

メタボローム解析の紹介

2016年1月27日 統合データベース講習会：AJACS薩摩（鹿児島大学医学部）



櫻井 望


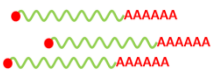

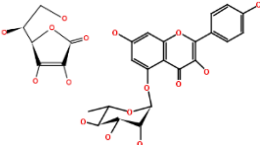
公益財団法人かずさDNA研究所
技術開発研究部
メタボロミクスチーム

メタボロミクス

代謝産物を**網羅的に**検出する技術



オーム科学：全体像をとらえる研究

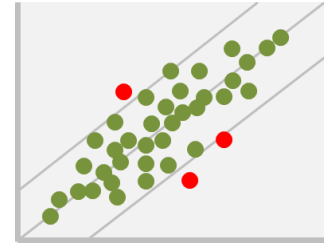
	構成要素	計測値	計測装置
ゲノム	 <p>STAACCTTA CGTTAAAGC TAGCTTTGA AACGTAGCG GATTCGAT</p> <p>遺伝子</p>	塩基配列 遺伝子注釈	DNAシーケンサ
トランスクリプトーム	 <p>mRNA</p> <p>転写</p>	転写量 塩基配列	DNAマイクロアレイ DNAシーケンサ
プロテオーム	 <p>タンパク質</p> <p>翻訳</p>	蓄積量 アミノ酸配列	二次元電気泳動 質量分析装置 (MS)
メタボローム	 <p>代謝化合物</p> <p>酵素反応</p>	蓄積量 化合物注釈 組成式 構造式	質量分析装置 (MS) 核磁気共鳴 (NMR)

メタボロームデータへの期待

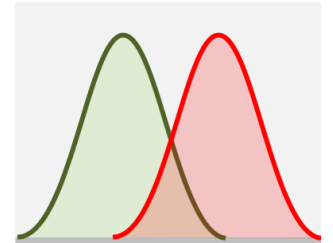
	サンプル1	サンプル2	サンプル3	...
成分1	8325	52013	26440	
成分2	5	35	26	
成分3	624	3901	1339	
成分4	5421	76548	28575	
成分5	300	2676	276	
成分6	559	6555	5852	
成分7	9589	80873	29508	
成分8	480	1145	51	
成分9	189	3018	520	
成分10	449	2298	714	
⋮				

メタボロームデータ = 成分表

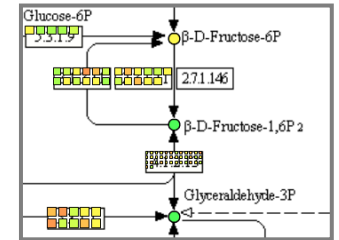
スキャッタープロット



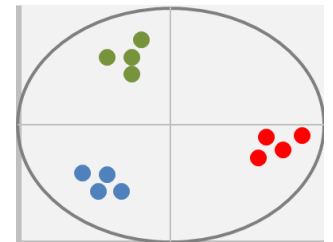
検定



代謝マップにあてはめ



多変量解析・モデル構築



遺伝子発現解析
DNAアレイ
次世代シーケンサ
と同じ

メタボロームデータの実際

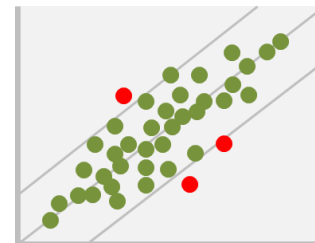
データ生産プロセス

	サンプル1	サンプル2	サンプル3	...
?	2893	39323	6074	
?	9	73	10	
成分1かも	130	1558	650	
?	2176	10138	5057	
成分2か3か4	317	3127	26	
成分5の誘導体かも	1517	3661	4617	
?	9985	35413	5006	
?	3628	8248	6357	
知りたい成分6	-	-	-	
知りたい成分7	-	-	-	
⋮				

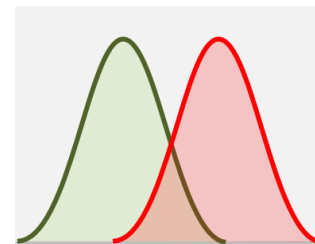
メタボロームデータ \neq 成分表

網羅性, 再現性, 定性性, 定量性

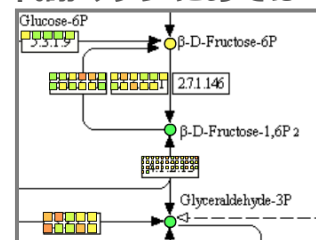
スキャッタープロット



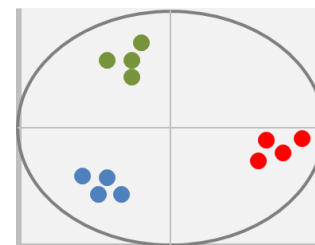
検定



代謝マップにあてはめ



多変量解析・モデル構築



内 容

一般的な話

どんな装置でデータが出ているか

網羅性、再現性、定量性（化合物の特性をふまえて）

どんなデータ処理がされているか

定性（同定）

データベース的な話

どんなことが自分でできるか

データベース検索、ウェブツール
実際のメタボロームデータに触れてみる

化合物の数

遺伝子数や既知成分数
からの推定

1生物種あたり

微生物 **数百**
酵母で600 Forster J et al (2003)

動物 **数千**
ヒトで2500 Ryals (2004)

植物 **数万**
シロイヌナズナで5000
Saito K & Matsuda F (2004)

植物界全体

~**20万**
Strack D & Dixon R (2003)

~**100万**
Afendi FM et al (2012)

化合物データベース登録数

※2015年8月現在

生物ごとのデータベース

YMDB	2,027	酵母
ECMDB	2,717	大腸菌
HMDB	41,993	ヒト ※含期待値

一般のデータベース

KEGG	16,684	
KNAPSAcK	50,899	主に植物
UNPD	229,358	天然物
DNP	272,415	天然物
PubChem	60,774,309	
CAS	101,526,536	

主に使われる検出装置

質量分析計 (MS)

- 【利点】
- 高感度
 - 他の成分分離装置（クロマトグラフィー）などと接続可能
 - 部分開裂情報（MS/MSフラグメンテーション）が分かる
- 【欠点】
- 立体構造を決定することはできない
 - 抽出操作が必要



LCQ (Thermo Fisher)

核磁気共鳴 (NMR)

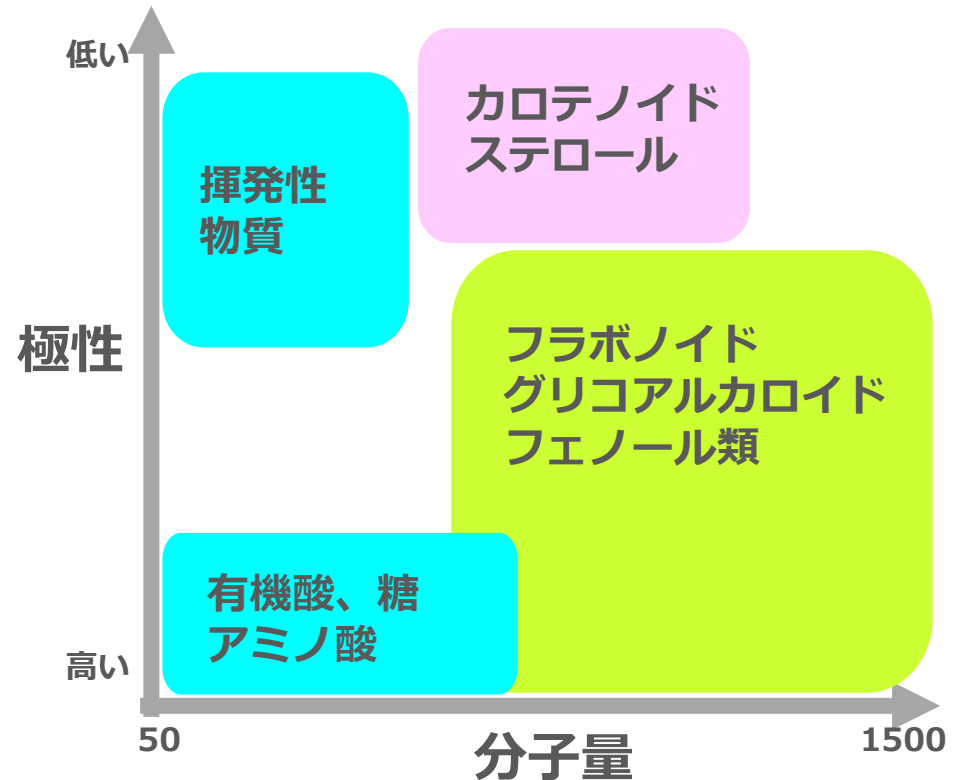
- 【利点】
- 化合物の立体構造を知ることができる
 - 抽出操作が省ける（リアルタイムで経時的変化を知ることができる）
- 【欠点】
- 感度が悪い（微量成分のシグナルは見えない）



http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/taiken/taiken_damr.htmlより

化学的性質の多様性

- 幅広い性質



- 幅広い存在量

適切な抽出や、場合によっては濃縮が必要
1 分析で全ての代謝物を測定するのは不可能

クロマトグラフィー-質量分析

gas chromatography (GC) - MS

揮発性化合物（臭い成分、テルペン類）、揮発性誘導体（糖、脂肪酸、アミノ酸など）



liquid chromatography (LC) - MS

有機化合物一般、二次代謝産物（フラボノイド類など）、サポニン、アミノ酸、脂質



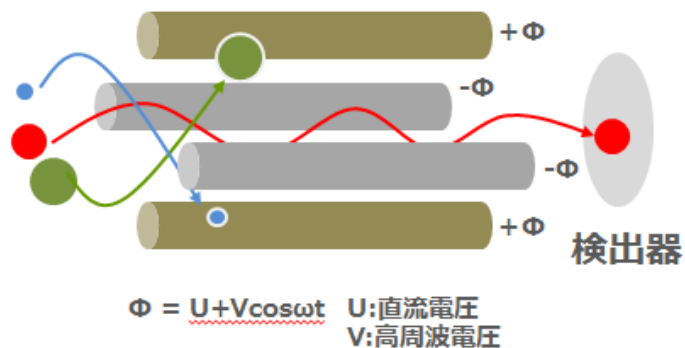
capillary electrophoresis (CE) - MS

イオン性化合物、有機酸、アミノ酸、糖リン酸など



質量分析の原理

四重極型 (Q)



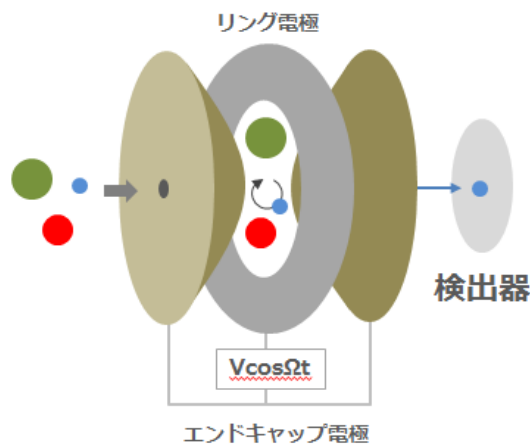
飛行時間型(TOF)

スキャンが高速。分子量に上限がない



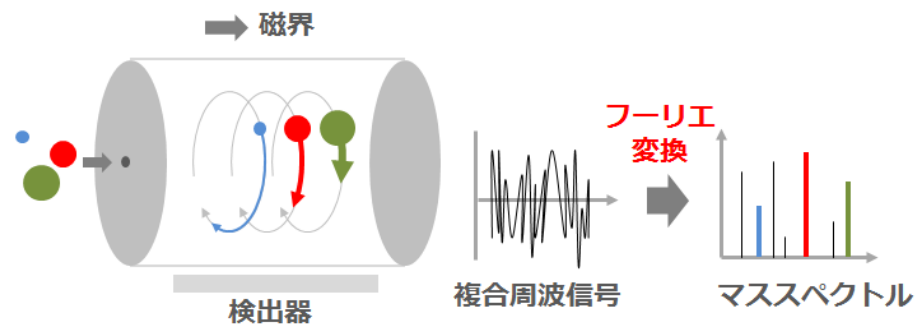
イオントラップ型 (IT)

多段階MS解析ができる



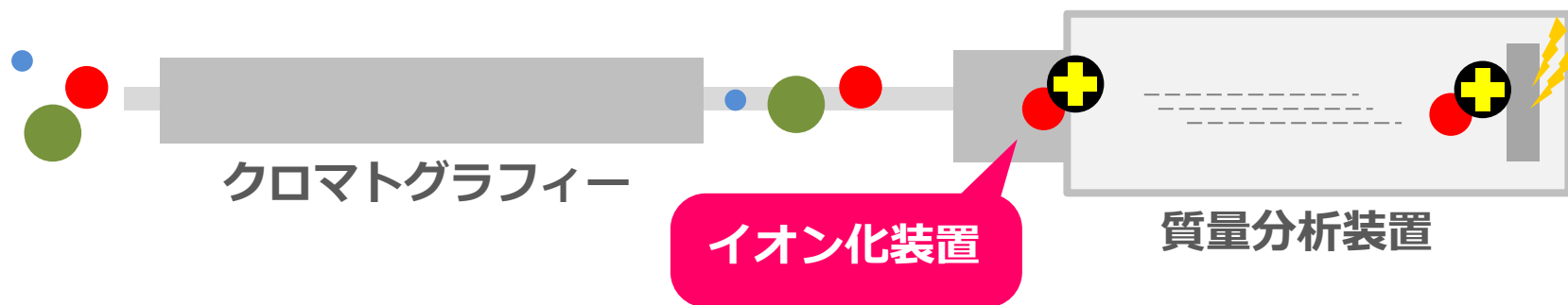
フーリエ変換型 (FT)

超精密質量が得られる



分子は荷電粒子 (イオン) として検出される 単位: 質量電荷比 (m/z)

イオン化



ハードイオン化法

- 電子イオン化 (EI)

ソフトイオン化法

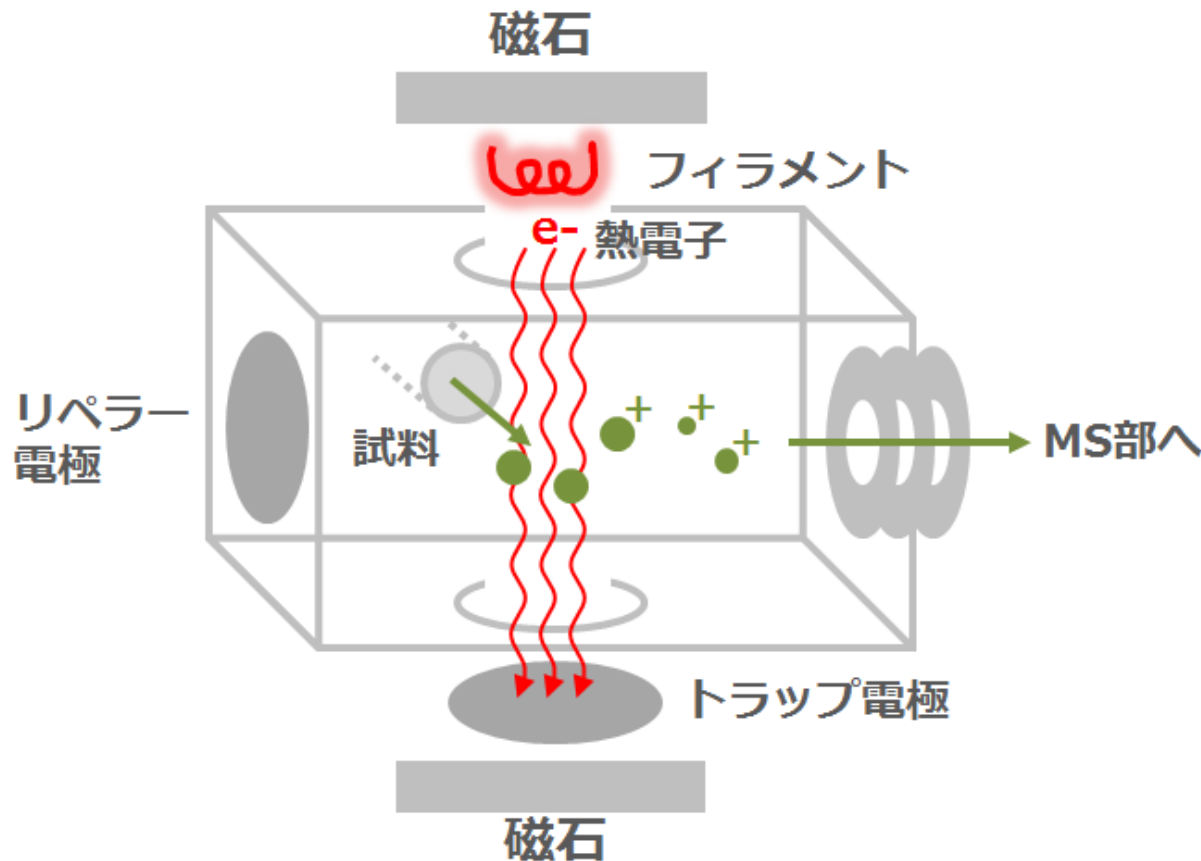
- エレクトロスプレーイオン化 (ESI)
- 大気圧化学イオン化 (APCI)
- マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) タンパク質向け

アンビエントイオン化 (紙幣の表面など、身のまわりのものを直接分析する)

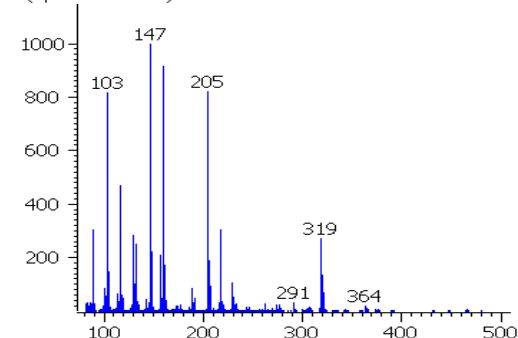
- 脱離エレクトロスプレーイオン化 (DESI)
- リアルタイム直接分析 (DART)

などなど

電子イオン化 : Electron Ionization (EI)



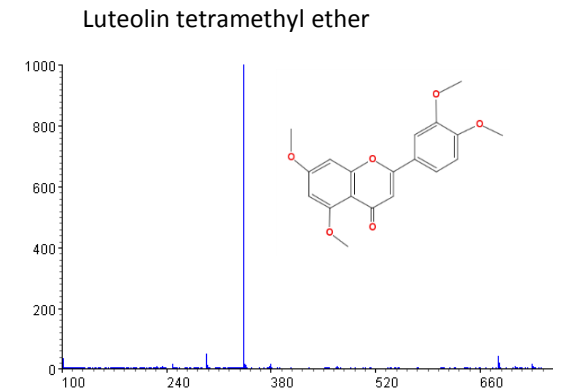
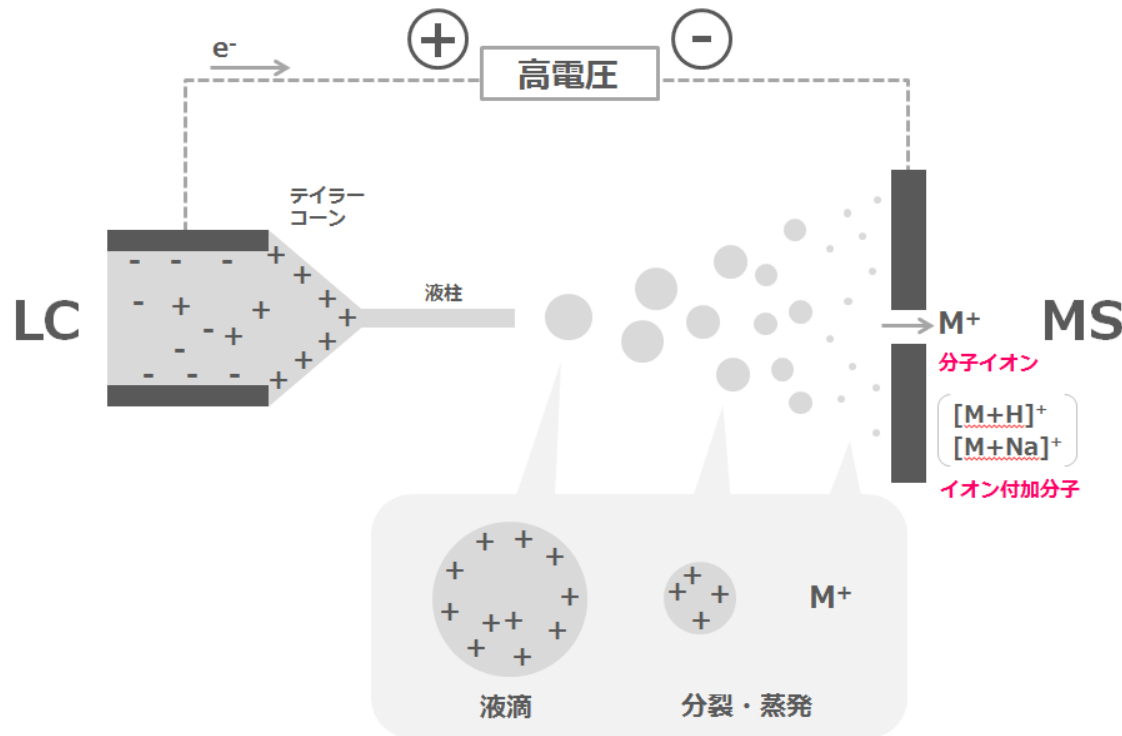
Peak True - sample "D-Glucose:1", peak 12, at 846.712 s (Spec # 12033)



EIでのマススペクトル

- GC-MSで使われる
- イオン化と同時にフラグメント化が起こる（ハードイオン化法）
- 装置によらず、化合物特有のフラグメントが生成しやすい

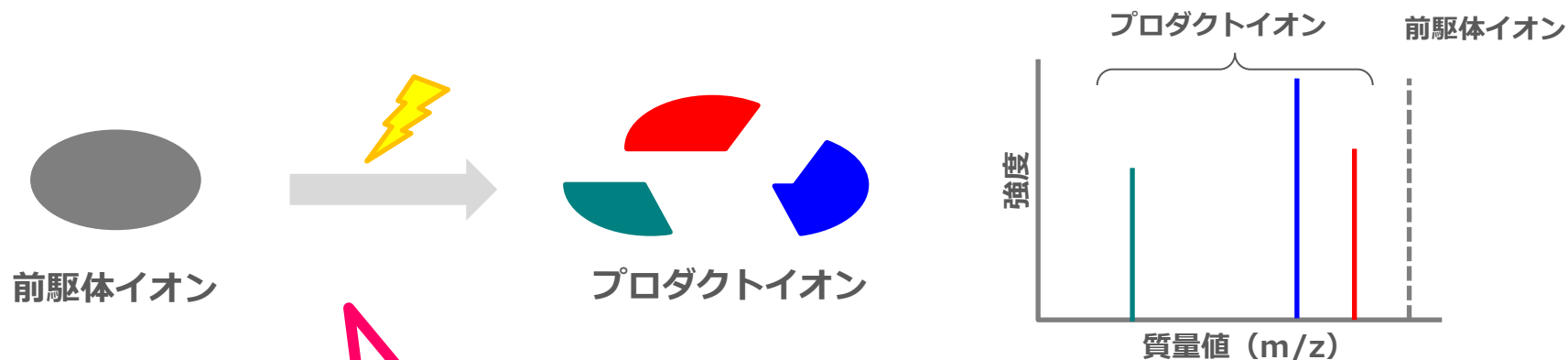
エレクトロスプレーイオン化: Electrospray Ionization (ESI)



ESIでのマスペクトル

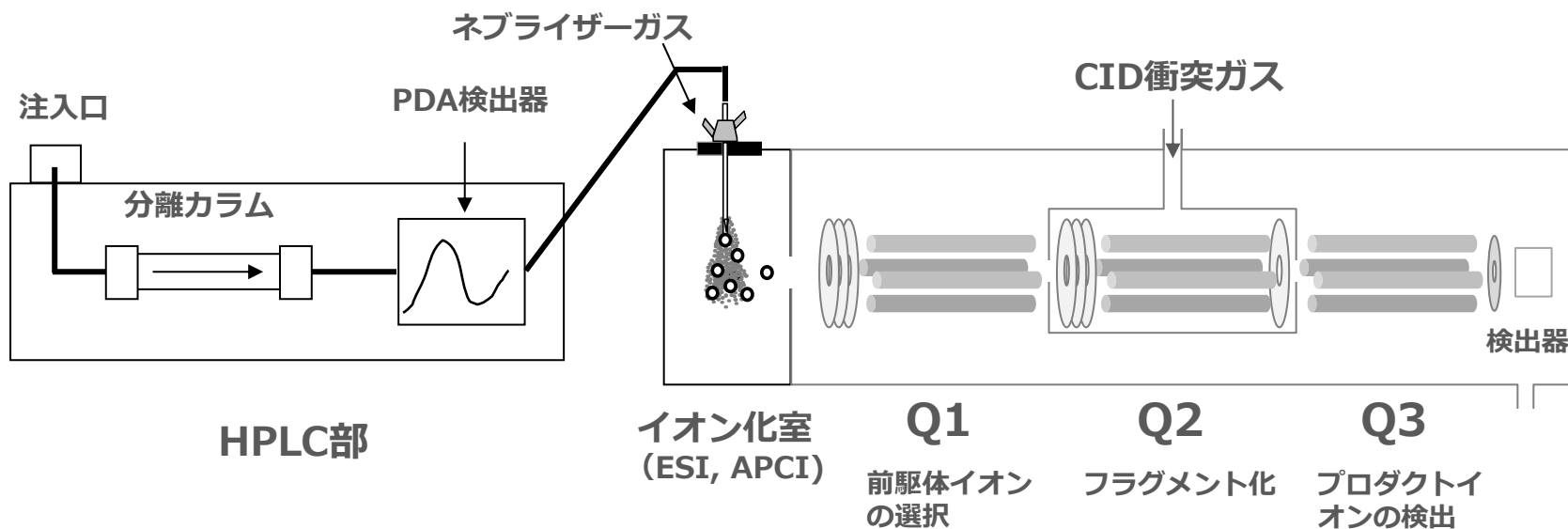
- LC-MS, CE-MSで使われる
- 分子があまりフラグメント化されずに検出される (ソフトイオン化法)
- イオン付加分子 (アダクト) が検出される
- 陽イオン検出 (Positive) と陰イオン検出 (Negative) がある
- 共溶出物がイオン化を妨げる場合がある (イオンサプレッション)

フラグメント化

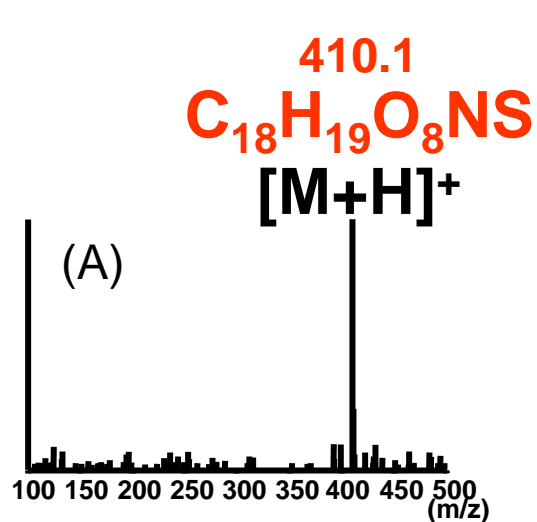


- 熱電子との相互作用
 - ・ 電子イオン化
- 不活性ガスとの衝突
 - ・ 衝突誘起解離 Collision-induced dissociation (CID)
 - ・ 高エネルギーCID (HCD)

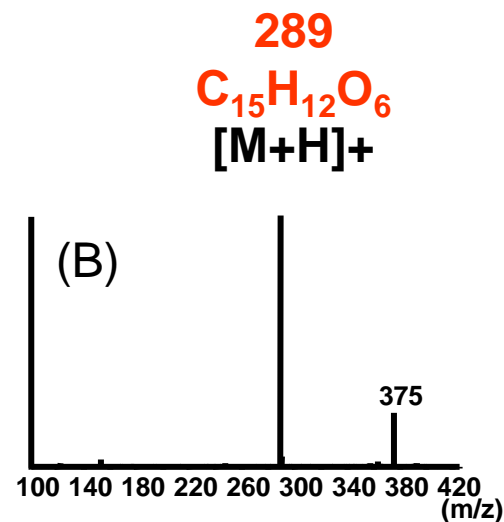
LC-MSにおけるMS/MS解析



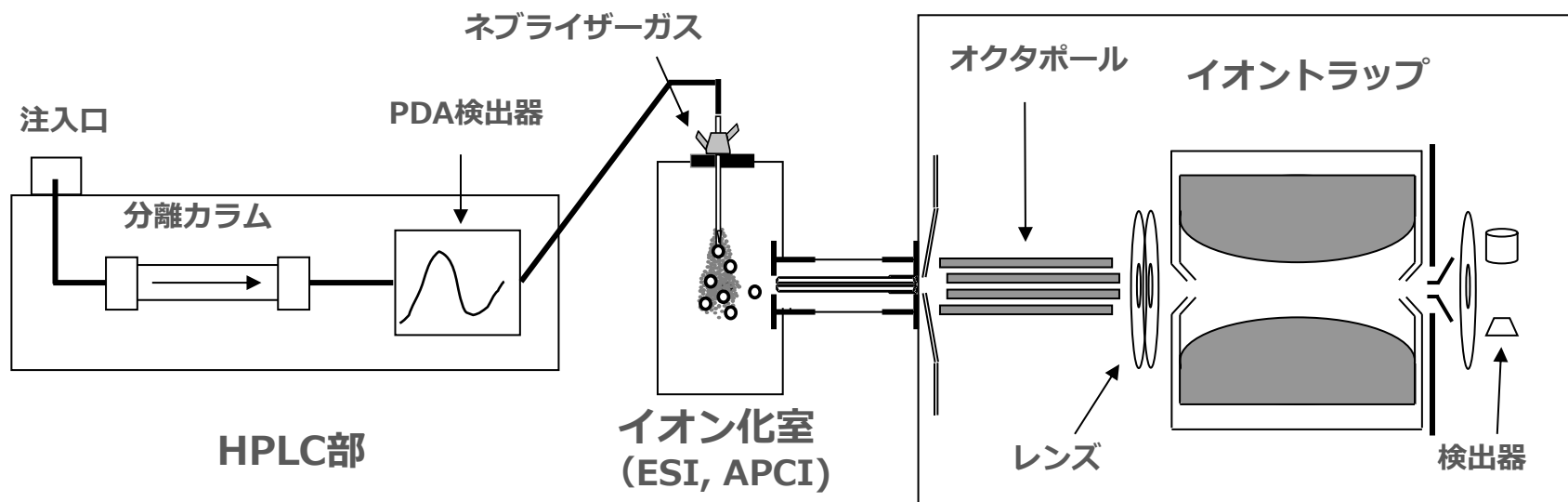
三連四重極型MS



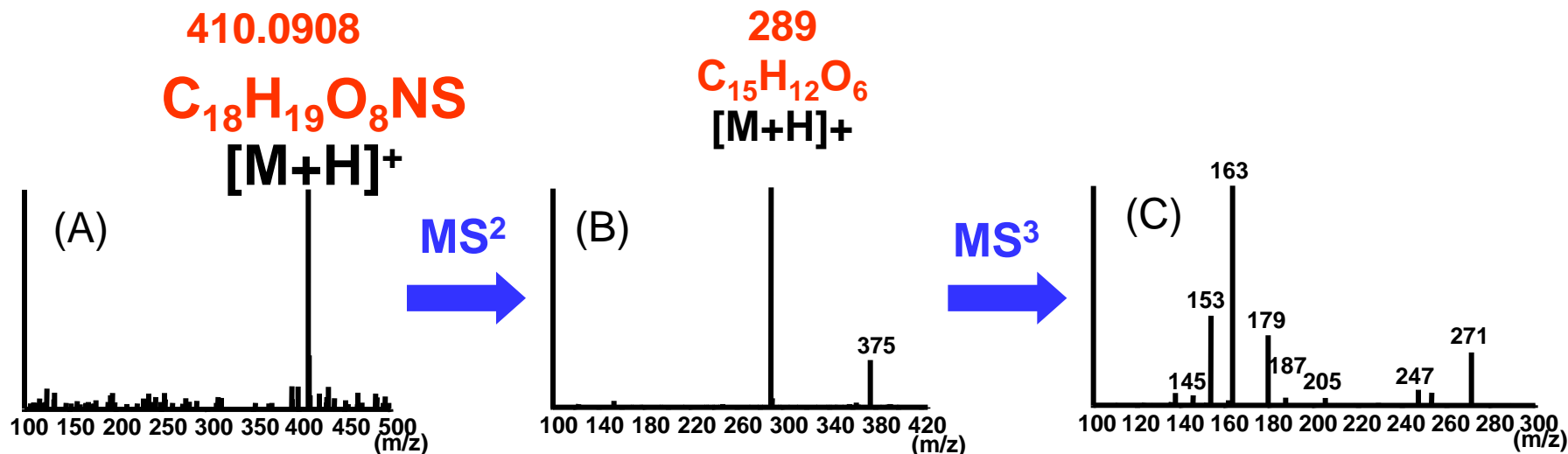
MS/MS
➡



イオントラップ型MSにおける多段階MS解析



イオントラップ型MSの例



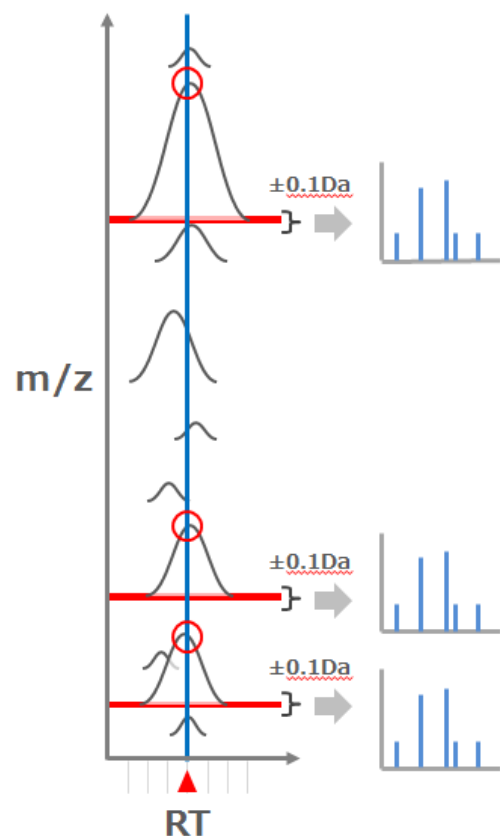
Data Independent Acquisition (DIA)

全化合物についてMS/MSを取得する技術

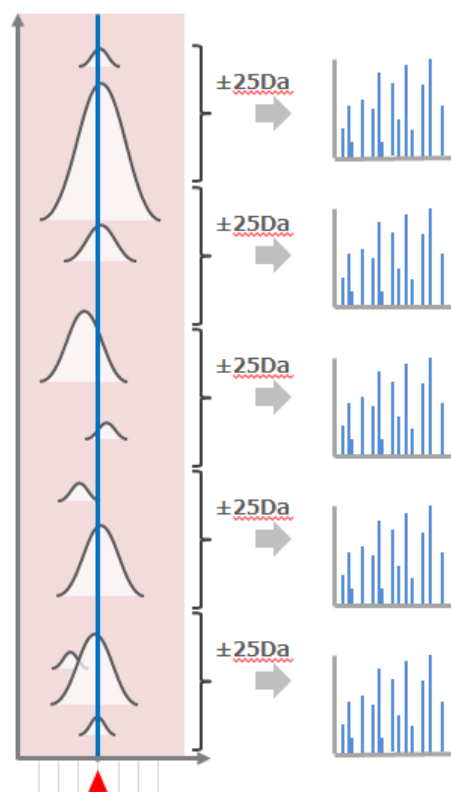
SWATH (ABSciex)

MS^E (Waters)

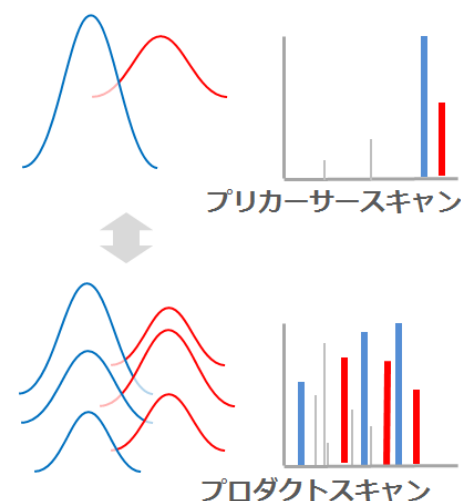
vDIA, All-ion Fragmentation (Thermo)



(従来) データ依存解析
強度が強い順にn個



データ非依存解析



小まとめ

化合物には大きな多様性がある

- 抽出・濃縮が必要
- 異なる分析技術を組み合わせる必要性

質量分析は、イオンを検出する

- イオン化されない化合物は検出できない
- 化合物によって、イオン化法を選択する必要がある
- イオンサプレッションが起こる場合がある

部分構造の質量値も得られる

- フラグメントイオンの情報が定性に使える



網羅性
再現性
定量性

内 容

一般的な話

どんな装置でデータが出ているか

網羅性、再現性、定量性（化合物の特性をふまえて）

どんなデータ処理がされているか

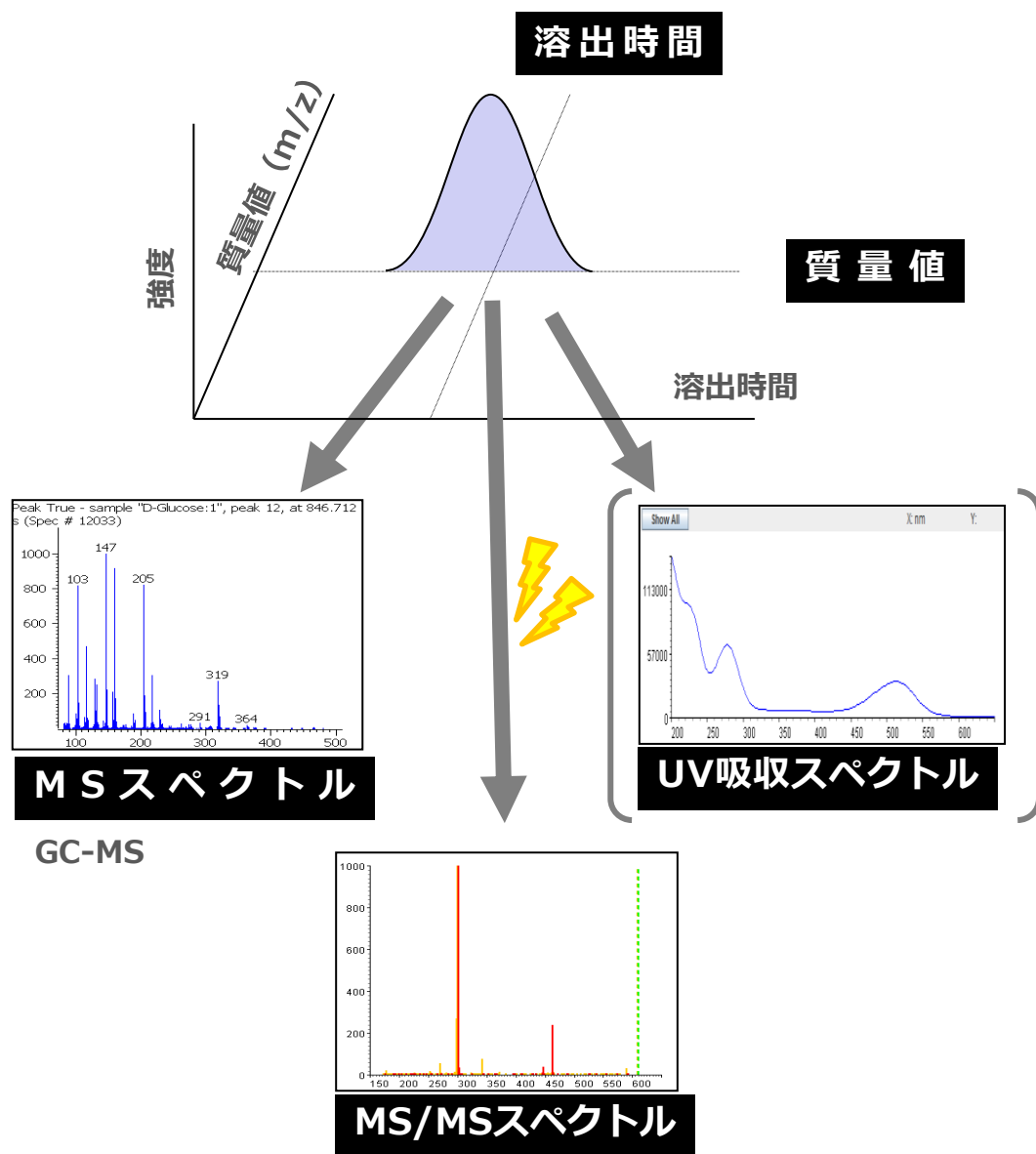
定性（同定）

データベース的な話

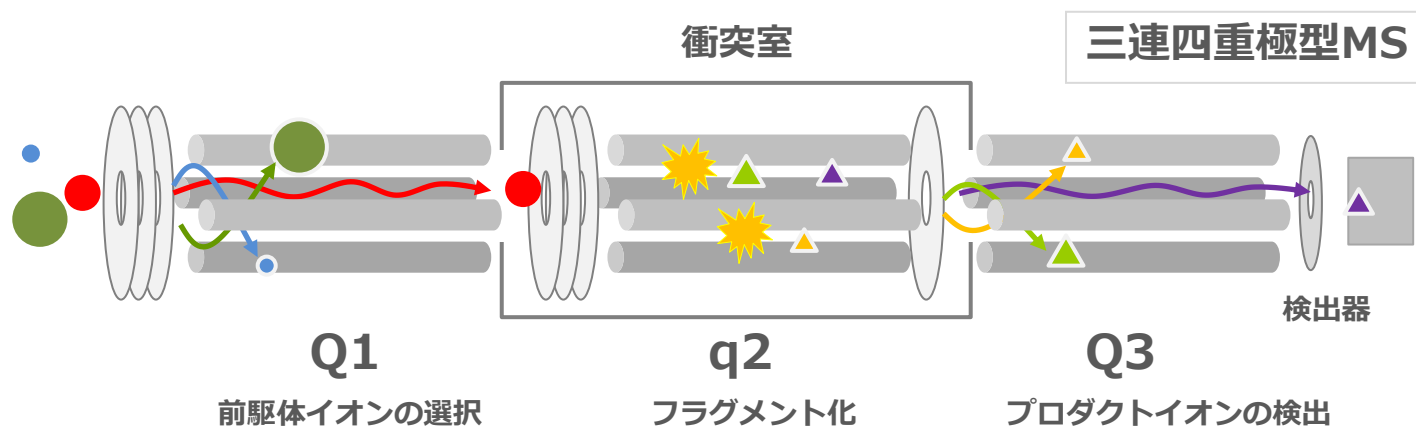
どんなことが自分でできるか

データベース検索、ウェブツール
実際のメタボロームデータに触れてみる

質量分析における化合物の同定



Multiple Reaction Monitoring (MRM)



Q1とQ3の二段階の選抜により、特異的かつ高感度に特定の化合物を検出する方法

標品を測定することにより、Q1で選択する m/z と、Q3で検出する m/z の最適な組み合わせ（MRMトランジション）を決めることができる。トランジションを適用する溶出時間範囲を限定することも可能。一分析で多数の化合物を検出することができる。



ワイドターゲットメタボロミクス

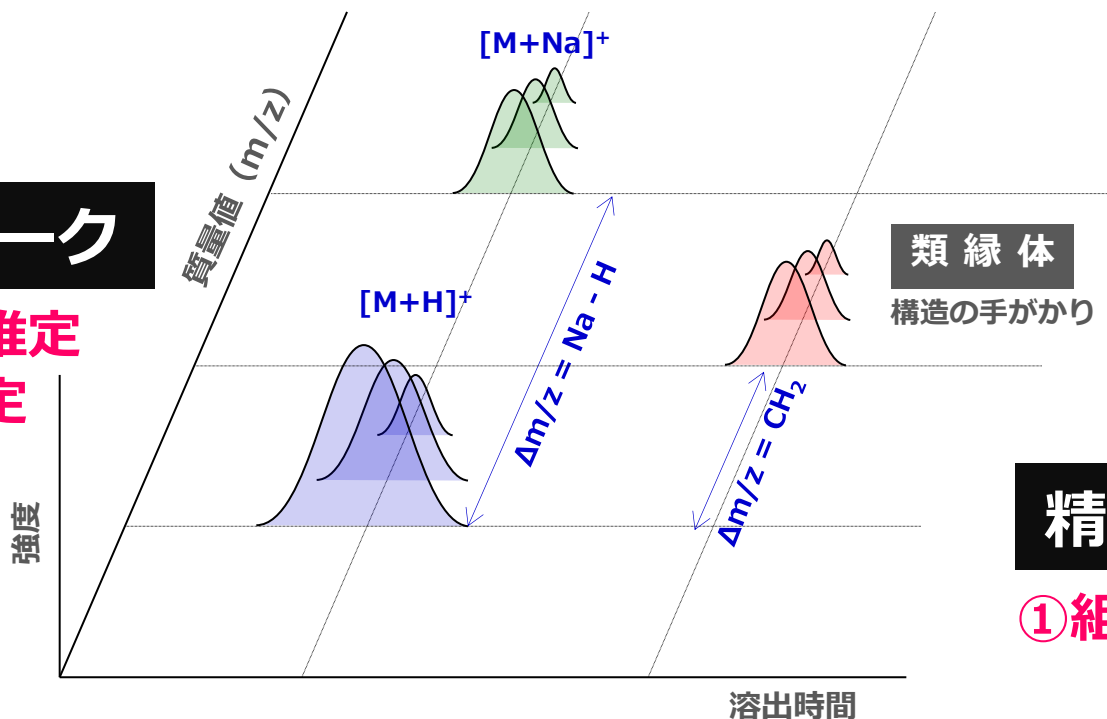
LC-MSでの化合物推定に役立つ情報

質量差分

④アダクトの判定

同位体ピーク

- ②炭素数の推定
- ③価数の判定



精密質量値

①組成式の推定

①精密質量による組成式の推定



www.thermofisher.com



www.bruker.com



sciex.com



www.waters.com



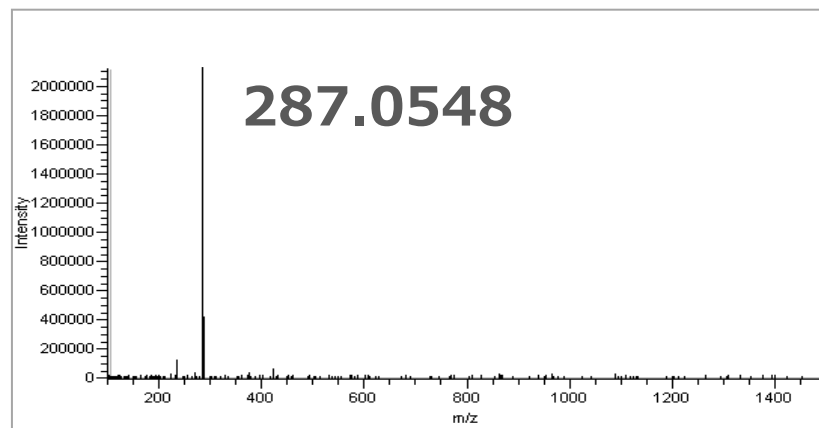
www.agilent.com

FT/ICR-MS (Orbitrap-MS)
フーリエ変換イオンサイクロトロン
共鳴型

質量精度: ~1 ppm

TOF-MS
飛行時間型

2~10 ppm



MSスペクトル

元素	精密質量
^{12}C	12(定義)
^1H	01.007825
^{16}O	15.994915
^{14}N	14.003074
^{31}P	30.973763
^{32}S	31.972071

287.0548

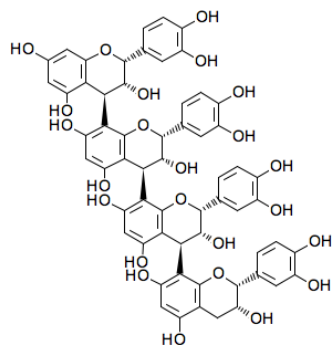


候補組成式	質量理論値 ([M+H] ⁺)	質量差 (Δppm)
$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	287.05501	-0.75
$\text{C}_{16}\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_2$	287.05635	5.41
$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_8$	287.05099	13.27
$\text{C}_{21}\text{H}_6\text{N}_2$	287.06037	19.42
$\text{C}_{22}\text{H}_6\text{O}_1$	287.04914	19.71
$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_7$	287.06223	25.87

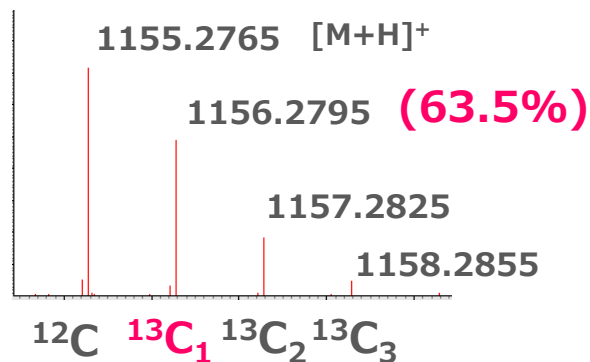
※ppm: ある質量範囲の質量値に対する100万分率
分子量1000の場合、1 ppmの誤差は、
 $1,000 \times 1 \text{ (ppm)} / 1,000,000 = 0.001 \text{ Da}$

② ^{13}C 安定同位体ピーク

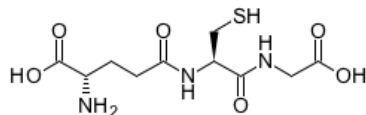
$^{13}\text{C}_1/^{12}\text{C}$ ピーク強度比から、構造中の炭素の数が推定できる



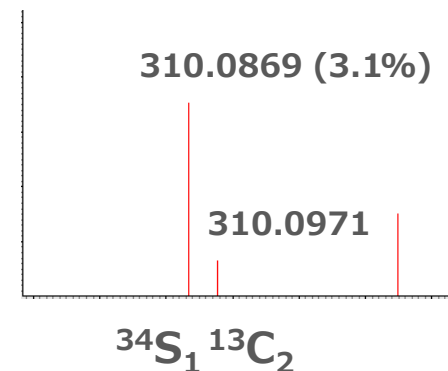
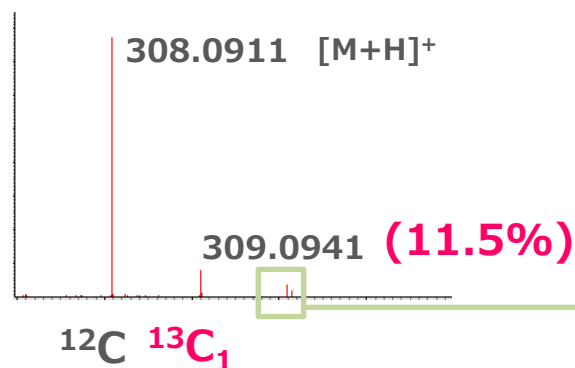
エピカテキン四量体
 $\text{C}_{60}\text{H}_{50}\text{O}_{24}$



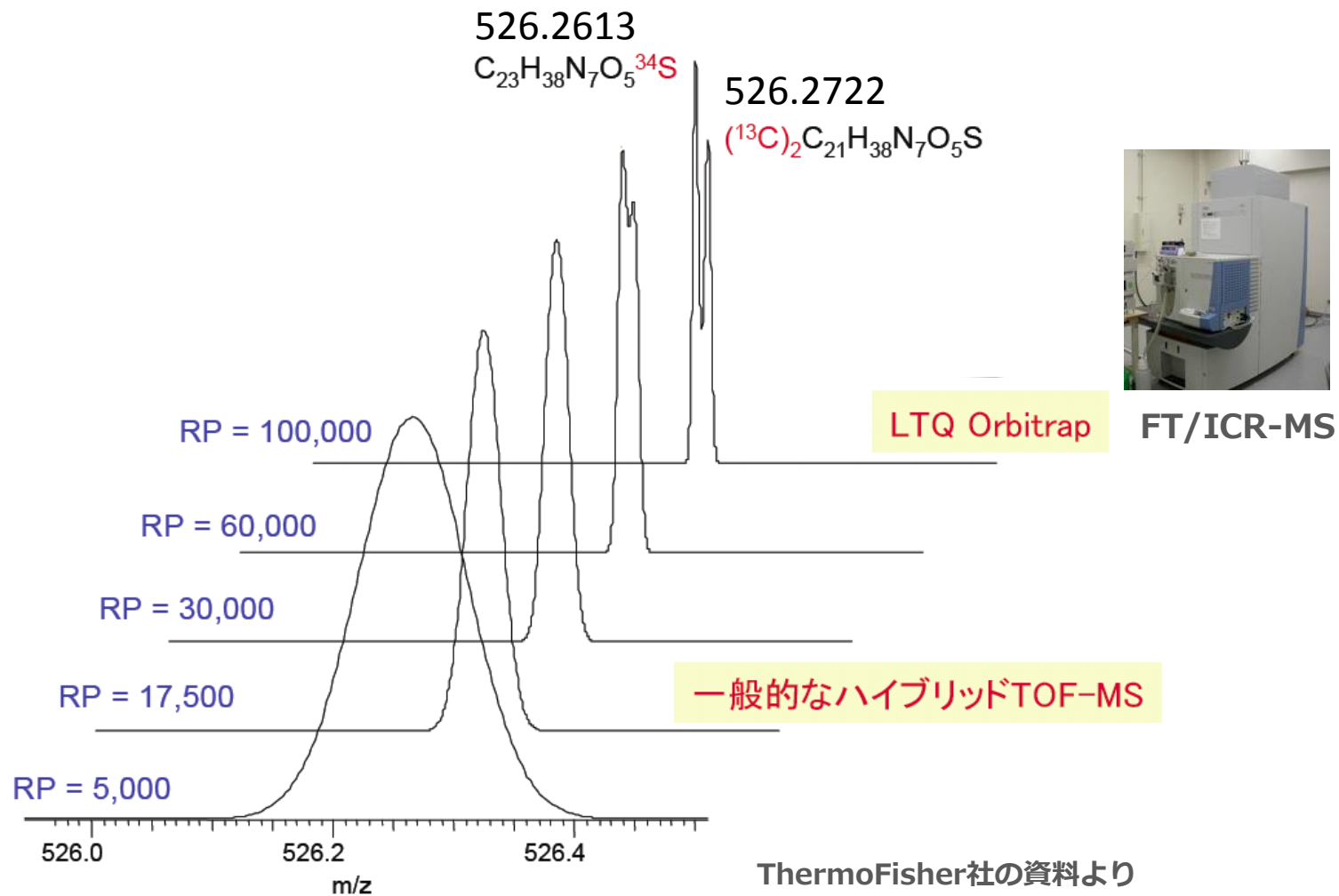
安定同位体	精密質量	天然存在比率
^{12}C	12	98.9%
^{13}C	13.0034	1.1%
^{32}S	31.9721	95.0%
^{34}S	33.9679	4.2%
^{14}N	14.0031	99.6%
^{15}N	15.0001	0.4%



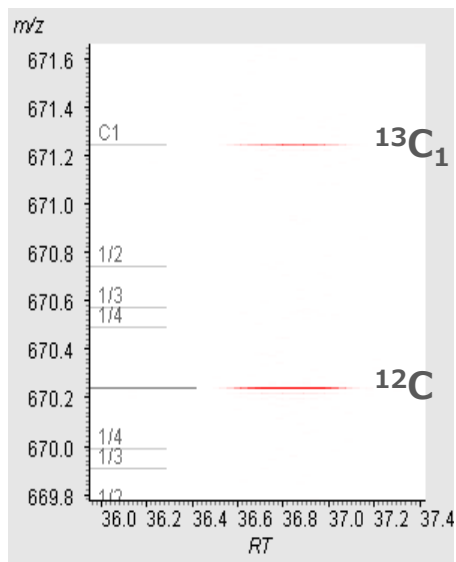
グルタチオン
 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$



MSの分解能

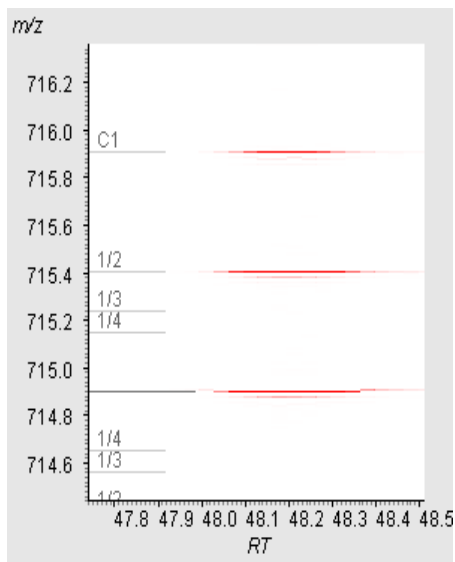


③価数の判定



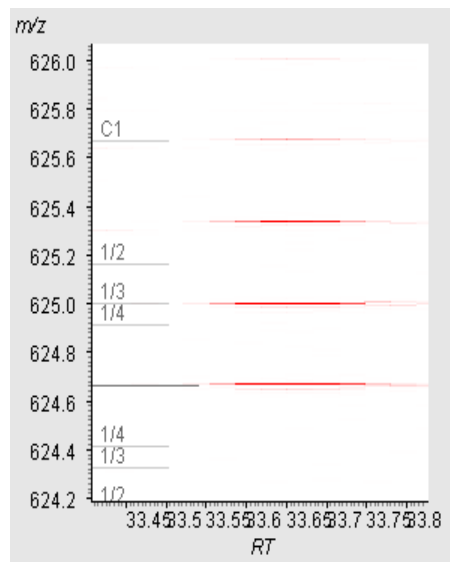
1 価

例) $[M+H]^+$



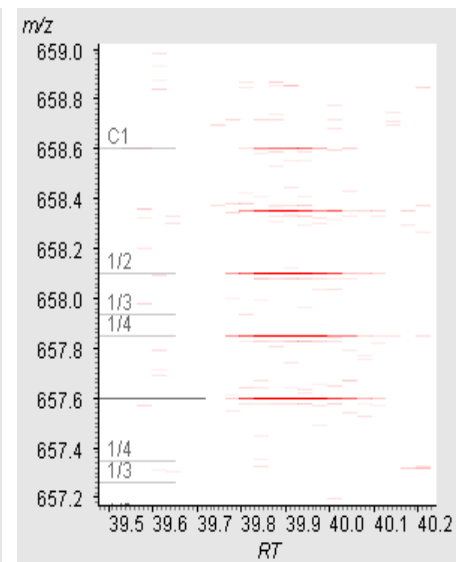
2 価

例) $[M+2H]^{2+}$



3 価

例) $[M+3H]^{3+}$



4 価

例) $[M+4H]^{4+}$

原因

例) $M = 600$ の分子が
2価として検出されると

$$^{12}\text{C}: [M+2H]^{2+} = 301$$

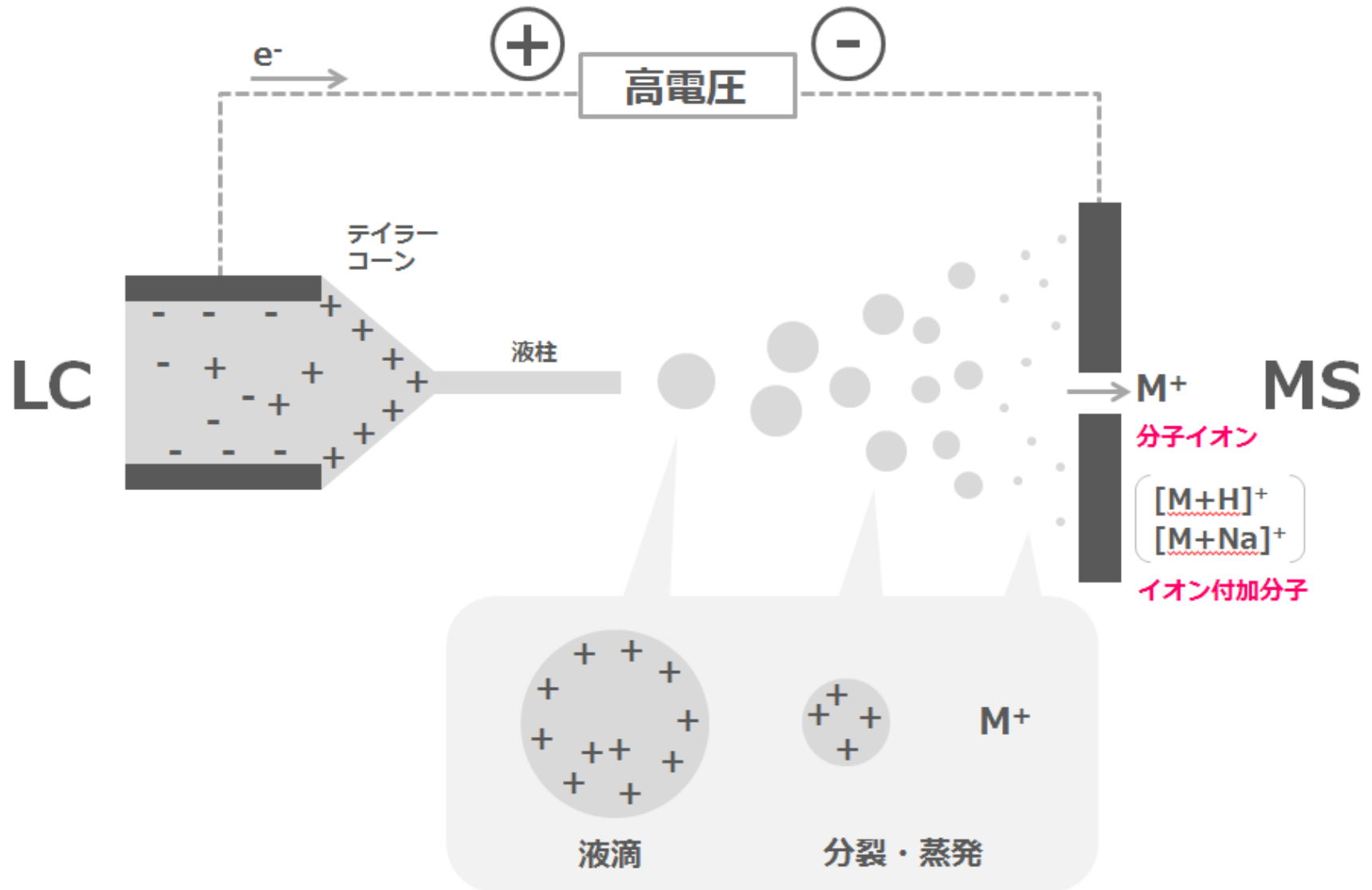
$$^{13}\text{C}_1: [M+2H]^{2+} = 301.5$$

$$^{12}\text{C}: M+2H = 602$$

$$^{13}\text{C}_1: M+2H = 603$$

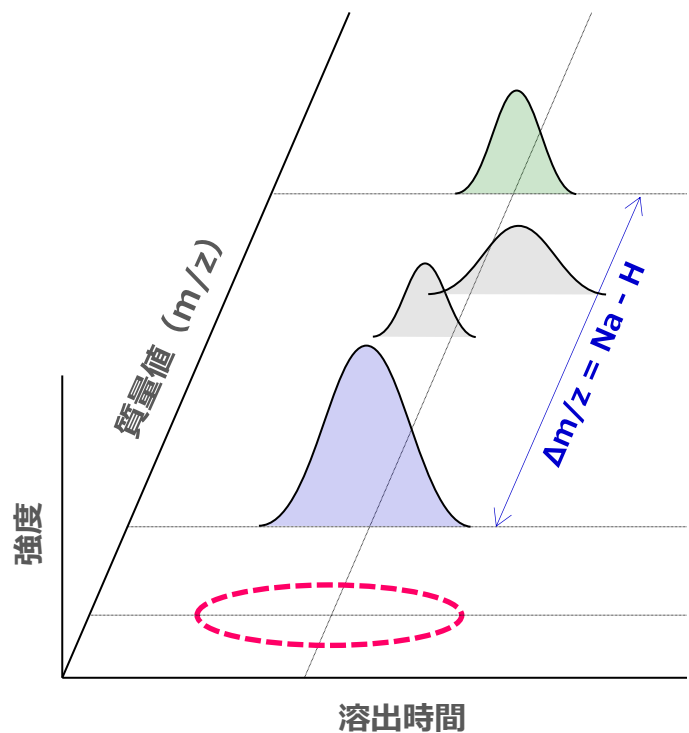
m/z (質量電荷比)

エレクトロスプレーイオン化: Electrospray Ionization (ESI)



④アダクト（イオン付加分子）の判別

同じ時間に同じ消長で観測されたピーク間の質量差分から判別



$[M+Na]^+$

Naの質量を引き
電子の質量を加える

$[M+H]^+$

Hの質量を引き
電子の質量を加える

M

データベース検索では、観測されたイオンの質量値から中性分子Mの質量を計算して検索する

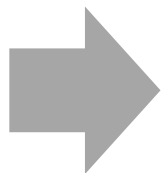
小まとめ

質量分析による化合物の同定

標品との比較が必要

化合物を推定するための手がかりが得られる

- 組成式候補
- 炭素の数、硫黄原子の有無
- 価数
- アダクト
- フラグメントのスペクトル



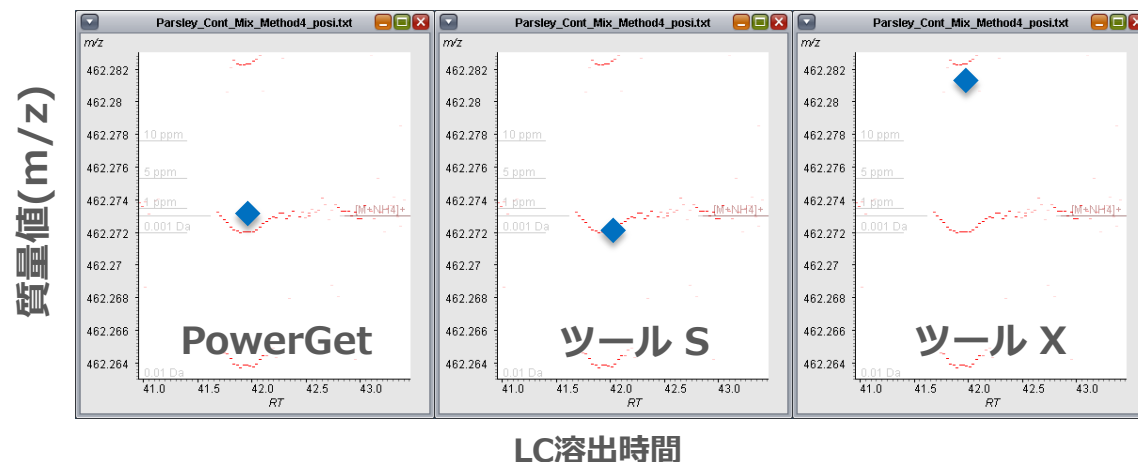
メタボロームデータ

- ・ 標品との比較結果（～数百）
- ・ 上記手がかりからの推定結果

	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	...
?	2893	39323	6074	
?	9	73	10	
成分 1 かも	130	1558	650	
?	2176	10138	5057	
成分 2 か 3 か 4	317	3127	26	
成分 5 の誘導体かも	1517	3661	4617	
?	9985	35413	5006	
?	3628	8248	6357	
知りたい成分 6	-	-	-	
知りたい成分 7	-	-	-	
⋮				

PowerGet (宣伝)

精密質量の正確な評価

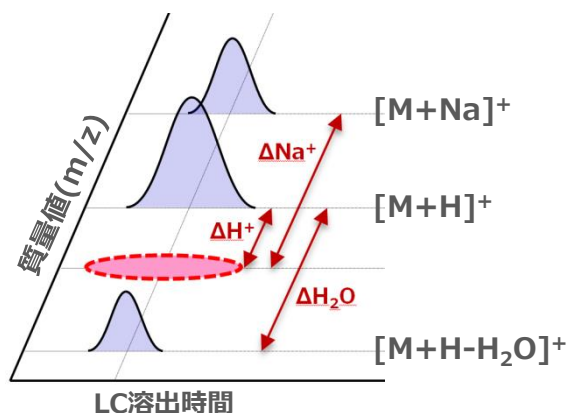


Sakurai et al. (2014)
BioMed Res Int 2014: 1-11

5 ppm

各ソフトで評価された
ピークの質量値

アダクト・多価イオンの正確な判定



高速な組成式推定



Sakurai et al. (2012)
Bioinformatics

正確なピーク抽出・アダクトの判定による組成式推定

内 容

一般的な話

どんな装置でデータが出ているか

網羅性、再現性、定量性（化合物の特性をふまえて）

どんなデータ処理がされているか

定性（同定）

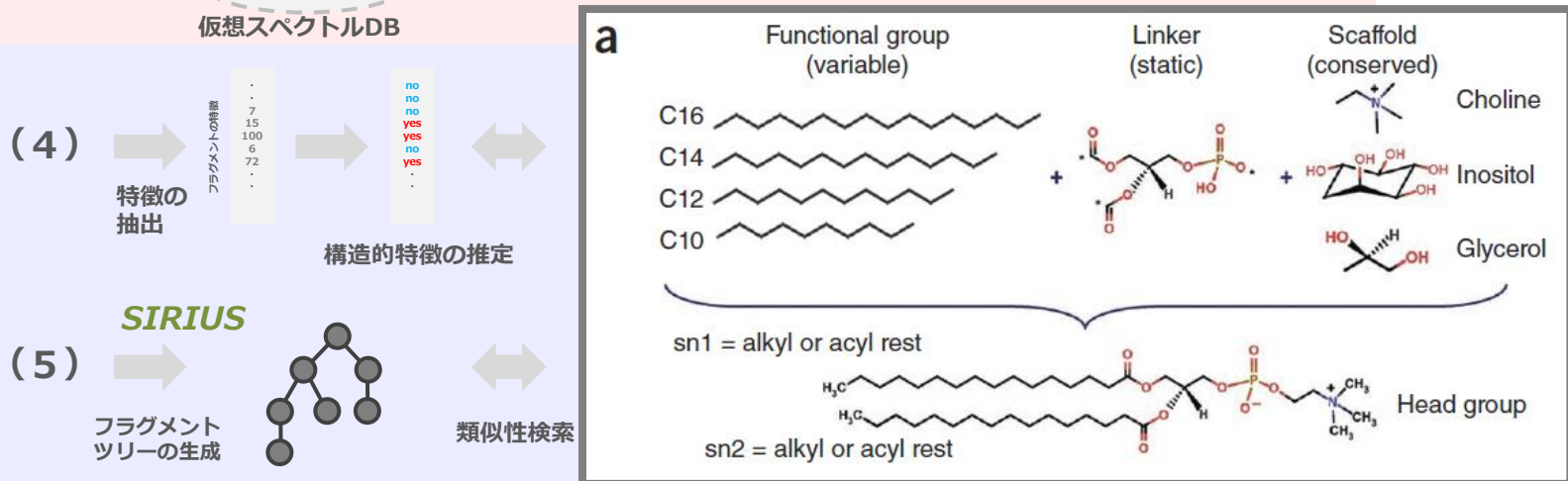
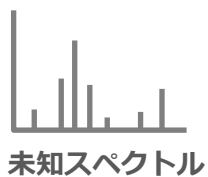
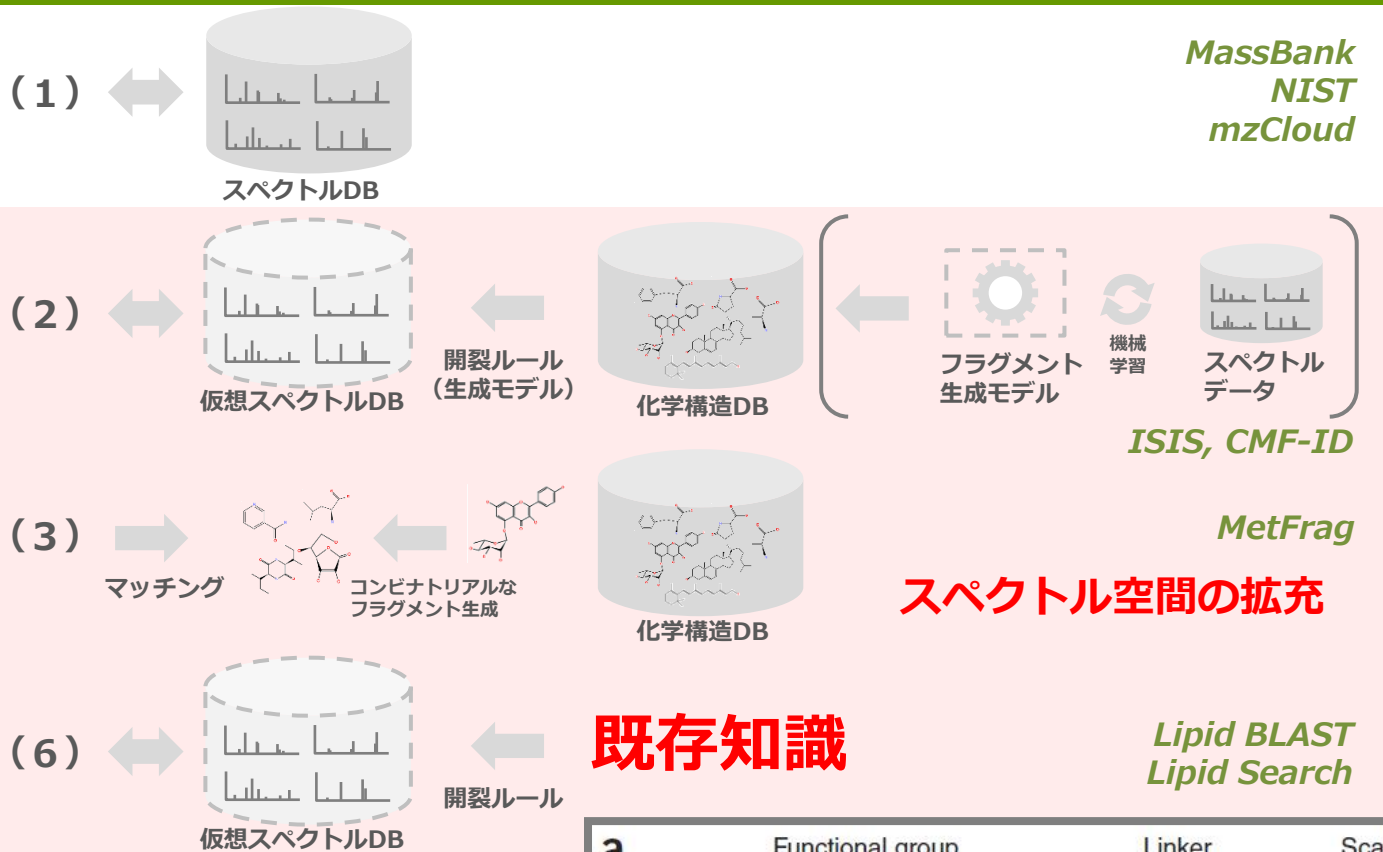
データベース的な話

どんなことが自分でできるか

データベース検索、ウェブツール
実際のメタボロームデータに触れてみる

実習

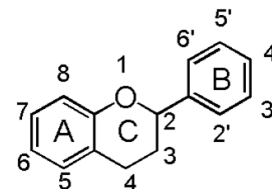
MS/MSスペクトル自動解読の戦略



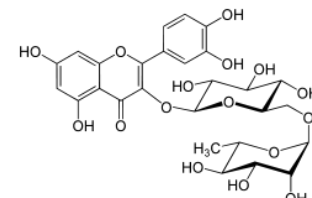
フラボノイドの推定（宣伝）

フラボノイド 茶カテキン、ポリフェノール、大豆イソフラボンなど

- 天然には～7000種類が存在
- 糖鎖の位置などが異なる構造異性体が多い



フラボノイド基本骨格

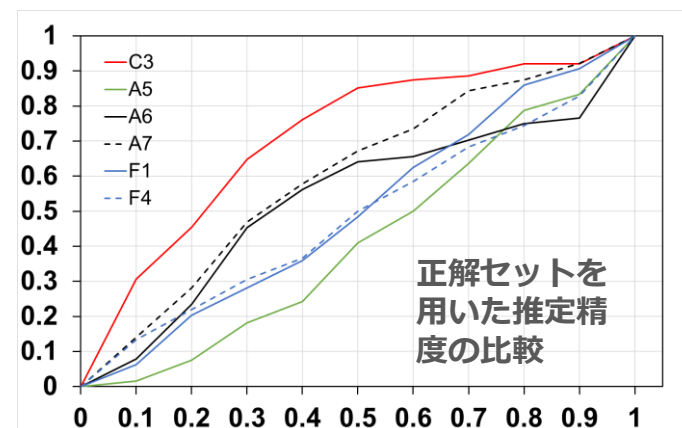


配糖体の例：ルチン

FlavonoidSearch

- 1) 143種類の標品を質量分析(MS/MS解析)
- 2) 基本骨格の開裂のしかたをルール化 **(経験知)**
- 3) 約7000種類の既知構造に、そのルールを適用
- 4) 出現するMS/MSフラグメントを予測しデータベース化

FlavonoidSearch
FingerID
CFM-ID (jaccard)
(DotProduct)
MetFrag (renumber)
MetFrag (localSDF / renumber)



既存ツール以上の予測精度

網羅的なフラボノイド解析（フラボノーム）が可能に



"KNApSack" Family

Since 2008.07



KNApSack Metabolomics



3D

Since 2012.11



Core System

Since 2004.04



Search Engine

Since 2008.12

Pocket Search for Functional Species

Food & Health



YAKUZEN

薬膳データベース

Since 2015.09



Lunch Box

食用データベース

Since 2008.07



DietNavi

病気予防データベース

Since 2012.11



FoodProcessor

加工食品データベース

Since 2012.11



DietDish

食べ合わせデータベース

Since 2014.04



MARCHE

旬データベース

Crude Drug



WorldMap

世界の薬用植物データベース

Since 2009.06



KAMPO

漢方薬、生薬データベース

Since 2008.08



JAMU

IndonesiaHerbデータベース

Since 2009.11



Tea Pot

ハーブデータベース

Since 2011.08

Biology



Metabolite Ecology

Distribution

Since 2015.02



Biological Activity

Natural Activity

Since 2011.08



Biological Activity

Metabolite Activity

Since 2013.01



Skewered KNApSack

串刺し検索

Since 2010.10

Picnic

Gene Annotation



Arabidopsis

Since 2008.04



Bacillus

Since 2008.05



Human

Since 2009.03

Strap

Correlation Coefficient



Arabidopsis

Since 2009.08



Bacillus

Pickaxe

Metalloprotein Database



MetalMine

Since 2009.08



Motorcycle

Metabolic Pathway

代謝データベース

Since 2011.08



Bicycle

Algae Metabolic Pathway

代謝データベース

Since 2013.09

まとめ

- いろいろ制限はあるが、背景をおさえればデータを生かせる
- DBやツールは、こなれていない部分も多い

「こういうことがしたい！」
というフィードバックを是非お寄せください

参考： 化合物データベース

KEGG	www.genome.jp/kegg/	京大、金久研がつくるデータベース。ゲノム、遺伝子、タンパク質、パスウェイが統合されている。
KNAPSAcK	kanaya.naist.jp/KNAPSAcK/	奈良先端大、金谷研がつくる、天然物-生物情報を軸とした情報データベース。しっかりした文献情報に基づくのが特徴
DNP	dnp.chemnetbase.com/	CRC出版の天然物のデータベース。詳細を見るには有料
UNPD	pkuxxj.pku.edu.cn/UNPD/	北京大学がつくる天然物のデータベース。件数が多いが出典が不明なものも。
ChEBI	www.ebi.ac.uk/chebi/	欧州バイオインフォマティクス研究所（EBI）がつくる化合物分類データベース。化学寄り。
PubChem	pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	米国NHIがつくる化合物データベース。合成物質なども含み登録件数が多い。
ChemSpider	www.chemspider.com/	400を超える化合物データベースを串刺し検索できるサイト。データの更新が遅め。
HMDB	www.hmdb.ca/	カナダ、アルバータ大がつくるヒトのメタボロームデータベース
ECMDB	www.ecmdb.ca/	同、E. coliのメタボロームデータベース
YMDB	www.ymdb.ca/	同、酵母のメタボロームデータベース
DrugBank	www.drugbank.ca/	同、薬物のデータベース
LIPIDMAPS	www.lipidmaps.org/	脂質のデータベース。ポリフェノール類なども含む。
Flavonoid Viewer	metabolomics.jp/wiki/Category:FL	フラボノイドのデータベース。

参考： 解析ツール

MS/MS解析

MassBank	www.massbank.jp/	実測のMSnスペクトルのデータベース
mzCloud	www.mzcloud.org/	Thermo社が自社のMSで取得したスペクトルのデータベース
METLIN	metlin.scripps.edu/	MSnスペクトルのデータベース
MetFrag	msbi.ipb-halle.de/MetFrag/	MS2から化合物を予測するツール
CFM-ID	cfmid.wishartlab.com/	MS2から化合物を予測するツール
FingerID	research.ics.aalto.fi/kepaco/fingerid/	MS2から化合物を予測するツール
MAGMa	www.emetabolomics.org/	多段階MSから化合物を予測するツール
Sirius	http://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/	同位体パターンと多段階MSから組成式を正確に予測するツール

ポータルサイト・情報

KOMICS	www.kazusa.or.jp/komics/ja/	かずさ研のツール・データベースポータル
PRIME	prime.psc.riken.jp/	理研のツール・データベースポータル
OmicsTools	omictools.com/	いろんなオミクス関係のツール、データベースを紹介するポータル
Fiehn-Lab	fiehnlab.ucdavis.edu/	UC DavisのO. Fiehnのラボページ。有用な情報が多数。
ESI友の会	sites.google.com/site/esitomonokai/home	日本の若手メタボロミクス研究者がつくる情報発信サイト

参考： レポジトリ

実際に分析した質量分析データの公開

MassBase	webs2.kazusa.or.jp/massbase/	かずさ研の生データ公開サイト。公開数最大級
MetaboLights	www.ebi.ac.uk/metabolights/	EUが作るレポジトリ。標準化を目指している
Metabolome Express	www.metabolome-express.org/	オーストラリアのサイト。GC-MS中心
Metabolomics Workbench	www.metabolomicsworkbench.org/	米国NIHの。ヒトデータ中心。未公開データも多数
MetabolomeX change	metabolomexchange.org/	クロス検索サイト。MetaboLights, Metabolomics Workbenchなどが探せる

実習1 データのダウンロード

実習で使うファイルのダウンロードをお願いします

<http://webs2.kazusa.or.jp/sakura/ajacs58/>

※アクセスPWはお手元の配布資料に

AJACS薩摩

資料

[Download](#)

metabolome_files.zip (47.4 MB)

実習で使うファイル

ダウンロードファイルの内容

解析ソフト

Ms2Viewer_0.6.1

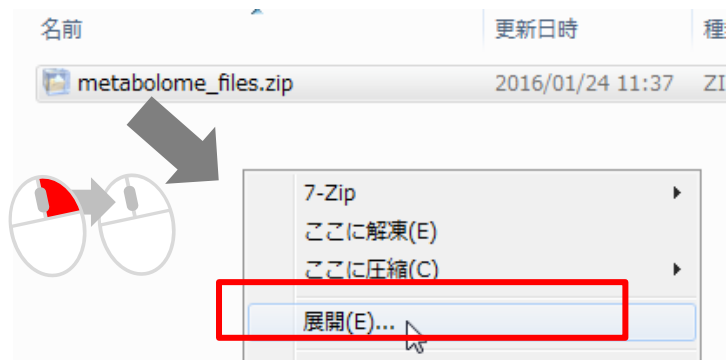
サンプルデータ

HU_pos_001.mzXML ヒト尿 [MetaboLights ID: MTBLS20_HU_pc](#)

Parsley.mzXML パセリ

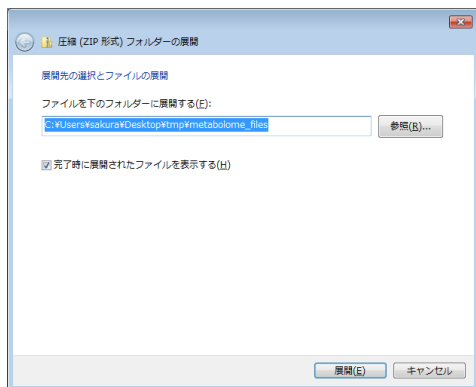
実習 1 zipファイルの展開のしかた

1) 右ドラッグで「展開...」を選択



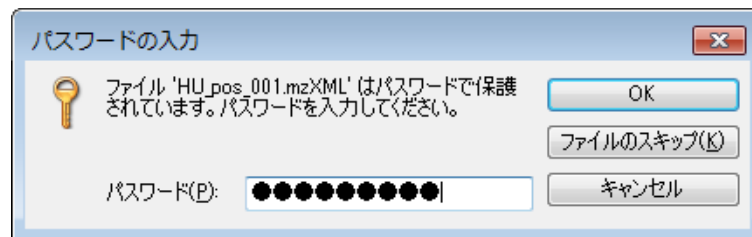
- ①ファイル上でマウス右ボタンを押し、ボタンを押したままマウスを移動させてボタンを放す（右ドラッグ）
- ②メニューに「展開...」が現れるので、選択する

2) 「展開」ボタンを押す



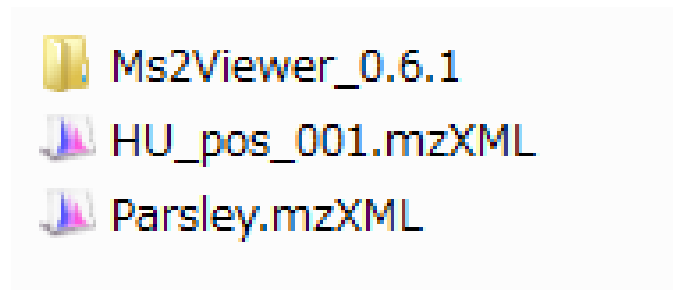
展開先を確認・変更するためのウィンドウが現れる。
通常はそのまま「展開」ボタンを押せばよい

3) パスワードを入力



ウェブページアクセス用のパスワードと一緒です

4) ファイルを確認



上記3つのファイルが出来ていれば成功です

実習 2 観測されたm/zから化合物を検索 (1)

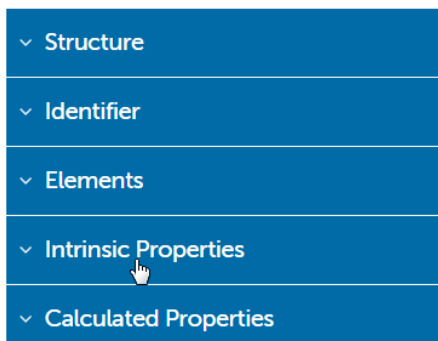
ChemSpiderで検索 (<http://www.chemspider.com/>)

例) 166.0861455

1) Advancesを選択



2) Intrinsic Propertiesを選択 Advanced search



3) 下の方に、Monoisotopic Massの欄があるので、観測されたm/z、±許容誤差、アダクトの種類、チャージを選択

☒ **Monoisotopic Mass:**
12Cピークのm/zのこと

±

☐ min/max ☒ +/-

4) 一番下にある「Search」ボタンを押す。

Supplementary info

Tags

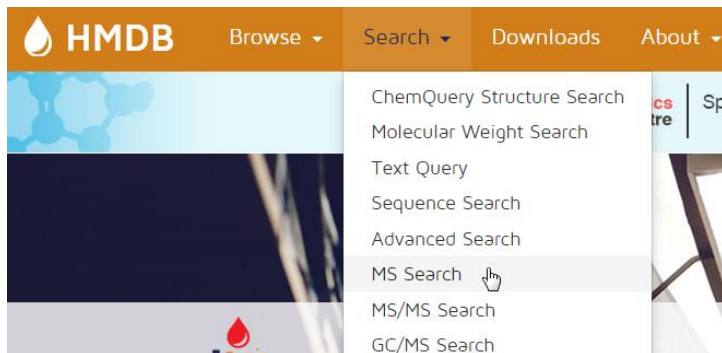
Search Hits Limit:

実習3 観測されたm/zから化合物を検索 (2)

HMDBで検索 (<http://www.hmdb.ca/>)

例) 166.0861455

1) Search -> MS Searchを選択



※画面が小さいときは、右上のを押すとメニューが出てくる



2) 検索するm/z、モード (Positive/Negative)、アダクト、許容誤差 (Daまたはppm) を入れてSearchボタンを押す

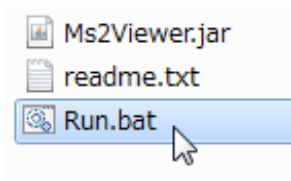
A screenshot of the HMDB search interface. The 'Query Masses (Da)' field contains '166.0861455'. The 'Ionization' field is empty. The 'Ion Mode' dropdown is set to 'Positive'. The 'Adduct Type' dropdown is open, showing a list of adducts: M+H, M+NH4, M+Na, M+CH3OH+H, M+K, M+ACN+H, M+2Na+H, and M+IsoPrOH+H. The 'Molecular Weight Tolerance' field is set to '5' and the unit is 'ppm'. The 'Search' button is highlighted in orange. A 'Load Example' button is also visible.

実習 4 観測されたm/zから化合物を検索 (3)

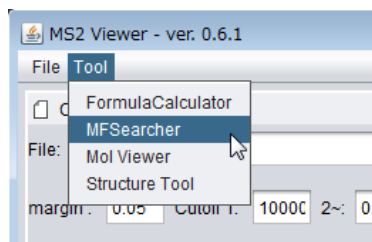
MFSearcherで検索

例) 166.0861455

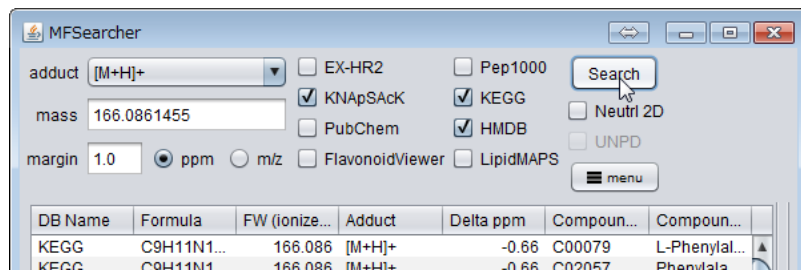
1) ダウンロードしたMS2Viewの、Run.batをダブルクリックして起動



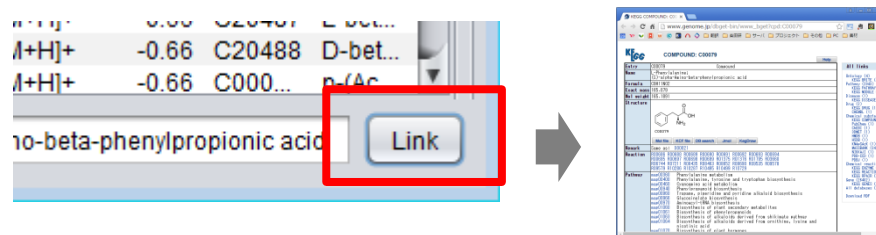
2) ToolメニューのMFSearcherを選択



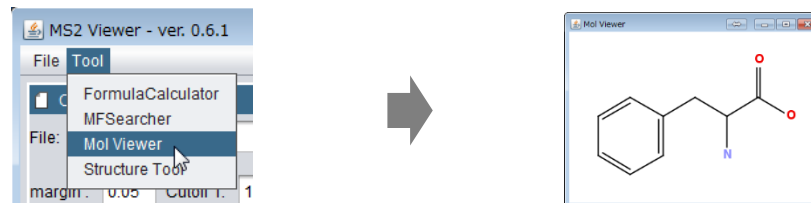
3) mass, アダクト、許容誤差、検索対象データベースを選択し、Searchボタンを押す。



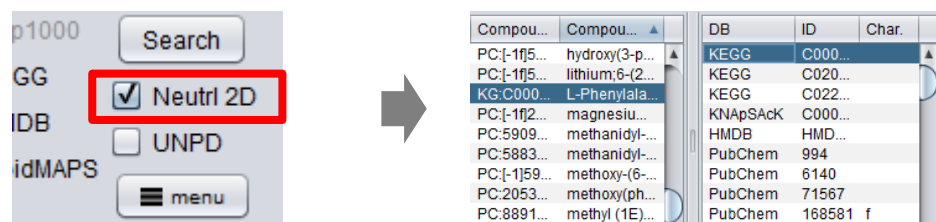
Tips1) 一覧から候補を選び、Linkボタンを押すと、オリジナルのサイトがひらく



Tips2) ToolメニューのMol Viewerを開いている状態で、一覧から候補を選ぶと、構造が表示される
※データベースによっては表示されない場合もあります



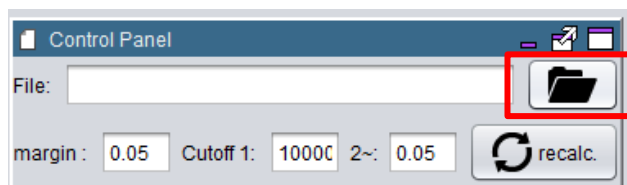
Tips3) Neutrl 2Dボタンを押して検索すると、立体を無視して化学結合が同じデータが縮約して表示されます



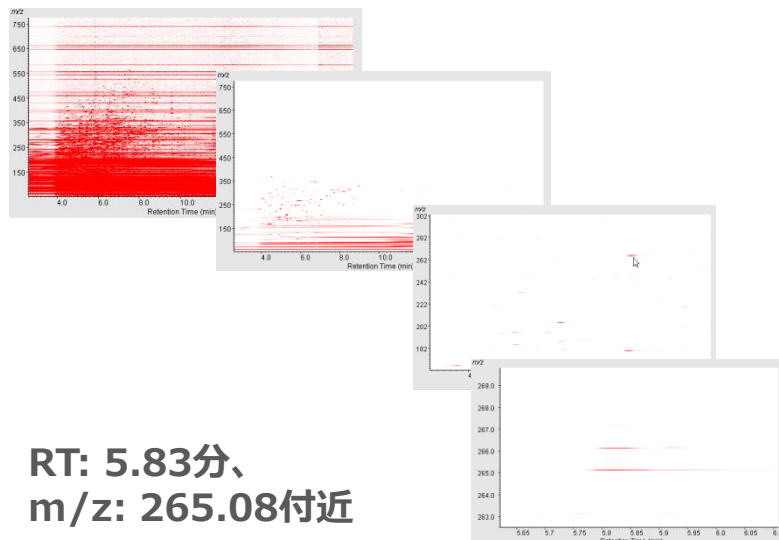
実習5 生データを見てみる(1)

MS2Viewerでヒト尿のデータを見る

1) Control Panelのフォルダアイコンから、ダウンロードした「HU_pos_001.mzXML」を開く

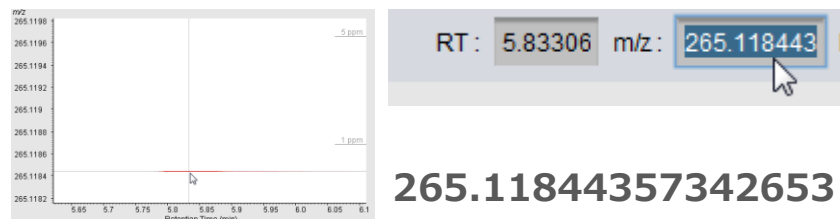


2) 色の濃さを調整しながら、一番強度が強そうなピークを探してみる



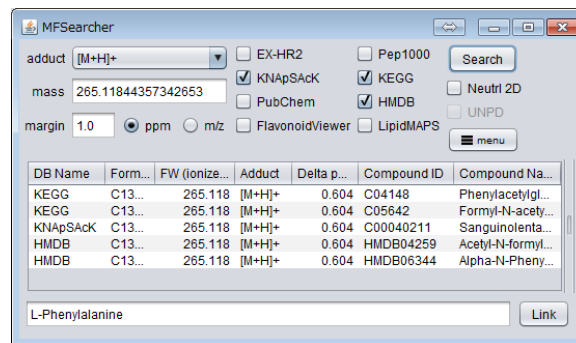
RT: 5.83分、
m/z: 265.08付近

2) ^{12}C ピーク（モノアイソトピックピーク）を十分に拡大して、ピーク位置をダブルクリックし、正確なm/z値を取得する。



265.11844357342653

3) 取得した値を使いMFSearcherで検索する



[M+H]⁺,
1 ppm,
KNAPSAck,
KEGG,
HMDBで検索

4) HMDBのデータを元サイトで見てみる
結果一覧を選んでLinkボタン

実習6 生データを見てみる(2)

パセリのデータを見てみる(データベースでMS/MS検索を試してみる)

1) Control Panelのフォルダアイコンから、DLした「Parsley.mzXML」を開く

2) グルタチオンのピークを探す

RT: 20.5分、
m/z: 308.1付近

3) MS2データを取得する

① 2D画面でShow Prec.のチェックを入れ、MS/MSが取得されたプレカーサーイオンを表示させる。

② ピークトップ付近のプリカーサーイオン周辺をクリックし、MS2データ一覧表の該当イオンをハイライトさせる

③ 一覧表でハイライトしたイオンをクリックする

④ MSn View画面で数値データを確認する

⑤ 「S」ボタンを押して、MassBank検査フォーマットでデータをクリップボードにコピーする

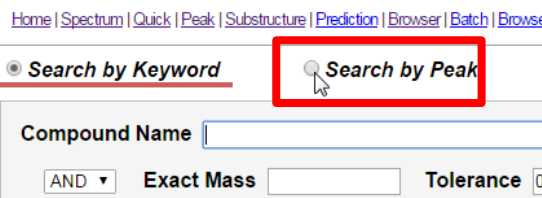
m/z	Int.	NL	Rel.Int.
179.095...	21,759	128.995...	1,000
179.966...	20,901	128.124...	961
234.103...	5,610	73.98666	258
161.942...	5,589	146.148...	257
162.942...	5,421	145.148...	249

Decimal 5 T S prec M

4) MassBank (www.massbank.jp/) へ行き、画面中程の「Quick Search」を選択する



5) Search by Peakを選択する



6) Peak Dataの欄に、3) でコピーしたデータを貼り付け、Searchボタンを押す。

● Search by Keyword ● Search by Peak

Peak Data

179.09530794921875 1000.0
179.38603339354668 960.5802752100052
234.10397338867188 257.84452999085206
161.9420166015625 256.8715206709108
162.94253540039062 249.15615974883573
231.094482421875 117.3300816359285
233.0174560546875 76.39763580211118

* m/z and relative intensities(0-999), delimited by a space.

Example1 Example2

Cutoff threshold of relative intensities 5

Number of Results 20

Search

結果画面で、グルタチオンの結果がヒットしていることが確認する

実習7 生データを見てみる(3)

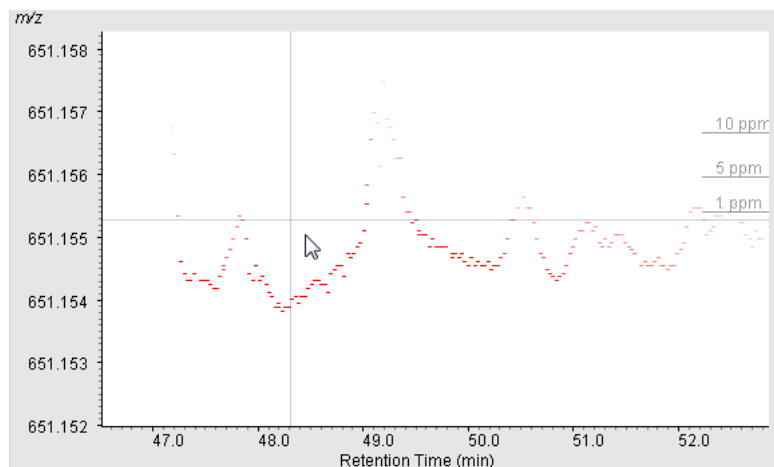
パセリのデータを見てみる (MS/MSの解釈)

1) Control Panelのフォルダアイコンから、DLした「Parsley.mzXML」を開く

2) 色の濃さを調整しながら、一番強度が強そうなピークを探してみる

RT: 48.2分、
m/z: 651.15付近

3) ^{12}C ピーク (モノアイソトピックピーク) を十分に拡大して、ピーク位置をダブルクリックし、正確なm/z値を取得する。



強度が極端に強い領域でマスズレが起きているデータなので、強度が弱い部分を参考に、上図のような部分を正確なm/z値として取得する

4) 取得した値を使いMFSearcherで検索する
m/z: 651.155265037963

[M+H]⁺, 1 ppm, KNApSACk, KEGG, HMDBで検索

5) 構造が異なる2種類のものがヒットしていることがわかる (HMDBなど)。

6) ピークトップ付近のMS2データを取得する

① 2D画面でShow Prec.のチェックを入れ、MS/MSが取得されたプレカーサーイオンを表示させる。

② ピークトップ付近のプリカーサーイオン周辺をクリックし、MS2データ一覧表の該当イオンをハイライトさせる

③ 一覧表でハイライトしたイオンをクリックする

④ MSn View画面で数値データを確認する

例)

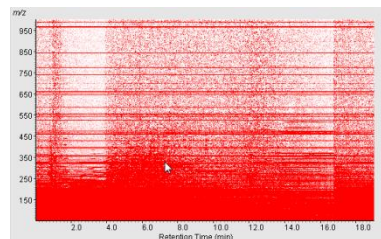
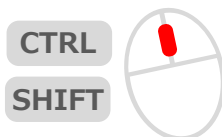
m/z	Int.	NL	Rel.Int.
271.06799	1,750,064	380.08624	1,000
519.10907	1,081,284	132.04517	618
565.12860	91,336	86.02563	52

7) Structure Toolを使い、上記二つの化合物候補のうちどちらにあてはまるかを考えてみる

2D画面の基本操作（1）

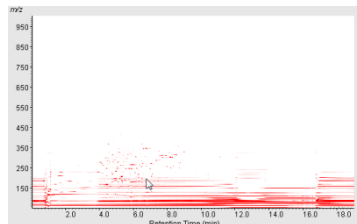
色の濃さの調整

CTRLキー、SHIFTキーを両方
押しながら、マウスホイールを回す



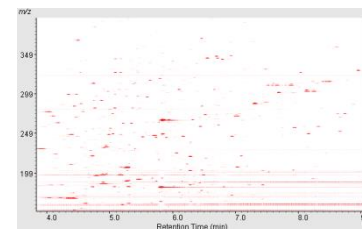
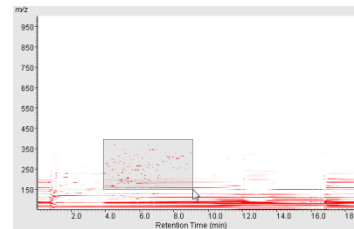
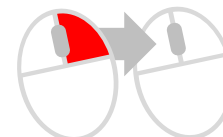
手前に回すと
濃くなる

奥に回すと
薄くなる



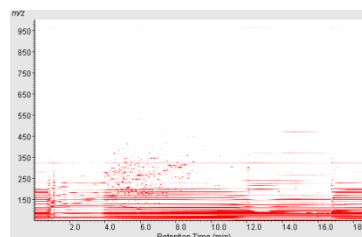
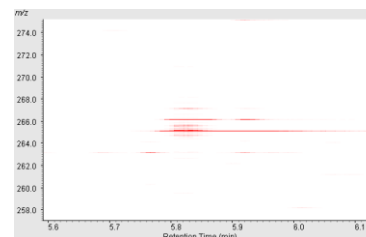
選択範囲を拡大

マウス右ボタンドラッグ



全体表示に戻す

右ボタンをダブルクリック



縦方向だけ全体表示

CTRLキーを
押しながら右
ボタンダブル
クリック

CTRL



横方向だけ全体表示

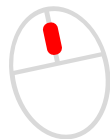
SHIFTキーを
押しながら右
ボタンダブル
クリック

SHIFT



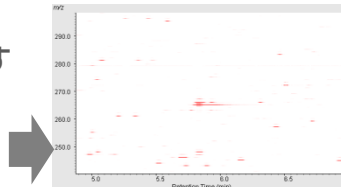
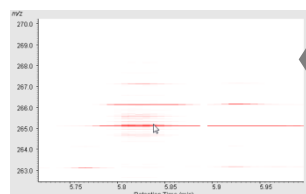
拡大・縮小

マウスホイールを回す



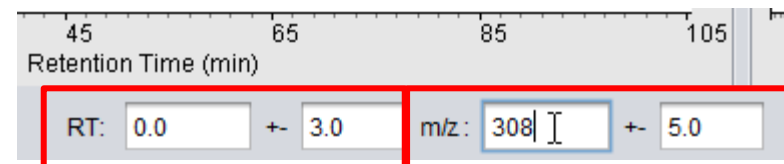
拡大：
手前に回す

縮小：
奥に回す



任意の選択範囲を表示

2D画面下部のボックスに任意の値を入力して、リターンキーを押す



※RT（溶出時間、単位は分）と、m/zのボックスは、それぞれ独立しています。両方の範囲を指定する場合は、RT、m/zそれぞれで、値を設定後にリターンキーを押して下さい

縦方向だけに拡大・縮小

CTRLキーを押しながらマウスホイールを回す

CTRL



横方向だけに拡大・縮小

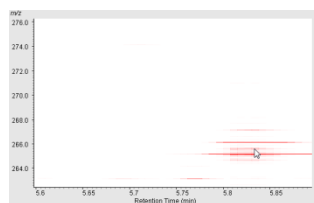
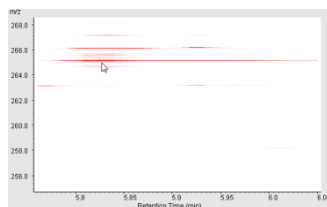
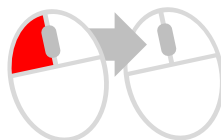
SHIFTキーを押しながらマウスホイールを回す

SHIFT



移動

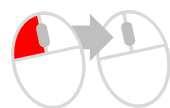
マウス左ボタンをドラッグ



縦方向だけに移動

CTRLキーを押しながら左ボタンドラッグ

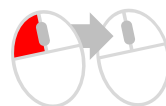
CTRL



横方向だけに移動

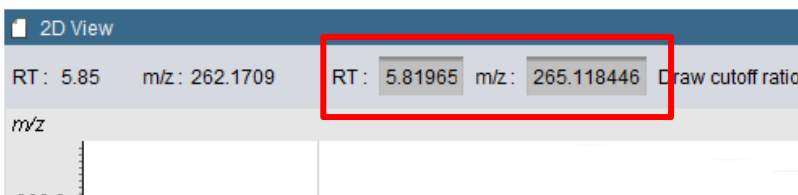
SHIFTキーを押しながら左ボタンドラッグ

SHIFT



現在位置の取得

マウス左ボタンをダブルクリック



2D画面上部のボックスに、ダブルクリックした位置の正確な保持時間とm/z値が表示されます。

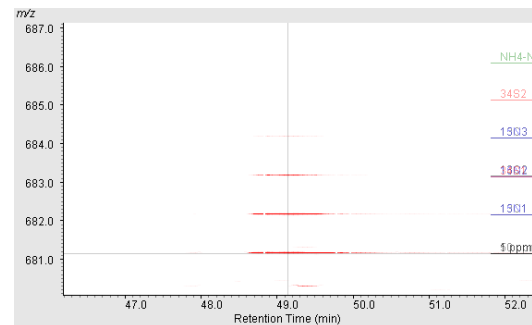


ボックスの中の数字を選択し、CTRLキー+「C」キーを押すと、数値がクリップボードにコピーされます。

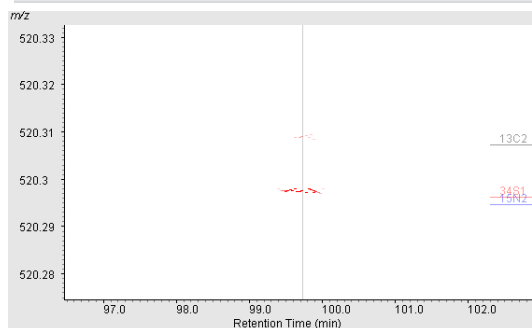
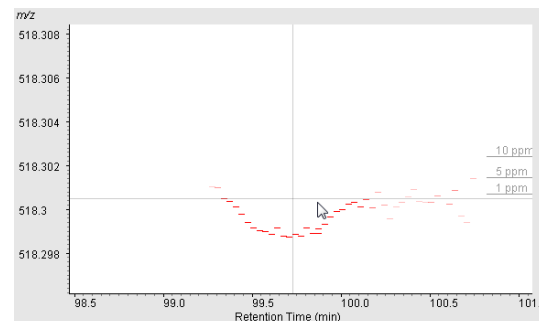
※マウス操作で数字を選択しにくい場合は、CTRLキー+「A」キーを押すと、ボックスの中が全選択されます。

CTRL + 「C」キー：コピー

CTRL + 「A」キー：数字を全選択

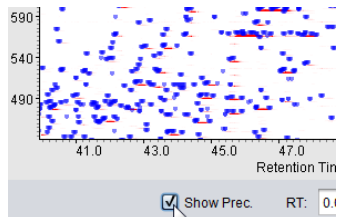


2D画面の右端には、m/zの差分を示すルーラーが、ダブルクリックした位置を基準点として表示されます。

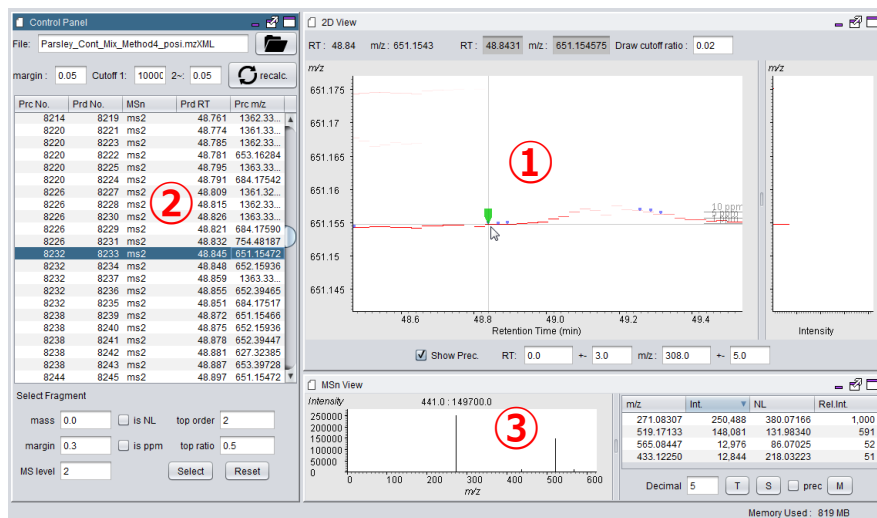


拡大して正確なm/z値を取得したり、そこを起点に³⁴Sピークを判別したり、アダクトの判断をしたりなどに利用できます。

2D画面下部、Show Prec.にチェックをつけます



2D画面上では、MS2データが取得された前駆体イオン（Precursor）の位置を示すインジケター（青い点）が示されます。



①2D画面上をクリックすると、クリック位置に最も近いプリカーサーイオンが、MS2Viewer画面左の一覧表でハイライトされます。

②ハイライトされたプリカーサーを一覧表上でクリックすると、2D画面上ではその位置が緑のインジケターで示されます。

③また、②で一覧表をクリックすると、画面下部のMSn View画面に、MSnスペクトルの情報が表示されます。

MSn Viewの数値データ表示画面の下部にある、「T」、「S」、「M」のボタンを押すと、数値データを決めたフォーマットでクリップボードにコピーできます。

m/z	Int.	NL	Rel.Int.
271.08307	250,488	380.07166	1,000
519.17133	148,081	131.98340	591
565.08447	12,976	86.07025	52
433.12250	12,844	218.03223	51

Decimal 5 T S prec M

Memor Copy in a space-separated format (for MassBank)

「T」：タブ区切りテキストでコピーします。

「S」：スペース区切りでコピーします。

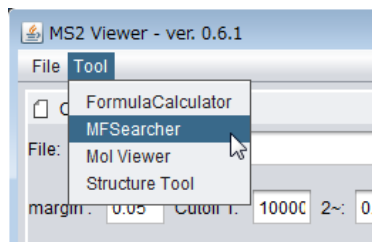
上記ふたつは、m/z値と強度値をコピーします。強度は、最大強度を1000とした相対強度です。

precのチェックをつけた場合は、プリカーサーのm/z値が、1行目に付加されます。

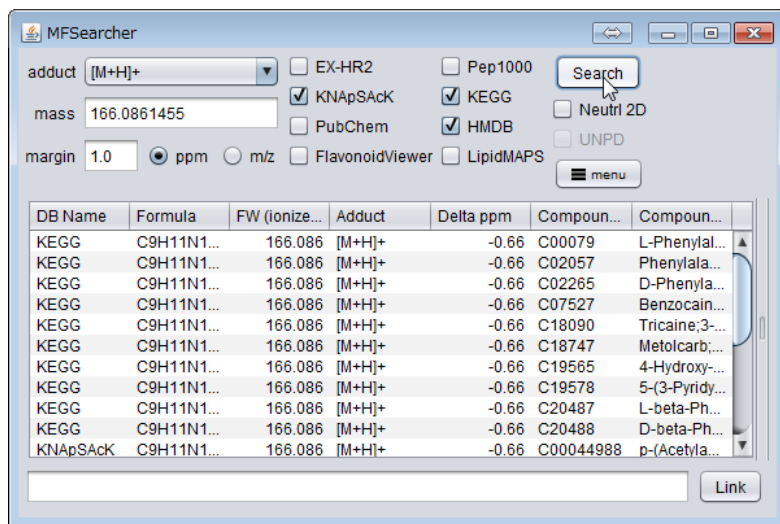
「M」：MAGMaというウェブツール用のフォーマットでコピーします。MAGMaはMS3以上の多段階MSのデータの場合に有効に候補を絞り込むためのツールです。

m/z値から化合物DBを一括検索をしたり組成式候補を計算したりするツール

1) ToolメニューのMFSearcherを選択

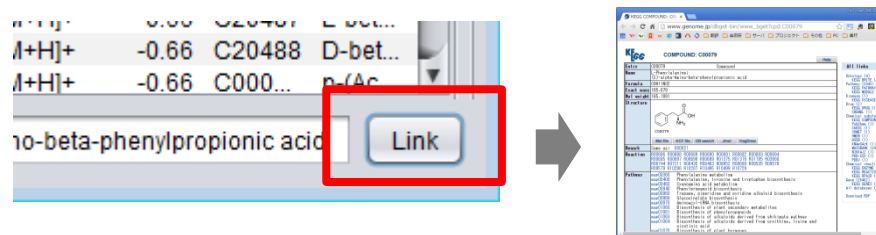


2) mass, アダクト、許容誤差、検索対象データベースを選択し、Searchボタンを押す。

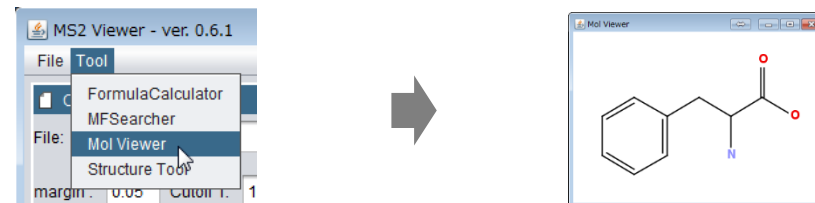


ヒットした候補が一覧表示されます。

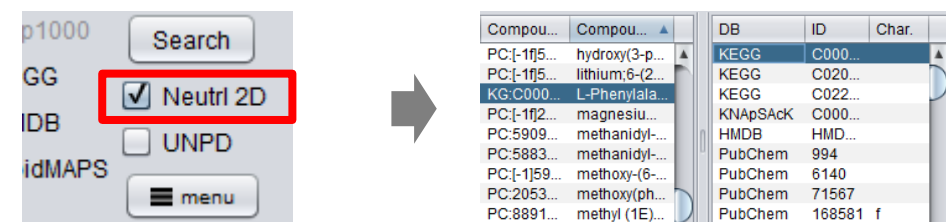
Tips1) 一覧から候補を選び、Linkボタンを押すと、オリジナルのサイトがひらく



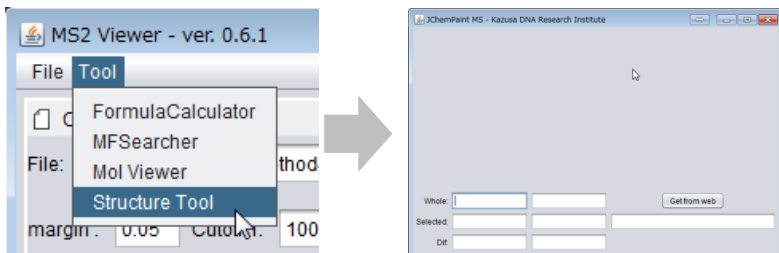
Tips2) ToolメニューのMol Viewerを開いている状態で、一覧から候補を選ぶと、構造が表示される
※データベースによっては表示されない場合もあります



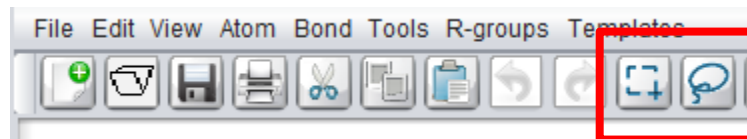
Tips3) Neutrl 2Dボタンを押して検索すると、立体を無視して化学結合が同じデータが縮約して表示されます



ToolメニューからStructure Toolを選択すると、下記のような画面が表示される

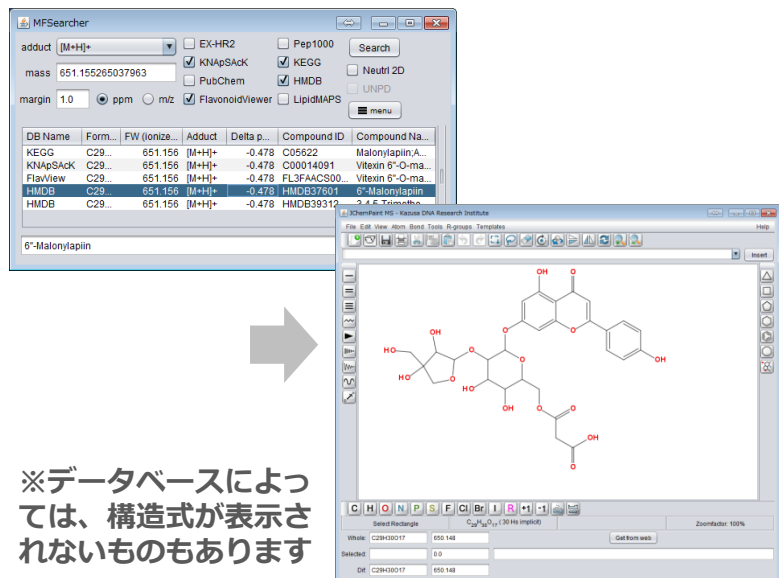


範囲選択ツール、または投げ縄ツールを選択します



画面上の元素を囲むと、選択部分がハイライトされます。選択部分および、残った部分の組成式および精密質量が、画面の左下に表示されます

MFSearcherの結果一覧をクリックすると、Structure Tool画面内に構造式が表示される



※データベースによっては、構造式が表示されないものもあります

