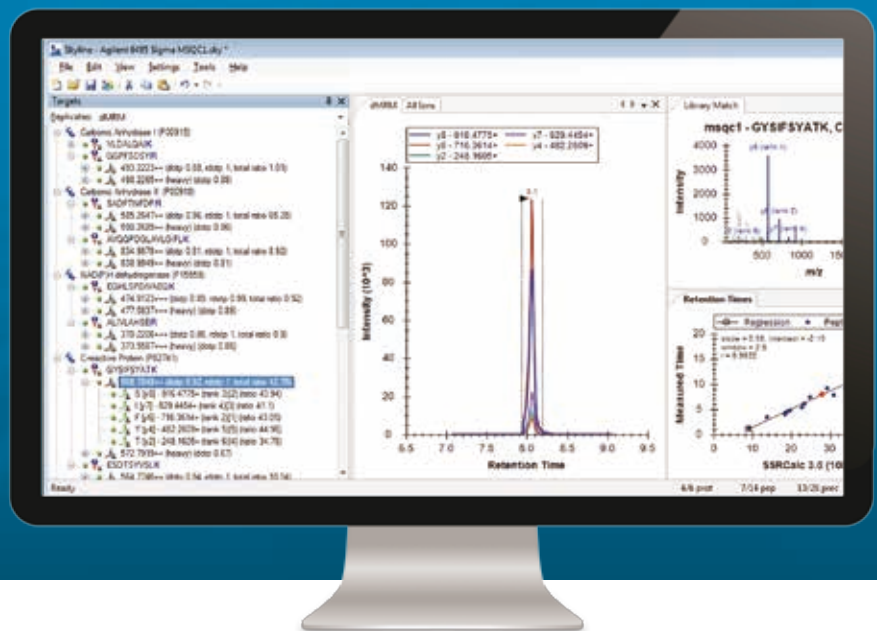




# Skyline プロテオミクスソフトウェアによる ターゲットプロテオミクス研究

アジレントのソリューションによる  
新たなパスウェイの発見

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

# 研究に最適なツール: アジレントの LC/MS と Skyline ソフトウェア

ターゲットタンパク質の分析では、どのようなツールを用いたかによって、結果が大きく異なる場合があります。適切な機器とソフトウェアを用いると、研究を順調かつスピーディに進めることができます。Agilent LC/MS 機器とシアトルのワシントン大学の MacCoss グループの Skyline ソフトウェアの組み合わせは、まさにタンパク質の分析と定量のための最適なツールといえるでしょう。

Skyline は、無料の Windows クライアントアプリケーションで、世界中のリーダー的なラボで広く使用され、高く評価されています。また、アジレントの機器およびソフトウェアとは特別に密接に統合されています。

## カスタマイズされた機能

Skyline ソフトウェアは、プロテオミクス研究用に特別に設計されています。インターフェースはタンパク質からペプチドまで、さらに MRM トランジションまでを取り扱うことができ、プロテオミクスに携わる研究者は、直観的に作業を進めることができます。

アジレントは、長期間にわたる Skyline のサポーターとして、MacCoss ラボの科学者たちと緊密に研究を発展させてきました。この結果、Skyline はアジレントの装置用にカスタマイズされた機能も備えています。私たちは共同で Agilent Automation ソフトウェアにリンクする Skyline のユーティリティを、オープンソースソフトウェアとして作成しました。

## シームレスな統合

アジレントは、Agilent Automation と呼ばれる独自のソフトウェアを開発しました。このソフトウェアは、MRM メソッド開発を簡素化し、生産性を向上させます。Agilent Automation は、Agilent トリプル四重極システムと Skyline を接続して、最適化されたリテンションタイムでスケジュールされた MRM メソッドを自動的に作成します。

## 2つのプログラム

### MassHunter

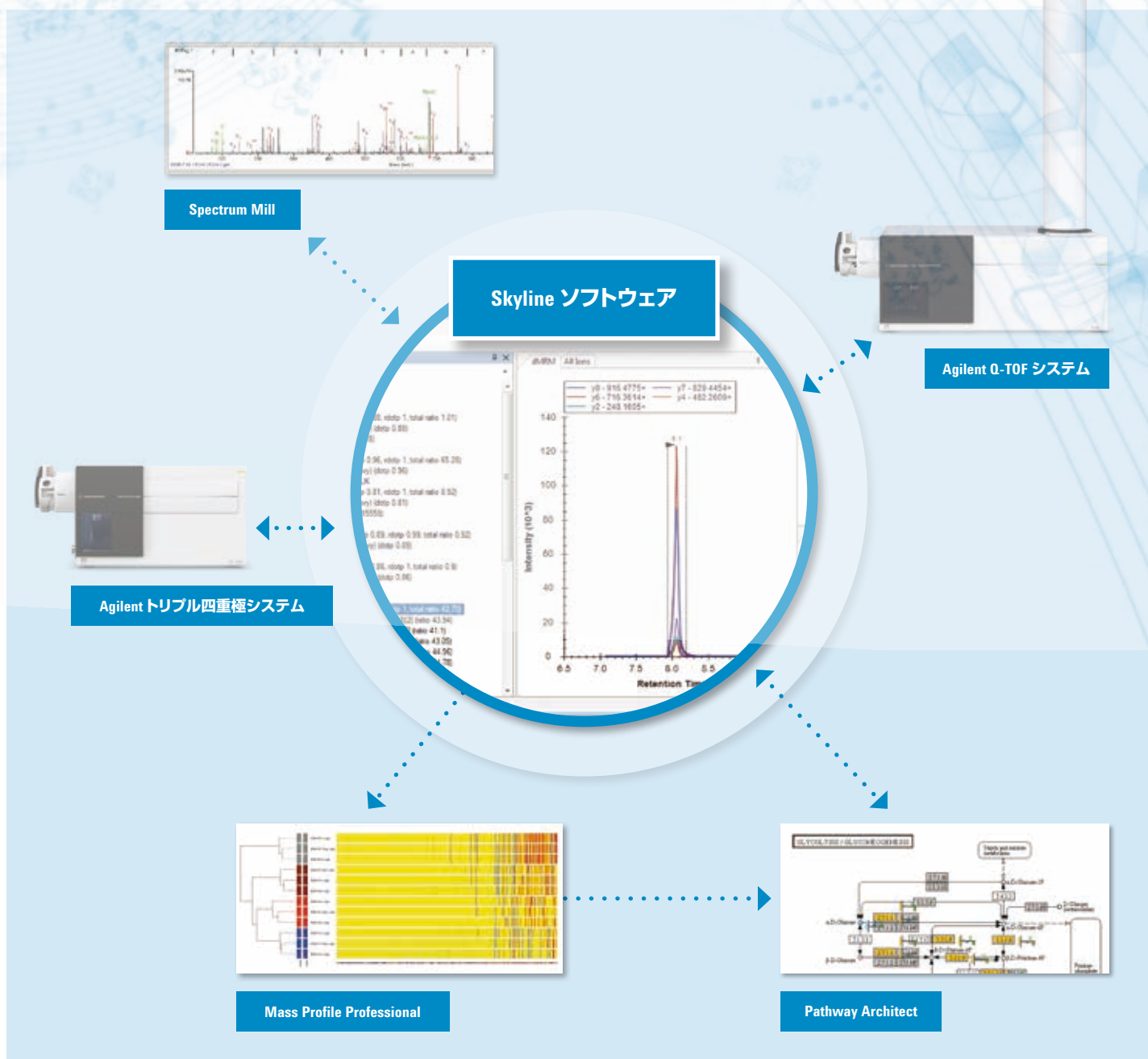
- 日常的な定量
- 異常値検出のための有用なフラグgingおよび視覚化ツール
- tMRM スペクトルをライブラリと照合することによるペプチドの確認

### Skyline

- アミノ酸組成に配慮したアルゴリズム
- データ検証用の優れた視覚化ツール
- 有用なペプチドの MRM 予測
- リテンションタイムを予測し、スペクトルを照合するための強力なツール
- ユーザのフィードバックに基づく継続的な改善

Skyline は、ペプチドメソッドおよび目的タンパク質のデータ検証を開発するための優れた環境を提供します。MassHunter Quant ソフトウェアは、ペプチドの日常的な絶対定量に最適です。

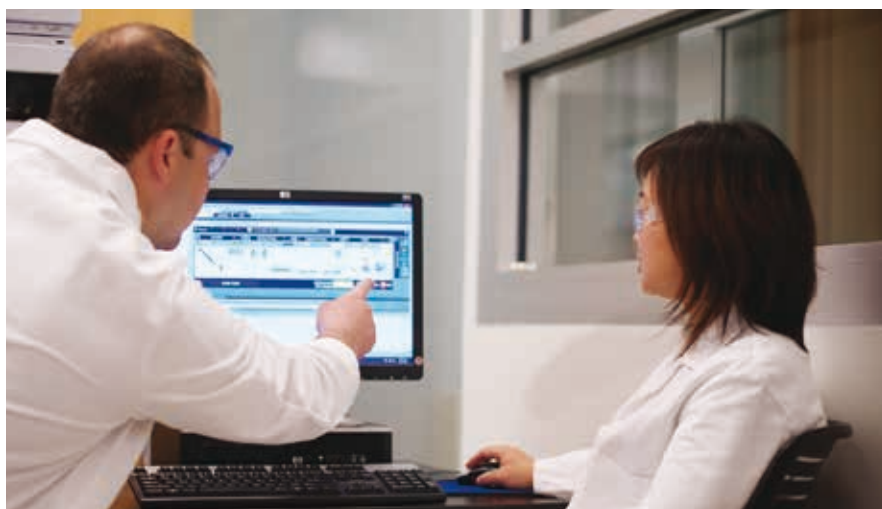
## Agilent 製品と Skyline の接続



## 従来の MRM 測定の限界を打破

既知のタンパク質の定量分析においては、トリプル四重極質量分析計が一般的に使用されてきました。しかし、サンプルが複雑化し、適切な定量シグナルおよび定性シグナルを捕捉する機能がマルチプルリアクションモニタリング (MRM) メソッド設定の実用限界に達しました。

その結果、プロテオミクスの研究者はさまざまな方法でこの問題に取り組み、アジレントの機器と Skyline ソフトウェアが多く使用されてきました。



### 2つのモード

Skyline は、トリプル四重極 LC/MS システムの MRM 測定法の限界を超えるためにアジレントが開発した 2 つのモードをサポートしています。

1 つはダイナミック MRM モードで、ペプチドの溶出時にのみ MRM トランジションを実施します。これにより、多数のペプチドアッセイの実施と狭いピーク幅の正確な定量が可能になります。ダイナミック MRM は、任意のポイントでモニタリングされるトランジションの数がタイムセ

グメントメソッドよりも大幅に少ない場合により結果が得られます。さらに高速の MS スキャンとより長いデュエルタイムの測定を実現できます。

もう 1 つは、トリガ MRM モードです。データ依存のロジックを追加し、ペプチド確認のためにトランジションをさらに測定します。トリガ MRM は、従来のデータ依存型 MS/MS スキャンよりも高速かつ高感度で、擬似 MS/MS スペクトルを生成し MassHunter Quant でライブラリ照合に使用することができます。

### 自動化された最適化プログラム

アジレントの Skyline 自動化ツールは、重要なメソッドの開発および最適化プロセスを自動化することによって新しいメソッドの作成をより簡単にします。Skyline と MassHunter は連携して動作し、容易に設定可能なソリューションを提供します。サンプルをバイアルに置きパラメータをセットアップするだけで、残りはソフトウェアが実行します。プログラムによってメソッドが作成され、サンプルを実行する準備が整います。

カラムやメソッドの交換時、複雑なメソッドでのリテンションタイムの調整に時間がかかる場合があります。MassHunter のリテンションタイムキャリブレーションツールはリテンションタイムの変更に対処するためにメソッドを容易に調整できるように設計されています。Skyline は、ペプチドリテンションタイムを保存し予測できる iRT 機能も備えています。

Agilent MassHunter と Skyline ソフトウェアは連携して、ペプチドの定量分析をより高速、より容易、より高い生産性で実現します。

## Agilent Automation ツールを使用した、簡易な 3 ステップの自動化 MRM 測定

### 1 RT の決定

- Skyline のドキュメントの作成
- タンパク質 / ペプチド情報の追加
- MRM メソッドのエクスポート
- MRM 分析の実行

### 2 CE の最適化

- MRM 結果のインポート
- CE 最適化メソッドのエクスポート
- CE 最適化の実行

### 3 最終メソッドの作成

- CE 最適化の結果のインポート
- 最終ダイナミック MRM メソッドのエクスポート
- 最終メソッドの実行



Agilent Automation ツールを使用すると、MRM メソッド開発用のステップやパラメータを選択できます。

## データを答えに変えるソフトウェア

トリプル四重極質量分析装置は、少数のタンパク質のターゲット定量プロテオミクスに最適な機器です。一方、多数のタンパク質をモニタリングする場合、Q-TOF 質量分析計がターゲット MS/MS プロテオミクス用に最適な機器です。

ターゲット MS/MS プロテオミクスは、ペプチド MS/MS スペクトルをターゲットリストに基づく分析手法で収集します。測定したスペクトルをペプチド MS/MS ライブラリで確認することによって、対象となる特定のタンパク質の配列からペプチドを同定します。

### 柔軟なデータ取り込み

Skyline と MassHunter は様々なデータ測定法をサポートします。ターゲットリストを使用しない網羅的測定では、wideband isolation や All Ions MS/MS を用いることができます。All Ions MS/MS は、四重極でのアイソレーション、2 つ以上のコリジョンエネルギーによるコリジョンセル内のフラグメントイオンを使用しません。これらの手法はいずれも、Agilent Q-TOF システムから得られる非常に高精度な質量測定値により、適切に機能します。この結果、スペクトルデータのマイニングおよび照合を容易に実行できます。さらに、Skyline は、Agilent Spectrum Mill ソフトウェアで生成されるライブラリなど、公的に利用できる、またプライベートに作成されるペプチド MS/MS ライブラリを作成するために使用可能です。

Skyline は、探索的な実験のデータ (discovery data) からスペクトルライブラリを構築し、MS1 フィルタリング用に設定できます。この MS1 フィルタリングは Agilent TOF および Q-TOF 機器で使用可能です。このシナリオでは、MS1 データは目的の特定のペプチドの定量に使用され、ペプチドの同定には MS/MS スペクトルからのスペクトルライブラリが使用されます。

Agilent Q-TOF は、非常に汎用的な機器で、ディスカバリープロテオミクスおよびターゲット MS/MS プロテオミクスにも使用することができます。MRM モードのトリプル四重極型質量分析装置は究極の感度を提供しますが、同定および定量するための Q-TOF の機能はラボにとってより重要になることもあります。Skyline ソフトウェアは、ターゲット定量モードでの動作時に、Q-TOF データをシームレスに処理するために設計されました。

### 知見の獲得

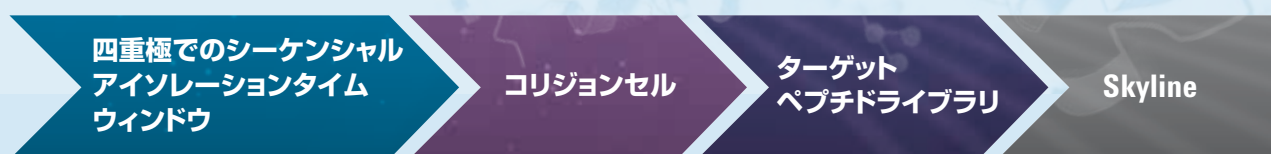
手法に関係なく、最初にあるのはスペクトルデータです。データから答えを導出する際に、Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアを使用すると、複雑なタンパク質実験の多変数解析が可能になり、生物学的差異と相関のある主なタンパク質を正確に特定できます。Skyline ソフトウェアからアジレント機器で得られた結果を MPP にエクスポートできます。Skyline はタンパク質の情報を基に解析されるため、エクスポートされた結果にはタンパク質アクセッション番号が含まれません。この番号により、生物学的パスウェイでのタンパク質を Mass Profiler Professional の Pathway Architect モジュールで視覚化できます。

## Skyline による Agilent Q-TOF のすべての捕捉モードでのサポート

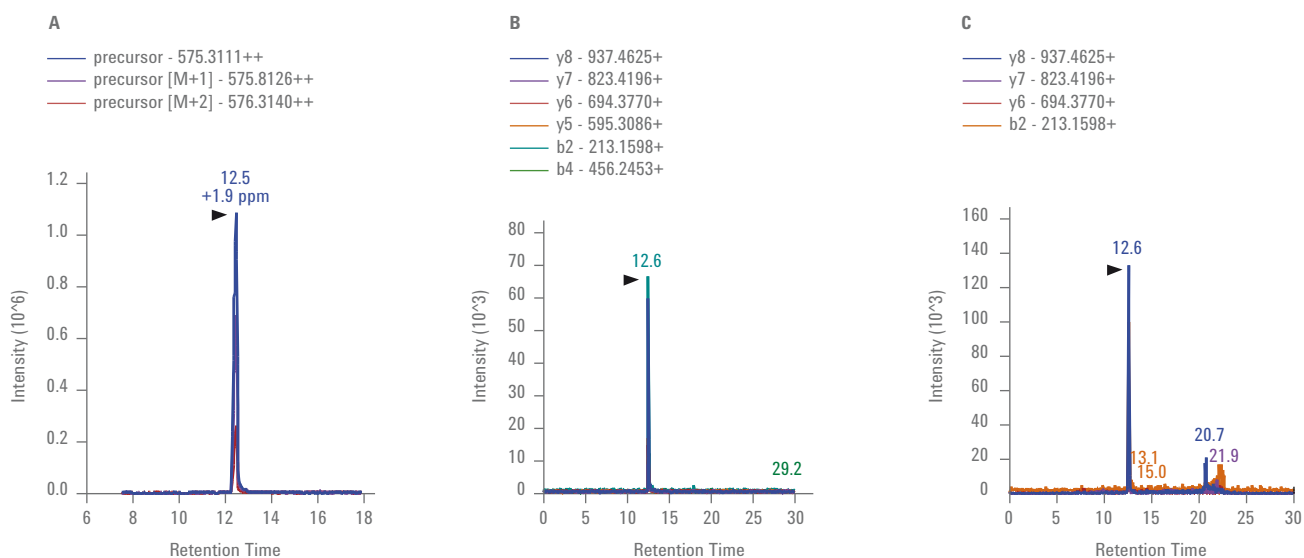
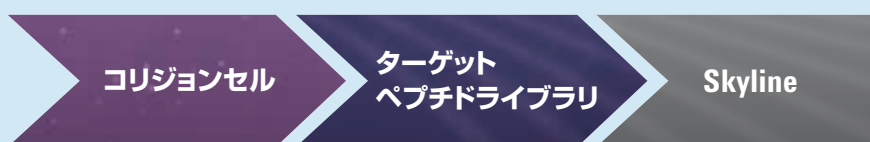
MS1 full-scan フィルタリング



Wide-band isolation



All Ions MS/MS



A) MS1 Full-scan filtering を使用した分析、B) Wide-band isolation を使用した分析、  
C) Agilent All Ions MS/MS を使用した分析

## お問い合わせ先

### カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本資料掲載の製品は、全て研究用です。診断目的では使用できません。  
本資料記載の情報は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan, October 22, 2014

5991-5248JAJP



**Agilent Technologies**