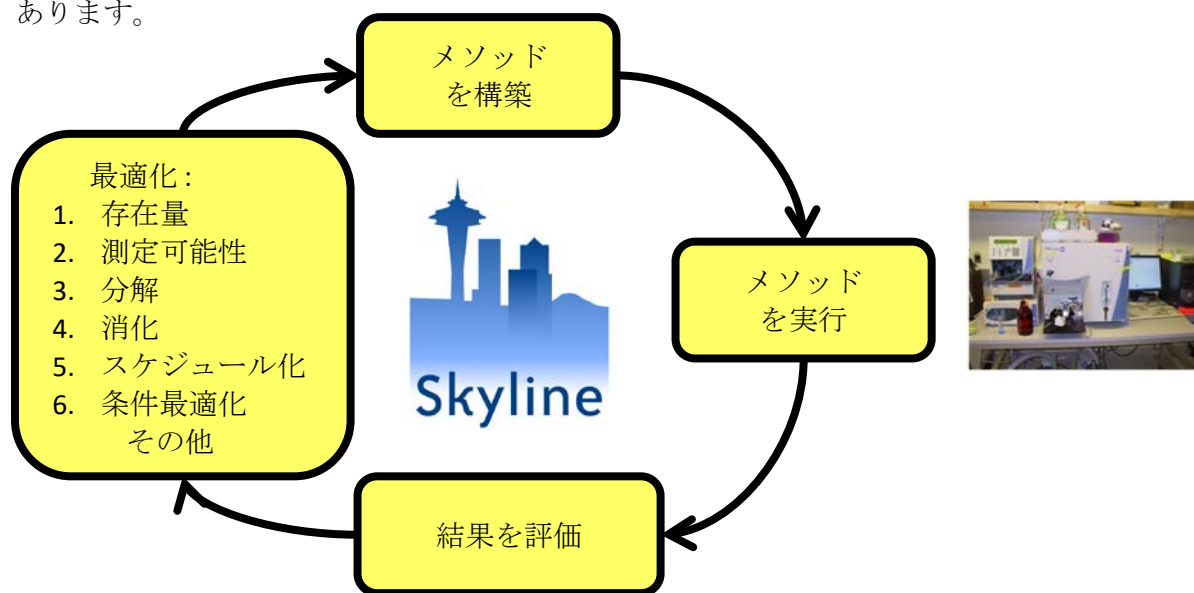


Skyline ターゲットメソッドの最適化

本チュートリアルでは、Skyline ターゲット質量分析環境における選択イオンモニタリング（SRM: Selected Ion Monitoring、または多重反応モニタリング（MRM）とも呼ばれる）メソッドの最適化に利用する機能を紹介し、紹介される概念の多くは、Parallel reaction monitoring（PRM）やデータ非依存性測定（DIA）にも適用されるでしょう。

あるタンパク質の理想的なターゲットペプチドが不明な場合でも、Skyline を用いると広範囲なペプチドを測定対象としたメソッドを容易に作成でき、サンプルマトリクス中で最も測定しやすいペプチドを探索できます。さらにこのメソッドを用いて行った測定結果を Skyline へとインポートすることにより、メソッドを改良し、測定を繰り返してこれを改善していくことも可能です。

これをターゲットメソッド最適化サイクルと呼び、下図に示すような考え方を表すことが多くあります。



このサイクルを繰り返すことで、同時に数十から数千のタンパク質を対象とした最適なターゲットメソッド構築ができます。また実験目的に沿った最良のペプチド、プロダクトイオン、および装置設定をメソッドに組み込むことができます。ただしサイクル開始時のリストが大きいときには、他のチュートリアルで紹介されているグループ比較や詳細ピーク検出モデルといった統計メソッドを用いてサイクルを開始することもできます。

本チュートリアルでは、ターゲットメソッド最適化サイクルを2回半行う例を示します。この例に従ってさらにサイクルを繰り返すことで、最適な定量メソッド構築を行うことができます。

はじめに

チュートリアルを始める前に、以下の zip ファイルをダウンロードしてください。

<https://skyline.ms/tutorials/MethodRefine.zip>

この中のファイルを、以下のコンピュータ上のフォルダで解凍します。

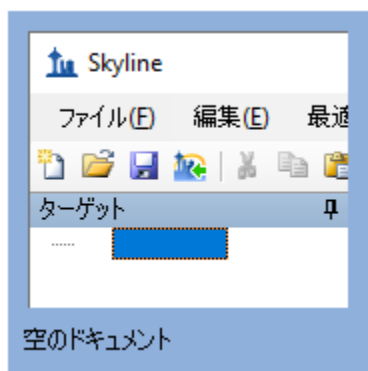
C:\Users\brendanx\Documents

これにより以下の新しいフォルダが作成されます。

C:\Users\brendanx\Documents\MethodRefine

本チュートリアルを始める前に Skyline を使用していた場合には、Skyline をデフォルト設定に戻すことをお勧めします。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、このような空のドキュメントをクリックします。

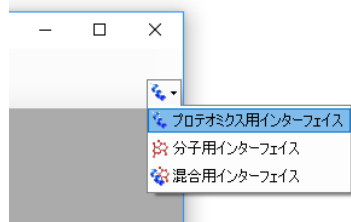



- [設定] メニューで、[デフォルト] をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで [いいえ] をクリックします。

この Skyline ファイル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。

この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、以下のようにして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] を選択します。



Skyline は、Skyline ウィンドウの右上隅のプロテインアイコン  で表示されるプロテオミクスモードで動作しています。

これで WormUnrefined.sky ファイルを開いて開始する準備ができました。

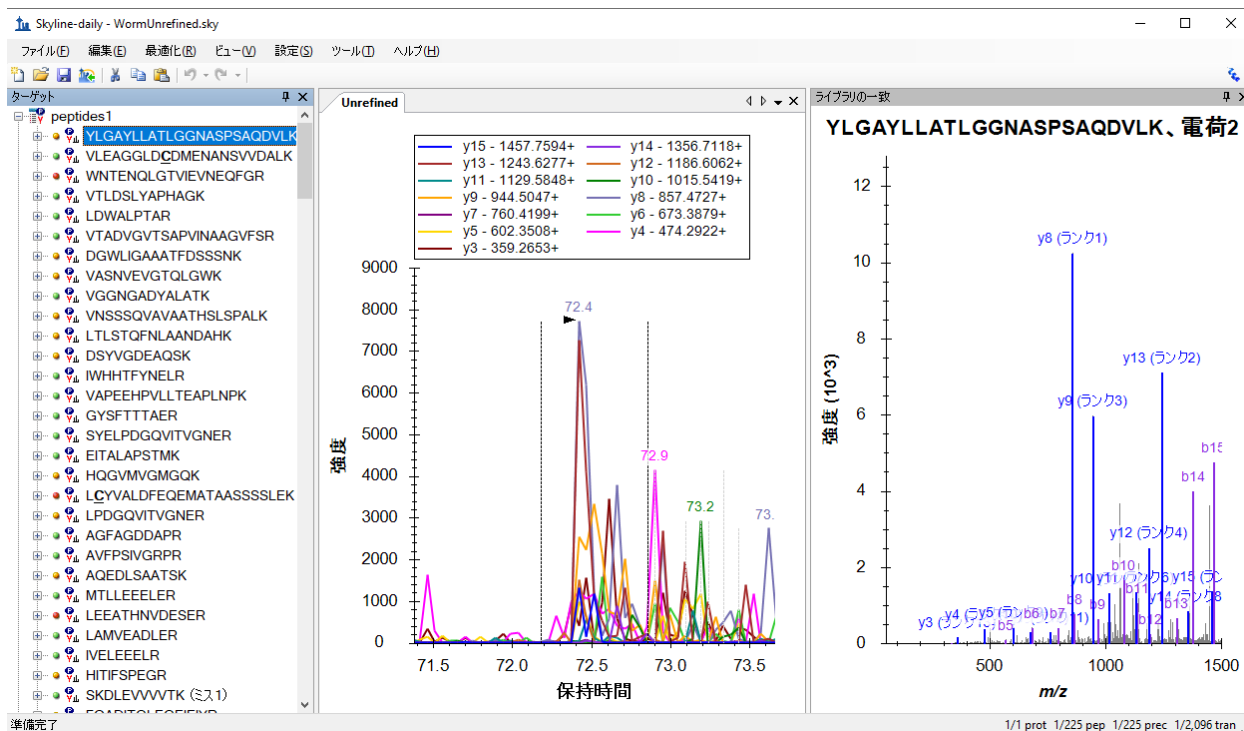
- Windows Explorer でファイルをダブルクリックするか、または Skyline のインスタンスを実行している場合には [ファイル] メニューで [開く] をクリックし、ファイルを見つけて開きます。

測定結果

開始するには、以下の操作を行います。

- [ターゲット] 表示で最初のペプチド (YLGAYLLATLGGNASPSAQDVLK) を選択します。
- [表示] メニューで、[自動ズーム] を選択し [最適ピーク] をクリックします。
- [表示] メニューで、[イオンタイプ] を選択して [B] をクリックします。

ライブラリから、MacCoss ラボの装置で測定されたこのペプチドの MS/MS スペクトルおよび、プロダクトイオン y3~y15 についての時間-強度クロマトグラムが表示されます。



注：各ペプチドに関連付けられたライブラリ内の MS/MS スペクトルは、イオントラップ型質量分析計を用いた測定結果から得られたものです。

Skyline の左側のペプチド表示では、ペプチド配列の左に緑、黄、赤の点が表示されています。これらはピーク品質アイコンといい、それぞれの意味は以下の通りです。

- 緑 - すべてのトランジションが共溶出されたピークとなっており、Skyline が最良とみなしています。
- 黄 - 半分以上のトランジションが共溶出ピークとなっていますが、すべてではありません。
- 赤 - 半分未満のトランジションが共溶出ピークとなっています。

このライブラリは、39 個の Thermo RAW ファイルをドキュメント内へインポートしたものから構成されています。Skyline 画面右下の数字をご覧ください。ドキュメント内には 225 個のペプチドと 2096 のトランジション（各ペプチドの y3~y(n-1)をカバー）が保存されています（ここで n はペプチドシーケンス内中のアミノ酸数です）。

Skyline ドキュメントの目標は、特定のターゲットマトリックスで測定可能なペプチドを決定し、測定可能なペプチドの最良トランジションを決定することでした。ペプチドあたりのトランジション数が多いほど、測定されたピークが対象ペプチド由来であるという信頼度が高くなります。この信頼度は、対象ペプチドの各トランジションにおけるピーク強度と、ライブラリ上にある同一ペプチドのスペクトル^{1,2}との類似度（内積を用いた相関）から得られます。

未最適化メソッド

ペプチドを測定するのに必要なトランジションリストを作成するには、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、[トランジションリスト]をクリックします。
- [複数メソッド]を選択します。
- [試料インジェクションごとの最大トランジション数]に「59」と入力します。

[トランジションリストをエクスポート]は以下のように表示されます。

トランジションリストをエクスポート

装置タイプ(D): Thermo

OK

キャンセル

シングルメソッド(S)

タンパク質毎に1つのメソッド(Q) m/zの順に並べる

複数メソッド(M) タンパク質を無視(R)

試料インジェクションごとの最大トランジション数(X):

59

メソッド: 39 S-レンズ値を書き込む

最適化(Z): なし

メソッドタイプ(T): 標準

- [OK] ボタンをクリックします。
- 次のフォーム内の MethodRefine フォルダに移動します。
- [ファイル名]に「worm」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

Windows Explorer で MethodRefine フォルダを開くと、39 個の新しい CSV ファイル (worm_0001.csv~worm_0039.csv) がフォルダ内に含まれていることがわかります。それぞれのサイズは約 4KB で、Thermo 社 TSQ 用未スケジュール化メソッドにインポートできる 59 個以下のトランジションのリストが含まれています。

注：最新の三連四重極装置は何百ものトランジションを最低 2 ミリ秒のドウェル時間で同時に測定できます。2009 年に本例のデータファイル収集に使用した TSQ Quantum Ultra では、まだ適切な設定ではありませんでした。

複数の測定結果をインポートする

測定結果ファイルのインポート方法を練習するには、別の ZIP ファイル (36MB) をダウンロードする必要があります。この ZIP ファイルには、MacCoss ラボでデータ収集された 39 個の Thermo RAW ファイル (非圧縮で 161MB) が含まれています。これは、前節でエクスポートしたトランジションリストを用いて測定したものです。

ダウンロードした元の MethodRefine.zip ファイルには、データファイル WormUnrefined.skyd が入っており、Skyline で必要とされるすべてのデータが含まれています。既存のデータファイルを引き続き利用する場合、以下のセクションはスキップして構いません。

自身でデータを再インポートするには、以下の ZIP ファイルをダウンロードします。

<https://skyline.ms/tutorials/MethodRefineSupplement.zip>

続いて前セクションで使用したフォルダにこのファイルを解凍します。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\MethodRefineSupplement

Skyline で以下の手順を実行して、以前にキャッシュしたデータを削除します。

- [編集]メニューで、[結果を管理]をクリックします。
- [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。

クロマトグラムチャートとピーク品質アイコンの両方が、Skyline インターフェイスから削除されます。

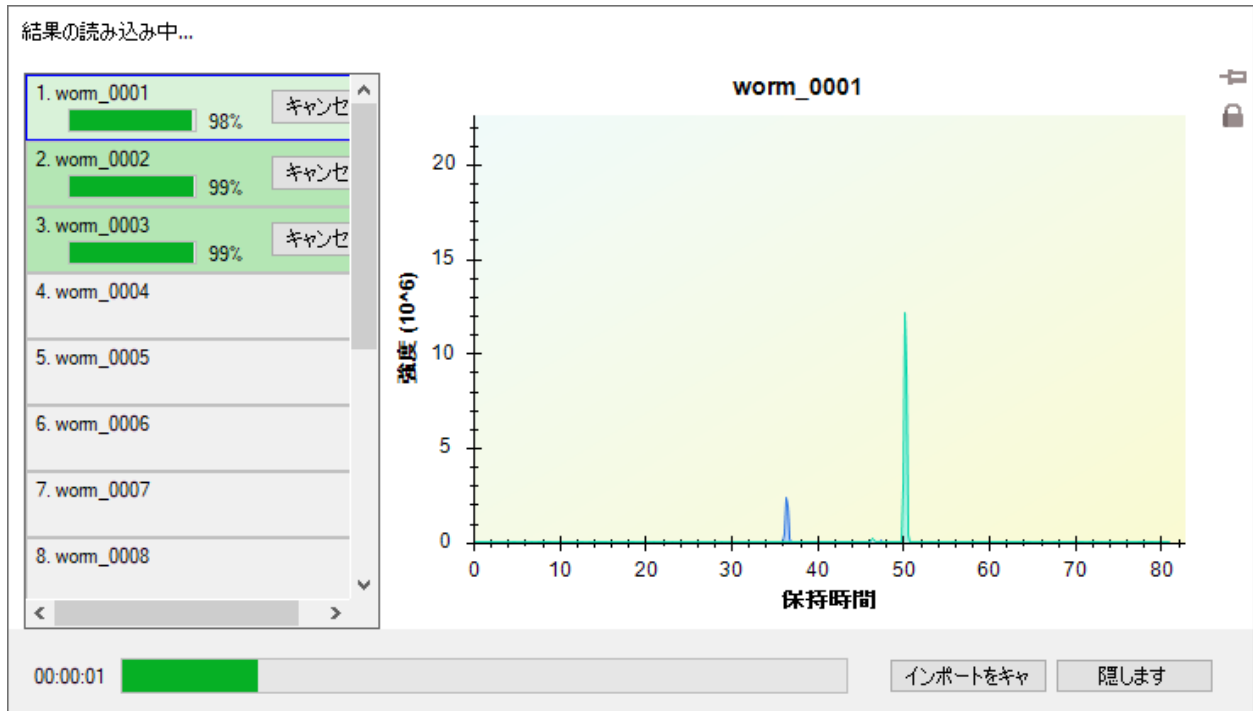
- [ファイル]メニューで[保存] (Ctrl+S) をクリックします。

これで、元のデータをインポートする準備が整いました。すべてを一度にインポートする必要はありません。巨大な未最適化メソッドからエクスポートした、全トランジションリストのデータ取得が完了する前に、データチェックをするときに本機能は便利です。このチュートリアルでは、データを 2 つのバッチに分けてインポートします。

まず、次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を 1 つ追加]を選択します。
- [名前]フィールドに「Unrefined」と入力します。
- [OK]ボタンをクリックします。
- MethodRefineSupplement フォルダに移動します。
- 「worm_0001.RAW」ファイルをクリックします。
- 「worm_0015.RAW」ファイルをシフト・クリックして、最初の 15 個のファイルを選択します。
- [開く]ボタンをクリックします。

Skyline が 15 個のファイルのインポートを開始します。インポートの進捗状況は、以下のよう
に [結果をインポート] に表示されます。



Skyline がこのデータを高性能なデータファイル形式に変換している間も、結果の確認が可能です。ドキュメントの修正を始めることも可能ですが、このチュートリアルでは、以下の手順に従って先に 39 個の結果ファイルすべてのインポートを完了してください。（ただし、最近のコンピュータは非常に高速なため、みなさんが他の作業を始める前にインポートが完了すると思います。）

- [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。
- [既存の繰り返し測定にファイルを追加]を選択します。
- [OK]ボタンをクリックします。
- MethodRefineSupplement フォルダに移動します。
- 「worm_0016.RAW」ファイルをクリックします。
- 「worm_0039.RAW」ファイルをシフト・クリックして、残りのすべてのファイルを選択します。
- [開く]ボタンをクリックします。

インポートが完了すると、次のセクションを開始する準備が整います。データファイルは、削除される前の元のものと一致しています。

手動最適化

ドキュメントを最適化する 1 つ目の方法として、各ペプチドを目で見て確認して、Skyline が提供する豊富な情報に基づいて、どのトランジションを取捨選択するかを決定する方法があります。これは、ASMS 2009 でポスター発表したもので、このチュートリアル of Skyline ドキュメントを最適化するときに用いた方法です。各々のペプチドについて目で見て確認し、ライブラリスペクトルと良く一致するピークのトランジションから、3 つの最良トランジションを選択するのにかかった時間は、1 時間未満でした。

このチュートリアル of Skyline ドキュメントを見ると、一つ目のペプチドについて、現在ズームインしているピークよりも、良いピークを Skyline が見過ごしていないか疑問に思うかもしれません。この疑問に答えるには、以下の手順を行ってズームアウトします。

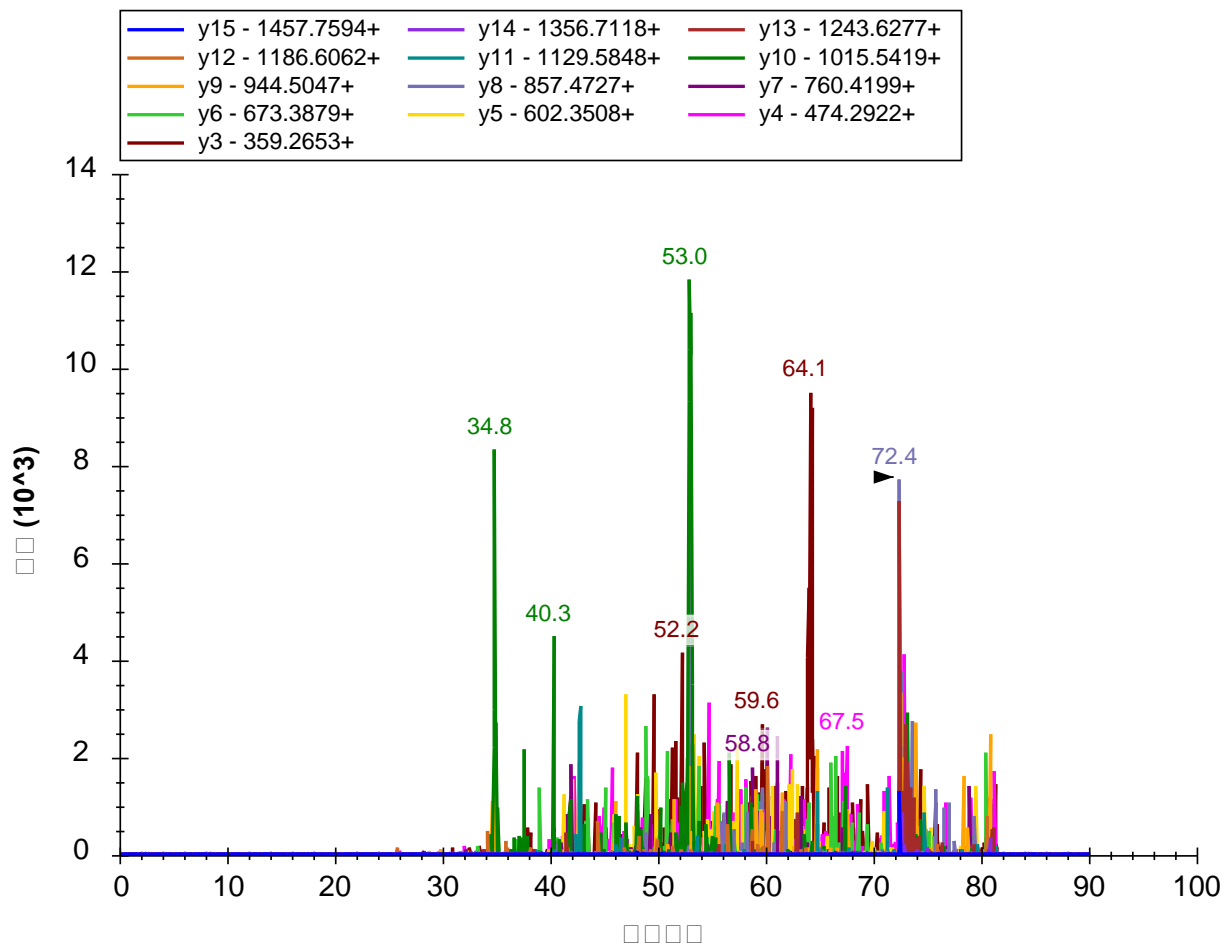
- [表示]メニューで、[自動ズーム]を選択して[なし] (Shift+F11) をクリックします。

以下のキーボードショートカットは憶えておくと便利です。

- 表示 / 自動ズーム / 最良ピーク – F11
- 表示 / 自動ズーム / なし – Shift+F11

これらの機能を利用すると、選択したピークの拡大図と測定した各トランジションの保持時間範囲の全体図との間を、素早く切り替えることが可能です。

ドキュメント内の最初のペプチドのトランジションの保持時間範囲の全体図は、以下の通りです。



一見ノイズの多いデータであるように見えます。より詳細に見るには、保持時間でラベルされたどの大きなピークも、その周辺をマウスでドラッグすると拡大できます。

もし、このペプチド由来の正しい測定結果が含まれていないことが確認できたら、以下の操作を行って一つ目のペプチドをドキュメントから削除します。

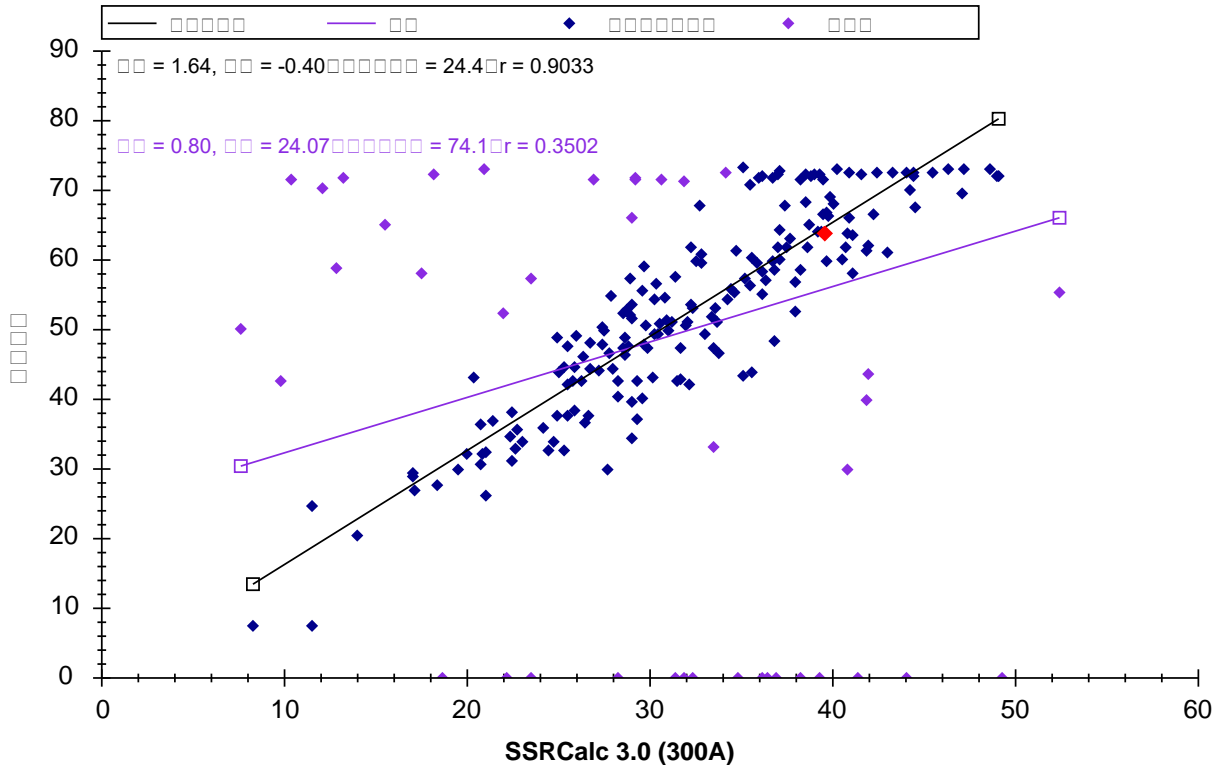
- [編集]メニューで、[削除]をクリックするか、キーボードの **Delete** キーを押します。

保持時間予測

クロマトグラムピークについて調べるときには、ペプチドの予測保持時間について何かわかることも便利です。Skyline に Sequence-Specific Retention Calculator (SSRCalc) 3.0³ を統合することで、保持時間予測が可能となりました。保持時間予測の他のメソッドは別のチュートリアルで説明されています。SSRCalc 疎水性スコアと測定したペプチドの保持時間との線形回帰直線を見るには、以下を行います。

- [表示]メニューで、[保持時間]、続いて[回帰]を選択してから、最後に[実行するスコア]をクリックします。

Skyline に、以下のようなグラフが表示されます。

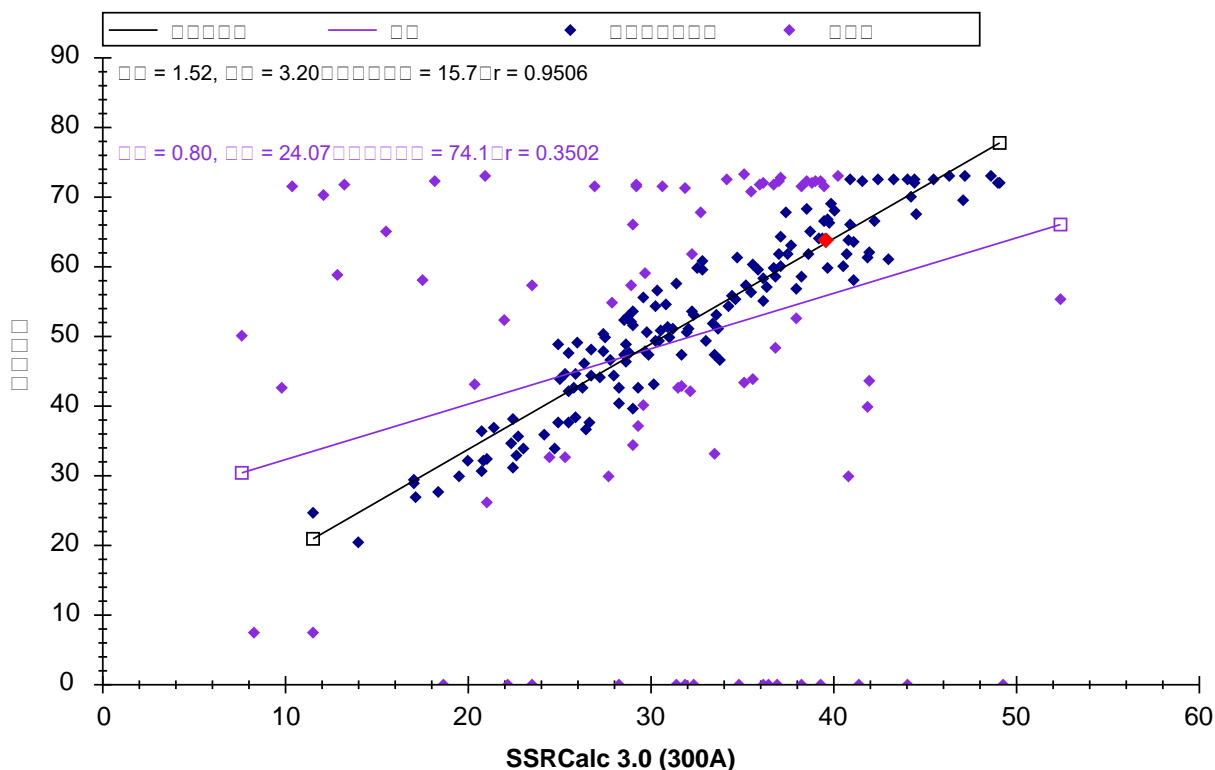


「回帰の改良 refined regression」直線上に、赤色の点がハイライト表示されています。この点は、現在選択されているペプチドに対する SSRCalc スコアおよび測定時間を表しています。ハイライト表示された点は、Skyline [ターゲット]表示で異なるペプチドを選択すると変更されます。

初期設定では、「回帰の改良」を行う残差の閾値として相関係数 $r = 0.9$ が採用されており、閾値が満たされるまで回帰から点が削除され異常値の標識が付けられます。なお、閾値の調整は、以下の手順で行います。

- グラフを右クリックして、[閾値を設定]をクリックします。
- [閾値]で「0.95」と入力します。
- [OK] ボタンをクリックします。

Skyline が再度線形回帰を行い、より多くのペプチドを異常値としてマークしてグラフを以下のように変更します。



以下の手順を行うことにより、保持時間予測のための新たな線形方程式を作成することも可能です。

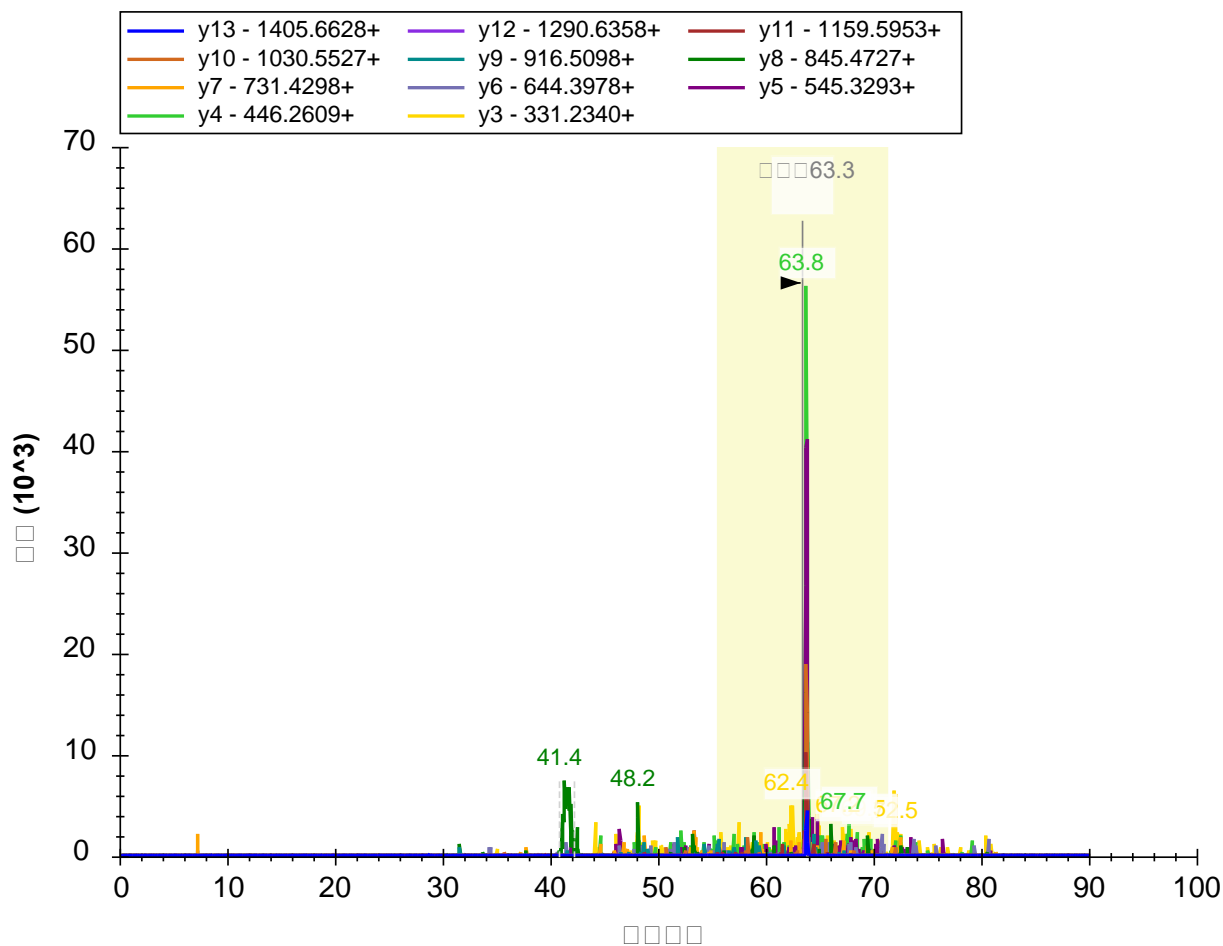
- グラフを右クリックして、[回帰を作成] をクリックします。

Skyline に [保持時間予測を編集] が表示されます。このフォームには、保持時間回帰グラフからの得られた情報（補正済みの回帰データ（146 のペプチド）とその勾配、切片、時間枠のみを含む）が事前に入力されています。Skyline が示す時間枠（当該回帰の残差から得られる標準偏差の 4 倍値）には 146 のペプチドの約 95% が含まれているはずですが。

Skyline は、相関係数 r が 1.0 に最も近くなるような計算式を選択します。現在選択できるのは、孔径 100 または 300 オングストロームの逆相系の粒子充填型カラムを用いた測定を学習データとしてトレーニングさせた SSRCalc 3.0 のみです。MacCoss lab では、孔径 90 オングストロームの充填材を使用しているため、SSRCalc 3.0 (100Å) でより良いフィットが得られます。

- Skyline により示す値でいい場合は、[OK] ボタンをクリックします。

下図のように、クロマトグラムにペプチドの予測保持時間が追加されます。



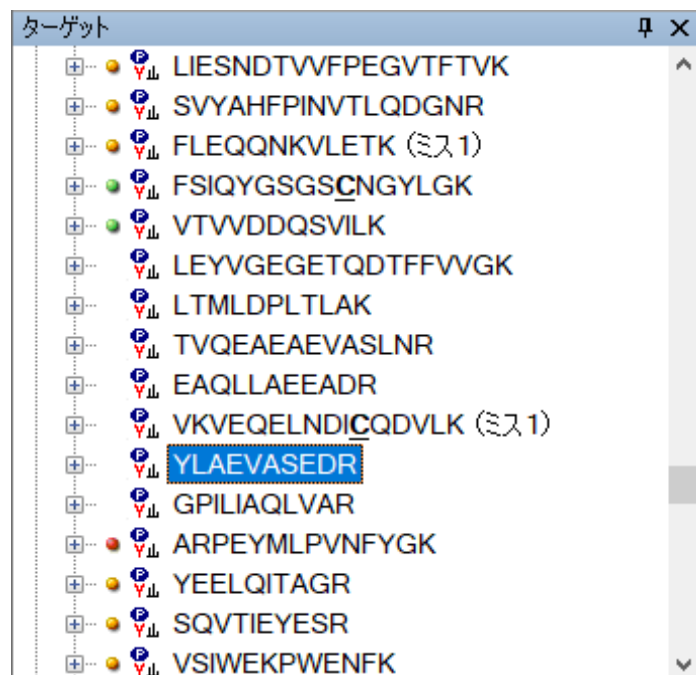
保持時間予測値周辺の影がついた部分は、[保持時間予測を編集]で承認したウィンドウ幅 (15.7 分) を示します。影がついた部分の外側にあるピークはすべて、保持時間が予測値から標準偏差の 2 倍以上外れたものです。

データの欠落

保持時間回帰グラフを終了してこのドキュメントの手動修正に戻る前に、多くの異常値が x 軸上にあることに注目してください。これは、このペプチドのピークが測定結果から発見できなかったために異常値とみなされたということを意味します。その理由を調べるには、以下の操作を行います。

- マウスマウスカーソルを x 軸上の一番左にポイントし、カーソルが手の形に変わるのを待ちます。
- 左マウスボタンをクリックします。

クリックした点が赤でハイライト表示され、[ターゲット]表示をスクロールして選択したペプチド (YLAEVASEDR) を表示します。Escape キーを押して [ターゲット] 表示に戻ると、以下のように表示されます。

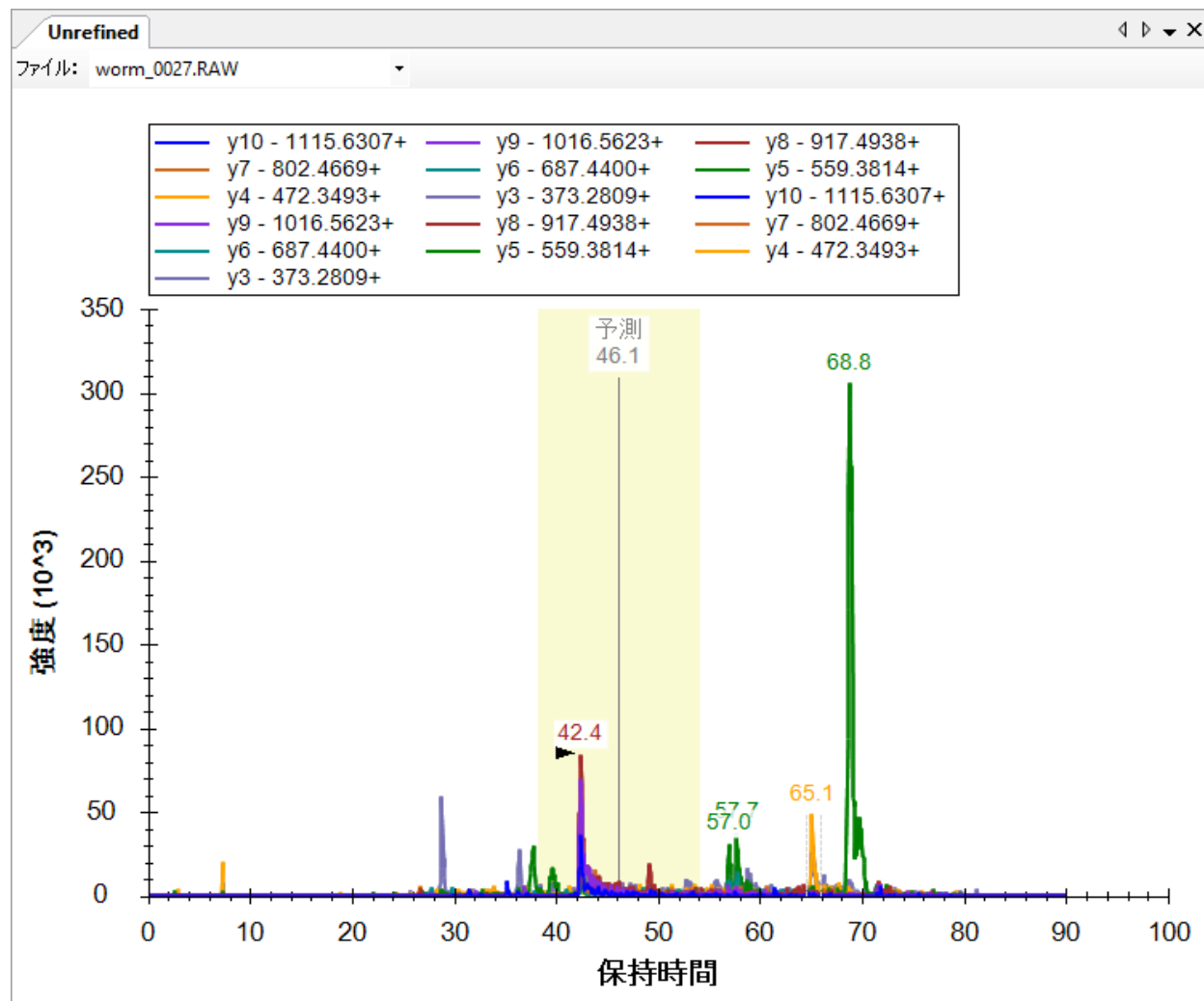


赤いドットのピーク品質アイコンがないということは、このドキュメントにインポートした RAW ファイルの中には、これら 7 つのペプチドの測定値が存在しないことを表しています。最初に RAW ファイルをインポートしたとき、39 のトランジションリストと 39 の RAW ファイルがありました。いったい何が起こったのでしょうか？

Skyline を用いてもう少し説明しましょう。

- データが欠落している上記のペプチド VTVVDDQSVILK をクリックします。

クロマトグラムグラフが以下のように表示されます。



上部に追加された、[ファイル] 選択リスト付きのツールバーに注目してください。このリストをクリックすると、worm_0027.RAW および worm_0028.RAW の両方がこのペプチドの測定値を含んでいると表示されます。

将来、1回の試料インジェクションで1つのペプチドを2度測定する必要があるかもしれませんが、現在のところ、[ファイル] リストを示すクロマトグラムグラフは、どこかに不具合があることを例示しています。原因としては、Skyline 上で同じ測定ファイルから別個の測定ファイルとしてインポートされるケースや、今回のように、2つの出力ファイルに同じトランジションリストが繰り返し出力され、誤ってもう一つのトランジションリストが削除されたメソッドで測定を行っていたケースが考えられます。ペプチド表示を上方向にスクロールすると、これが worm_0015.RAW と worm_0016.RAW にも起こっているのがわかります。

測定値のないこれらのペプチドをここで消去することも可能ですが、このチュートリアルの後半で行う単一最適化操作の一環として消去を行うことも可能です。今のところは、そのままにしておいて先に進みます。

- 保持時間回帰グラフの右上角にある赤い x をクリックします。

測定可能なペプチドおよびトランジションを選択する

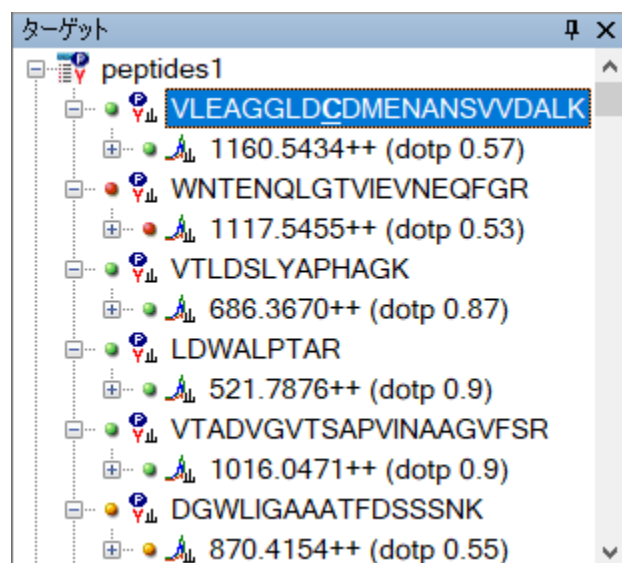
Skyline を用いればメソッドを自動で最適化することが可能です。しかし、測定ペプチドやトランジションを手動で選択する方法を理解しておくことは重要です。手動での確認は、以下の手順で行います。

- ドキュメント内の最初のペプチドを選択します。
- F11 を押してクロマトグラム表示内の**最良ピーク**にズームインします。
- [編集]メニューで、[すべて展開]を選択して[ペプチド]をクリックします。

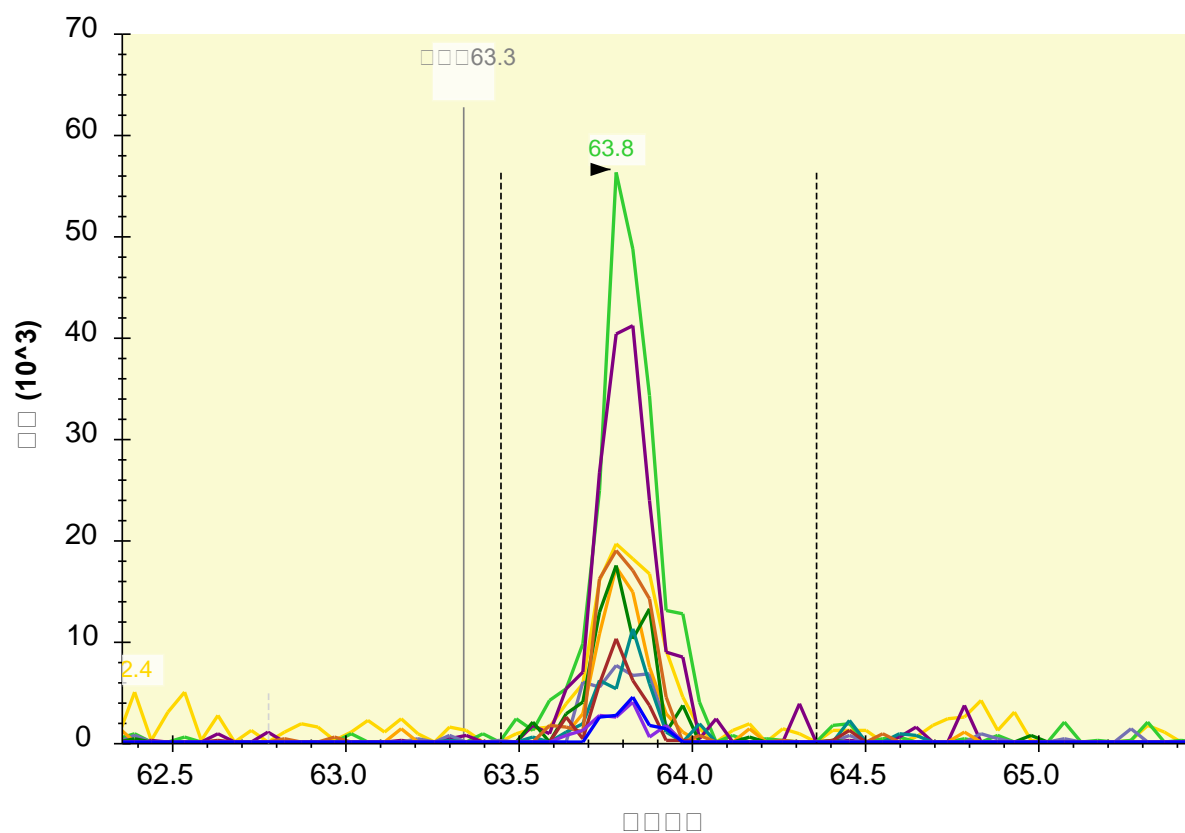
この最後の操作により、ペプチド表示内に「dotp」値が表示されます。dotp 値は、SRM により測定されたピーク領域値と MS/MS ライブラリにおけるピーク強度とのドット積値による類似度指標^{4,5}です。この値が 1.0 に近いほど、相関性が高いといえます。

注：Skyline 2.1 以降、Skyline のすべての dotp 値は Toprak, et al. MCP 2014.に記載された「normalized spectral contrast angle」計算法を使用しており、実際のドット積値ではなくなっています。

ペプチド表示は以下のように表示されます。

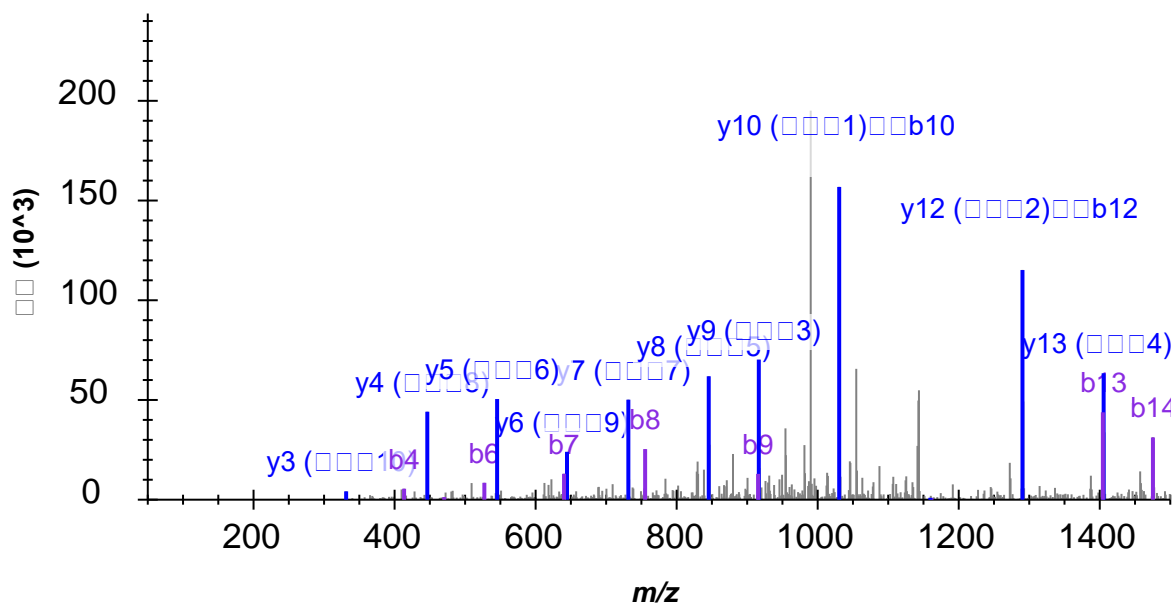


選択したペプチドはピーク品質アイコンが緑色であることから、プロダクトイオン (y1-y11) のピークすべてがほぼ同じ時間に観測されているとわかります。しかし、dotp 値 (0.57) はあまりよくありません。



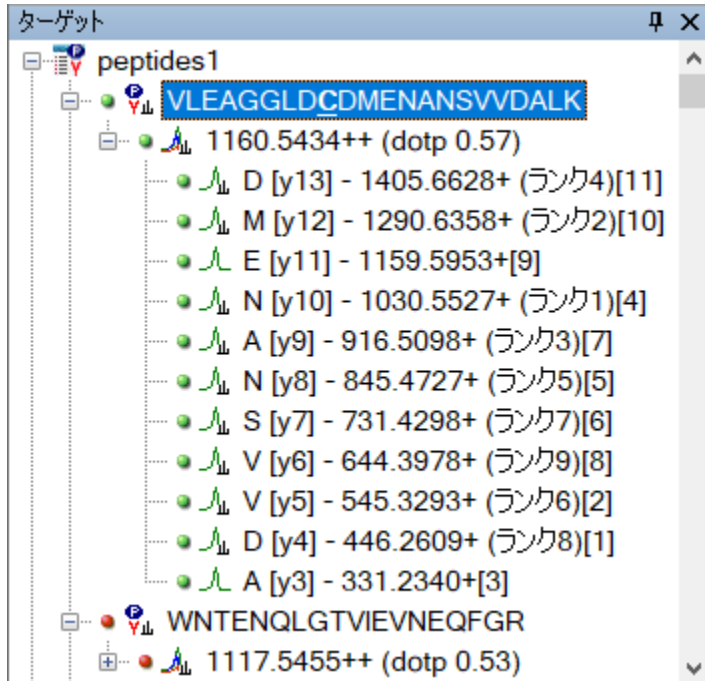
ライブラリの MS/MS スペクトルを見てみると、dotp 値がよくない原因が理解できます。

VLEAGGLDCDMENANSVVDALK□□□2



ライブラリの MS/MS スペクトル内で最も強度が高いピーク 2 つに、**y**-および **b**-イオン (**y10**、**b10** および **y12**、**b12**) 両方の注釈が付いていることに注目してください。SRM 測定に使用した Thermo TSQ では一般的に **b**-イオンはあまり生成しません。そのため、この今回の測定系では **b10** および **b12** イオンは検出されないと考えます。

- トランジションの詳細を見るためプリカーサーイオンの $m/z=1160.5434++$ を展開します。



左側の () に囲まれた数字はライブラリ内の MS/MS スペクトルにおける強度のランクを示します。右端の [] に囲まれた数字は実際に SRM 測定をした結果から得られる各プロダクトイオンのピーク領域のランクを示します。このランクは、実測値とライブラリ内の MS/MS スペクトルがどの程度一致しているかを判断する指標となります。ただしこのチュートリアルでは、このペプチドを削除する必要があります。

- ペプチド VLEAGGLDCMENANSVVDALK をハイライトし、**Delete** キーを押します。

次のペプチド (WNTENQLGTVIEVNEQFGR) は明らかに測定が上手く行えていません。なぜなら、ピーク品質アイコンが赤色であり、また dotp 値も 0.34 と非常に小さいからです。これも消去してください。

- このペプチドをハイライトし、**Delete** キーを押します。

その次の 3 つのペプチドは、測定可能ペプチドの非常に良い例です。なぜなら、3 つのペプチドすべてでピーク品質アイコンが緑色であり、また dotp 値も 0.87 以上と非常に高いからです。各ペプチドに対して 3 つのトランジションを組み込むとして、まずは 1 つ目のペプチドについて考えてみましょう。

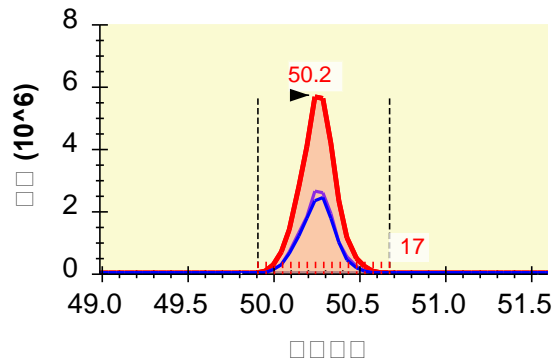
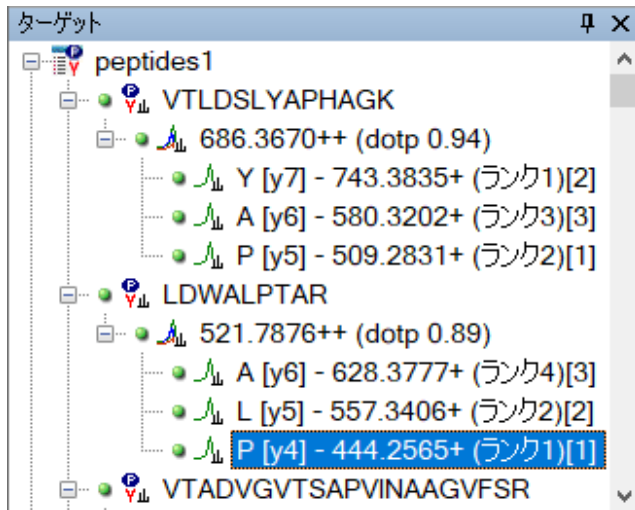
- ペプチド VTLDLSLYAPHAGK を選択します。
- プリカーサー m/z 686.3670 の左にある + をクリックしてプリカーサーを展開します。
- ライブラリ内の MS/MS スペクトルと SRM 測定の結果が一致していて、かつ強度が高い 3 つのプロダクトイオン以外をすべて対象とします。

- 削除するイオンを選択し、**Delete** キーを押します。

2 つ目のペプチド LDWALPTAR では、ライブラリ内の MS/MS スペクトルにおける rank 4 のピークは rank 3 とほぼ同一の結果です。トップ 3 の SRM ピーク [1]、[2]、[3]を維持してください。

- プリカーサー LDWALPTAR を選択します。
- プリカーサー m/z 521.7876 の左にある+をクリックしてプリカーサーを展開します。
- 削除するプロダクトイオンをもう一度選択し、**Delete** キーを押します。

組み込むトランジションは以下のように考えられるはずです。



3 つ目のペプチドとそのトランジションを見てみると、y3 イオンが SRM 測定結果の中で 3 番目に大きいピーク領域を持つことがわかります。しかし 4 番目にランク付けされた y13 イオンもターゲットとして用いるのに十分なピーク領域を持ちます。強度が高い 4 つのピーク以外をすべて消去して、**Shift+F11** を押してズームアウトすると、y3 イオン・y13 イオンの測定はどちらもノイズなどによる影響が少ないことが見て取れます。一般的にトランジションを組む際プロダクトイオンの強度が同じであるなら、できるだけ長い配列を持つイオンを選択しメソッドを構築する方が、より高い選択性を持つ測定が行えます。そのため、今回は y13 イオンをプロダクトイオンとして選択し、トランジションを組むほうがよいでしょう。以上からこのチュートリアルでは、y14、y13、および y11 イオンをプロダクトイオンとして選択します。

- y14、y13、y11 以外のすべてのトランジションを選択し (**Ctrl** を押しながらクリック)、**Delete** キーで削除します。

同様の方法を続けて、次の 2 つのペプチドを消去します。さらに、その次のペプチドに対して、高強度、低ノイズで、高い選択性のトランジションを選択します。または、**Skyline 最適化フォーム**を使用して多くの初期フィルタリングを一度に行うこともできます。

自動最適化

Skyline 最適化では、大半の調整操作を自動的に行うことが可能です。このチュートリアルでここまで手動で行ってきたタイプの調整は、以下を行ってシングル操作で実行可能です。

- [最適化]メニューで[詳細]をクリックします。
- [結果]タブをクリックします。
- [最大トランジションピークランク]フィールドに「3」と入力します。
- [大きいプロダクトイオンを選択する]チェックボックスをオンにします。
- [結果のないノードを削除]を選択します。
- [線形回帰の目標 R 値]フィールドに「0.95」と入力します。
- [最小ドット積]フィールドに「0.8」と入力します。
- [OK] ボタンをクリックします。

これにより 80 個のペプチド、240 個のトランジションが組みられます。以下の作業で自動最適化がうまくいっているかどうかを、クロマトグラム内で確認します。

- [編集]メニューで、[すべて折り畳む]を選択して[ペプチド]をクリックします。
- ホームキーを押します。
- 最後のペプチドに到達するまで下向き矢印キーを押します。

しかし、ここまでの操作ではペプチド選択に対する閾値の設定が少し厳しすぎるかもしれません。よって、最初の自動最適化での閾値を少し低く設定するために、初期自動最適化と手動での確認を組み合わせた半自動化の方法の手順を追加します。

- [編集]メニューで[元に戻す] (Ctrl+Z) をクリックします。
- [最適化]メニューで[詳細]をクリックします。
- [結果]タブをクリックします。
- [最大トランジションピークランク]フィールドに「6」と入力します。
- [結果のないノードを削除]を選択します。
- [線形回帰の目標 r 値]フィールドに「0.9」と入力します。
- [最小ドット積]フィールドに「0.712」と入力します。
- [OK] ボタンをクリックします。

この設定では測定対象として 127 個のペプチドが選択され、ピークの品質を示す指標となる dotp 値を計算するのに十分なトランジション数が組みられます。最終的な最適化は、[最適化]フォームがまだ不足している可能性があるということを考慮して手動で行うことができます。

効率的なデータ測定をスケジュールする

みなさんが編集中の Skyline ドキュメントは、2009 年春に MacCoss lab での実際の実験に使用されました。しかし当時は Skyline に [最適化] フォームはなく、dotp 値の計算もできませんでし

た。したがって、当時は手動で測定対象ペプチドを 86 個に削減し、メソッド最適化サイクルを次のフェーズに進めました。以下は、当時行ったのと同じ手順です。

- [編集]メニューで[元に戻す] (Ctrl+Z) をクリックします。
- [編集]メニューで、[結果を管理] (Ctrl+R) をクリックします。
- [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。

これで、すべての未最適化の結果およびクロマトグラムが削除されます。

- [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。
- [ディレクトリ内にある複数回注入された繰り返し測定を追加]を選択します。
- [OK]ボタンをクリックします。
- [フォルダの参照]フォームの[OK]ボタンをクリックしてデフォルトのドキュメントフォルダを承認します。
- 共通プリフィックス「Unscheduled0」を削除するか尋ねるフォームが現れますので、[削除しない]ボタンをクリックします。

これにより Skyline は、MethodRefine フォルダ内の 2 つのフォルダ (Unscheduled01 および Unscheduled02) から、スケジュール化されていない 2 種の測定結果ファイルを新たにインポートします。各フォルダには 2 つの RAW ファイルが含まれており、これらの RAW ファイルには、最初の最適化で選択されなかったすべての測定ペプチドに対して、3 つのスケジュール化されていないトランジションのクロマトグラムが記録されています。

現在のドキュメントには、これらの RAW ファイル内で検出されなかった多数のトランジションも含まれています。検出されたトランジションのみへドキュメントを削減するには、以下の手順を行います。

- [最適化]メニューで、[結果のないものを削除]をクリックします。

これにより、86 個のペプチドと 255 個のトランジションが残ります。

保持時間を測定する

これらのペプチドは 2 回よりも 4 回に分けてインジェクションして測定したほうがよいかもしれませんが。しかし、メソッド最適化の第 2 フェーズの目的は、スケジュール化に必要な予測保持時間を決定することです。したがって、1 サイクルの時間を長くし、時間軸におけるデータ点を少なくすることによって、必要な注入回数を削減することにしました。

以下の操作により、我々が測定に使用したものと同様のトランジションリストを作成可能です。

- [ファイル]メニューで[エクスポート]を選択し、[トランジションリスト]をクリックします。
- [試料インジェクションごとの最大トランジション数]に「130」と入力します。

[トランジションリストをエクスポート]は以下のように表示されます。

トランジションリストをエクスポート

装置タイプ(D):
Thermo

OK
キャンセル

シングルメソッド(S)
 タンパク質毎に1つのメソッド(O) m/zの順に並べる
 複数メソッド(M) タンパク質を無視(R)

試料インジェクションごとの最大トランジション数(X):
130

メソッド: 2 S-レンズ値を書き込む

最適化(Z):
なし

メソッドタイプ(T):
標準

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

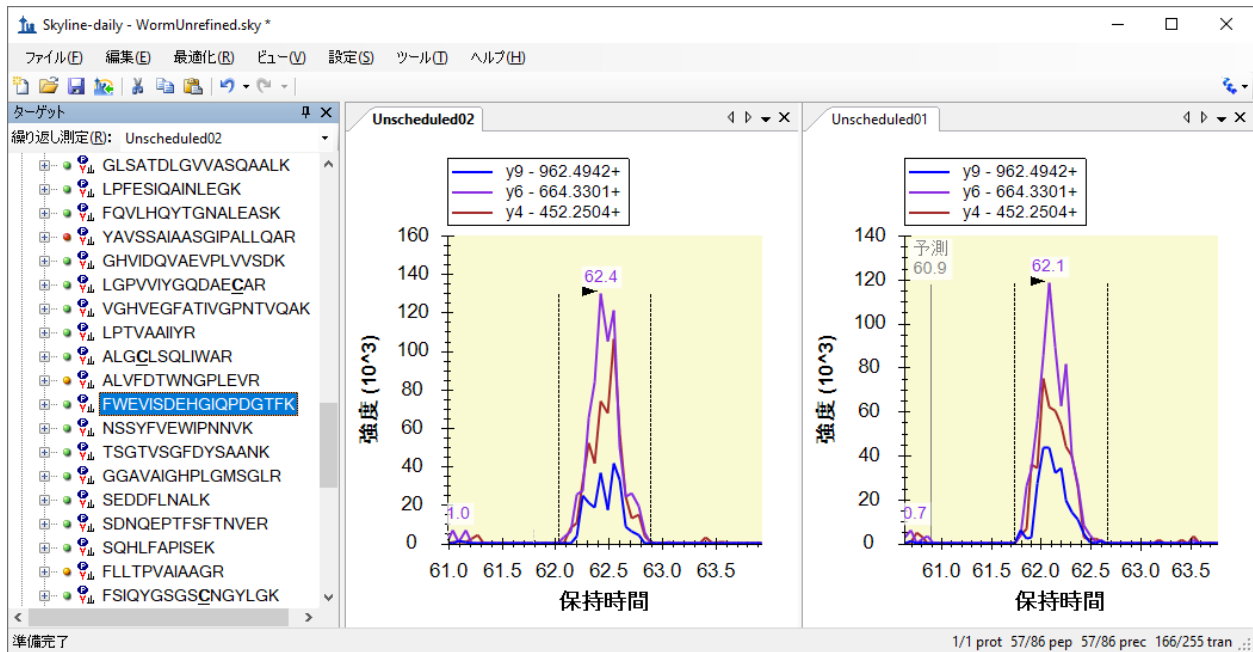
MethodRefine フォルダを調べてみると、2つのトランジションリスト CSV ファイル (Unscheduled_0001.csv および Unscheduled_0002.csv) が見つかります。これらは、先ほどインポートしたファイルのような、データを新規に収集するために利用可能です。

保持時間情報を再確認する

保持時間情報が得られたかを再確認するには以下を行います。

- [ライブラリー一致] チャートを閉じます (赤い x 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 [タイトル] (Ctrl+T) をクリックします。
- 下向き矢印キーを使用してペプチドを選択します。

2 回の繰り返し測定の方のクロマトグラムが、以下のように表示されます。

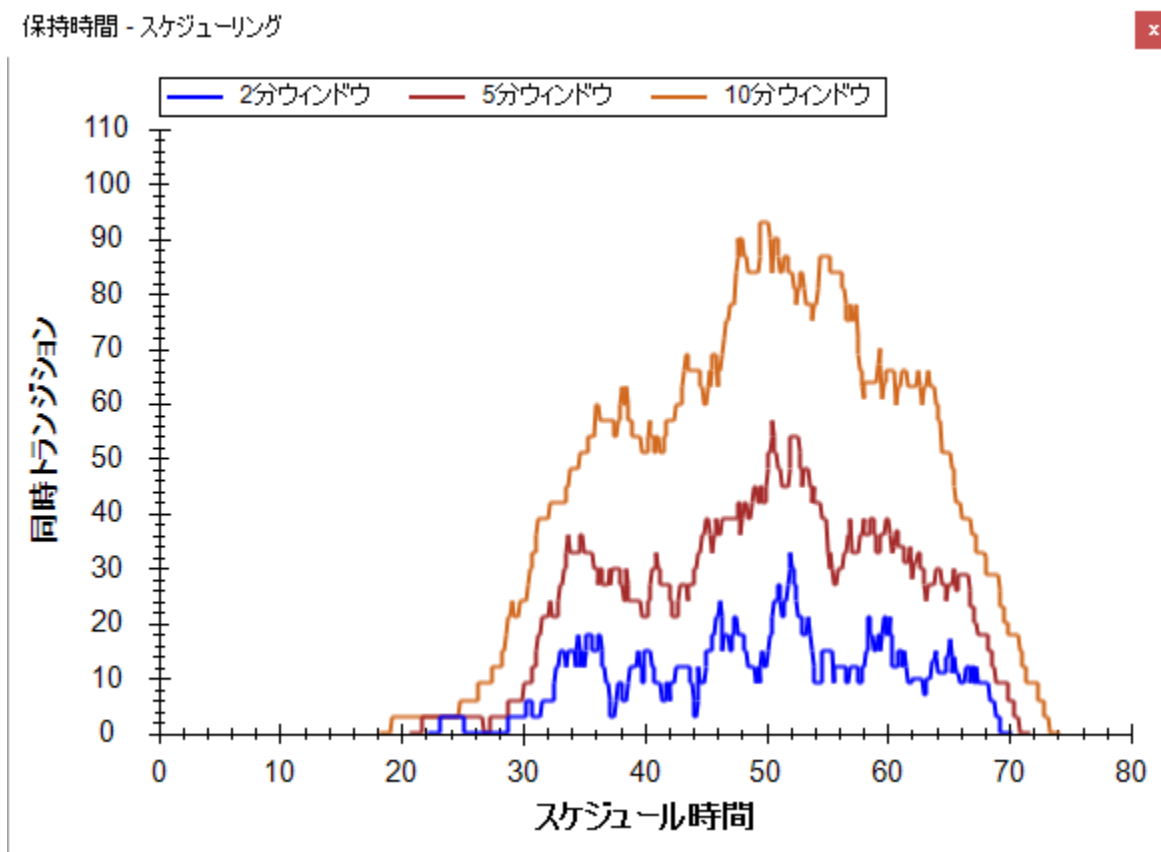


- Shift+F11 を押すと取得データの全範囲が表示されます。
- その後 F11 を押すと、最良ピークのズームに戻ります。

これらの予測された保持時間を前提として、以下を行うことで、トランジションをスケジュール化する方法の概要を理解することが可能です。

- [表示]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。

Skyline に以下のようなグラフが表示されます。



このグラフより、測定中のある時間（横軸）において同時に測定する必要のあるトランジション数（縦軸）が、トランジションの測定時間ごとによりわかります。1 トランジションの測定時間ウィンドウが長くなるほど、より多くのトランジションを同時に測定する必要が発生します。今回の場合は、各トランジションの測定時間ウィンドウを5分に設定すると、最大で約60のトランジションを同時に測定する必要があります。使用する装置のスピードに応じて1 トランジションあたりの測定時間を設定することにより、1回の測定で各ペプチドの全トランジションで溶出曲線を描くのに十分なデータを取得することができるでしょう。

スケジュール化されたトランジションリストを作成する

各トランジションの測定時間は、クロマトグラフィーの再現性を考慮して決定します。ペプチドの保持時間の変動に対して、短すぎる測定時間を設定すると、ピークの端が欠けてしまう、またはピークが検出できないといった可能性があります。スケジュール化されたトランジションリストを作成する前に、測定間における保持時間の変動幅を理解しておくことが大切です。

最大数のトランジションが同時測定される場合であっても、ペプチドの溶出曲線を描くのに十分なデータが得られるサイクル時間となるように測定時間を決定する必要があります。我々はこの実験で測定時間を4分とすることでこれを達成しました。同一のことは行うには、以下の手順を実行します。

- [保持時間]表示を閉じます。
- [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。
- [時間ウィンドウ]フィールドに「4」を入力します。

[ペプチド設定]は以下のように表示されます。

ペプチド設定

消化 予測 フィルタ ライブラリ 修飾 定量化

保持時間予測(R):
Wom Unrefined

保持時間の実測値があれば使用します(U)

時間ウィンドウ(W):
4 分

イオン移動度予測(I):
なし

スペクトルライブラリのイオン移動度の値が存在する場合には使用する(S)

分解能(P):
[]

線形ピーク幅(L)

OK キャンセル

- [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、[トランジションリスト]をクリックします。
- [シングルメソッド]を選択します。
- [メソッドタイプ]リストで「スケジュール」を選択します。

[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表示されます。

- [OK] ボタンをクリックします。
- 表示される [スケジュールデータ] フォームで [平均保持時間を使用] を選択します。
- [OK] ボタンをクリックします。
- [ファイル名] フィールドに「Scheduled」と入力します。
- [保存] ボタンをクリックします。

MethodRefine フォルダ内に、新たにスケジュール化された SRM トランジションリストファイル (Scheduled.csv) が作成されます。当該ファイルを Excel で開くと、4 分間の測定の開始・停止時間が D 列および E 列に追加されていることが確認できます。

	A	B	C	D	E	F	G
1	686.367	743.3835	26.7	40.97	4	1	VTLDSLYAPHAGK
2	686.367	580.3202	26.7	40.97	4	1	VTLDSLYAPHAGK
3	686.367	509.2831	26.7	40.97	4	1	VTLDSLYAPHAGK
4	521.7876	628.3777	21.1	56.36	4	1	LDWALPTAR
5	521.7876	557.3406	21.1	56.36	4	1	LDWALPTAR
6	521.7876	444.2565	21.1	56.36	4	1	LDWALPTAR
7	1016.047	1389.748	37.9	64.83	4	1	VTADVGVTAPVINAAGVFSR
8	1016.047	1130.632	37.9	64.83	4	1	VTADVGVTAPVINAAGVFSR
9	618.8146	909.4676	24.4	31.24	4	1	VGGNGADYALATK
10	618.8146	781.409	24.4	31.24	4	1	VGGNGADYALATK
11	618.8146	319.1976	24.4	31.24	4	1	VGGNGADYALATK

複数繰り返し測定結果を確認する

ここまでの操作でSRMメソッド最適化サイクルを開始する準備が完了しました。我々はペプチドのターゲットモードでの測定で生じる以下のような問題を明らかにするため、次の実験において複数の繰り返し測定を行いました。

- ピーク領域の変動
- 保持時間の変動
- 潜在的な干渉

このメソッドを用いた5回の繰り返し測定の結果を確認するには、以下の手順を実行します。

- [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。

これにより、スケジュール化されていない繰り返し測定およびクロマトグラムグラフが削除されるはずですが。

- [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。
- [ファイル内の1回注入された繰り返し測定を追加] (デフォルト) を選択します。
- [OK] ボタンをクリックします。
- ファイル「Scheduled_REP01.RAW」をクリックします。
- 「Scheduled_REP05.RAW」ファイルをシフト・クリックして、5つのファイルを選択します。
- [開く] ボタンをクリックします。
- 共通プリフィックスを削除するか尋ねるフォームの中で、[共通プリフィックス]フィールドに「Scheduled_」が含まれるよう編集します。
- [OK] ボタンをクリックします。

5回の繰り返し測定ごとにタブが作成され、データのインポートが開始されます。Skyline ウィンドウ下部のステータスバーとグラフで進行状況が表示されます。

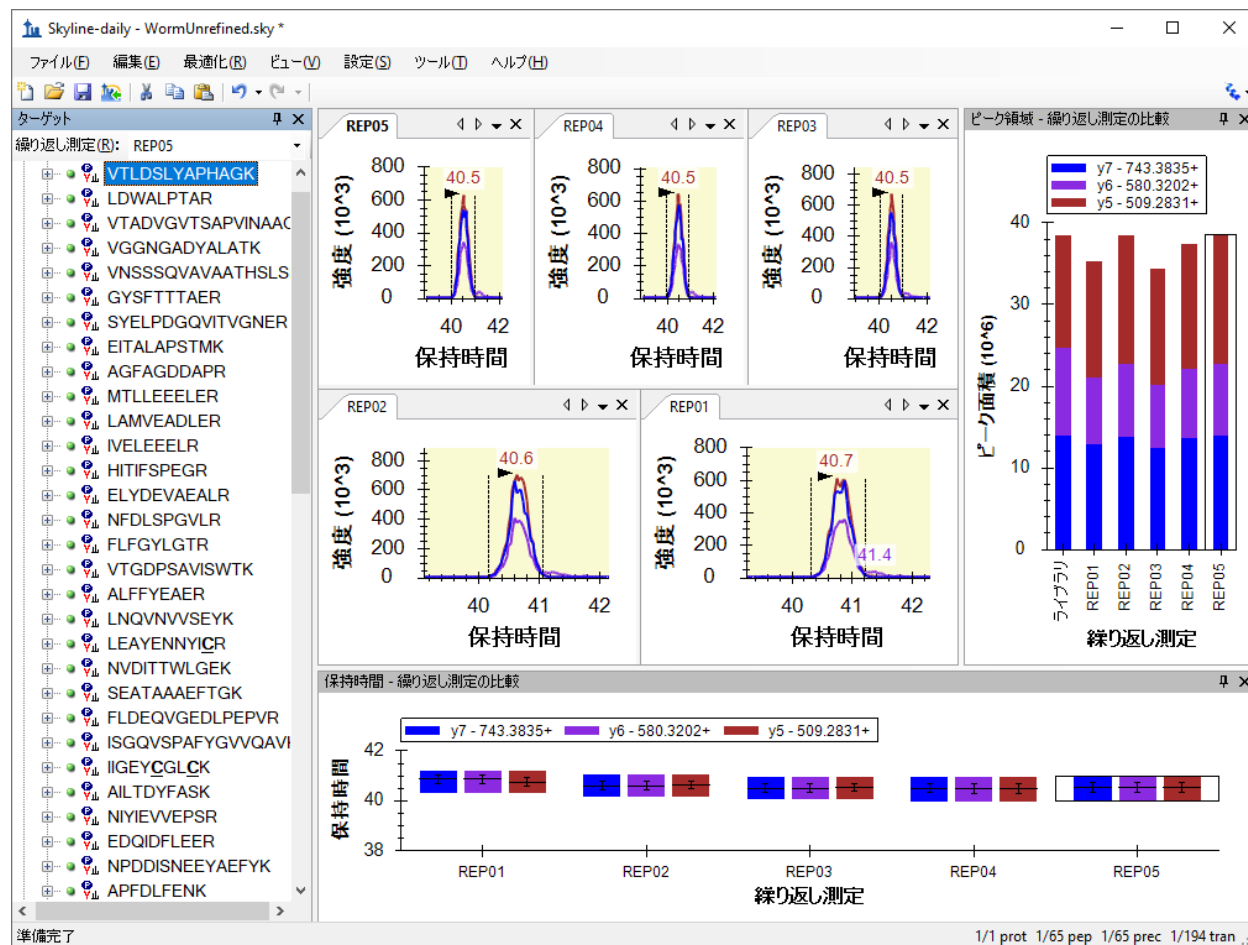
インポートが完了すると、スケジュール化していない分析ランで測定した一部のペプチドが、スケジュール化した分析ランでは削除されたことがわかります。これは色のついたドットがないためです。以下の手順に従い、測定されたペプチドのみを残してドキュメントを縮小することができます。

- [最適化]メニューで、[結果のないものを削除]をクリックします。

これらのデータを確認するには、以下を行います。

- [表示]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。
- [表示]メニューで、[保持時間]を選択して[繰り返し測定比較](F8)をクリックします。
- 表示されたウィンドウをクリックしてドラッグし、Skyline ウィンドウ下部端にある矢印の上にカーソルを置き、リリースします。
- [表示]メニューで、[ピーク領域]を選択して[繰り返し測定比較](F7)をクリックします。
- 表示されたウィンドウをクリックしてドラッグし、Skyline ウィンドウの右端にある矢印の上にカーソルを置き、リリースします。
- クロマトグラムグラフの1つを右クリックし、[凡例]をクリックします。

Skyline ウィンドウが以下のように見えるまで、スプリッターおよびウィンドウサイズを調整します。



ここで下向き矢印キーを使用すると、これらのペプチドについて収集したデータを確認することが可能です。複数の繰り返し測定により最適化した SRM メソッドの詳細については、その他のチュートリアルで説明いたします。

まとめ

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を作成し、繰り返し測定を伴う定量研究用にそれらを最適化する Skyline の強力なツールについて紹介しました。本チュートリアルで、2 サイクル以上のメソッド最適化サイクルを行ったみなさんは、Skyline を自身のプロテオミクス研究を展開するのに役立つことができるはずです。今回行ったこと以外に、衝突エネルギー (CE) といった装置パラメータの最適化、定量精度改善のための標識付き内部標準ペプチドの導入、または校正曲線の実行なども Skyline を用いて行うことができます。その他の Skyline チュートリアル・Skyline 機能も利用して、ターゲットプロテオミクス実験に Skyline を最大限活用してください。

参考文献

1. Prakash,A. *et al.* Expediting the development of targeted SRM assays: Using data from shotgun proteomics to automate method development. *J Proteome.Res.* 2009.
Ref Type: In Press
2. Sherwood,C.A. *et al.* Correlation between γ -type ions observed in ion trap and triple quadrupole mass spectrometers. *J. Proteome. Res.* **8**, 4243-4251 (2009).
3. Krokhin,O.V. Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-Å pore size C18 sorbents. *Anal. Chem.* **78**, 7785-7795 (2006).
4. Stein,S.E. & Scott,D.R. Optimization and Testing of Mass-Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification. *JASMS* **5**, 859-866 (1994).
5. Tabb,D.L., MacCoss,M.J., Wu,C.C., Anderson,S.D., & Yates,J.R., III Similarity among tandem mass spectra from proteomic experiments: detection, significance, and utility. *Anal. Chem.* **75**, 2470-2477 (2003).