

FlavonoidSearch

FsTool チュートリアル

2017 年 5 月 16 日

目次

はじめに	1
必要なコンピューター環境	1
準備	1
MassChroViewer	1
FsTool	1
マスキロマトグラムデータ	2
解析	2
手順 1) MassChroViewer でのマスキロマトグラムデータのオープン	2
手順 2) MS2Viewer の起動	3
手順 3) 対象ピークの選択	4
手順 4) 対象ピークの MS スペクトルデータの取得	5
手順 5) FsTool によるフラボノイドアグリコンの推定	7
MassChroViewer 1.3.2 以上の場合	7
MassChroViewer 1.3.2 より古い場合	8
検索結果	10
手順 6) 置換基の推定	11
手順 7) アノテーションの確認	14
お問い合わせ先	17
公開論文	17

はじめに

FlavonoidSearch¹は、MS/MS や多段階 MS のスペクトル情報を用いて、フラボノイドのアグリコン（非糖部）を推定できるシステムです。FlavonoidSearch は、MS スペクトルを格納したデータベース部分（FsDatabase）と、それを検索するためのツール部分（FsTool）から構成されています。このチュートリアルでは、FlavonoidSearch システムを使った具体的な検索方法を、GUI で操作できる FsTool と、実際のメタボロームデータの例として、パセリの多段階 MS 分析データを使って示します。

必要なコンピューター環境

このチュートリアルを行うためには、Java 実行環境（64 bit 版、バージョン 1.7 以上）が搭載された PC（64 bit、メモリ 2GB 以上推奨）が必要です。手順 7）のデータベース検索や化学構造の解析を行うためには、お使いの PC がインターネットに接続できる必要があります。

準備

MassChroViewer

パセリの分析データから MSⁿ スペクトルデータを得る部分で、MassChroViewer ツールを使います。バージョン 1.3.2 以降の MassChroViewer には、FsTool が組み込まれています。

以下の URL からダウンロードし、マニュアルに従ってセットアップをしてください。

<http://www.kazusa.or.jp/komics/software/MassChroViewer/>

FsTool

※MassChroViewer バージョン 1.3.2 以上がインストールされている場合は、FsTool を別途インストールする必要はありません。

単体ツールとして使用したい場合には、下記サイトからダウンロードし、マニュアルに従

ってセットアップしてください。

<http://www.kazusa.or.jp/komics/software/FlavonoidSearch>

マスキロマトグラムデータ

使用するパセリの分析データは、MassChroViewer のウェブサイト（上記）からダウンロードできます。

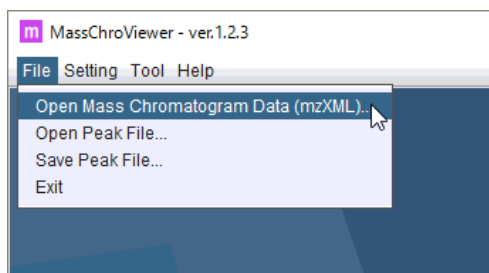
S2_Cont_LRes_DX_ms2-3.zip をダウンロードして、zip ファイルを解凍ソフトウェア（7zip 等）で解凍してください。

S2_Cont_LRes_DX_ms2-3.mzXML という名前のファイルができあがります。

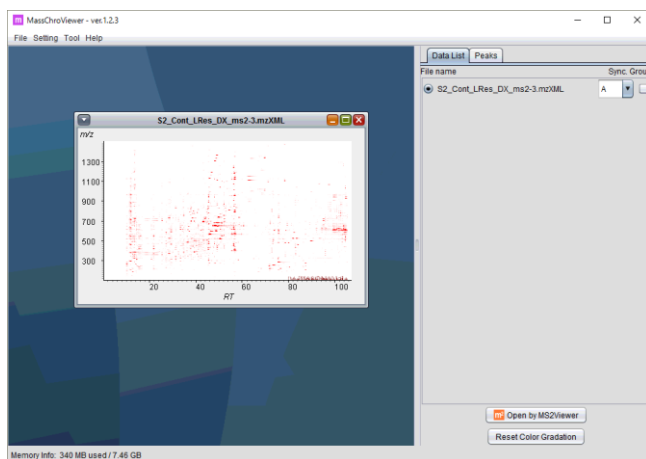
解析

手順 1) MassChroViewer でのマスキロマトグラムデータのオープン

MassChroViewer を起動し、File メニューから「Open Mass Chromatogram Data (mzXML)」を選択します。開いたファイル選択ダイアログボックスで、ダウンロードした mzXML ファイル（S2_Cont_LRes_DX_ms2-3.mzXML）を選択します。

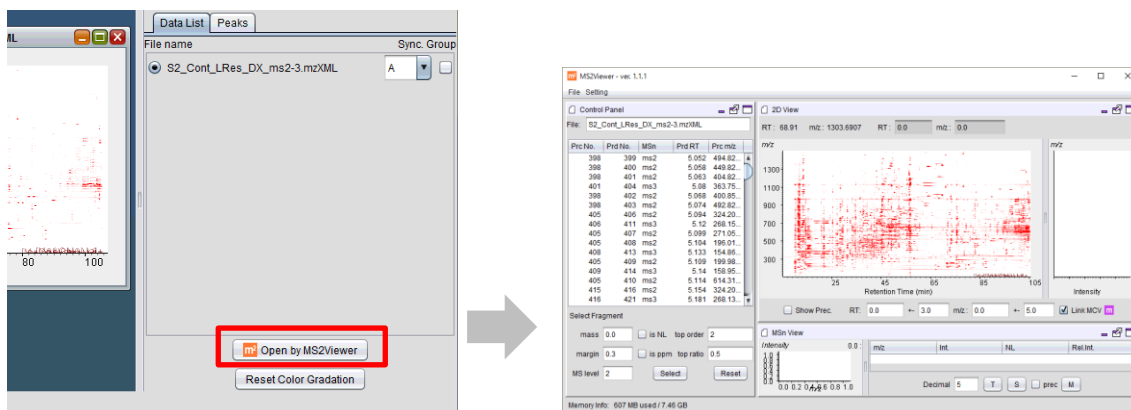


マスキロマトグラムが 2D 表示として表示されます。

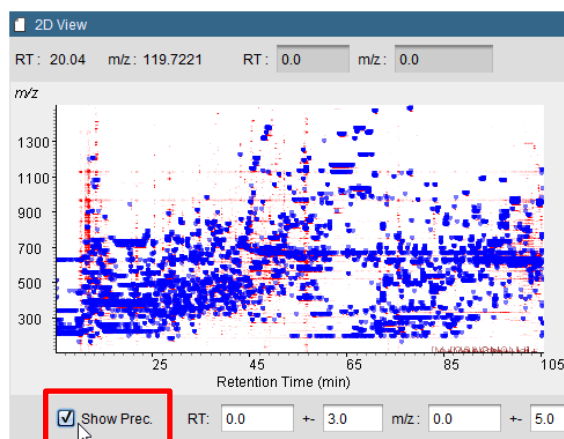


手順 2) MS2Viewer の起動

MassChroViewer の Data List と書かれたパネルの下部にある「Open by MS2Viewer」ボタンをクリックします。すると、MS2Viewer ウィンドウが表示されます。



MS2Viewer の、2D View パネルの下部にある、Show Prec.にチェックを入れてください。MSⁿ 解析が実施されたプリカーサーイオンの位置が、小さな青のマーカで表示されます。

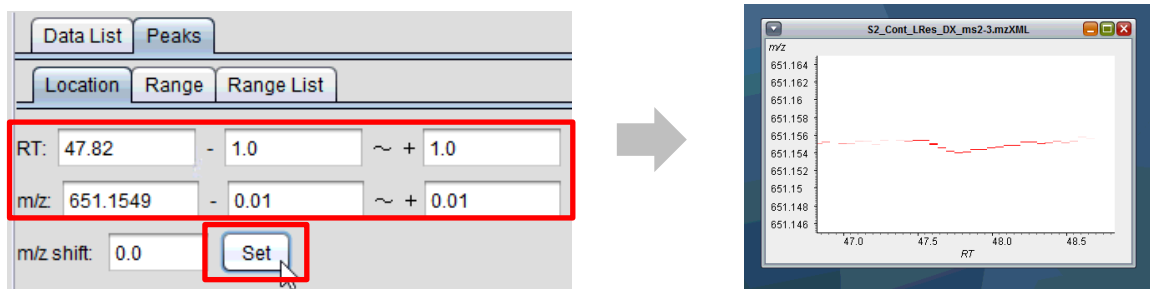


手順 3) 対象ピークの選択

MassChroViewer の 2D 画面で、ピークを選択します。

今回は、分析データの中で最も強度が強かった、溶出時間 (RT) 47.82 分、 m/z 値 651.1549 のピークを対象にします。

マウス操作でピークを拡大するか、Peaks タブにある Location サブパネルに、以下の値を入力して、「Set」ボタンを押し、2D 画面にピークを拡大表示させてください。



マウス操作は以下です。

操作	マウス操作	備考
色の濃さの調整	CTRL + SHIFT + マウスホイールの回転	Windows の場合、手前に回すと濃くなります。
選択範囲を拡大	マウス右ボタンでドラッグ	
全体表示に戻す	マウス右ボタンをダブルクリック	※ 1
拡大・縮小	マウスホイールの回転	手前に回すと縮小

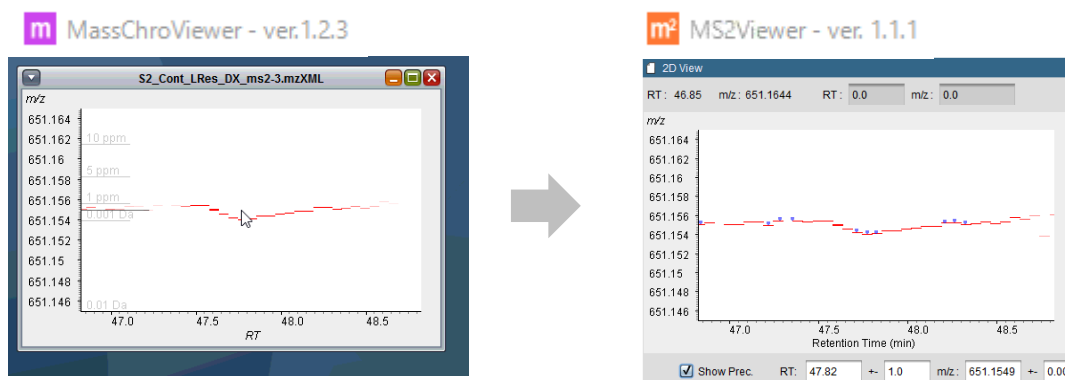
		※ 1
移動	マウス左ボタンをドラッグ	※ 1
数値の取得	マウス左ボタンをダブルクリック	ダブルクリックした地点の m/z 値と溶出時間が、ルーラーの基準点の設定など、各種機能と連携します。

※ 1 拡大・縮小・移動の方向を、縦および横方向に固定することができます。

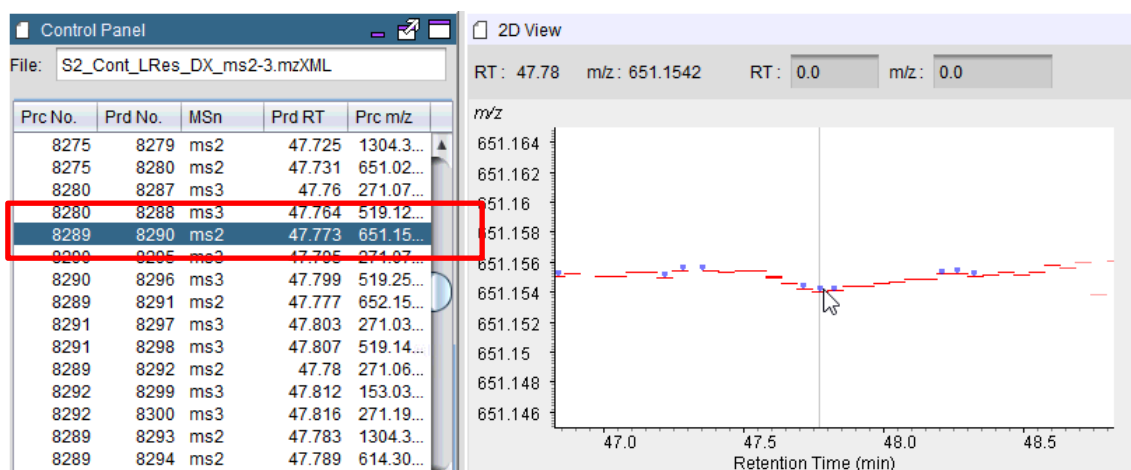
- CTRL キーを押しながらマウス操作をすると、縦方向に固定されます。
- SHIFT キーを押しながらマウス操作をすると、横方向に固定されます。

手順 4) 対象ピークの MS スペクトルデータの取得

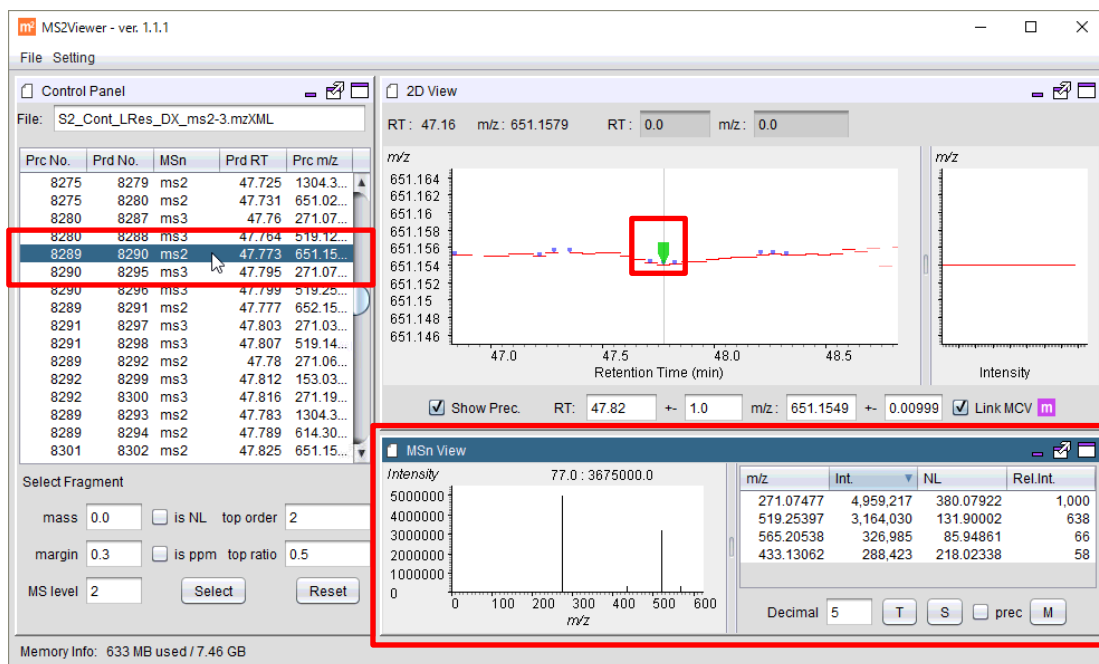
対象ピークが拡大されたら、ピークトップ付近をダブルクリックします。すると、MS2Viewer 上でも同じピーク位置が表示されます。



ピークトップ近傍で、MS/MS 解析が行われたことを示す青い点付近をクリックしてください。コントロールパネル上に、そのプリカーサーイオン情報がハイライトされます。



ハイライトされた行をクリックすると、プリカーサーの正確な位置が 2D View 上に緑のマーカーで示されます。また、MSⁿ スペクトルが MSⁿ View パネル上に表示されます。



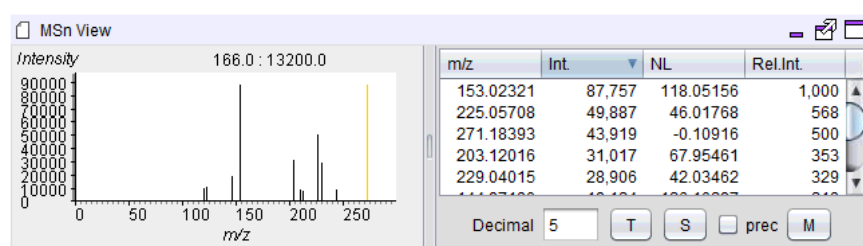
ハイライトされた行をみると、ms2 と書かれており、MS² スペクトルであることがわかります。このパセリの分析では、MS³ 分析も実施されているため、直下の行に ms3 と書かれた行が見えます。MS² スキャンで得られた 271.07 のプロダクトイオンを MS³ 解析したデータの行（直下にある、プロダクトスキャン番号[Prd. No.]が 8295 の行）を選択してください。

Prc No.	Prd No.	MSn	Prd RT	Prc m/z
8275	8279	ms2	47.725	1304.3...
8275	8280	ms2	47.731	651.02...
8280	8287	ms3	47.76	271.07...
8280	8288	ms3	47.764	519.12...
8289	8290	ms2	47.773	651.15...
8290	8295	ms3	47.795	271.07...
8290	8296	ms3	47.799	519.25...
8289	8291	ms2	47.777	652.15...

→

Prc No.	Prd No.	MSn	Prd RT	Prc m/z
8275	8279	ms2	47.725	1304.3...
8275	8280	ms2	47.731	651.02...
8280	8287	ms3	47.76	271.07...
8280	8288	ms3	47.764	519.12...
8280	8290	ms2	47.773	651.15...
8290	8295	ms3	47.795	271.07...
8290	8296	ms3	47.799	519.25...
8289	8291	ms2	47.777	652.15...

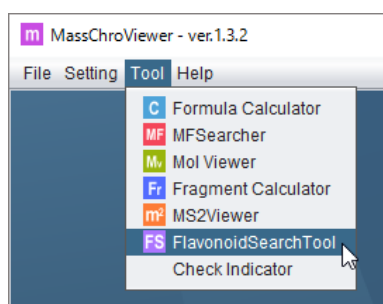
MSn View に、MS³ のデータが表示されます。

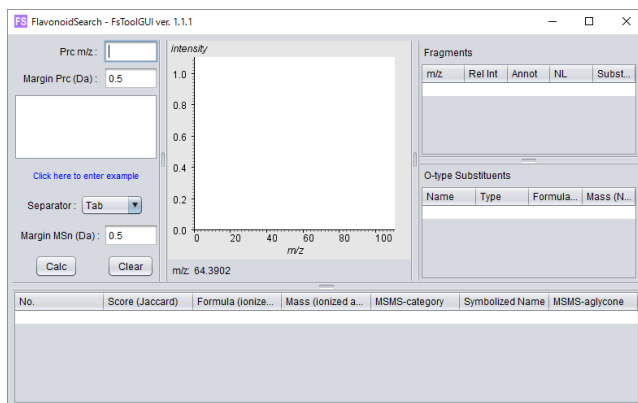


手順 5) FsTool によるフラボノイドアグリコンの推定

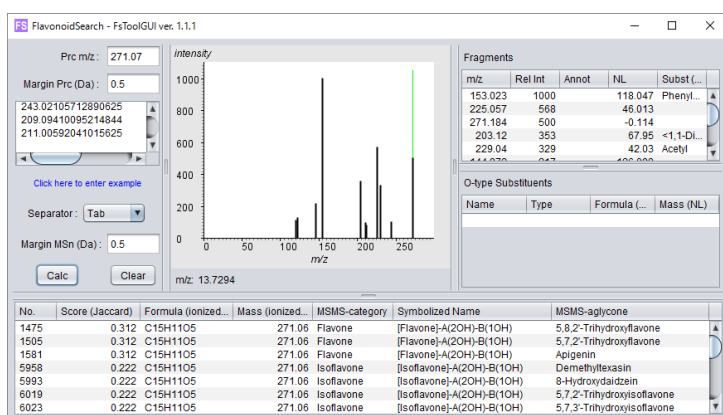
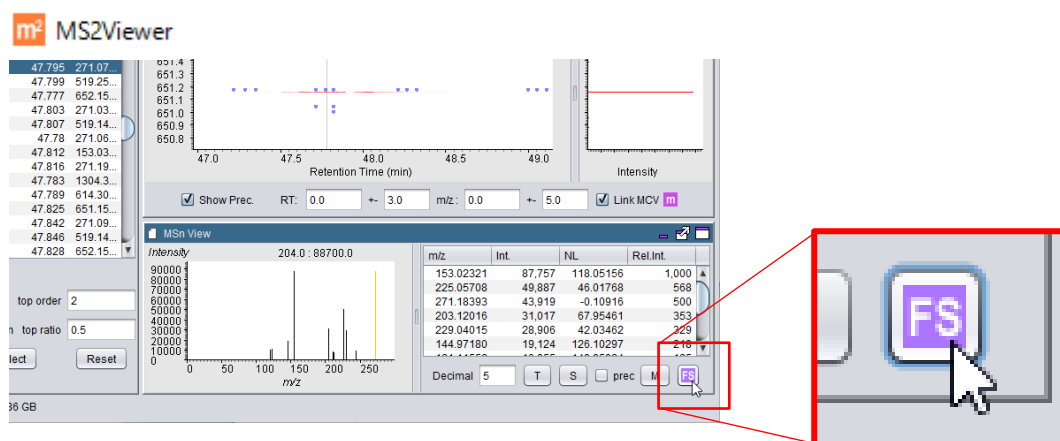
MassChroViewer 1.3.2 以上の場合

MassChroViewer の Tool メニューで‘FlavonoidSearch Tool’を選択し FsTool を起動します。





MS2Viewer の MSn View パネルの右端にある、「FS」 ボタンをクリックすると、スペクトルデータが FsTool に受け渡され、検索結果が表示されます。



MassChroViewer 1.3.2 より古い場合

1.3.2 以前の MassChroViewer には、FsTool がふくまれていませんので、FsTool のマニユ

アルに従い、FsTool を単体で起動してください。その後、以下のようにコピー&ペーストで、FsTool にスペクトルデータを入力した後、「Calc」ボタンで検索を行います。

MSn View パネルの T ボタンをクリックします。スペクトル情報がタブ区切りテキストでクリップボードにコピーされます。

m/z	Int.	NL	Rel.Int.
153.02321	87,757	118.05156	1,000
225.05708	49,887	46.01768	568
271.18393	43,919	-0.10916	500
203.12016	31,017	67.95461	353
229.04015	28,906	42.03462	329

Decimal 5 **T** S ☐ prec M

クリップボードにコピーしたスペクトルのテキストデータを、FsTool のテキスト入力欄にペーストします。ペーストするには、CTRL+V キーなどをお使いください。

Prc m/z:

Margin Prc (Da): 0.5

243.021037 12090825

209.09410095214844

211.00592041015625

[Click here to enter example](#)

Separator:

プリカーサーイオンの m/z 値を、Prc. m/z 欄に入力します。今回は、MS2Viewer のコントロールパネル中に表示されている、271.07 を手で入力してください。

←

MS2Viewer - ver. 1.1.1

Prc No.	Prd No.	MSn	Prd RT	Prc m/z
8275	8279	ms2	47.725	1304.3...
8275	8280	ms2	47.731	651.02...
8280	8287	ms3	47.76	271.07...
8280	8288	ms3	47.764	519.12...
8289	8290	ms2	47.773	654.15...
8290	8295	ms3	47.79	271.07...
8290	8296	ms3	47.799	519.25...
8289	8291	ms2	47.777	652.15...

Calc ボタンを押すと、FsTool での検索が行われます。

FS FlavonoidSearch - FsToolGUI v

Prc m/z: 271.07

Margin Prc (Da): 0.5

243.02105712890625
209.09410095214844
211.00592041015625

[Click here to enter example](#)

Separator: Tab

Margin MSn (Da): 0.5

Calc Clear

検索結果

検索結果は FsTool の下部の表に表示されます。

FS FlavonoidSearch - FsToolGUI ver. 1.1.1

Prc m/z: 271.07

Margin Prc (Da): 0.5

243.02105712890625
209.09410095214844
211.00592041015625

[Click here to enter example](#)

Separator: Tab

Margin MSn (Da): 0.5

Calc Clear

intensity

m/z: 13.7294

Fragments

m/z	Rel Int	Annot	NL	Subst (...)
153.023	1000		118.047	Phenyl...
225.057	568		46.013	
271.184	500		-0.114	
203.12	353		67.95	<1,1-Di...
229.04	329		42.03	Acetyl...

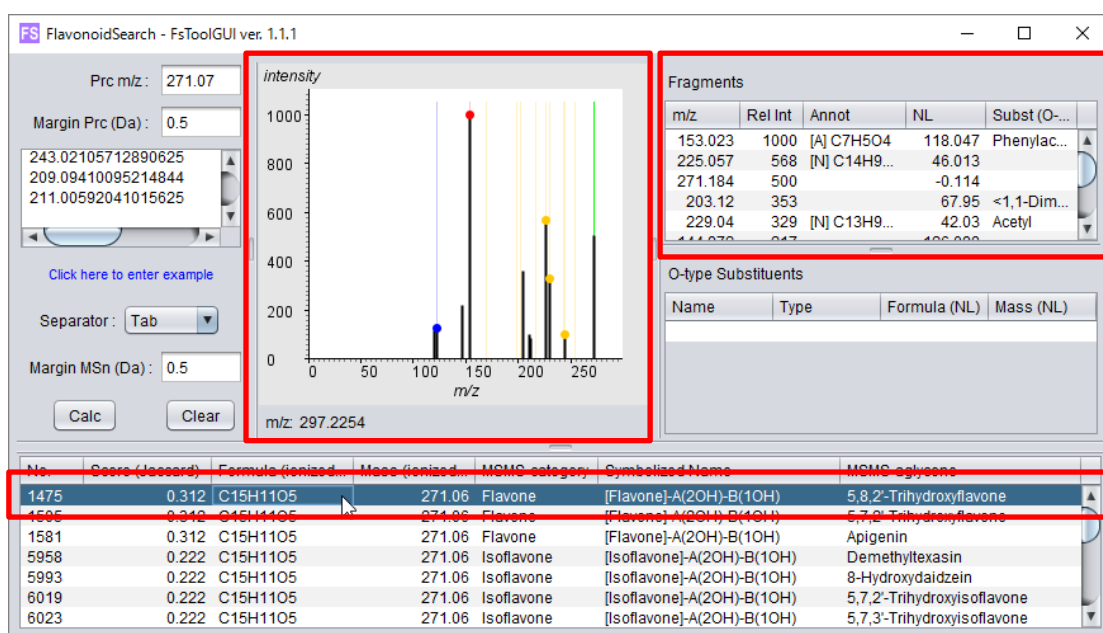
O-type Substituents

Name	Type	Formula (...)	Mass (NL)

No.	Score (Jaccard)	Formula (ionized...)	Mass (ionized...)	MSMS-category	Symbolized Name	MSMS-aglycone
1475	0.312	C15H11O5	271.06	Flavone	[Flavone]-A(2OH)-B(1OH)	5,8,2'-Trihydroxyflavone
1505	0.312	C15H11O5	271.06	Flavone	[Flavone]-A(2OH)-B(1OH)	5,7,2'-Trihydroxyflavone
1581	0.312	C15H11O5	271.06	Flavone	[Flavone]-A(2OH)-B(1OH)	Apigenin
5958	0.222	C15H11O5	271.06	Isoflavone	[Isoflavone]-A(2OH)-B(1OH)	Demethyltaxasin
5993	0.222	C15H11O5	271.06	Isoflavone	[Isoflavone]-A(2OH)-B(1OH)	8-Hydroxydaidzein
6019	0.222	C15H11O5	271.06	Isoflavone	[Isoflavone]-A(2OH)-B(1OH)	5,7,2'-Trihydroxyisoflavone
6023	0.222	C15H11O5	271.06	Isoflavone	[Isoflavone]-A(2OH)-B(1OH)	5,7,3'-Trihydroxyisoflavone

パセリの代表的なアグリコンである Apigenin を含む、[Flavone]-A(2OH)-B(1OH)が最有力候補として示されています。

行をクリックすると、スペクトル画面上に、FsDatabase で予測されたフラグメント情報（薄い赤、青、黄色の線）と、それにヒットしたフラグメントイオン（赤、青、黄色の丸）が示されます。



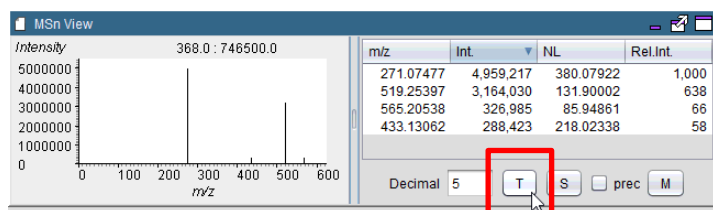
赤、青、黄色はそれぞれ、A 環、B 環、ニュートラルロス由来のフラグメントであることを示しています。緑色の線はプリカーサーイオンの m/z 値を示します。高頻度で観察されることが予測されるフラグメント（Essential Fragment、秋元らの論文）は、太線、および黒で縁取った丸で表されます。

右にある Fragments テーブルには、Annot 列に、予測されたフラグメントの組成式情報が記載されています。[] 内に示された A, B, N は、A 環、B 環、ニュートラルロスに由来するフラグメントをそれぞれ示し、Essential Fragment は*で示されています。

手順 6) 置換基の推定

MS2Viewer に戻り、この MS³ を取得したプリカーサーが含まれる MS² のスペクトルを取得します。コントロールパネルから、一つ上の行にある MS² データ (Prd No.: 8290 の行) を選びます。

Prc No.	Prd No.	MSn	Prd RT	Prc m/z
8275	8279	ms2	47.725	1304.3...
8275	8280	ms2	47.731	651.02...
8280	8287	ms3	47.76	271.07...
8280	8288	ms3	47.764	519.12...
8289	8290	ms2	47.773	651.15...
8290	8295	ms3	47.795	271.07...
8290	8296	ms3	47.799	519.25...
8289	8291	ms2	47.777	652.15...



MSn View パネル上で、T ボタンを押し、スペクトル情報をクリップボードにコピーします。

FsTool で、Clear ボタンを押し、これまでの計算結果を消去した後、手順 5) と同様にスペクトル情報をペーストします。プリカーサーイオンの m/z 値として、651.15 を入力します。

FS FlavonoidSearch - FsToolGUI ver.

Prc m/z: 651.15

Margin Prc (Da): 0.5

519.2539672851562
565.2053833007812
433.130615234375

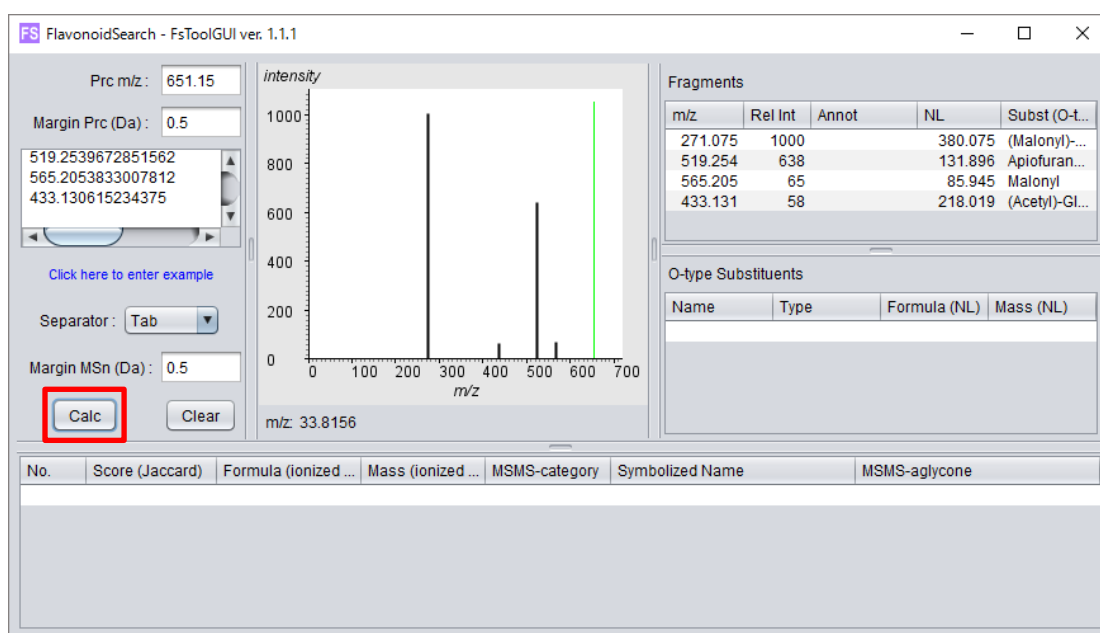
[Click here to enter example](#)

Separator: Tab

Margin MSn (Da): 0.5

Calc Clear

Calc ボタンを押します。

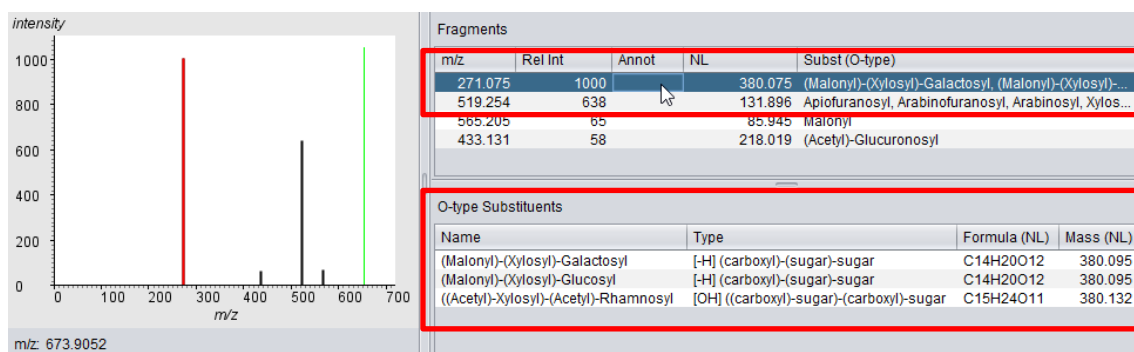


該当するアグリコン情報がなかったため、下部の表にはなにも表示されません。

Fragments テーブルの Subst (O-type)の列を見ると、既知フラボノイドで見られる置換基（秋元らの論文、Supplementary Table S8）に該当するニュートラルロスがある場合に、その情報が表示されています。

Fragments				
m/z	Rel Int	Annot	NL	Subst (O-type)
271.075	1000		380.075	(Malonyl)-(Xylosyl)-Galactosy...
519.254	638		131.896	Apiofuranosyl, Arabinofurano...
565.205	65		85.945	Malonyl
433.131	58		218.019	(Acetyl)-Glucuronosyl

Fragments テーブルの行をクリックすると、詳細情報が O-type Substituents テーブルに表示されます。

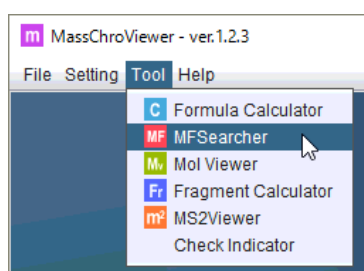


380.075 のニュートラルロスによる 271.075 のフラグメントイオンは、Malonyl と Xylosyl がヘキソース（Galactose または Glucose）についての置換基のニュートラルロス（C₁₄H₂₀O₁₂）の可能性があることが分かります。

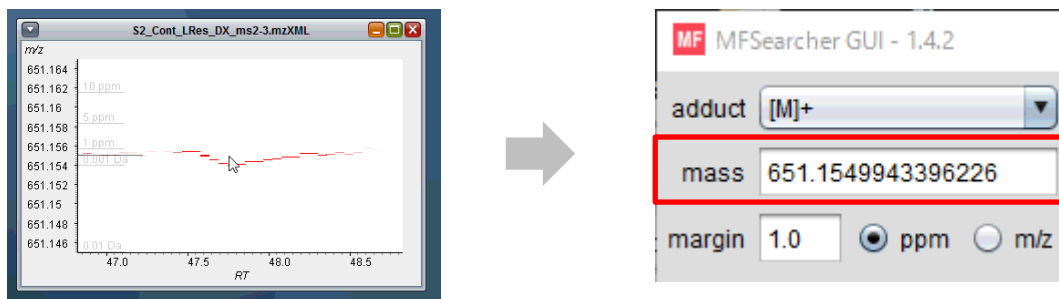
※Fragments テーブル中でクリックしたフラグメントは、スペクトルパネルで赤色で表示されます。

手順 7) アノテーションの確認

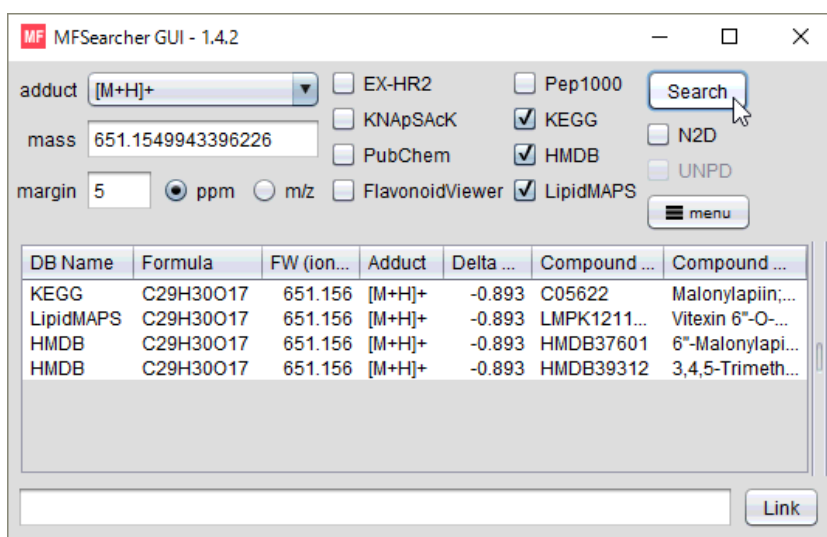
MassChroViewer で「Tool」メニューから「MFSearcher」を選択します。MFSearcher は、質量値から化合物データベースを検索できるツールです。



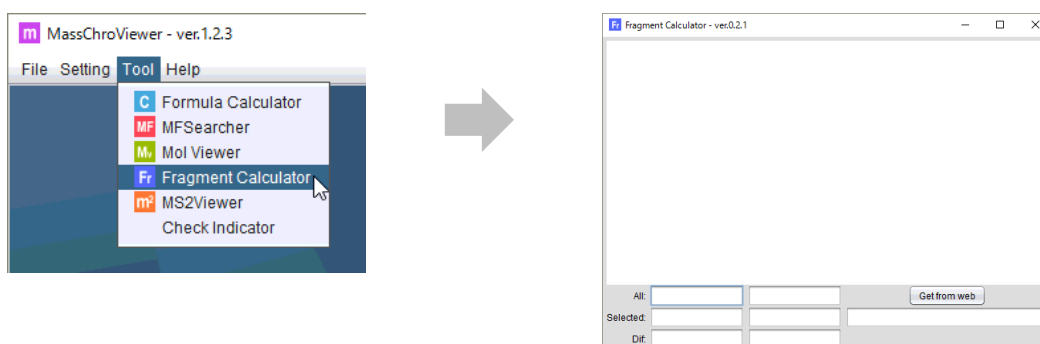
2D Window 上で、ピーク的位置をダブルクリックすると、MFSearcher の mass 欄に、クリックした場所の m/z の値が入力されます。



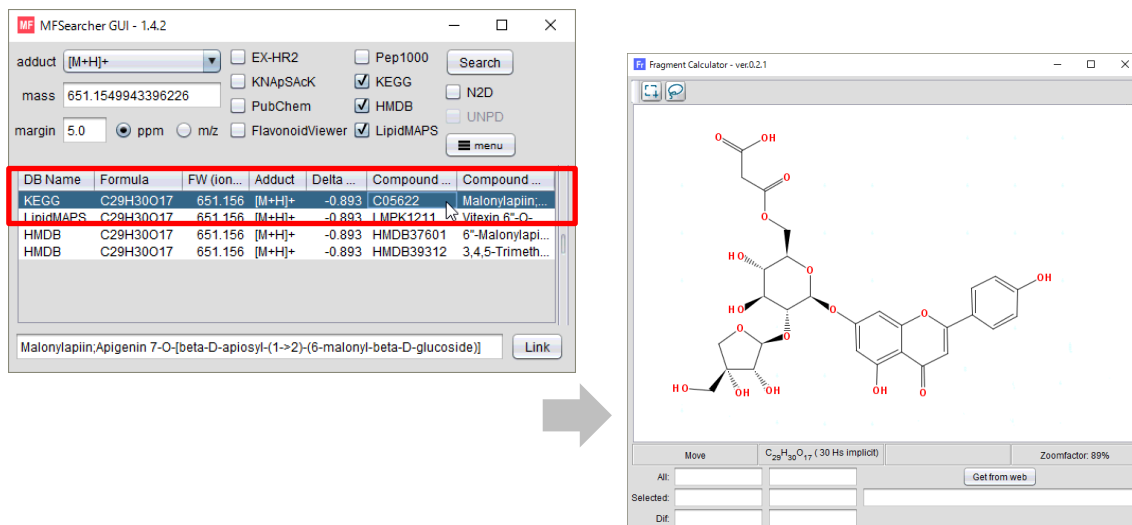
下図のように、検索条件を設定します。adduct を[M+H]⁺、margin を 5 ppm、対象データベースとして、KEGG、HMDB、LIPID MAPS などを選択します。「Search」ボタンを押すと検索が実行され、いくつかの候補が表示されます。



つぎに、MassChroViewer の「Tool」メニューから「Fragment Calculator」を選択します。

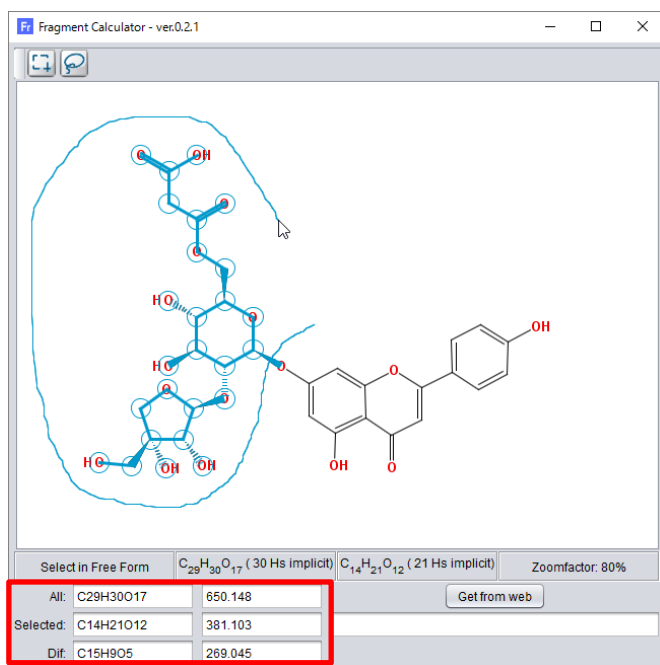


この状態で、MFSearcher の検索結果から、KEGG の C05622 を選択してください。Fragment Calculator に、構造式が表示されます。



この候補を見ると、**Apigenin** の 7 位に、手順 6 で候補として挙がっていた置換基構造が付いている様子が分かります。従って、該当ピークはこの化合物の可能性が高いと言えます。

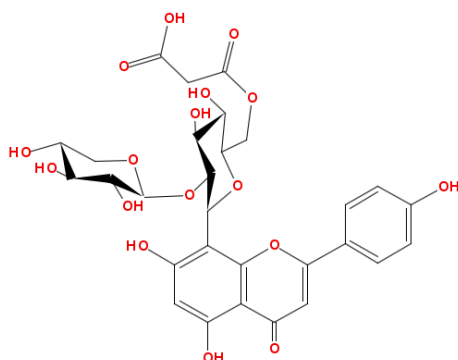
投げ縄ツールを使って構造式を囲むことで、その部分構造に含まれる組成式や質量値を確認できます。



この例の場合、囲んだ部分 (C₁₄H₂₁O₁₂, 381.103) から H が脱離した構造が、置換基候補 (C₁₄H₂₀O₁₂, 380.095) と一致していることが確認できます。

MFSearcher による質量値の検索では、Vitexin の誘導体などの候補も得られていますが、この構造は、C-配糖体のため、MS/MS フラグメントは大きく異なることが予想されます。FsTool では、これに対するヒットはありません。

DB Name	Formula	FW (ioniz...	Adduct	Delta ppm	Compou...	Compou...
KEGG	C29H30...	651.156	[M+H] ⁺	-1.038	C05622	Malonyla...
LipidMAPS	C29H30...	651.156	[M+H] ⁺	-1.038	LMPK121...	Vitexin 6"-...
HMDB	C29H30...	651.156	[M+H] ⁺	-1.038	HMDB37...	6"-Malony...
HMDB	C29H30...	651.156	[M+H] ⁺	-1.038	HMDB39...	3,4,5-Tri...



このように、FlavonoidSearch システムを利用してアグリコンの構造を判別することで、同じ組成式の異性体候補の中から、適切なフラボノイドをアノテーションすることが可能です。

お問い合わせ先

(開発元)

公益財団法人かずさ DNA 研究所

技術開発研究部 メタボロミクスチーム

櫻井望 E-mail: sakurai AT kazusa.or.jp (AT を半角@に変更してください)

公開論文

1. Akimoto, N. et al. FlavonoidSearch: A system for comprehensive flavonoid annotation by mass spectrometry. *Sci Rep* **7**, 1243 (2017).