

Skyline での低分子化合物（代謝物）メソッド作成と CE(Collision Energy)の最適化

Skyline のターゲット分析(SRM)のデータ解析では、質量分析装置で得られた raw データをドキュメントにインポートすることで情報を視覚的に表示することが可能です。Skyline はもともとプロテオミクス解析ソフトとして開発されてきましたが、最近では代謝物などの低分子化合物のデータ解析にも対応できるように拡張されています。本チュートリアルでは、低分子化合物の定量データ解析に Skyline を使用する方法を説明します。

このチュートリアルでは、Waters の Xevo TQ-S triple quad (LC-MS/MS) で測定したエネルギー代謝産物のデータ解析メソッドの作成について説明します。データセットの分析では、以下の項目について学びます。

- まず Waters の Xevo TQ-S triple quad でのターゲット定量分析 (SRM) のデータ解析 Workflows
- 次にすでに公開されているターゲット低分子化合物のトランジションリストで上記とは異なる装置メーカーで LC-MS/MS でデータ取得されている場合のデータ解析方法
- 上記の公開されているトランジションリストに記載されている CE (衝突エネルギー) の値を使い **Unscheduled** (スケジュール化されていない) Skyline メソッドを作成
- **Unscheduled** (スケジュール化されていない) メソッドをもとにした保持時間での **Scheduled** (スケジュール化された) メソッドの作成
- さらにそこから **Scheduled** (スケジュール化された) メソッドでの最適化された CE (Collision energy) 値のインポート

このチュートリアルのベースとなっている [Skyline チュートリアルウェビナー16](#) の後半も併せてご覧ください。

Skyline は質量分析装置によるターゲット定量分析 (SRM) のプラットフォームの提供をしています。質量分析装置は複数の装置メーカー (Agilent、SCIEX、Bruker、Shimadzu、Thermo-Scientific、Waters など) がありますが、Skyline ではこれら複数の分析装置メーカーの raw データをインポートすることが可能です。さまざまな装置で取得したデータがインポート可能なので、プロテオミクス、メタボロミクスなどターゲット分子に依存せずかつ装置間のデータ比較および複数施設間での共同研究も容易となりました。

まだ「[Skyline 小分子ターゲット](#)」チュートリアルをご覧になっていない方は、Skyline で化学式や付加 (Na Adduct など) がどう表示されるかご覧ください。

はじめに

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/SmallMol+leculMethodDevAndCEOptimization.zip>

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\bspratt\Documents

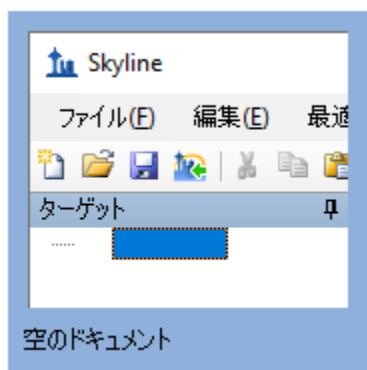
新しいフォルダが内部に作成されます。

C:\Users\bspratt\Documents\SmallMolMethodCE

フォルダにはチュートリアルに必要なファイルがすべて含まれています。

すでに Skyline を使用しているユーザーは、まず 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方法は以下の通りです。

- Skyline を起動します。
- **開始ページの空のドキュメント**をクリックします。

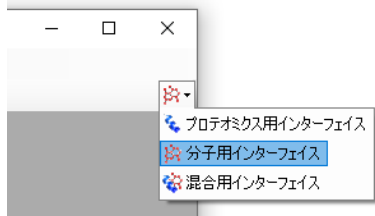



- [設定]メニューの[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかで[いいえ]を選択します。

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。

このチュートリアルは低分子化合物に関するもので分子用インターフェイスが選択できます。

- 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、[分子用インターフェイス]を選択します。



Skyline ウィンドウの右上隅の分子アイコン  で表示される分子モードでの動作に切り替わり、プロテオミクスメニューやコントロールが表示されなくなります。

低分子化合物のトランジションリストのインポート

本チュートリアルは Raw データは UPLC-MS/MS (Waters の Acquity UPLC- Xevo TQ-S) でデータ取得されたものですが、トランジションリストは Agilent の質量分析装置 (Agilent 1290 Infinity II UHPLC - 6495 triple quadrupole mass spectrometer) と HILIC カラムで測定した過去文献に基づいています (Guder et al. [Anal Chem. 2017 Feb 7;89\(3\):1624-1631](#)) 。

公開されているトランジションリストは以下の通りです。

Functional Category	Metabolite	KEGG id	Q1 -12C	Q3-12C	Q1-13C	Q3-13C	CE	Mode
Central Metabolism	a-Ketoglutaric acid	C00026	145	101	150	105	5	Negative
Central Metabolism	Phosphoenolpyruvate	C00074	167	79	170	79	29	Negative
Central Metabolism	Dihydroxyacetone-P	C00111	169	79	172	79	29	Negative
Central Metabolism	Pentose-P	C00199	229	79	234	79	45	Negative
Central Metabolism	Hexose-P	C01094	259	79	265	79	53	Negative
Central Metabolism	Seduheptulose 7-P	C05382	289	97	296	97	17	Negative
Central Metabolism	Fructose-1,6-Bisphosphate	C00354	339	241	345	247	16	Negative
Central Metabolism	UDP-N-acetyl-D-Glucosamine	C00043	606	385	623	394	29	Negative
Central Metabolism	Acetyl-CoA	C00024	808	408	831	418	37	Negative
Cofactor metabolism	NAD	C00003	662	540	683	555	20	Negative
Cofactor metabolism	NADP	C00006	742	620	763	635	20	Negative
Nucleotide metabolism	Orotate	C00295	155	111	160	115	9	Negative
Nucleotide metabolism	Dihydroorotate	C00337	157	113	162	117	5	Negative
Nucleotide metabolism	UDP	C00015	403	79	412	79	69	Negative
Amino acid metabolism	GABA	C00334	104	69	108	73	37	Positive
Amino acid metabolism	Phenylpyruvic acid	C00166	165	95	174	101	13	Positive
Amino acid metabolism	Diaminopimelic acid	C00666	191	128	198	134	13	Positive
Central Metabolism	D-Alanyl-Alanine	C00993	161	44	167	46	13	Positive
Cofactor metabolism	D-Pantothenic acid	C00864	220	90	229	93	13	Positive
Cofactor metabolism	Oxidized glutathione	C00127	613	355	633	365	25	Positive
Nucleotide metabolism	Hypoxanthine	C00262	137	55	142	57	37	Positive
Nucleotide metabolism	Guanine	C00242	152	110	157	114	21	Positive
Nucleotide metabolism	UMP	C00105	325	97	334	102	17	Positive
Nucleotide metabolism	cAMP	C00575	330	136	340	141	29	Positive
Nucleotide metabolism	AMP	C00020	348	136	358	141	21	Positive
Nucleotide metabolism	ADP	C00008	428	136	438	141	37	Positive
Nucleotide metabolism	UTP	C00075	485	97	494	102	21	Positive
Nucleotide metabolism	ATP	C00002	508	136	518	141	37	Positive

各分子のライト (12C) およびヘビー (13C: 安定同位体標識) プリカーサーやフラグメントの m/z 、電荷に関する情報がすべて記載されています。ここではネガティブモードのエントリのみを使って作業します。CE (Collision energy) 値は過去文献に記載されている (Agilent 6495

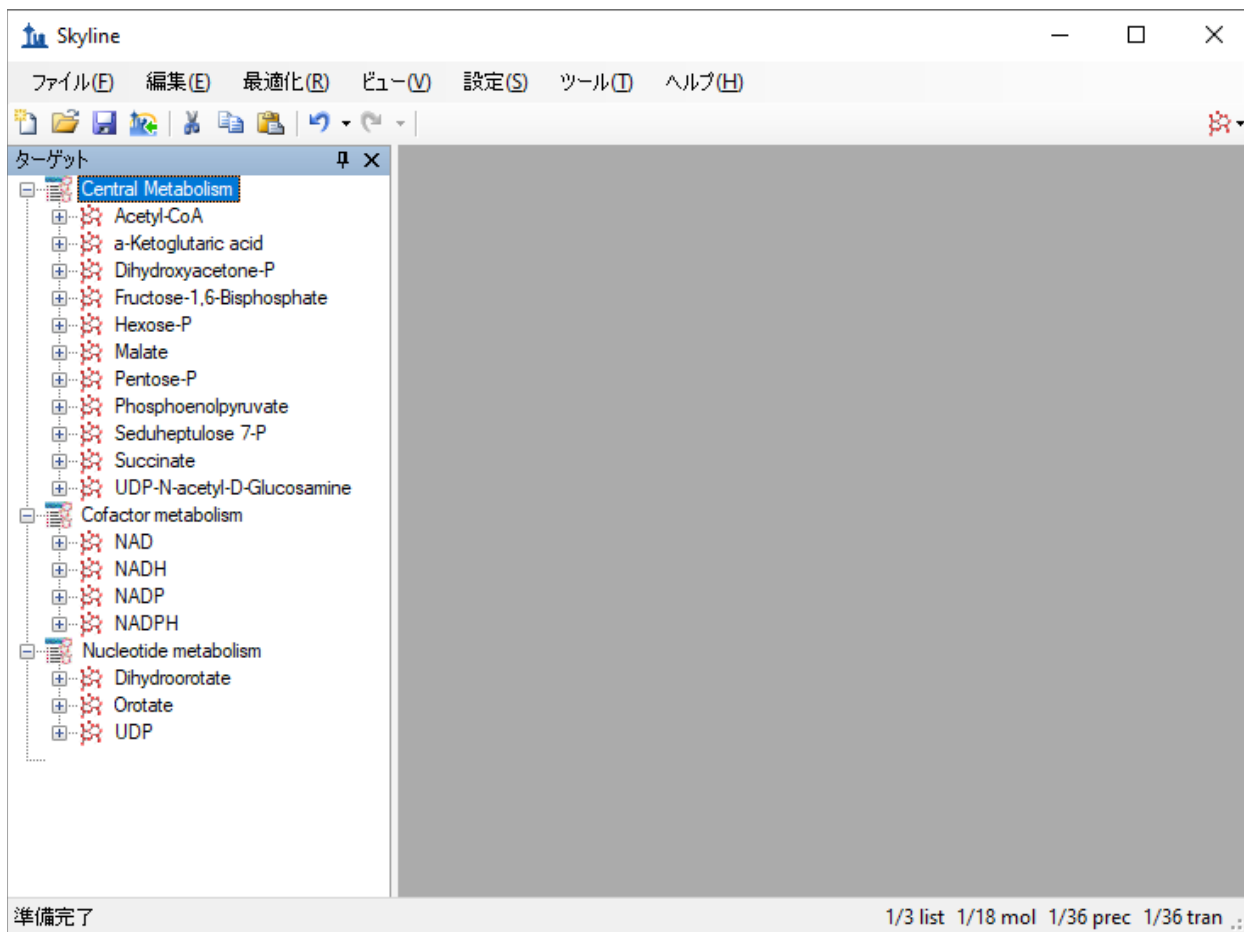
triple quadrupole mass spectrometer) のものです。異なる装置 (Waters Xevo TQ-S など) で新しいメソッドを作成する場合も同様に行います。

Excel や他のスプレッドシートエディターを使用すれば、Skyline で読み込める上記のような表にフォーマット化ができます。たとえば、各トランジションのヘビーとライトの段 (列) は、メーカーが異なる装置のトランジションリストでは列が別の位置になることもあります。本チュートリアル開始時に作成したフォルダの中にある「Energy_TransitionList.csv」ファイルはすでにフォーマット化したファイルとなります。

「Energy_TransitionList.csv」ファイルは Skyline が認識する列ヘッダーにフォーマット化されています。[トランジションリストの挿入] フォームで (メニューオプションから [編集]> [挿入]> [トランジションリスト]) ヘッダー行を含むすべてを Skyline の [ターゲット] ビューに貼り付けるだけです。以下に手順を記載します。

- 本チュートリアル開始時に作成したフォルダから「Energy_TransitionList.csv」を Excel もしくはその他テキストエディタで開きます。
- **[すべてを選択]** (Ctrl+A) し、**[コピー]** (Ctrl+C) します。ヘッダー行を含むのを忘れないようにします。
- Skyline の **[編集]** メニューから **[貼り付け]** (Ctrl+V) をクリックします。

Skyline ウィンドウは以下ようになります。

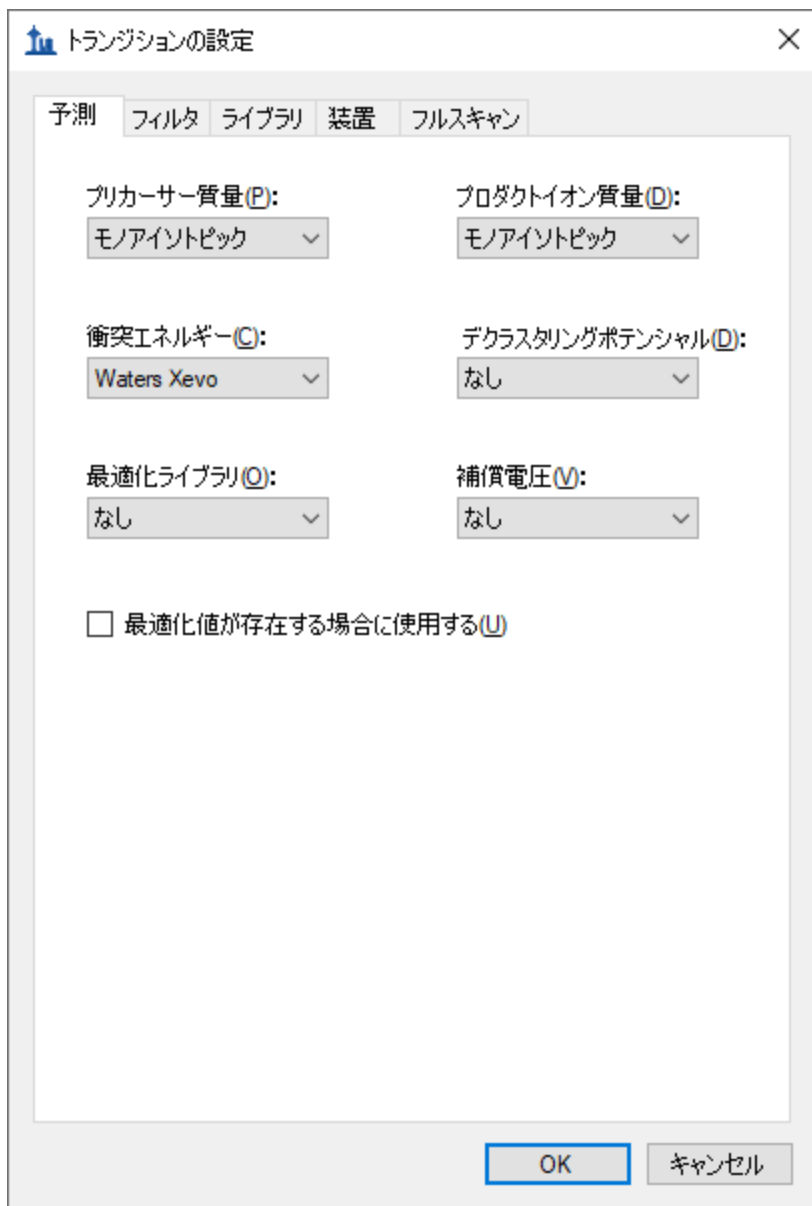


注：本チュートリアルではこのターゲットの m/z と電荷値を記載していますが、化学式や同位体標識などより詳細な情報も記録できます。フルスキャンや高分解能 MS で取得したデータを解析する場合は化学式があると同位体分布も計算でき、有用です。今回は四重極を用いた SRM データなので、 m/z と電荷のみで十分です。

トランジション設定

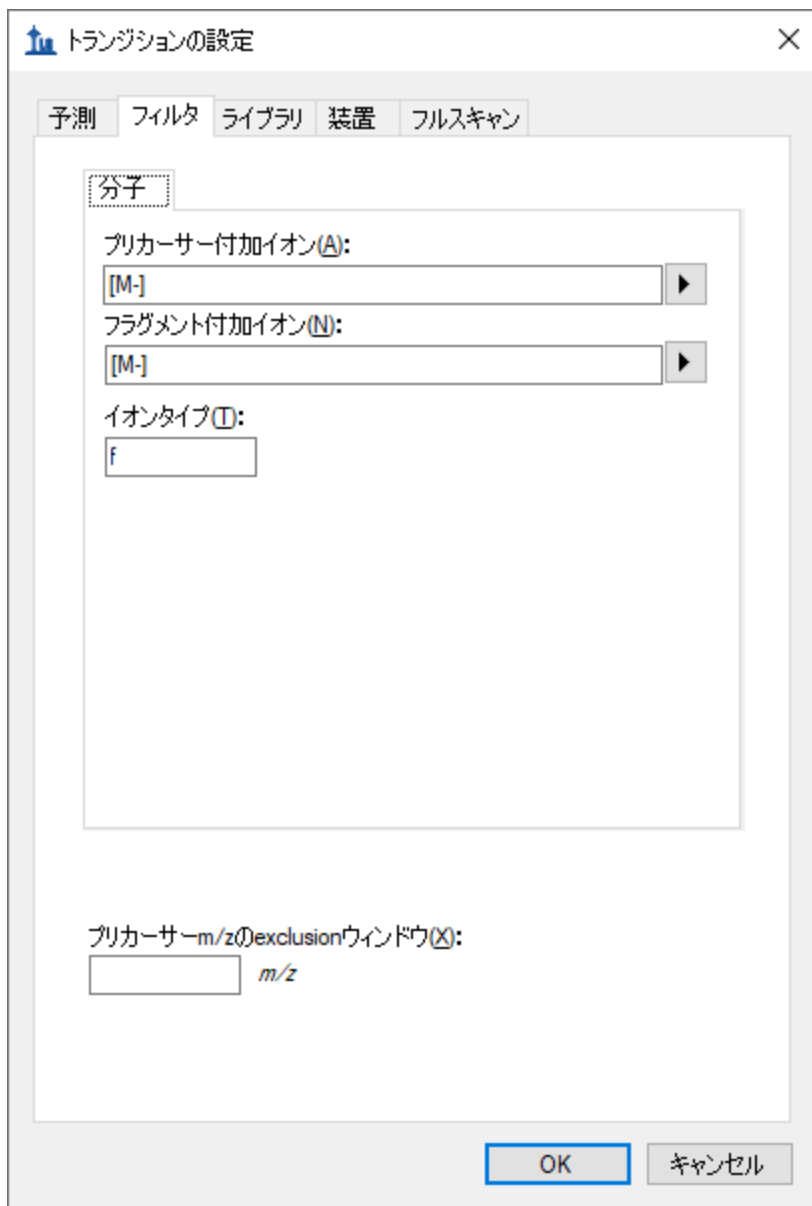
以下の手順でトランジション設定を更新し、装置メソッドと本チュートリアルで用いる測定データを合わせます。インポート元の CE データと Raw データがそれぞれ異なる装置を用いて行うためこの作業は重要です。

- [設定]メニューで[トランジション設定]をクリックします。
- [予測]タブの[衝突エネルギー]ドロップダウンリストで、「Waters Xevo」を選択します。



衝突エネルギーの値は Agilent の装置由来ですが、Raw データは Waters Xevo なので衝突エネルギー最適化をこのように実施します。

- [フィルタ] タブをクリックします。
- ネガティブモードでの解析なので[プリカーサー付加イオン]および[フラグメント付加イオン]フィールドで「[M-]」に変更します。



この実験ではトランジション設定で指定したように、負の電荷をもつトランジションのみのネガティブモードでの測定となります。Skylineでの付加物の説明は通常よく

目にする「[M-H]」、「[M+Na]」だけでなく、未知のイオンにも対応が可能です（ここで選択した「[M-]」は電荷1の負のイオンモードということで既知の化学組成を反映していません）。今回はフラグメントイオンのトランジションのみ測定するため[イオンタイプ]フィールドは「f」にします。プリカーサーイオンも同時に測定したい場合は「f,p」とします。

- [OK] ボタンをクリックします。

残りの3つのタブについてですが、[ライブラリ]および[フルスキャン]は今回は関係ないので適用外、[装置]についてはデフォルトでの対応が可能のため設定変更は不要となります。

以下のようにして Skyline ドキュメントを保存します。

- [ファイル]メニューで[保存]をクリックします (Ctrl+S)。
- 作成した SmallMolMethodCE フォルダへ移動します。
- [ファイル名]に「EnergyMet」と入力します。
- [保存]ボタンをクリックします。

Unscheduled (スケジュール化されていない) メソッドのエクスポート

測定に用いる質量分析装置制御ソフトウェアがインストールされたコンピュータで Skyline を使う場合、指定するテンプレートメソッドファイルを装置のメソッドへエクスポートもできます。一部の Thermo 装置では装置制御コンピュータでの実行が必須となります。

Raw データが今回は Waters の装置であるため、Waters MassLynx がインストールされていない場合には、「トランジションリストのエクスポート」のセクションに進んでください。

インストールがすでに完了している場合は以下のように測定時間が 2 分と 5 分の 2 つのメソッドをエクスポートします。

- [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、「Waters Xevo TQ」を選択します。
- [実行時間]に「2」を入力します。
- [参照]ボタンをクリックし、チュートリアルフォルダにある VerifyETemplate.exp を選択します。

[メソッドをエクスポート]は以下ようになります。

- [OK] ボタンをクリックします。
- メソッドを「EnergyMet_2minutes」の名前で保存します。
- 次に上記の手順を繰り返し、今度は実行時間を5に変更し「EnergyMet_5minutes」の名前で保存します。

Unscheduled (スケジュール化されていない) トランジションリストのエクスポート

お使いのコンピュータで装置メソッドファイルの形式に合う形でのエクスポートができない場合でも（対応する装置メーカーのソフトがインストールされていないなど）、まずエクスポートを行い後でメーカーソフトウェアを使用して装置メソッドでインポートするという方法をとれば装置固有のトランジションリストの形となり使用可能となります。トランジションリストのエクスポートは、Unscheduled（スケジュール化されていない）メソッドをエクスポートする手順はテンプレートファイルがない点を除き Scheduled のメソッドのエクスポートと基本的に同じとなります。

- [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。
- [装置タイプ]ドロップダウンリストでは、先ほど[トランジション設定]-[予測]タブで設定した[衝突エネルギー]値に基づいて Skyline が自動的に「Waters」を選択します。
- [実行時間]フィールドに「2」を入力します。

[メソッドをエクスポート]フォームは以下ようになります。

- [OK] ボタンをクリックします。
- トランジションリストを「EnergyMet_2minutes.csv」の名前で保存します。
- 上記の手順を繰り返し、今度は実行時間を 5 に変更して「EnergyMet_5minutes.csv」と言う名前で保存します。

測定結果ファイルのインポート

この時点では、2分および5分のグラジエントのデータを収集します。この実験で使用した試料は市販のキットで抽出した大腸菌 *E. coli* (Cambridge Isotope Laboratories の有資格 *E. coli* 溶解物) の代謝産物で炭素が安定同位体標識がされたもの (^{13}C) とされていないもの (^{12}C) が 1:1 の割合で混合されたものとなります。

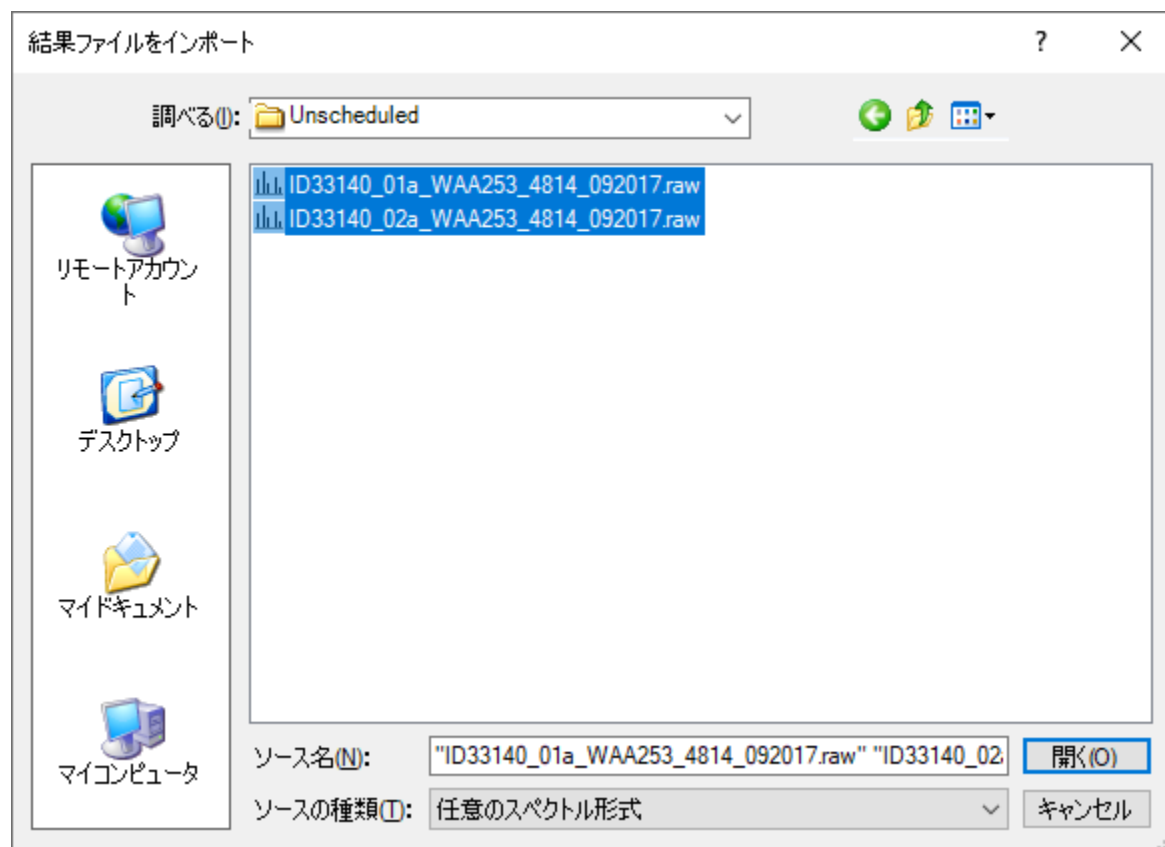
この 2 回の異なるグラジエントで測定された結果は、本チュートリアルを開始時に作成したフォルダ内の「Unscheduled」のサブフォルダにあります。「01a」の表示を含むファイルは 2 分

グラジエントの結果で、「02a」の表示を含むファイルは5分グラジエントでの結果を意味します。これらの結果から実験でどのグラジエントが最も効果的かを調べます。

以下の手順の実施で作成したファイルをドキュメントへインポートします。

- [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]フォームでは、デフォルトの[ファイルにシングルインジェクション繰り返し測定を追加]オプションが使用できます。[同時にインポートするファイル]ドロップダウンリストで、両方のファイルを同時にインポートするため「多く」が選択されていることを確認します。
- [OK]ボタンをクリックします。
- 「Unscheduled」サブフォルダに移動し、両方のファイルを選択します。

[結果ファイルをインポート]フォームは以下のようになります。



- [開く]ボタンをクリックします。

これらのファイル名で共通のプリフィックス (ID33140_0) とサフィックス (a_WAA253_4814_092017) があるので以下のフォームが表示されます (ファイル名の短縮を提案されます)。

結果をインポート ×

選択したファイルには共通のプリフィックスとサフィックスがあります。プリフィックスまたはサフィックスの一部または全部を削除して、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):
ID33140_0

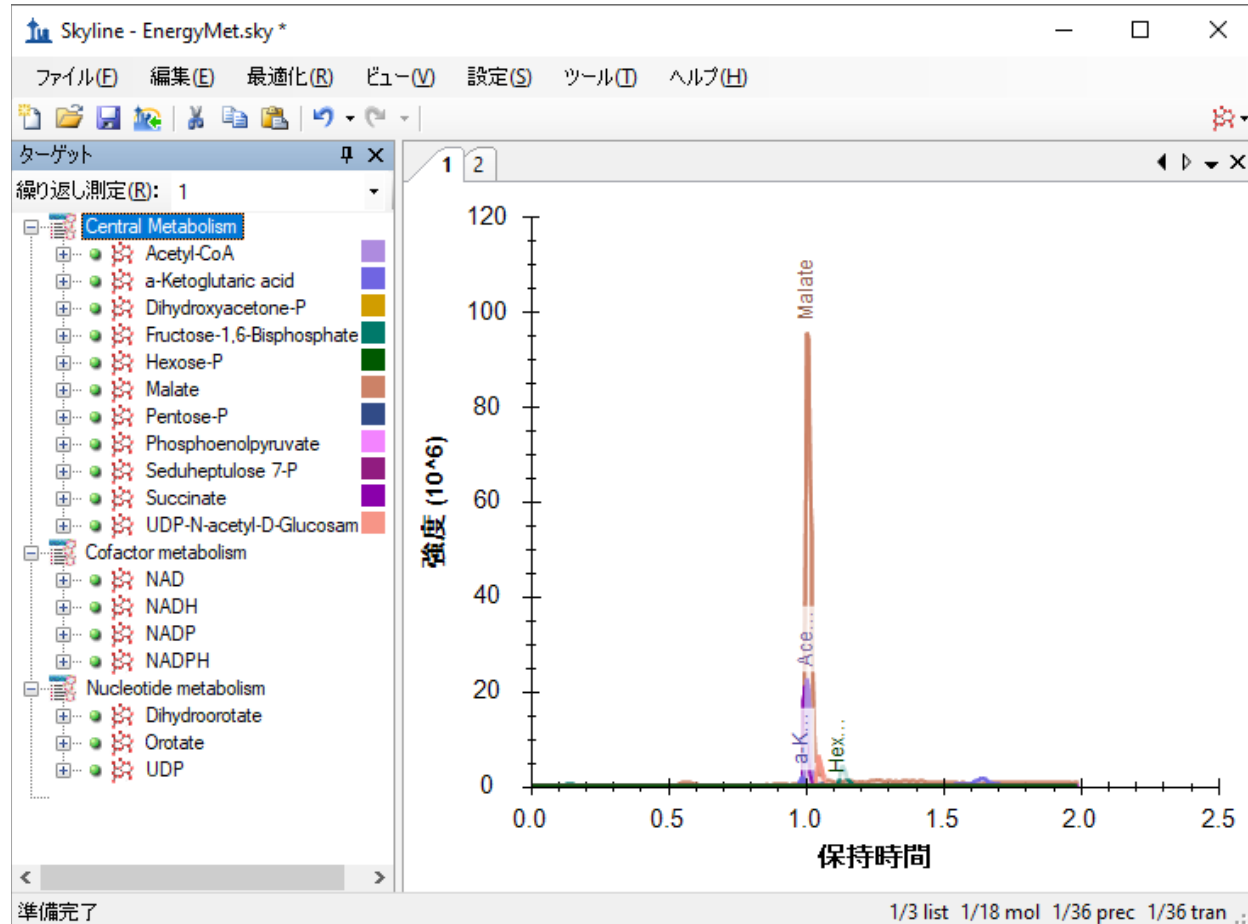
共通サフィックス(S):
a_WAA253_4814_092017

繰り返し測定名(N):
1
2

OK キャンセル

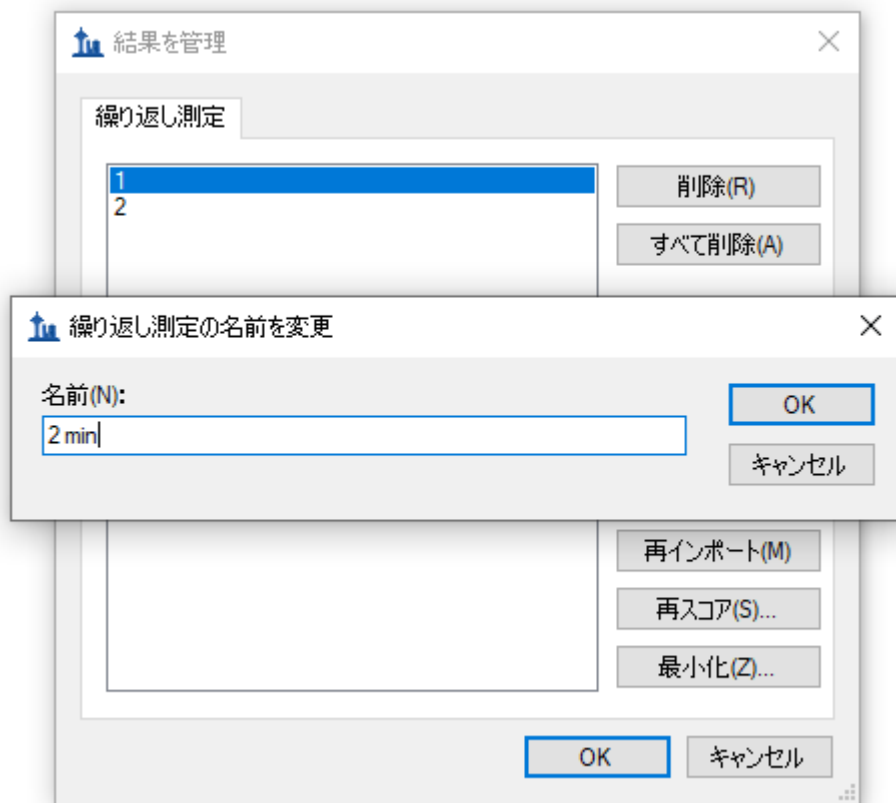
- [OK] ボタンをクリックして、短くなった繰り返し測定名「1」と「2」を承認します。

当該ファイルは素早くインポートされ、Skyline メインウィンドウは以下のようにになります。



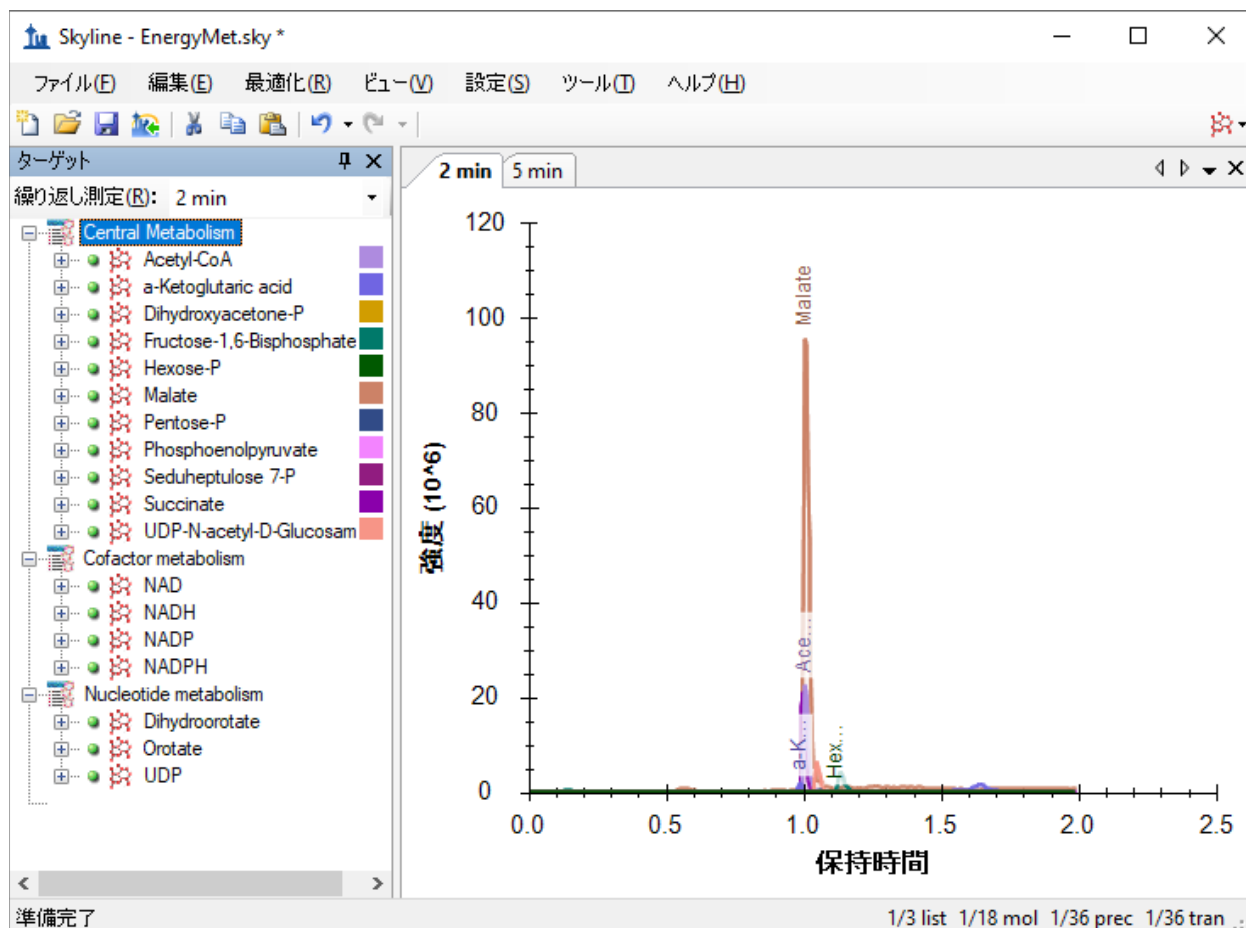
繰り返し測定名「1」と「2」はただの番号にすぎないため、以下のようにしてグラジエント情報を含む名前に変えることができます。

- [編集]メニューで、[結果を管理]を選択します。
- 最初の繰り返し測定「1」をダブルクリックします（または選択して[名前を変更]ボタンをクリックします）。
- [繰り返し測定の名前を変更]フォームの[名前]フィールドに、「2 min」と入力します。



- [OK] ボタンをクリックします。
- 上記の手順を繰り返し、繰り返し測定名「2」を「5 min」に変更します。
- [結果を管理] フォームの [OK] ボタンをクリックします。

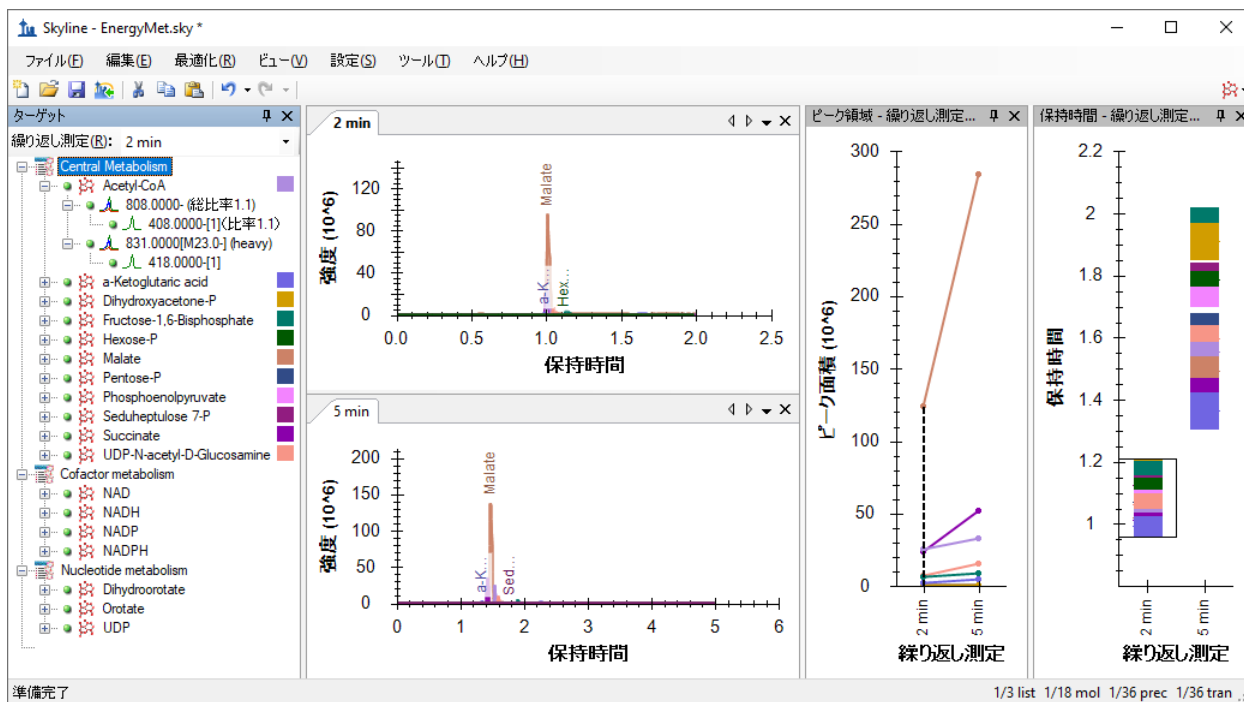
これでメイン Skyline ウィンドウは以下ようになります。



概要グラフで複数の繰り返し測定の統計結果を 1 画面表示するには以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで、[ピーク面積]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします (F7)。
- [ビュー]メニューで、[保持時間]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします (F8)。
- 繰り返し測定の比較グラフのタイトルバーをクリックし、メイン Skyline ウィンドウの右端にドラッグします。
- [ビュー]メニューで、[グラフを配置]を選択して[タイル]をクリックします (Ctrl+T)。

Skyline ウィンドウは以下のように繰り返し測定間の比較が可能となります。



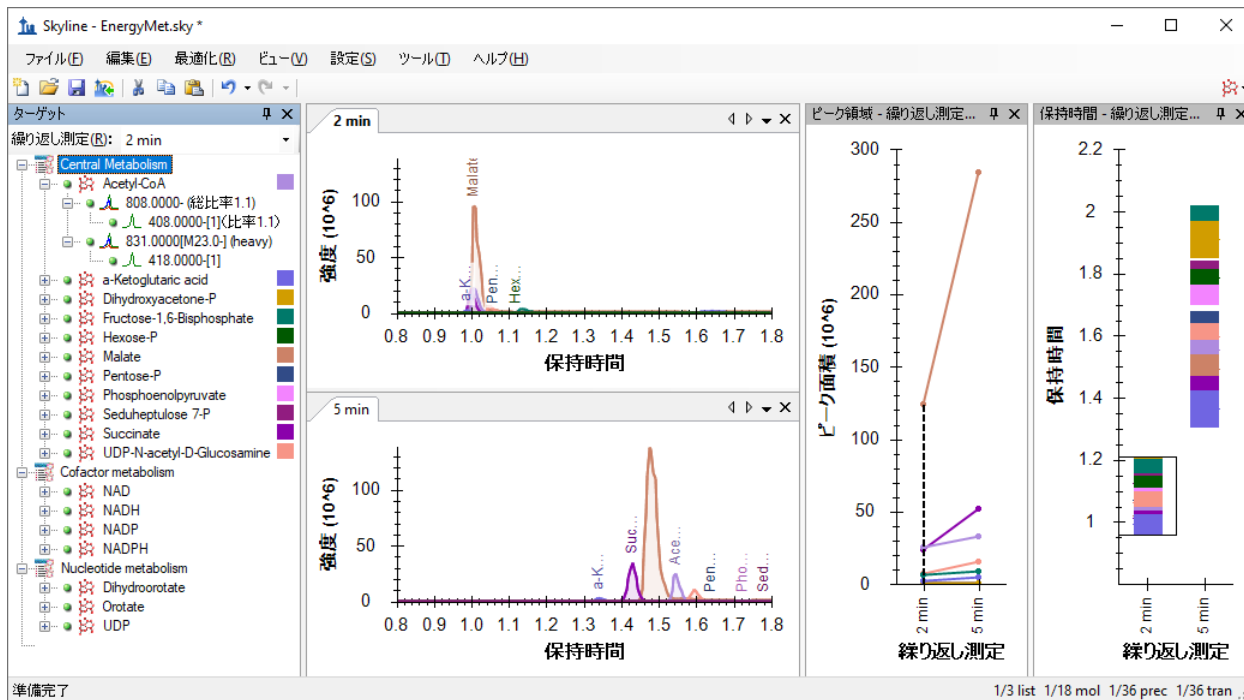
感度（ピーク面積）とクロマト分解能の比較

[ピーク領域-繰り返し測定]ビューを見ると、5分のグラジエントは2分のグラジエントよりも感度が高い（強度: ピーク面積）ことが分かります。これが測定間のバラツキでないことは測定の繰り返しで確認できます。この場合、5分のメソッドは多くのアナライト（代謝物）でピーク強度が高いように見えます。これはアナライトの分離向上と、イオンサプレッション（ion suppression）（「マトリックス効果」とも呼ばれる）の低下が理由と推測されます。要するにピーク分離が5分のグラジエントでは良好なので夾雑物の存在による感度低下も避けられるということです。それゆえこの実験では5分のグラジエントがよりよいメソッドと判断できます。

クロマトグラフのピークをもっと詳しく調べることも有用です。

- 調べたいクロマトグラムグラフ上で右クリックして [拡大縮小幅の同期]（クロマトグラムの拡大縮小）のチェックボックスがオンになっていることを確認します。
- クロマトグラム内をクリックしてドラッグし、0.8 から 1.8 分の時間範囲に拡大します。

Skyline は下図のようになります。5分のグラジエントはピーク分離が良好でアナライト（代謝物）が重なっていないことが分かります。信号強度（ピーク面積値）の改善を考慮すればやはりより長いグラジエントでクロマト分離を良好にしておくことは理にかなっているということがわかります。



Scheduled (スケジュール化された) メソッドの作成

グラジエントを5分に決定したら、今度はスケジュール化されたメソッドまたはトランジションリストを作成します。本チュートリアルでは、Watersの装置制御ソフトウェアであるMassLynxがインストールされておらず、測定メソッドを1から構築するのではなくトランジションリストを作成する場合を想定しています。しかし、テンプレートメソッドファイルをもとにしてメソッドを作成（前述）するのも可能です。

まずトランジションリストにエクスポートされる保持時間ウィンドウの設定を行います。

- [設定]メニューで[分子設定]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します]がチェックされていることを確認します。
- [時間ウィンドウ]フィールド(分)に「1」を入力します。

[分子設定] フォームは以下ようになります。

分子設定

予測 ライブラリ 標識 定量化

保持時間予測(R):
なし

保持時間の実測値があれば使します(U)

時間ウインドウ(W):
1 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

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。

今度は以下のようにしてトランジションリストをエクスポートできます。

- [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。
- [装置タイプ] ドロップダウンリストで自動的に「Waters」が選択されます。
- [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なります。

トランジションリストをエクスポート

装置タイプ(U): Waters

OK

キャンセル

シングルメソッド(S)

分子リスト毎に1つのメソッド(Q) m/zの順に並べる

複数メソッド(M) 分子リストを無視(R)

最大同時トランジション数(X):

メソッド: 1

最適化(Z): なし

メソッドタイプ(T): スケジュール

- [OK] ボタンをクリックします。

スケジュールの時間設定が必要なので、どのグラジエントを使用するか設定します。ここでは前述の 5min のグラジエントを選択します。

- [単一データセットから値を使用] をクリックします。
- [繰り返し測定] ドロップダウンリストで、「5 min」を選択して5分のグラジエントをスケジュールします。

[スケジュールデータ] フォームは以下のようになります。

スケジュールデータ

平均保持時間を使用

単一データセットから値を使用

OK

キャンセル

繰り返し測定:

5 min

- [OK] ボタンをクリックします。

トランジションリストファイル名を入力します。

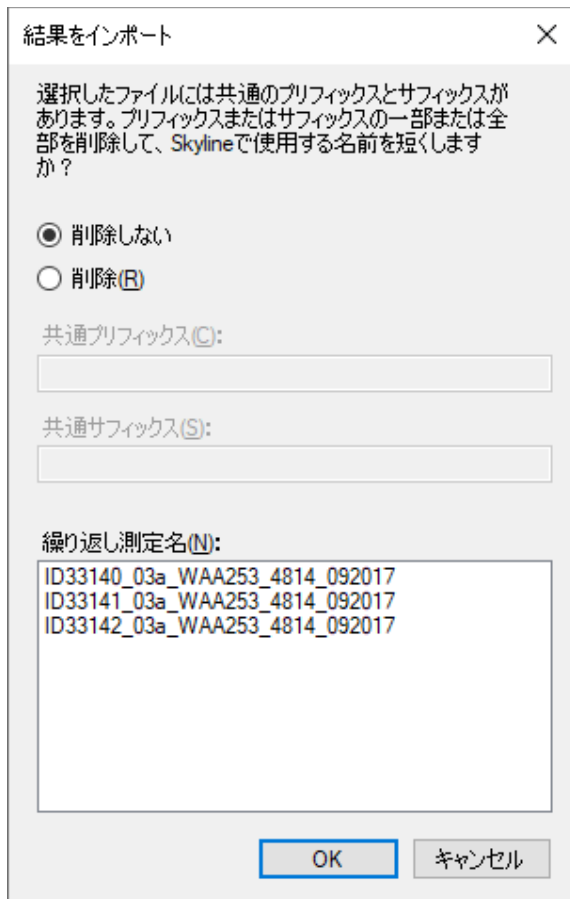
- トランジションリストを「EnergyMet_5minutes_scheduled.csv」の名前で保存します。

Scheduled（スケジュールされた）測定データの収集とインポート

新しく生成されたスケジュール化されたトランジションリストを使用して質量分析計で測定しデータ収集します。本チュートリアルではデータはライト（同位体ラベル標識なし）とヘビー（安定同位体ラベル標識）の混合比率を変えて3回測定を行ったという設定です。この3回の混合比はそれぞれ1:1混合、1:2混合、2:1混合です。これらの測定結果をドキュメントにインポートするには、以下の操作を行います。

- [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。
- [OK]ボタンをクリックしてデフォルト設定を承認します。
- チュートリアルフォルダの「Scheduled」サブフォルダに移動し、3つのファイルすべてを選択します。
- [OK]ボタンをクリックします。
- Skyline が繰り返し測定名の簡易化（プレフィックスとサフィックス）を提案してきたら、[削除しない]を選択します。

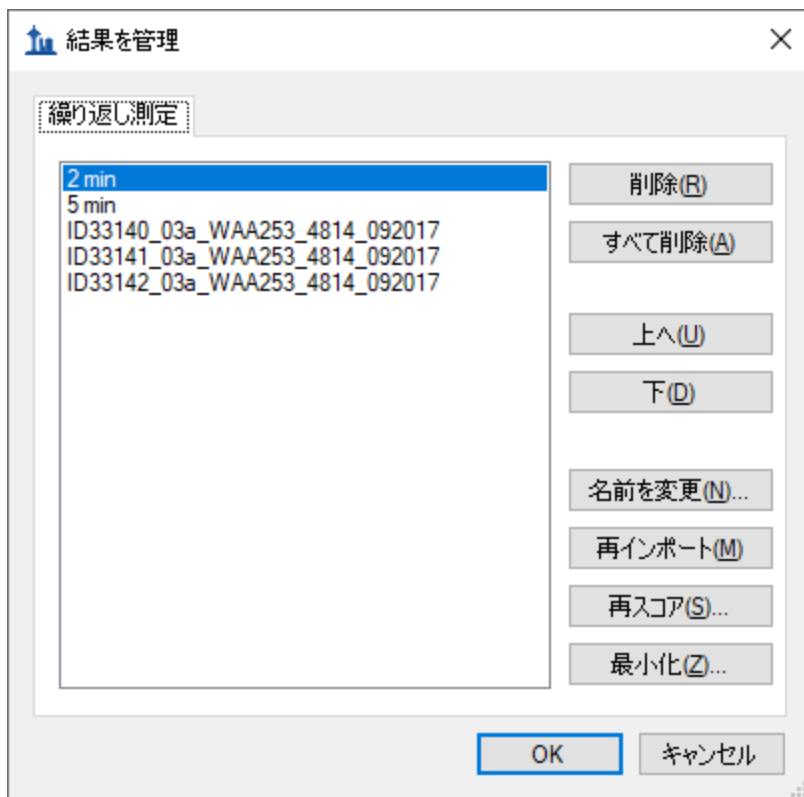
これにより[結果をインポート]フォームでは繰り返し測定名として使用するファイル名がフルファイル名（拡張子は除く）で表示されるようになります。



- [OK] ボタンをクリックします。

2分のグラジエントのデータのインポートが終了したら、以下のようにしてドキュメントから削除できます。

- [編集]メニューで、[結果を管理] (Ctrl+R) をクリックします。
- 「2 min」の繰り返し測定を選択します。



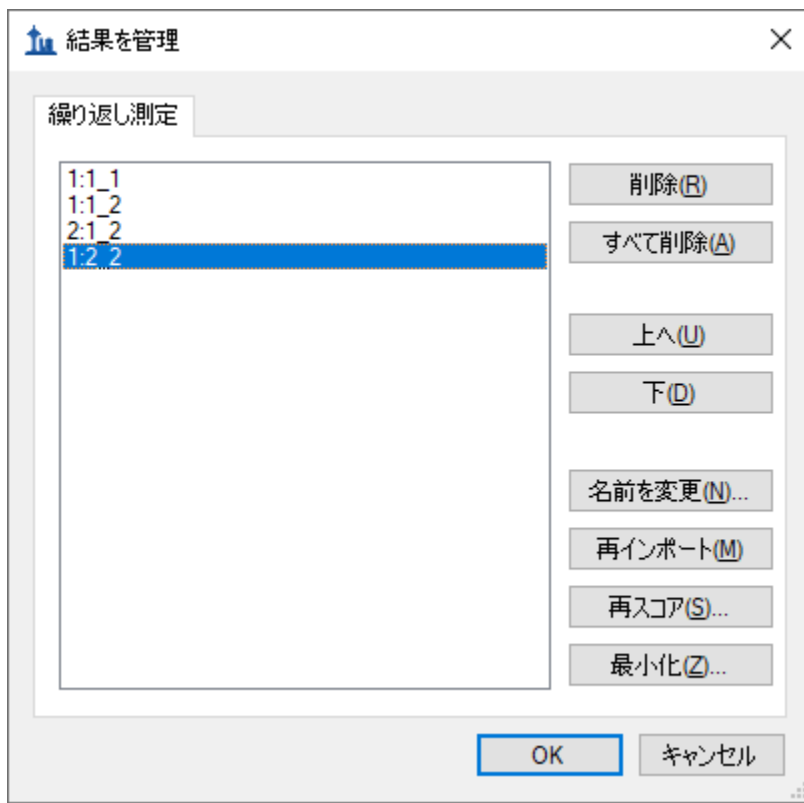
- [削除] ボタンをクリックします。

今度は残りの4つの繰り返し測定の名前を以下のようにして変更します。

- 「5 min」繰り返し測定をダブルクリックします。
- 名前を「1:1_1」に変更します。（今回は同位体比であるライトとヘビーの混合比率にしていますが名前の変更は可能です。）
- 「ID33140」、「ID33141」、「ID22142」で始まるその他の繰り返し測定の名前をそれぞれ「1:1_2」、「2:1_2」、「1:2_2」に変更します。

注：この名前変更は、[繰り返し測定]>[繰り返し測定名]フィールドを含むカスタムレポートテンプレートを使用して[ドキュメントグリッド]で行えます。

完了すると、[結果を管理] フォームは以下ようになります。



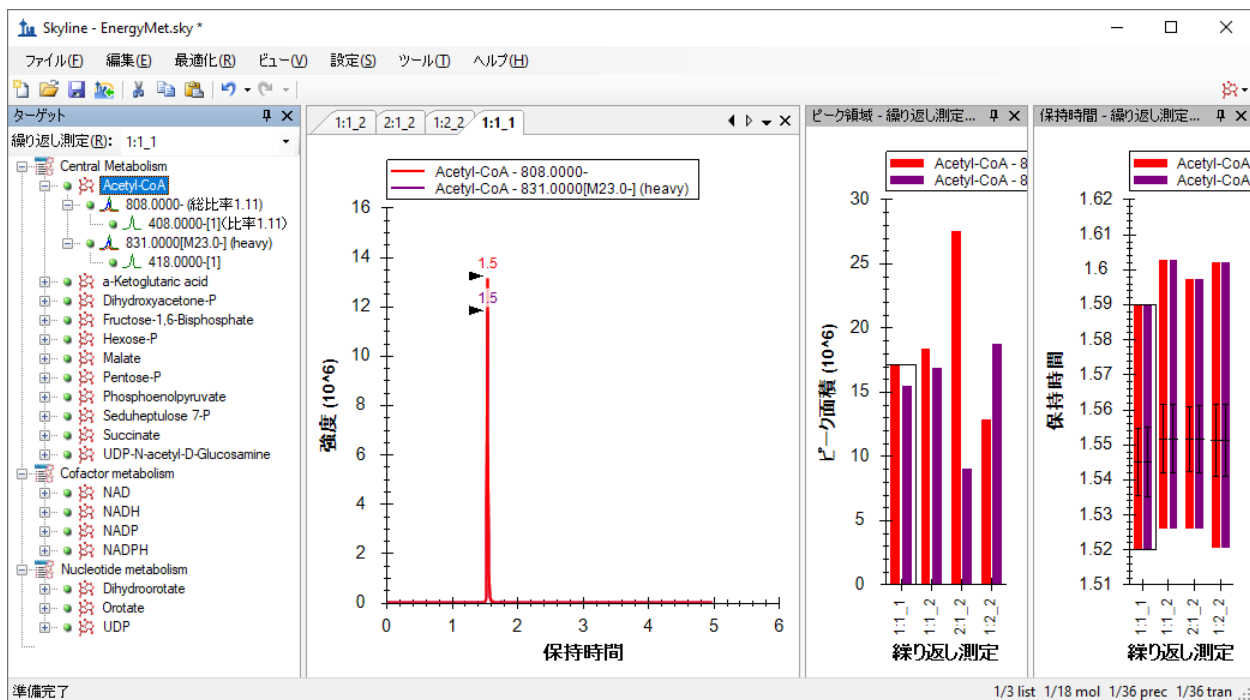
- [OK] ボタンをクリックします。
- [ビュー] メニューで、[グラフを配置] を選択して [タブ付き] をクリックします (Ctrl+Shift+T)。

インポートされた結果データの解析

[ピーク領域 – 繰り返し測定の比較] ビューで見ると、試料の既知の比率が視覚的に確認できます。

- [ターゲット] ビューで「Acetyl-CoA」 (アナライト) を選択します。
- 「Acetyl-Coa」の左にあるプラス (+) をクリックすると、サブ項目 (808 と 831: [M-H]⁺) 両方が展開され、その下にあるライト (同位体ラベルなし) とヘビー (Acetyl CoA の炭素がすべて ¹³C に置換されたもの) の各トランジション (808→408 と 831→418) が表示されます。

通常ピーク面積とアナライトの濃度には比例関係があることが予想されます。[保持時間 – 繰り返し測定の比較] ビューで、Acetyl-CoA は溶出時間が約 1.55 分で安定していることもわかります。これはスケジュール化メソッドでの測定間でも安定しています。



検量線の線形性評価

校正機能を使用して、既知の濃度比率とクロマトグラムピーク面積で作成される検量線の線形性評価ができます。

- [ビュー]メニューで、[ドキュメントグリッド] (Alt+3) をクリックします。
- [ドキュメントグリッド]で、[レポート]メニューをクリックし、[繰り返し測定]をクリックします。
- 各行の[試料タイプ]を[標準]に設定します。
- [アナライト濃度]を、繰り返し測定名ごとにそれぞれ**1**、**1**、**2**、**0.5**に設定します。

完了すると、[ドキュメントグリッド]は以下のようになります。

繰り返し測定	試料タイプ	アナライト濃度
1:1_1	標準	1
1:1_2	標準	1
2:1_2	標準	2
1:2_2	標準	0.5

検量線の線形性を調べる前に定量化設定を指定する必要があります。

- [設定]メニューで[ペプチド設定]をクリックします。
- [定量化]タブをクリックします。
- [回帰適合]ドロップダウンリストで「線形」を選択します。
- [正規化メソッド]ドロップダウンリストで、「Heavyに対する比率」を選択します。
- [単位]フィールドで、「ratio to heavy」と入力します。

[分子設定]フォームは以下のようになります。

分子設定

予測 ライブラリ 標識 定量化

回帰適合 (E):
線形

正規化メソッド (N):
Heavyに対する比率

回帰の重み (W):
なし

MSレベル (L)
すべて

単位 (U)
ratio to heavy

性能指数

最大LOQバイアス (B): [] % 最大LOQ CV (V): [] %

LOD計算基準 (C):
なし

OK キャンセル

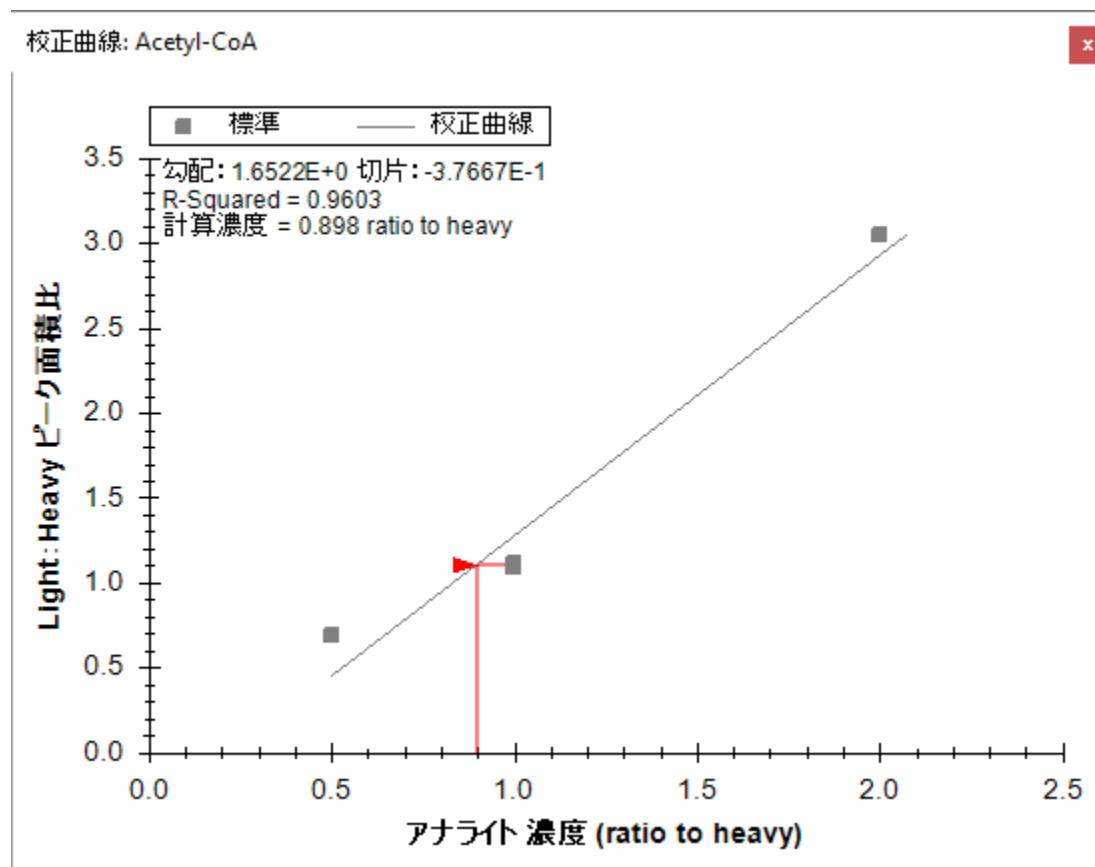
- [OK] ボタンをクリックします。

校正曲線グラフを調べるには、以下の操作を行います。

- [ドキュメントグリッド]ビューを閉じます。

- [ビュー]メニューで、[校正曲線]をクリックします。

以下のようなグラフが表示されます。



R-Square の値から線形性は低いと評価されました。それゆえアナライトの濃度を変えて再度測定し線形性のある濃度範囲を探す必要があるということになります。

CE（衝突エネルギー）の最適化

感度良くアナライト測定ができるよう、各トランジションの CE（衝突エネルギー）を最適化します。衝突エネルギー値は Waters の Xevo TQ-S ではなく Agilent 6495 で実施された文献のもので、装置ごとの最適化プロセスが必要なことがあります。Skyline はスケジュール化されたトランジションリストを作成できますが、この時の CE 値は元のトランジションリストの値を中心に複数の異なる衝突エネルギーを自動作成できます。同じトランジションリストを使用して、このチュートリアルですで見えてきた他の例と同様に Waters Xevo TQ-S で測定し結果を得ます。すでに測定したメソッドからインポートをし、Skyline で Waters 装置での CE 値の最適化を行います。

以下のようにして衝突エネルギー設定の確認から始めます。

- [設定]メニューで[トランジション設定]をクリックします。
- [予測]タブをクリックします。
- [衝突エネルギー]ドロップダウンリストは、すでに「Waters Xevo」に設定されています。[<現在の設定を編集...>]をクリックします。

[CE 計算式を編集] フォームが開きますので、[最適化]のセクションで以下の設定を確認してください。

- [ステップサイズ]フィールドに「2」を入力します。
- [ステップ数]フィールドは「5」に設定されています（されていなければ5を入力）。

	電荷	傾き	切片
▶	2	0.037	-1.066
	3	0.036	-1.328
*			

- [OK] ボタンをクリックします。

この設定で Skyline は 1 トランジションあたり 11 の CE 値で測定をします。衝突エネルギーは元の指定値を中心に各方向に 2 ボルトずつ 5 ステップ、または合計 11 になるように上下に変化させます。通常は比較的大きなステップサイズ (2 または 3 ボルト) で行うのが望ましいですが、ステップ間の信号の変化が大きい場合はステップサイズを下げ (1 ボルトなど) 最適化を繰り返し微調整することをお勧めします。

、トランジションリストをエクスポートする前に、CE 値の最終調整は[トランジション設定]-[予測]タブで行います。

- [最適化値が存在する場合に使用する] チェックボックスをオンにします。
- これによって表示される [以下により最適化] ドロップダウンリストでは、[トランジション] を選択します。

[トランジション設定] フォームは以下のようになります。

- [OK] ボタンをクリックします。

これでスケジュール化されたトランジションリストをエクスポートすることが可能となり、Skyline が測定するターゲット低分子化合物に対する最適な CE 値が決まります。もし装置の制御ソフトウェアがインストールされているパソコンで作業をする場合は、測定メソッドファイ

ルのエクスポートの方が望ましいですが、本チュートリアルではトランジションリストのエクスポートを行います。

- [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。
- [装置タイプ] ドロップダウンリストでは、Skyline が自動的に「Waters」を選択します。
- [複数メソッド]ラジオボタンをクリックします。

最適化によってターゲットリスト内の 36 個のトランジションが (CE 値の可変に伴い) 11 倍になることを思い出しましょう。装置が測定しなければならないトランジションは合計 (36X11 で) 396 個となります。

- [分子リストを無視] チェックボックスをオンにします。
- [試料インジェクションごとの最大トランジション数]に「100」と入力します。
- [最適化]ドロップダウンリストで、「衝突エネルギー」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なります。

トランジションリストをエクスポート

装置タイプ(D): Waters

OK

キャンセル

シングルメソッド(S)

分子リスト毎に1つのメソッド(Q) m/zの順に並べる

複数メソッド(M) 分子リストを無視(R)

最大同時トランジション数(X): 100

メソッド: 5

最適化(Z): 衝突エネルギー

メソッドタイプ(T): スケジュール

このスケジュール化された取得を選択することで[試料インジェクションごとの最大トランジション数]フィールド名が[最大同時トランジション数]に変わることにご注意ください。スケジュールによって測定のすべてのトランジションをどのように全サイクルで測定しないようにできるかを考慮します。Skyline は自動的にこの計算を行い、装置がどのサイクルでも絶対に

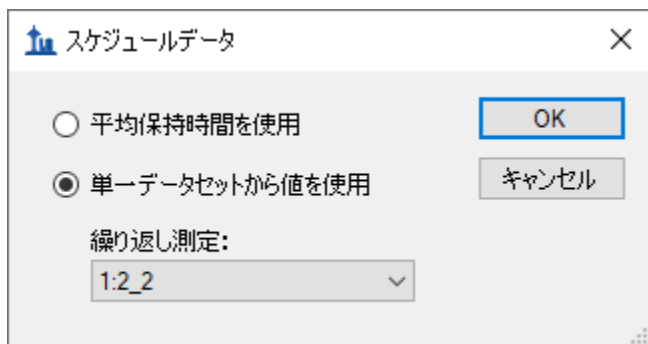
100 個以上測定しないようにして、クロマトグラフのピーク全体で希望するドウェル時間とポイントが確実に達成できるように自動調整します。しかしながらここでの 396 個のトランジションはあまりに数が多いため、フォームの [メソッド:5] というラベルが表示されます。これは最適化の実施に必要な 396 個のトランジションを測定するために、装置（質量分析計）で 5 個の異なるトランジションリストで少なくとも合計 5 回の測定を実際に行わなければならないということです。

- [OK] ボタンをクリックします。

溶出時間にどの繰り返し測定を使用するか尋ねられます。

- [単一データセットから値を使用] をクリックします。
- [繰り返し測定] ドロップダウンリストで、「1:2_2」を選択します。

[スケジュールデータ] フォームは以下のようになります。



- [OK] ボタンをクリックします。

トランジションリストファイル名を求められます。

- 「EnergyMet_5minutes_ceopt.csv」という名前で保存してください。

これによって（トランジションリストが異なる）5 個のファイルが自動的に作成されます。

- EnergyMet_5minutes_ceopt_0001.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0002.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0003.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0004.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0005.csv

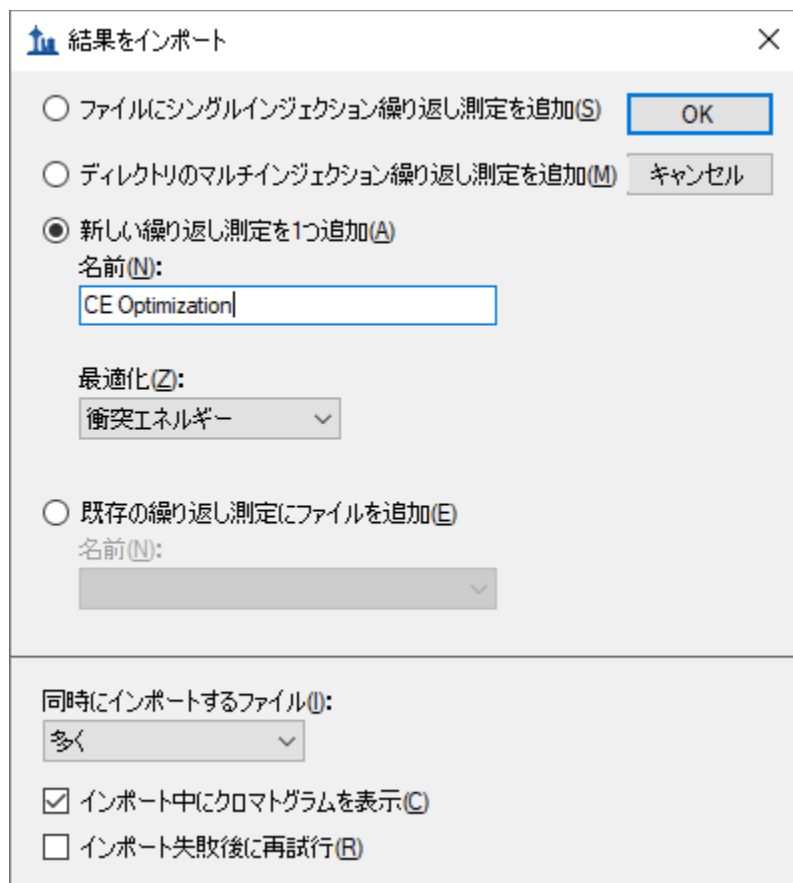
文献のトランジションリストをもとに 1:1 の試料を実際に 5 回にわけて測定しました。最適化のため作成されたデータファイルをインポートする必要があります。

- [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。

これまではインポートの際に各データファイルをターゲットとしていたすべてのトランジションに対する完全な測定セットとして扱っていました。ここではCE最適化のための5回の測定を、1セットへとまとめたいと考えます。そこで[結果をインポート]フォームに以下の調整を行います。

- [新しい繰り返し測定を1つ追加] オプションをクリックします。
- 下にある[名前]フィールドに、「CE Optimization」と入力します。
- [最適化] ドロップダウンリストで、「衝突エネルギー」を選択します。

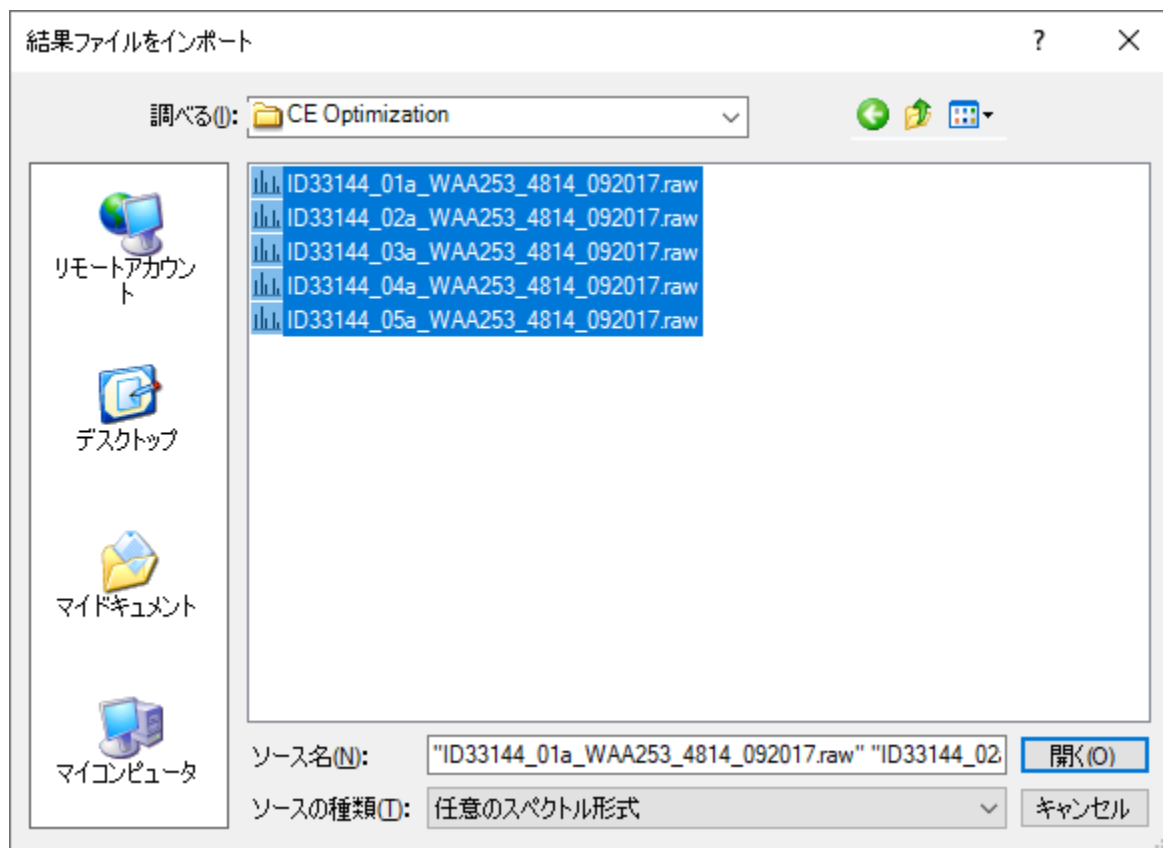
フォームは以下のようになります。



The screenshot shows a dialog box titled "結果をインポート" (Import Results). It has three radio button options: "ファイルにシングルインジェクション繰り返し測定を追加(S)" (Add single injection repeat measurement to file), "ディレクトリのマルチインジェクション繰り返し測定を追加(M)" (Add multi-injection repeat measurement to directory), and "新しい繰り返し測定を1つ追加(A)" (Add one new repeat measurement). The third option is selected. Below it is a text field for "名前(N):" (Name) containing "CE Optimization". Below that is a dropdown menu for "最適化(Z):" (Optimization) set to "衝突エネルギー" (Collision Energy). There are "OK" and "キャンセル" (Cancel) buttons. At the bottom, there is a section for "同時にインポートするファイル(I):" (Files to import simultaneously) with a dropdown set to "多く" (Many), and two checkboxes: "インポート中にクロマトグラムを表示(C)" (Show chromatogram during import) which is checked, and "インポート失敗後に再試行(R)" (Retry after import failure) which is unchecked.

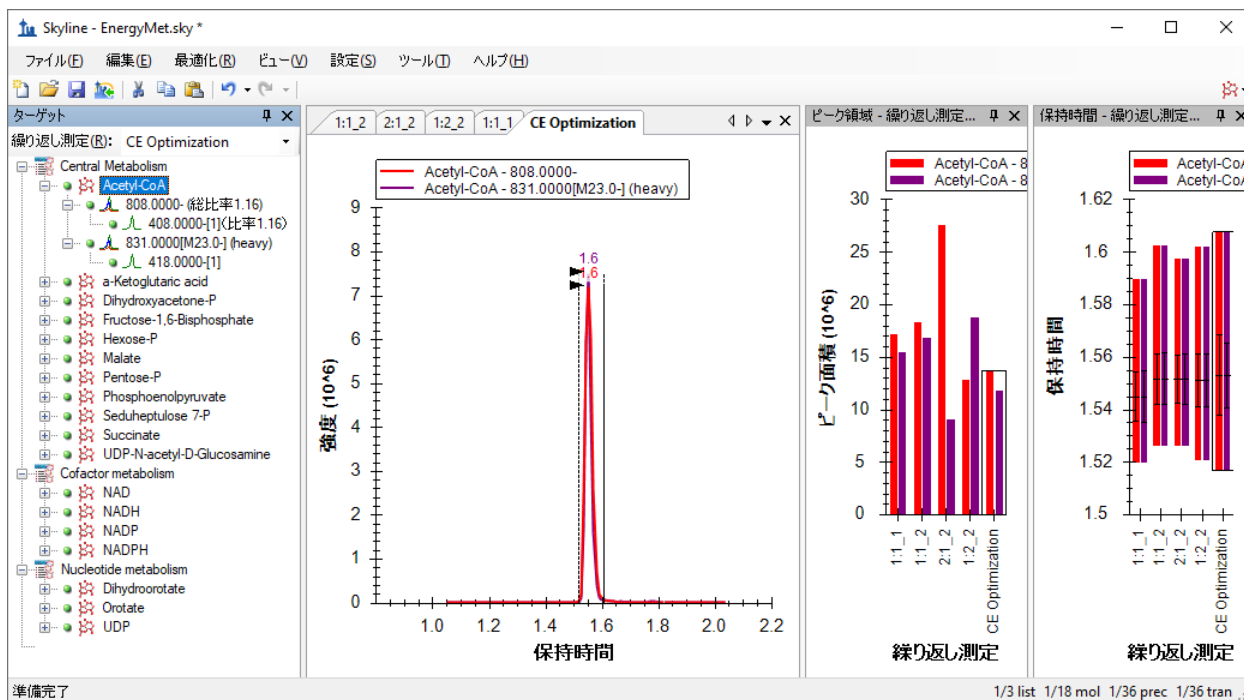
- [OK] ボタンをクリックします。
- 「CE Optimization」サブフォルダに移動し、5個のファイルすべてを選択します。

[結果ファイルをインポート] フォームは以下ようになります。



- [OK] ボタンをクリックします。

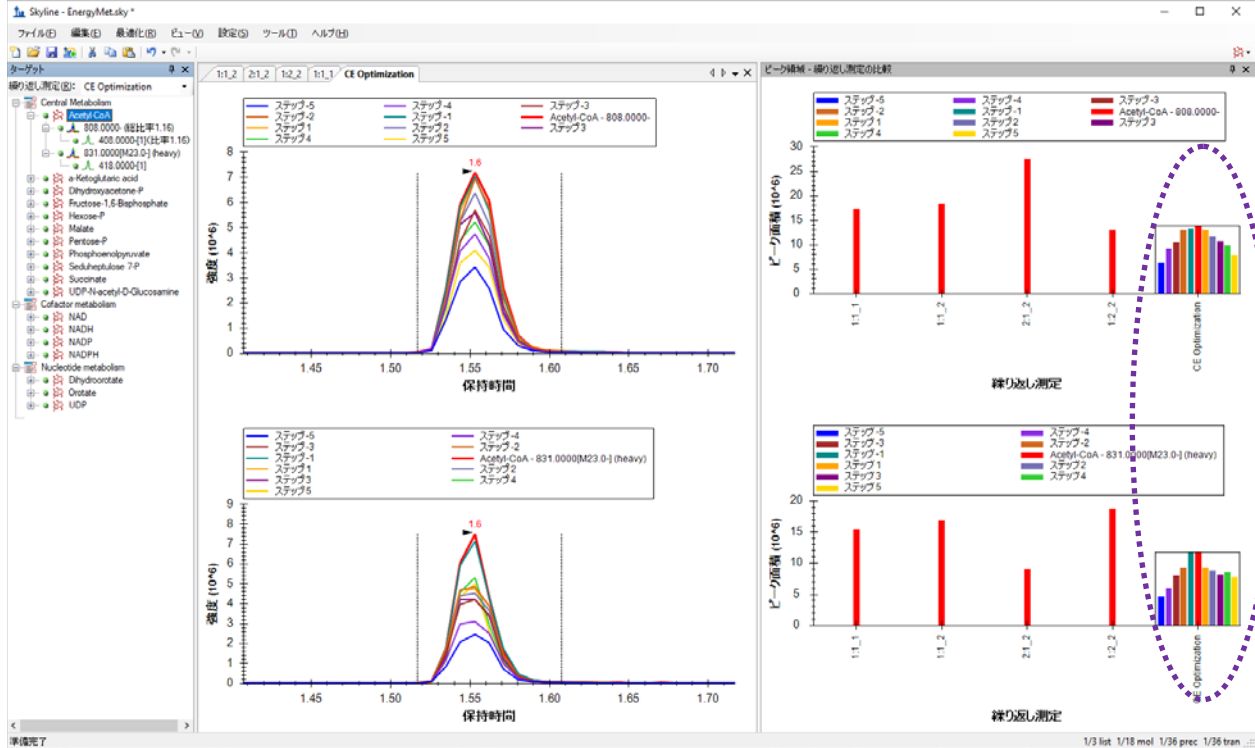
ファイルは「CE Optimization」という名前の繰り返し測定として読み込まれ、以下のように[ターゲット]ビューの[繰り返し測定]ドロップダウンリストに表示され、[繰り返し測定の比較]プロットの一番右端の値として、また以下のようにクロマトグラムプロットの一番右のタブとして表示されます。



ここで[ターゲット]ビューにて11個の異なるCE電圧で測定された11個の測定値を各トランジションについて表示できるようにするために以下の操作を行う必要があります。

- [ビュー]メニューで、[トランジション]を選択して[単一]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[最適ピーク] (F11) をクリックします。
- [保持時間]-[繰り返し測定の比較]プロットのタイトルバーのXをクリックしてプロットを非表示にします。
- クロマトグラムプロットで右クリックし、[トランジション]を選択し、[グラフの分割]をクリックします。

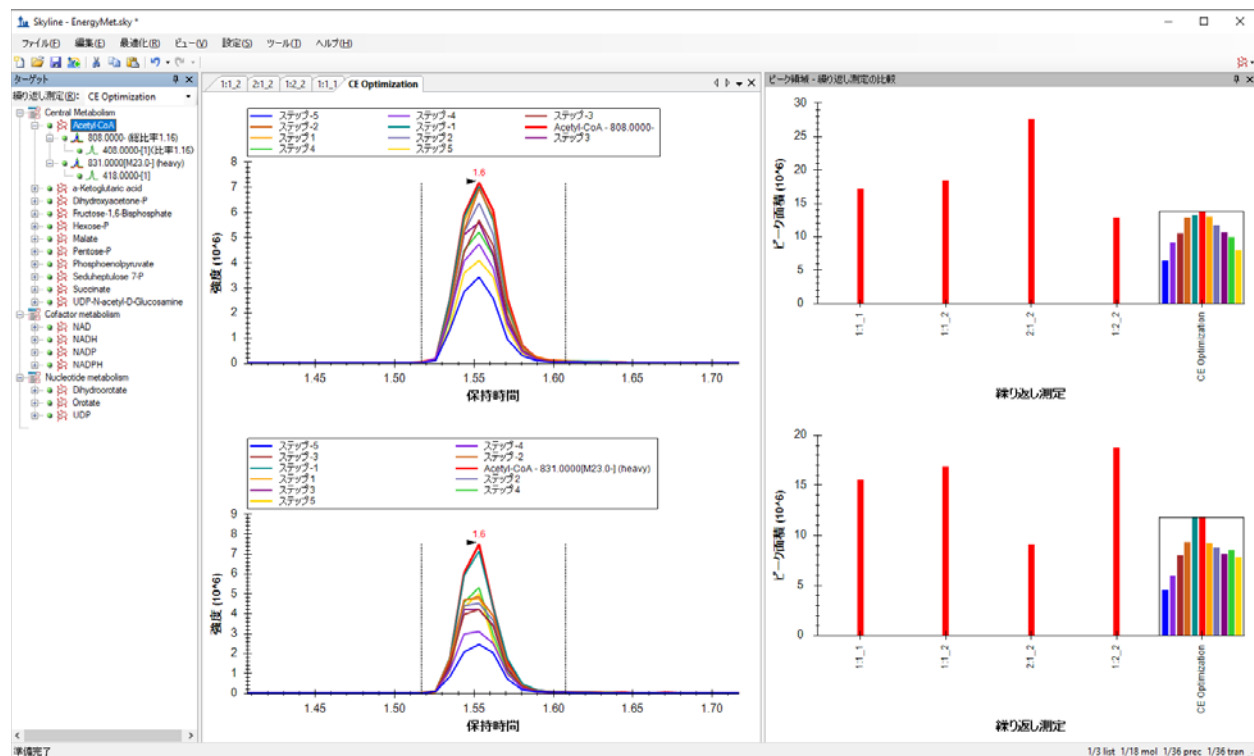
メイン Skyline ウィンドウは以下ようになります。



[ピーク領域-繰り返し測定の比較]ビューには、ライトとヘビー（安定同位体ラベル）のトランジションがそれぞれライトが上段に、ヘビーが下段に表示されます。CE Optimization の繰り返し測定では、（紫の円内の）ヒストグラムが各衝突エネルギーごとの感度を示しています。赤は元の CE 値（文献の Agilent 6495 装置で使用されたもの）、その他の棒はそこから 2eV ずつ増加させたものです。Acetyl-CoA の場合は、CE が元文献の値もしくは-2eV で最大の感度が得られるということがわかります。凡例を非表示にして、グラフの表示面積を広げると見やすくなります。

- [ピーク領域-繰り返し測定の比較] ウィンドウ内を右クリックし、[凡例] をクリックしてチェックボックスをオフにします。

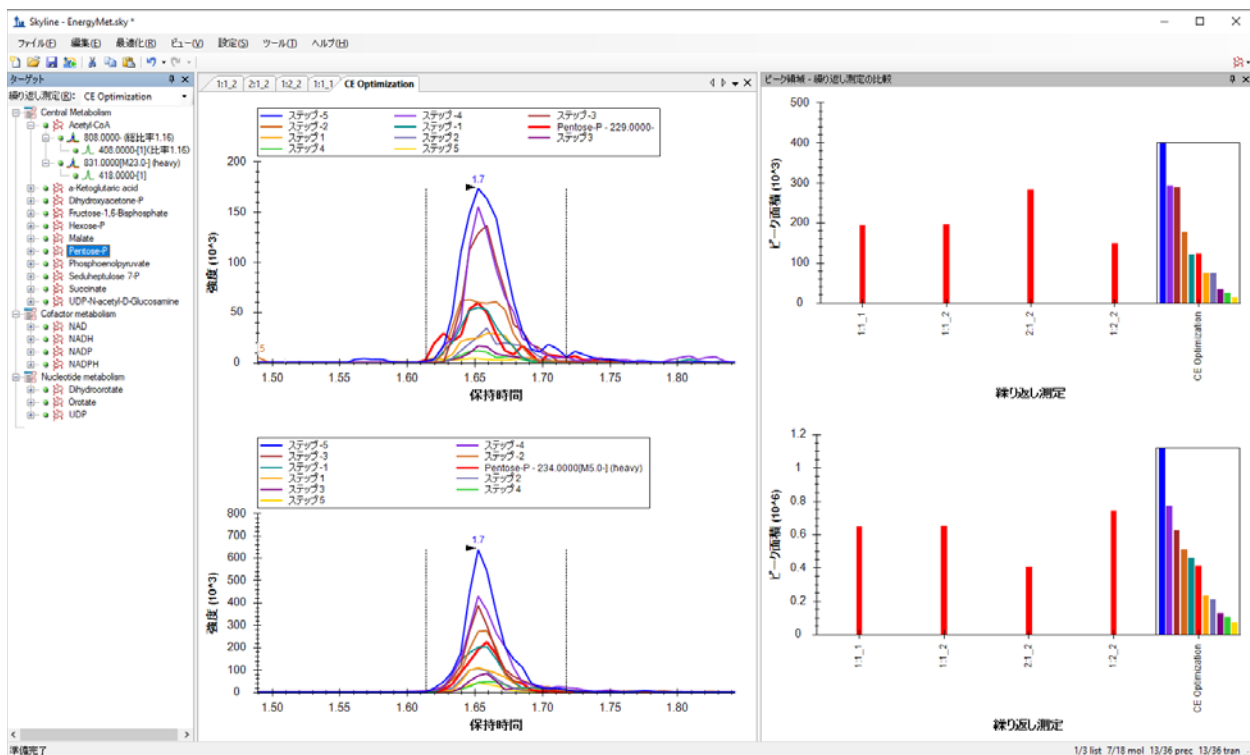
Skyline ウィンドウは以下ようになります。



これで他の低分子化合物に対しても文献の CE 値（衝突エネルギー）が最適かどうかを調べられます。これには、以下の操作が行えます。

- [ターゲット]ビュー内の分子いずれかをクリックするか、最初のクリックの後に上下矢印キーを使用してリスト内で選択を移動します。
- その後、[ターゲット]ウィンドウで「Pentose-P」をクリックします。

Pentose-P の場合は文献の CE 値は Waters Xevo TQ-S 上では最適でなく、最適 CE 値（Step-5、一番左の青い棒）は測定された CE 値の中で最小のものとなります。



この Pentose の場合は最小の CE 値なのでさらに CE 値を下げて最適値を調べてもよいでしょう。こういう場合はもっと広いステップサイズ (3 ボルトなど) で行うのもよいでしょう。いずれにしても、「Step-5」 (青いヒストグラム) の CE 値は文献の CE 値 (赤いヒストグラム) での測定よりも明らかによい感度を示しています。

以下のようにして、最も効果的な CE 観測値を使用する、新たなスケジュール化されたトランジションリストの作成を進めます。

- [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。
- [装置タイプ]ドロップダウンリストでは、Skyline が自動的に「Waters」を選択します。
- [シングルメソッド]ラジオボタンをクリックします。

各トランジションに対して1つの最適 CE 値のみを使用するため、今回もシングルメソッドのみが必要となります。

- [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]フォームは以下ようになります。

トランジションリストをエクスポート

装置タイプ(D): Waters

OK

キャンセル

シングルメソッド(S)

分子リスト毎に1つのメソッド(Q) m/zの順に並べる

複数メソッド(M) 分子リストを無視(R)

最大同時トランジション数(X): 100

メソッド: 1

最適化(Z): なし

メソッドタイプ(T): スケジュール

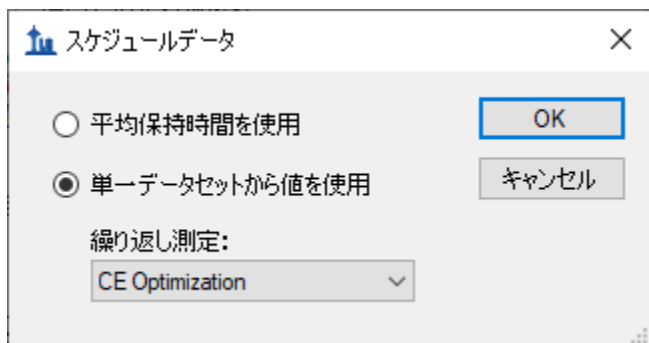
- [OK] ボタンをクリックします。

溶出時間にどの繰り返し測定を使用するか尋ねられます。

- [単一データセットから値を使用] をクリックします。
- [繰り返し測定] ドロップダウンリストで、「CE Optimization」を選択します。

保持時間はカラムの劣化に伴いドリフトすることがあるので直近の測定での保持時間を典型例として保持時間を設定できます。このチュートリアルでは保持時間はかなり安定していることがわかります。それゆえ先ほどの1分のスケジュールウィンドウにて、このフォームのオプションはどの場合でも問題ないこととなります。どれを選択しても最適 CE 値が CE 最適化の測定データから選択されます。

[スケジュールデータ] フォームは以下ようになります。



- [OK] ボタンをクリックします。

トランジションリストファイル名を入力します。

- 「EnergyMet_5minutes_optimal.csv」の名前で保存してください。

文献から得た CE 値と測定して最適化した CE 値の比較

ここまで 18 種類のエネルギー代謝産物と内部標準（安定同位体ラベル代謝物）に対する SRM トランジションの作成、CE 値の最適化などを文献で用いた装置 Agilent 6495 と異なる Waters Xevo TQ-S での測定用に最適化させました。ここまでの最適化の前後を比較すると興味深いことがわかります。

- 元文献の（Agilent 6495 利用）トランジションリストである Energy_TransitionList.csv と、最終的な（Waters Xevo TQ-S で最適化）トランジションリストである EnergyMet_5minutes_optimal.csv を Excel（またはその他ビューアで）開きます。
- 各ターゲット低分子化合物の最適 CE 値を比較し気になる点をメモします（下記に具体例を示します）。
 - Acetyl-CoA は、両装置で最適 CE が同じです。
 - Pentose-P の値は装置間でかなり最適 CE 値が異なります。Agilent 6495 は 45eV ですが、Waters Xevo TQ-S では 35eV です。

Pentose-P の CE をさらに最適化したい場合は（最適と特定されている CE 値が測定範囲の中で最小の CE 値であったため）、EnergyMet_5minutes_optimal.csv トランジションリストを新たな CE 最適化の出発点（この場合は前回の最適化で最小の CE 値となります）として使用し、今度はステップサイズを 1 ボルトにステップ数は減らして最適化プロセスを繰り返せばよいだけです。

CE 値の最適化を行う際は、大きなステップ値で開始して幅広い範囲の CE 値をテストし、その後より小さなステップにて最適値を絞り込んでいくといいでしょう。CE 最適化を行うときに [設定] メニュー、[トランジション設定]、[予測] の下にある [最適化値が存在する場合に使用する] ボタンがオンになっている場合には、新しくエクスポートされるメソッドやトランジシ

ョンリストは自動的に最適な衝突エネルギーをメソッドに取り込みます。より幅広い CE 最適化範囲を調べなければならないかどうかを確認する際以外に、手動での CE 最適化データ編集は必要ありません。

まとめ

本チュートリアルでは文献データをもとにプリカーサー m/z 、プロダクトイオン m/z 、CE（衝突エネルギー値）をインポートを中心にどのように Skyline ドキュメントを作成するかを学びました。また同位体標識を用いた定量のための検量線評価、さらに異なる装置間でのメソッド、データの互換性対応例として、Agilent 6495 三連四重極質量分析計で使用された CE 値を Wafers Xevo TQ-S での測定用にインポートし、低分子化合物（代謝物）用にスケジュール化と CE の最適化をする例も学びました。プロテオミクス解析ソフトとして作成された Skyline 機能のうちいくつかは低分子化合物のデータ解析でも適用可能かを学びました。しかしながら高分子と低分子では解析方法もデータ解析も異なる点が多数存在します。Skyline は今後もメタボロミクスを中心とした低分子化合物解析用にソフトの改良を継続していきます。