


M+3、M+4、M+5の各クロマトグラムを追加することで、この質量と保持時間の組み合わせがプリカーサーイオンのクロマトグラム上でどれだけ複雑かがはっきりわかります。

5b_MCF7_TiTip3



1_MCF7_TiB_L



このペプチドに対して明確なピーク積分値を得るため M と M+1 を除くすべてのクロマトグラムを削除します。その後積分境界を調整します。より選択性の高いメソッドを使用する方法もありますが、MS1 スペクトルのみからでも有用な定量データを多数取得することは可能です。定量解析については、明確な干渉のない、ランキングも高いプリカーサーイオンに絞ることをお勧めします。

本チュートリアルで見てきたようにピーク同定を工夫すれば使用すると、干渉の影響を小さくすることもできます。

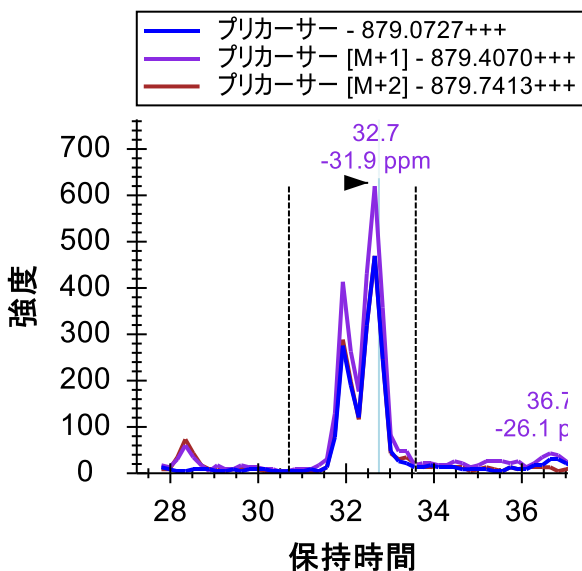
ペプチドの精査を続けます。わずかな積分調整を 1 つ行うだけで 22 番目のペプチド ALVEFESNPEETREPGSPPSVQR まで到達します。

翻訳後修飾が特殊なペプチドの解析

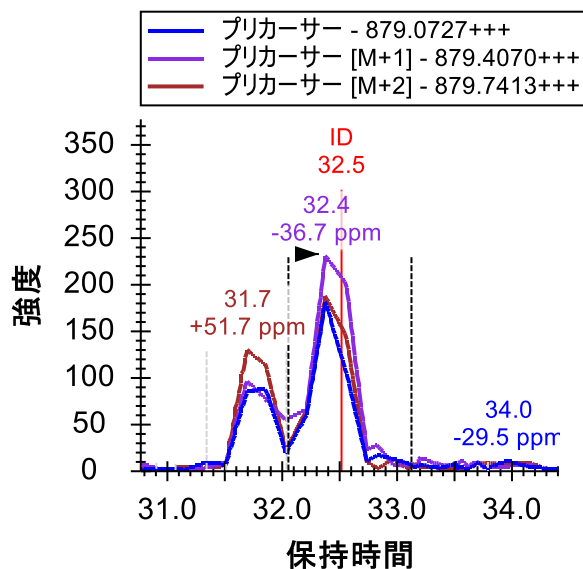
ドキュメントには ALVEFESNPEETREPGSPPSVQR およびその下の ALVEFESNPEETREPGSPPSVQR (どちらも 879.0727 のプリカーサー m/z を有する) が含まれています。検索エンジン (この場合は Protein Pilot) が前者を 5b_MCF7_TiTip3 で、後者を 1_MCF7_TiB_L で同定しました。しかしクロマトグラムを見ればどちらも約 32.5 分で同定されているピークとなっています。

興味深いことに、2 つのピークは同じ m/z 値 (Isobaric) でかつ保持時間が非常に近接しています。さらに良く似た同位体分布をもっていることがわかります。

5b_MCF7_TiTip3



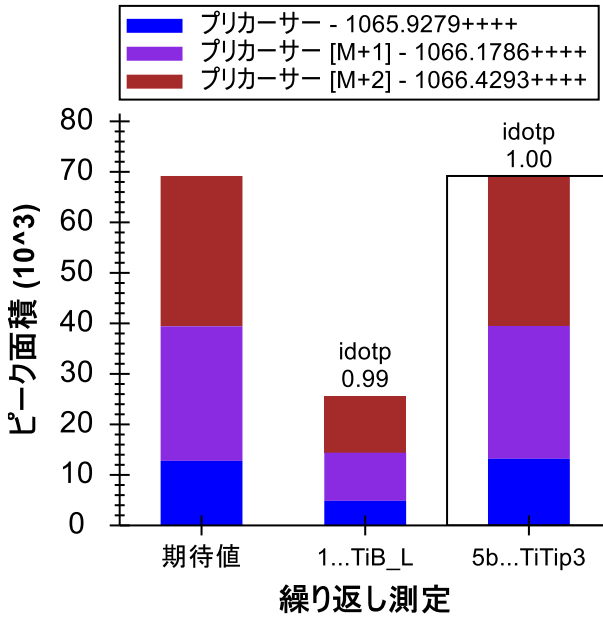
1_MCF7_TiB_L



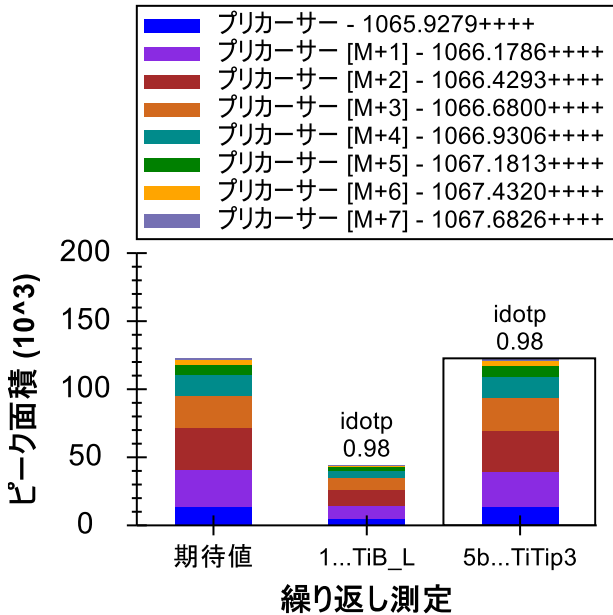
同位体分布と質量誤差を見ると、1_MCF7_TiB_Lにおける2つのピーク（どちらも31.5分と33分の間に出現しています）は5b_MCF7_TiTip3でのピークと異なるように見えますが、これは単に実験のばらつきが原因である可能性もあります。そこでM+3、M+4、M+5を追加してみると、両方のデータにおいて0.9を超えるidotp値が維持できることが確認できます（再度それぞれを積分して[ピーク面積]表示を確認し[元に戻す]）。このペプチドにはリン酸化部位が4か所あるため、2つのピークは同一ペプチドでリン酸化部位が異なるものである可能性、あるいはリン酸アイソフォームの溶出プロファイルが重複している可能性などが考えられます。MS1フィルタ使用時には検索エンジン出力結果を鵜呑みにせず、考えられるアイソフォームを慎重に評価することも行ってください。

その他のデータ解析ツール

ペプチド25まで下がっていくと、このドキュメントで最長かつ初めての4価のペプチドプリカーサーであるYGPADVDTTGSGATDSKDDDDIDLFGSDDEESEEAKRが見つかります。このペプチドは非常に大きく、その同位体分布も今まで見てきた典型的な2価のペプチドや3価ペプチドとかなり異なります。この場合 ^{13}C 原子取り込みのないモノアイソトピックペプチドM+はM+1やM+2よりも存在率が低くなると予測できます。実際クロマトグラムでも予測される分布のidotp値が1.0および0.99になっています。



今までと同じようにトランジション選択リストを利用し、M+3 から M+7 までのクロマトグラムを追加します。これらのイオンはすべて同位体分布全体で 1%以上となっており、idotp 値も高めの 0.98 であることがわかります。

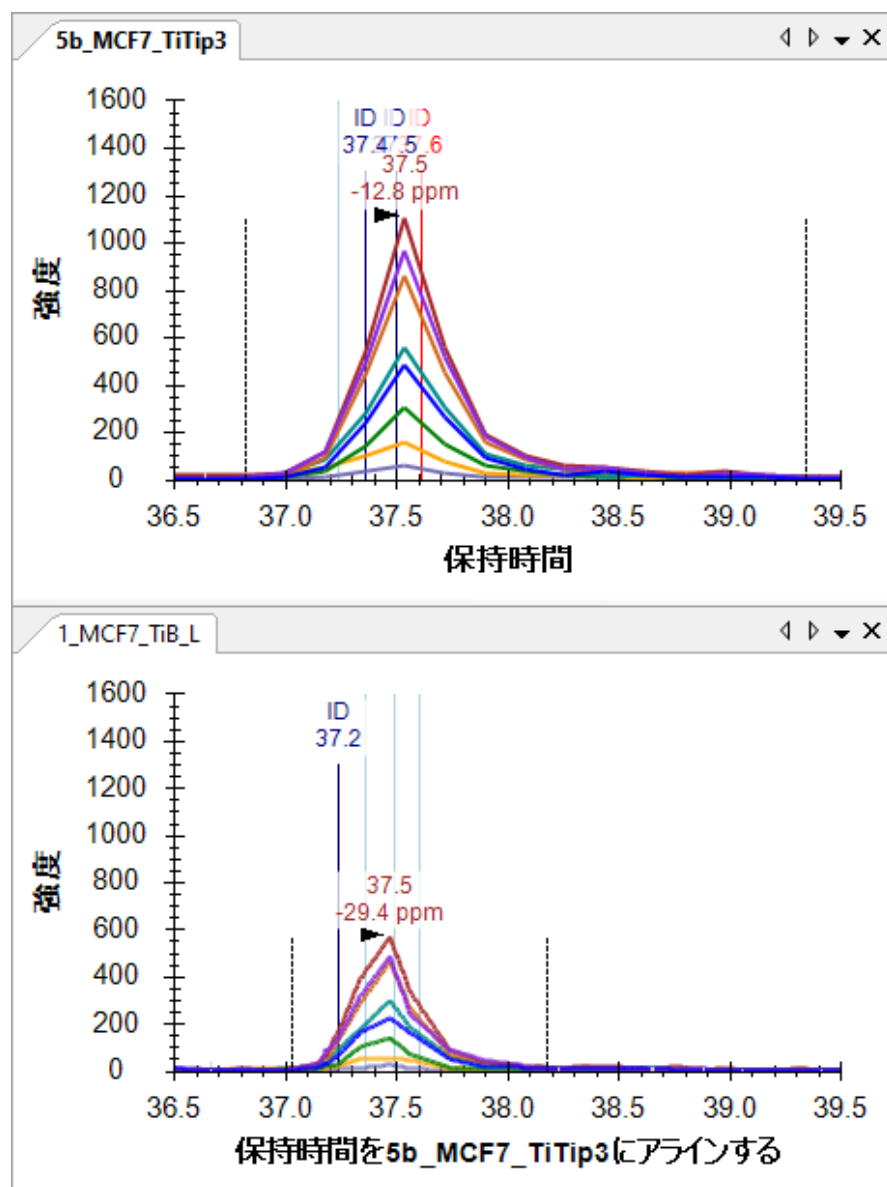


(クロマトグラムグラフをみると) このペプチドは本ドキュメント内で唯一、1 回の測定で複数回検出、同定されたものであることがわかります (5b_MCF7_TiTip3 において 3 回)。

以下の操作を行ってクロマトグラムを同じスケールにすると、これらの ID が繰り返し測定間でどうアライメントされているかわかりやすくなります。

- クロマトグラム上で右クリックし [**拡大縮小幅の同期**] のチェックをオンにします。
- クロマトグラム上で右クリックし [**自動スケール Y 軸**] のチェックをオフにします。
- 5b_MCF7_TiTip3 クロマトグラムで右クリックし、 [**100807_0005b_MCF7_TiTip3 に時間をアラインする**] のチェックをオンにします。（これにより、この現在のペプチドのみでなく、再度これをオフにするまでこのデータセットのすべてのペプチドがアライメントされることに注意してください。）
- マウスカーソルをプロット面積上に合わせ、マウスのスクロールホイールを手前にロールしてズームアウトします。
- 5b_MCF7_TiTip3 の積分範囲周りの細長い長方形をクリックしてドラッグします。

クロマトグラムは以下のようになります。

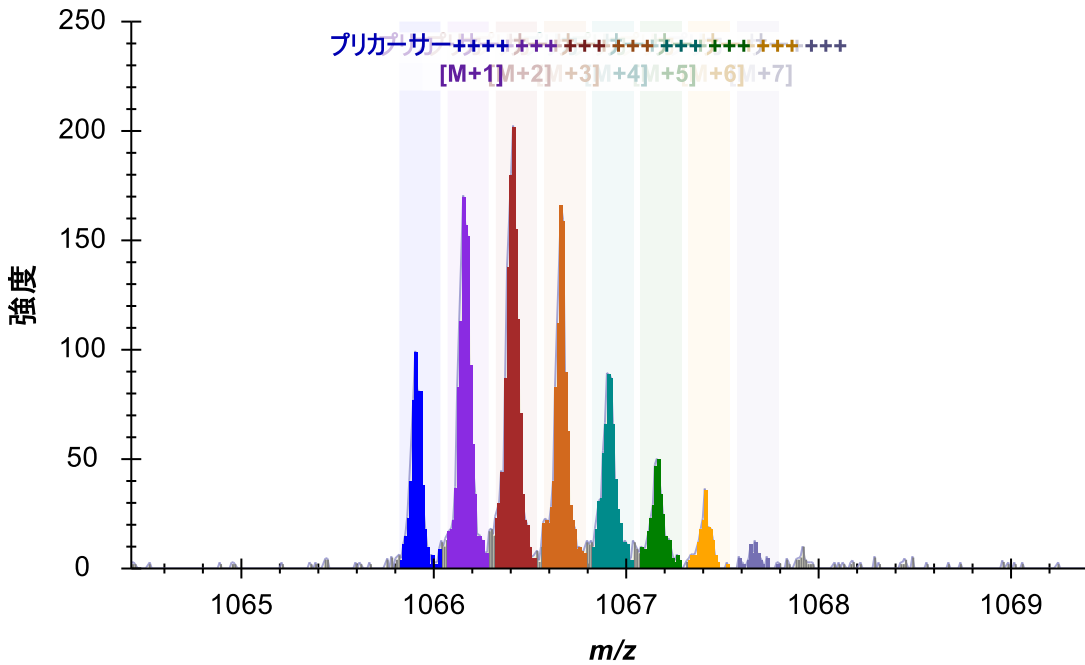


クロマトグラムの抽出元 MS1 スペクトル内の同位体分布を確認するため以下の操作を行います。

- 5b_MCF7_TiTip3 のピーク頂点にマウスカーソルを合わせ、表示される丸をクリックします。

以下のプロットで[フルスキャン]ビューが表示されます。

100803_0005b_MCF7_TiTip3.wiff (37.50 分)



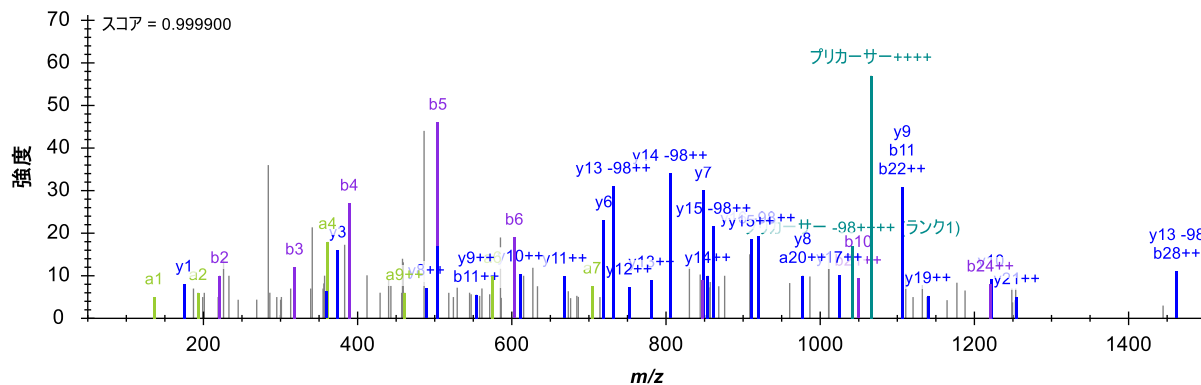
- [フルスキャン] 表示の右上隅の X をクリックし表示を閉じます。

アライメントによりクロマトグラフのプロットで ID とピークがきれいに並びました。Y 軸自動スケールによる拡大縮小幅の同期をオフにすればピークの相対的な高さもわかります。

クロマトグラム中の ID 注釈をクリックすると、検索エンジンがこのペプチドとして同定した MS スペクトルも確認できます。別のやりかたとしては[ライブラリの一致] 表示の上部にあるドロップダウンリストをクリックし、矢印キーを使用して一致した MS スペクトルのページを上下に移動する方法もあります。異なる測定からの MS スペクトルが同一ペプチドからのものであると確認できるまでもう少し解析が必要なこともあり得ます。

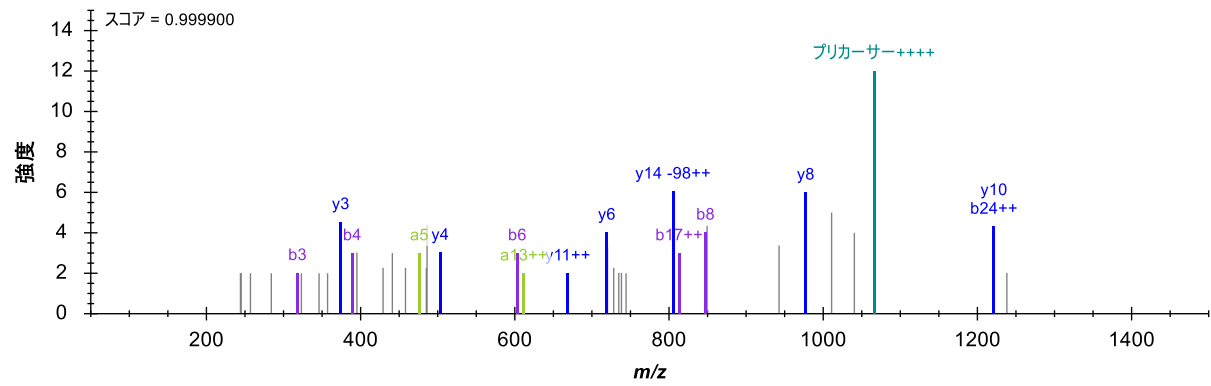
5b_MCF7_TiTip3 (37.61 分)

YGPADVEDTTGSGATDSKDDDDIDLFGSDDEEESEEAKR、電荷4



1_MCF_TiB_L (37.03 分)

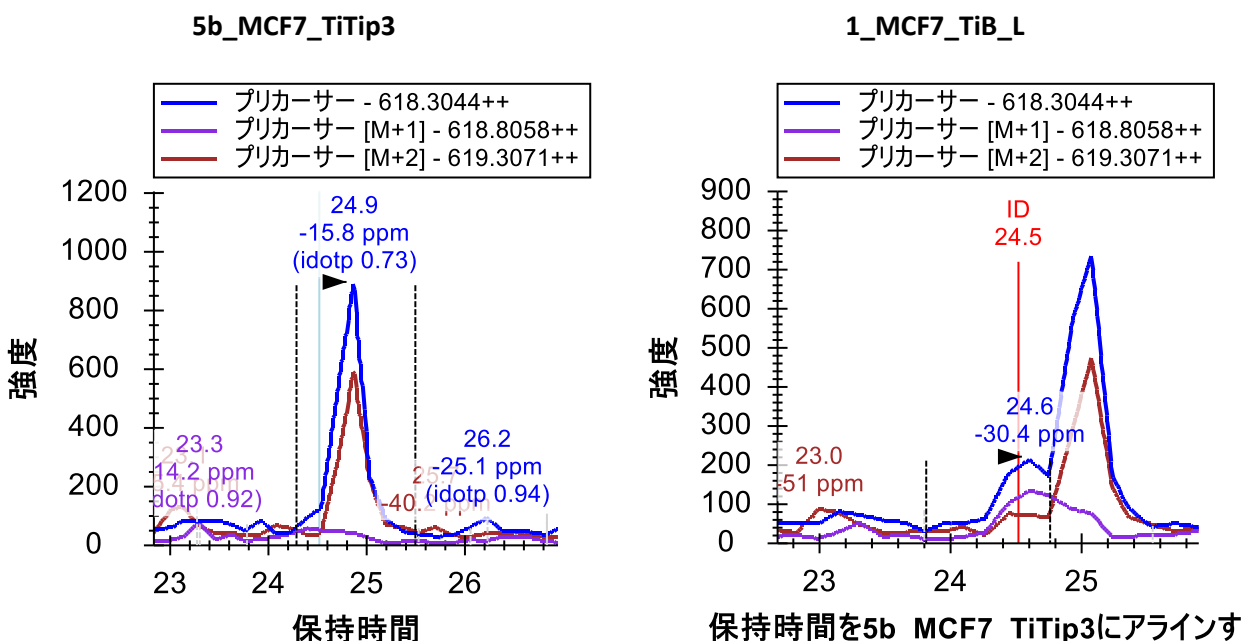
YGPADVEDTTGSGATDSKDDDDIDLFGSDDEEESEEAKR、電荷4



ただし、2つの測定のカロマトグラムピークは同一のペプチド分子を測定していると大いに確信できるはずです。

干渉に関する詳細

ペプチド DQVANSAFVER のピーク近傍には別の興味深い干渉があります。



1_MCF7_TiB_L では、ペプチドは 24.5 分で同定されましたが、どちらの繰り返し測定でも、25 分のあたりで強い干渉ピークが検出されています。しかしながら、干渉が観察されるのは M および M+2 のみです。ターゲットペプチドは 2 価であるため、これは干渉 1 価ペプチドと予想されます。5b_MCF7_TiTip3 ではターゲットのシグナルが弱い一方、干渉シグナルは相対的に強く、ターゲットのピークは M+1 クロマトグラム上でも検出、同定が難しくなっています。

どちらの繰り返し測定においても取得における干渉は深刻な問題であるためこのペプチドは MS1 定量化には適用できないと判断すべきです。もしこの特定のペプチドをどうしても測定したい場合は、PRM (Parallel reaction monitoring) や SRM (Selected reaction monitoring) など選択性の高いメソッドでの測定をお勧めします。

*SRM もしくは MRM ではプリカーサーから生じるプロダクトイオンの中で選択されたもののみを測定するのに対し、PRM では選択されたプリカーサーから生じるすべてのフラグメントイオンを測定する

以下の 7 つの問題についてはこれまで学習してきたことのおさらいです。以下の問題を理解し解決できる力は身に付けられているはずで

1. ETERASPIKMDLAPSK (31 および 32) 同一タンパク質の反復 (1 つを削除)
2. KTGSYGALAEITASK および KTGSYGALAEITASK (34 および 35) 配列が同じペプチドだがリン酸化部位が異なる

3. TPSPKEEDEEPESPEKK(41)ピーク分離が悪く、ピーク積分が上手くいっていない（ズームしてマニュアル積分で対応）
4. KEKTEPELPEPSVK(46)M+1 と M+2 に干渉あり
5. EKTEPELPEPSVK(47)M+2 に干渉あり
6. VPKPEPIPEPKEPSPEKNSK および VPKPEPIPEPKEPSPEKNSK（49 および 50）配列は同じペプチドだがリン酸化部位が異なるケース
7. KETESAEDNLDDLEK(51)M+1 に別の 1 価ペプチドの共溶出

クロマトグラムキャッシュファイルの最小化

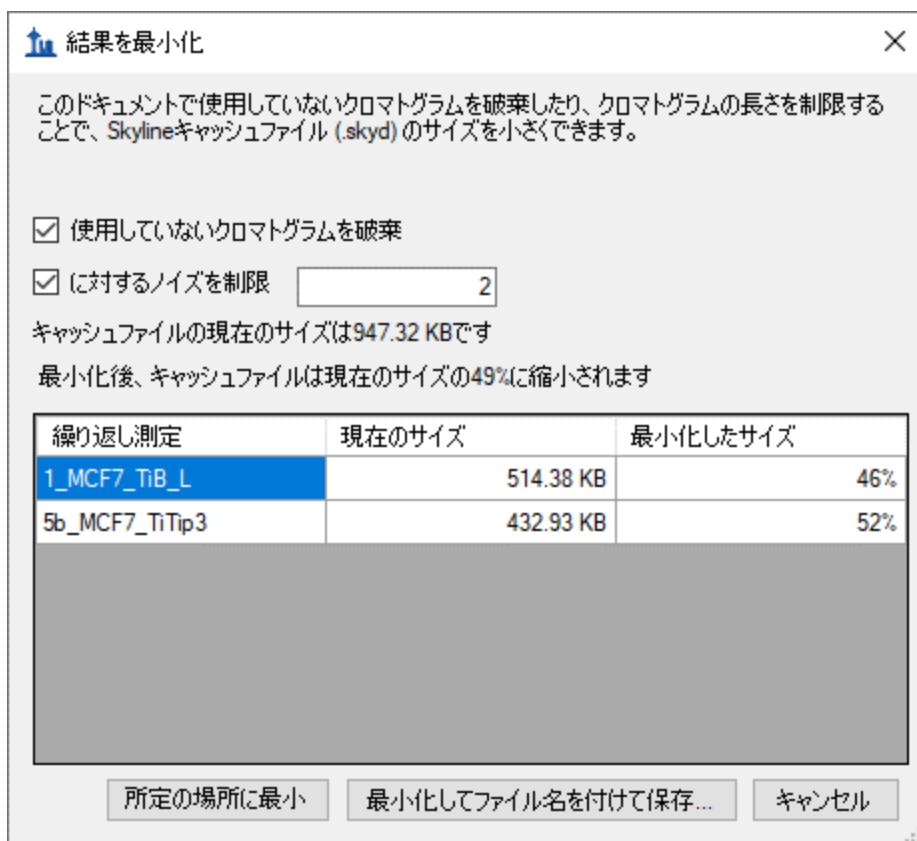
ドキュメントにある 50 個のペプチドの解析が一通り完了すると、すべてがかなり良好な積分結果が得られているはずですが、先へ進む前にまずは現在のドキュメントを保存します。

- [ファイル]メニューで[保存] (Ctrl+S) をクリックします。

次に、以下の手順を実施して、このドキュメントと無関係なクロマトグラムデータを破棄し、ドキュメントをできる限り小さく共有しやすくなるようにします。

- [編集]メニューで[結果を管理]をクリックします。
- [最小化]ボタンをクリックします。
- [ノイズを制限]チェックボックスをオンにします。
- フィールドに「2」を入力して、クロマトグラフピークの前後（分）のノイズを指定します。
- タブキーを押して、フォームによるサイズ縮小の再推定を実行します。

[結果を最小化]フォームは以下のようになります。



フォームはこの操作によってキャッシュファイルのサイズが約 947KB から約 464KB、つまり現在のサイズの 49%に縮小される見込みであることを示します。

- [最小化してファイル名を付けて保存] ボタンをクリックします。
- [ファイル名を付けて保存] の [ファイル名] フィールドに、「Ms1FilteringTutorial-2min.sky」という名前を入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

再度 Shift+F11 を押して縮小すると、この新しいドキュメントのペプチドのクロマトグラムが確認でき、積分境界から保持時間が両方向に 2 分拡大されていることがわかります。

クロマトグラムの最小化は、大規模な実験のためにドキュメントを作成する際に非常に便利です。ドキュメントは論文の補足データとしても共有ができます。生データのオンライン利用ももちろんできますが、最小化された Skyline ドキュメントの方がダウンロードも楽でかつ多面的なデータを提供することが可能です。

MS1 フィルタ用インクルージョンリストのエクスポート

上述の DDA 法を用いた複数の繰り返し測定では MS/MS スペクトルデータが不足しており、各 1 回の取得繰り返し測定では MS/MS でのペプチド同定がされないケースがあることも示されています。この問題については、既に説明したように、MS1 フィルタで RT アライメントを使用すると解

決可能です。ただしプロファイル型の測定から多数のターゲットペプチドを同時定量解析したい場合は、Skyline で DDA 実験用にインクルージョンリストメソッドをエクスポートし、「インクルージョンリストを用いたスクリーニング」²を取ることもできます。このインクルージョンリストを用いたメソッドでは、DDA 法と比べてターゲットペプチドを測定できる可能性がより高くなります。

* DDA では感度が低く選択されない場合は、インクルージョンリストにあらかじめ測定したいペプチドのプリカーサーイオン m/z を入れておくことで、感度に影響されることなくデータ取得ができます。

チュートリアル Skyline ドキュメントから次の MS1 フィルタ用のインクルージョンリストメソッドをエクスポートするため以下の手順を実施します。

- [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。
- [保持時間の実測値があれば使用]チェックボックスをオンにします。
- [時間ウィンドウ]フィールドで、たとえば「10」分といった予測される保持時間範囲を入力します。範囲の重複を少なくすることは、(SRM の場合と比較して)それほど重要ではありません。
- [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、[メソッド]をクリックします。
- [装置タイプ]ドロップダウンリストで「SCIEX QTOF」を選択します。
- [メソッドタイプ]ドロップダウンリストで「スケジュール」を選択します。
- [テンプレートファイル]フィールドで、QSTAR システムの取得メソッドテンプレートファイルへのパスを入力します。

SCIEX Analyst または Thermo Xcalibur のいずれかの装置ソフトウェアがインストールされている場合を除き、装置メソッドエクスポートについて行う作業はこのように行います。Skyline からのすべてのメソッドエクスポートはメソッドを実行しようとする装置の制御用コンピュータ上にある Skyline のインスタンスのエクスポート機能を実行すれば可能です。サポート対象の装置をお持ちの場合も、必要に応じて上記手順を実行して問題ありません。

結論

本チュートリアルでは、DDA 実験データの MS1 スキャンから定量情報を抽出するための機能について学びました。元々SRM 解析のために考案された Skyline の既存の機能の多くがそのまま MS1 抽出クロマトグラムに転用できます。その他の Skyline チュートリアルで提示される資料(動画資料も)での学習もお奨めします。MS1 スキャンからクロマトグラムピーク面積(プリカーサーイオンのピーク面積)を抽出して定量するという昔から存在している手法を Skyline はより効率的かつ視覚的に実現しているということです。MS1 定量を他の定量ツールで行った場

合も Skyline を使用して結果の確認、検証が可能です。さらに Skyline で DDA データを精査して DIA など異なる測定メソッドのスペクトルライブラリ作成をするというのもよいでしょう。データの品質、問題点もよりよく理解できるようになるでしょう。

補足

MS1 フィルタの原著論文で実際に使われたデータセットを自分で確認したい場合は¹以下のリンクからドキュメントをダウンロードしてください。

http://proteome.gs.washington.edu/supplementary_data/MS1_Filtering/minimized/

必要な Skyline ドキュメントおよび生データがすべて含まれています。

参考文献

1. 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* **11**, 202–214 (2012).
2. Jaffe, J. D. *et al.* Accurate Inclusion Mass Screening. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1952–1962 (2008).