

**FlavonoidSearch**

**FsTool マニュアル**

2017 年 5 月 16 日

# 目次

はじめに .....	1
ライセンス .....	1
動作環境 .....	1
使い方：GUI ツールとして .....	2
起動・終了 .....	2
Windows での起動 .....	2
Mac OSX / Linux での起動 .....	3
検索 .....	3
検索結果の閲覧 .....	5
フラグメント帰属情報の閲覧 .....	7
置換基情報の閲覧 .....	8
スペクトルパネル上の操作 .....	10
イオンの選択 .....	10
使い方：コマンドラインツールとして .....	11
スペクトルデータの準備 .....	12
FsTool の準備 .....	12
検索の実行 .....	13
公開論文 .....	14
お問い合わせ先 .....	15
引用文献 .....	15

# はじめに

FlavonoidSearch<sup>1</sup>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。FsDatabase は、約 7000 の既知のフラボノイドについて、そのアグリコンから予測される MS スペクトルを、膨大な文献情報や独自に見いだされた開裂の傾向などをもとに、専門家が手作業でキュレーションしたデータベースです。FsTool で実際のスペクトルを検索することで、既存の構造推定ソフトウェアと比較して予測精度の高い結果が得られます。また、FsTool で得られるヒットスコアは、フラボノイドとそれ以外の化合物を判別する指標としても使うことができます。

本マニュアルは、Java プログラムとして提供している FsTool のマニュアルです。以下の 2 種類の用途でお使いいただけます。

- 個別のスペクトルを簡易的に解析するための GUI ツールとして使う。
- サーバーでバッチ処理をするためのコマンドラインツールとして使う。

## ライセンス

このソフトウェアは学術目的においてフリーでご使用になれます。

コア部分のプログラム (flavonoidsearch.jar) は、[LGPL v.2.1](#) に基づくオープンソースソフトウェアとして配布されています。

## 動作環境

Java ランタイム環境（バージョン 1.6 以上）がインストールされたコンピューターが必要です。以下の環境でテストされています。

Windows10, Mac OSX 10.9.5, CentOS 7.2 Linux

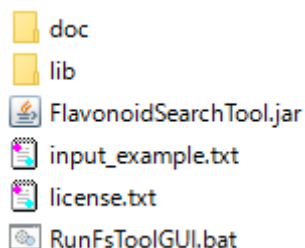
お使いのコンピューターに Java がインストールされていない場合には、下記の URL に従ってインストールして下さい。

[https://www.java.com/ja/download/help/download\\_options.xml](https://www.java.com/ja/download/help/download_options.xml)

## 使い方：GUI ツールとして

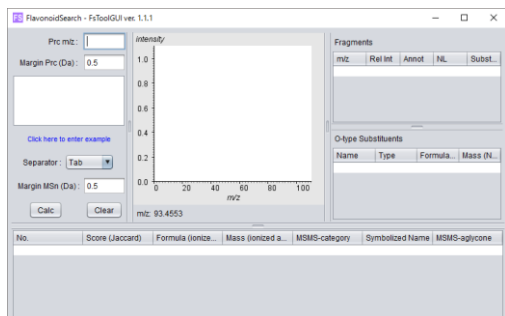
### 起動・終了

ダウンロードした zip ファイルを、ファイル解凍ソフトウェア（7zip 等）で解凍します。以下のファイルが生成されます。

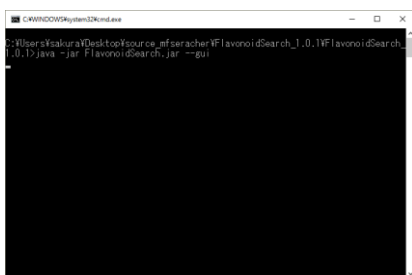


### Windows での起動

RunFsToolGUI.bat をダブルクリックすると、ソフトウェアが起動します。メイン画面が表示されます。



※この際、下記のようなコンソール画面も同時に表示されます。この画面は、ツールの起動中に閉じないようにしてください（最小化は可能です）。右上の「×」ボタンを押して画面を閉じると、ツール自体も終了してしまいます。



## Mac OSX / Linux での起動

ターミナルを開き、解凍したファイルがあるディレクトリに移動します。その後、下記のコマンドを実行します。

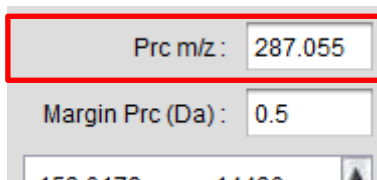
```
java -jar FlavonoidSearchTool.jar
```

メイン画面の右上の「×」ボタンを押すことで、ソフトウェアが終了します。



## 検索

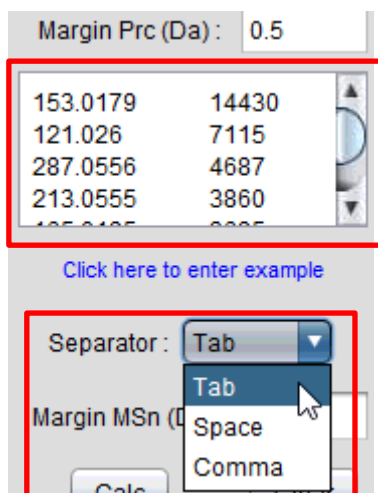
Prc m/z 欄にプリカーサーイオンの  $m/z$  値を入力します。



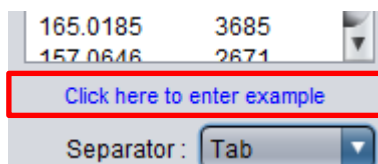
※FlavonoidSearch システムは、ポジティブモードでの分析データのみに対応しています。

※FlavonoidSearch では、通常のポジティブモードで検出されるイオン状態を想定して参照データ (FsDatabase) が作成されていますので、そのフラボノイドが分子イオン[M]<sup>+</sup>として検出されるか、水素アダクト[M+H]<sup>+</sup>等として検出されるかなどを区別することなく、実測された数値を入力してください。

下のテキストエリアに、MS<sup>n</sup>フラグメントイオンの *m/z* と *intensity* が一行ずつに書かれたテキストを入力します。*m/z* と *intensity* は、タブ区切り、スペース区切り、またはコンマ区切りで記述できます。Separator のプルダウンリストから、使用した区切り文字を選択してください。



※「Click here to enter example」という文字をクリックすると、サンプルテキストが入力されますので、ご参考にしてください。



Margin Prc と、Margin MSn の欄に、それぞれ、プリカーサーイオンおよび MS<sup>n</sup>フラグメントイオンの *m/z* 値の許容誤差範囲を入力します（単位は Da）。この値は、上記で入力したデータを、フラボノイドの予測フラグメントデータ（FsDatabase）と比較する際に使われます。

Prc m/z : 287.055

Margin Prc (Da) : 0.5

153.0179	14430
121.026	7115
287.0556	4687
213.0555	3860
165.018	255

[Click here to enter example](#)

Separator : Tab

Margin MSn (Da) : 0.5

Calc Clear

「Calc」ボタンを押すと検索が実行され、結果がウィンドウ下部の表に一覧されます。また、入力したスペクトルの情報が、中央のパネルと右側の表に表示されます。

FS FlavonoidSearch - FsToolGUI ver. 1.1.1

Prc m/z : 287.055

Margin Prc (Da) : 0.5

153.0179	14430
121.026	7115
287.0556	4687
213.0555	3860
165.018	255

[Click here to enter example](#)

Separator : Tab

Margin MSn (Da) : 0.5

Calc Clear

m/z: 314.3942

Fragments

m/z	Rel Int	Annot	NL	Subst...
153.018	1000	134.037	p-Meth...	
121.026	493	166.029	(OMe)-...	
287.056	324	-0.001		
213.055	267	74		
165.018	255	122.037		

O-type Substituents

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

No.	Score (Jaccard)	Formula (ionized...)	Mass (ionized...)	MSMS-category	Symbolized Name	MSMS-aglycone
3218	0.3	C15H11O6	287.055	Flavonol	[Flavonol]-A(2OH)-B(1OH)	Datisctin
3200	0.286	C15H11O6	287.055	Flavonol	[Flavonol]-A(2OH)-B(1OH)	3,7,8,4'-Tetrahydroxyflavone
3259	0.286	C15H11O6	287.055	Flavonol	[Flavonol]-A(2OH)-B(1OH)	Kaempferol
1438	0.25	C15H11O6	287.055	Flavone	[Flavone]-A(1OH)-B(3OH)	7,3',4',5'-Tetrahydroxyflavone
1516	0.25	C15H11O6	287.055	Flavone	[Flavone]-A(2OH)-B(2OH)	5,7,2',5'-Tetrahydroxyflavone
1519	0.25	C15H11O6	287.055	Flavone	[Flavone]-A(2OH)-B(2OH)	5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone
1525	0.25	C15H11O6	287.055	Flavone	[Flavone]-A(2OH)-B(2OH)	5,7,2',3'-Tetrahydroxyflavone

## 検索結果の閲覧

下部の検索結果一覧には、候補となるアグリコンが、ヒットスコア（Jaccard 係数）の高い順に表示されています。Jaccard 係数は、入力したフラグメントイオンの  $m/z$  値と、FlavonoidSearch が持つ予測フラグメントデータベース（FsDatabase）の  $m/z$  値の一致度を下記の式で表したものです。

Score (Jaccard) = 入力と予測のフラグメントで共通していたイオンの数 / 入力と予測のフラグメントに存在する  $m/z$  の種類

なお、FlavonoidSearch システムでは、入力したスペクトルデータの強度情報は、検索には使用されません。 $m/z$  の一致のみで評価されます。

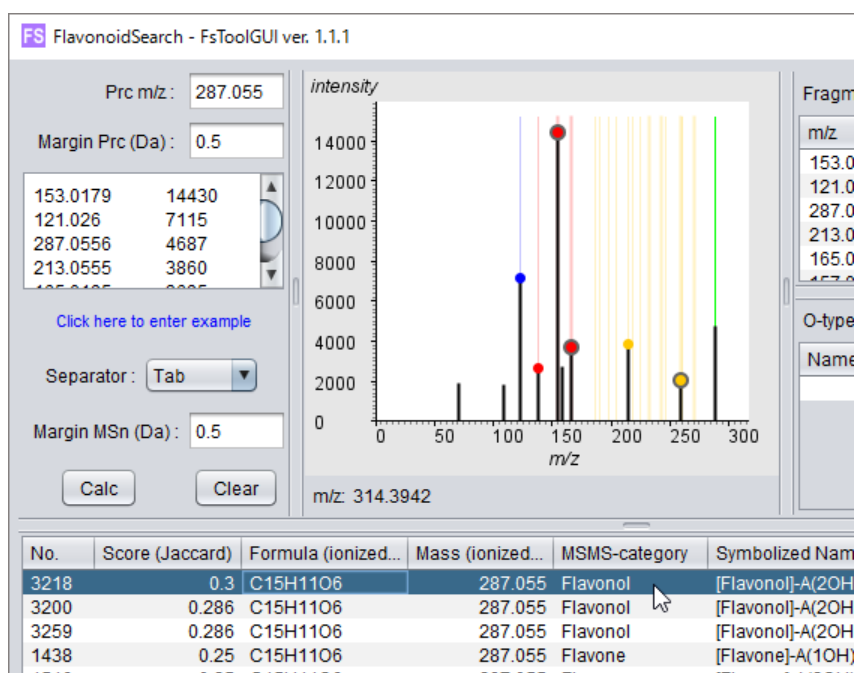
検索結果一覧には、以下の情報が記載されています。

No	FlavonoidSearch システムにおけるフラボノイドの No
Score (Jaccard)	0~1 で示される、イオンの $m/z$ 値の一致度。スコアが高いものほど優先順位の高い候補を表します。
Formula (ionized aglycone)	イオン化された状態のアグリコンの組成式
Mass (ionized aglycone)	イオン化された状態のアグリコンの理論質量。
MSMS-category	FlavonoidSearch システムで定義したフラボノイドのカテゴリ分類名。
Symbolized Name	MSMS-aglycone（下記）の構造を確認しやすいように、MSMS-category 名および A 環、B 環に付加する置換基の数と種類で表した名称。
MSMS-aglycone	FlavonoidSearch システムで定義した名前。MS/MS 解析で、C6-C3-C6 のフラボノイドバックボーンとともに開裂がおけると予想される、解離しにくい置換基を含めたアグリコン部位につけた名前です。

※FsTool のコマンドラインツールでは、上記以外に、MSMS-category に付与した ID などの追加情報が取得できます。

結果一覧をクリックすると、中央のスペクトル図に、予測フラグメントとの一致の状況が図示されます。



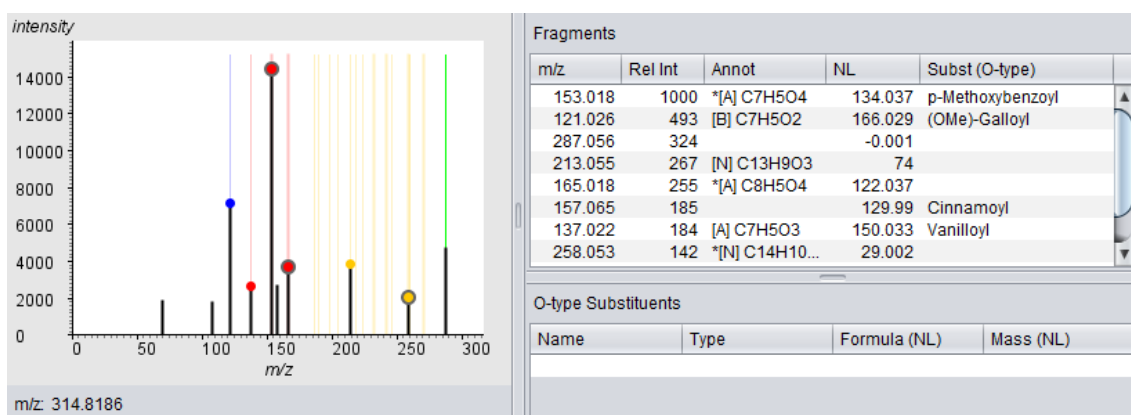


スペクトル図の色表示は、以下を意味しています。

黒の太線	入力したフラグメントイオン
緑の線	入力したプリカーサーイオンの $m/z$
薄い赤、青、黄色の線	<p>FsDatabase 側の予測フラグメントの <math>m/z</math>。色は以下を意味します。</p> <p>赤：A 環由来のフラグメント</p> <p>青：B 環由来のフラグメント</p> <p>黄：ニュートラルロスに由来するフラグメント</p> <p>太く描かれた線は、高頻度で出現するフラグメント (Essential Fragment!) を示します。</p>
●印	<p>予測フラグメントイオンとの一致が見られた入力フラグメントイオン。フラグメントの由来に応じて、上記と同じ色分けがされています。高頻度で出現するフラグメントと一致したイオンは、●印が黒く縁取りされています。</p>

## フラグメント帰属情報の閲覧

スペクトルの詳細情報は、右側の Fragments テーブルに表示されています。

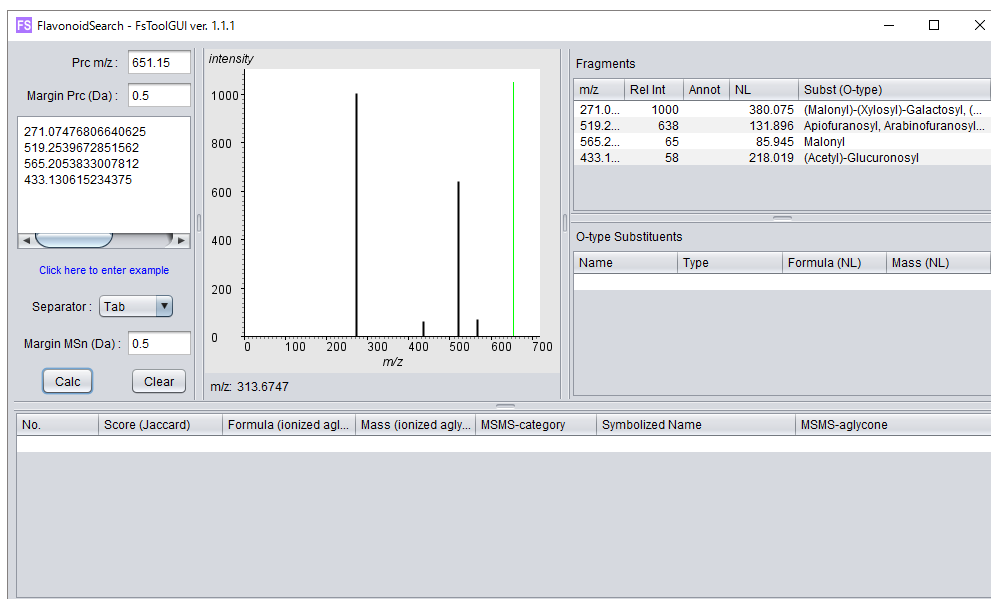


以下の情報が確認できます。

m/z	検索したフラグメントイオンの <i>m/z</i> 値
Rel Int	検索したフラグメントイオンの相対強度。最大強度のイオン（ベースピークイオン）を 1000 とした値です。
Annot	ヒットした予測フラグメントの情報。フラグメントの由来を、A 環由来 [A]、B 環由来 [B]、およびニュートラルロス由来 [N] で示し、フラグメントの <i>m/z</i> を与える組成式を表します（チャージは省略されています）。「*」がついたものは、高頻度で出現するフラグメント（Essential Fragment <sup>1</sup> ）を表します。
NL	ニュートラルロスの質量値（プリカーサーイオンからの質量差分）。
Subst (O-type)	既知のフラボノイドに付加している O-type 置換基（Supplementary Table S8 <sup>1</sup> ）のうち、ニュートラルロスに相当するものが表示されます。

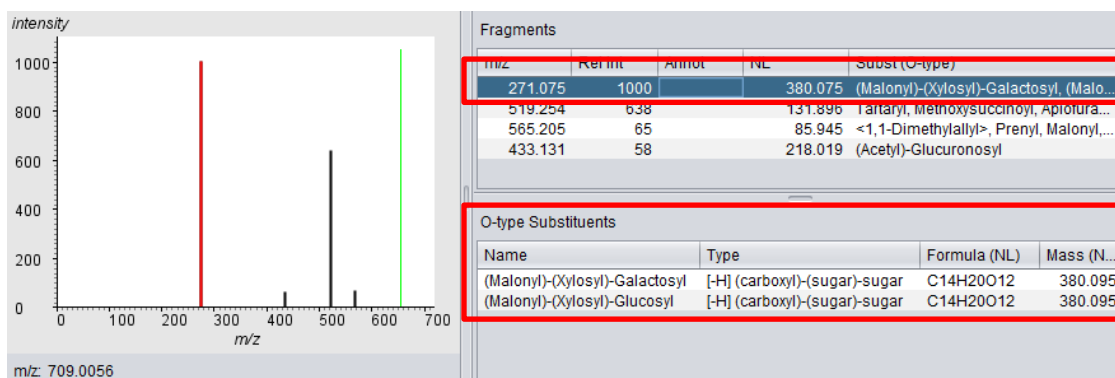
## 置換基情報の閲覧

Fragments テーブル中で Subst の欄に表示される置換基情報は、配糖体の MS/MS スペクトルの解析などで参考となります。例えば下記の配糖体のスペクトルの例では、Subst の欄にいくつかの置換基候補が表示されています。



※この例では、予測フラグメントへのヒットは0件でした。

フラグメントテーブルの行を選択すると、候補の置換基が O-type Substituents テーブルに表示されます。



O-type Substituents テーブルは以下を示します。

Name	置換基の種類と構造を示した名称。構造単位が複数あるときには、その名称がハイフンで連結されます。ひとまとまりの構造ブロックは中括弧「()」で囲まれます。各ブロックで最後に書かれたものを介して、アグリコンや他のブロックと結合します。
Type	置換基の構造を判別しやすいよう、Name では一般名で記載されている構造を、carboxyl、hydroxyl、OMe、sugar、sulfo の大まかな分類名で表したものです。先頭に書かれた[-H]および[OH]は、それぞれ、アグリコンから脱離しニュートラルロスとなる際に、構造から除外される (H) あるいは付加される (OH) 組成式を示します。置換基に含まれる構造ユ

	ニットの数 (Number of substituents units, Supplementary Table S8 <sup>1</sup> ) が 2 個以上で、sugar を介してアグリコンに結合している置換基については、[-H]体のみを検索対象としています。
Formula (NL)	ニュートラルロスとしての組成式
Mass (NL)	ニュートラルロスとしてのマス値

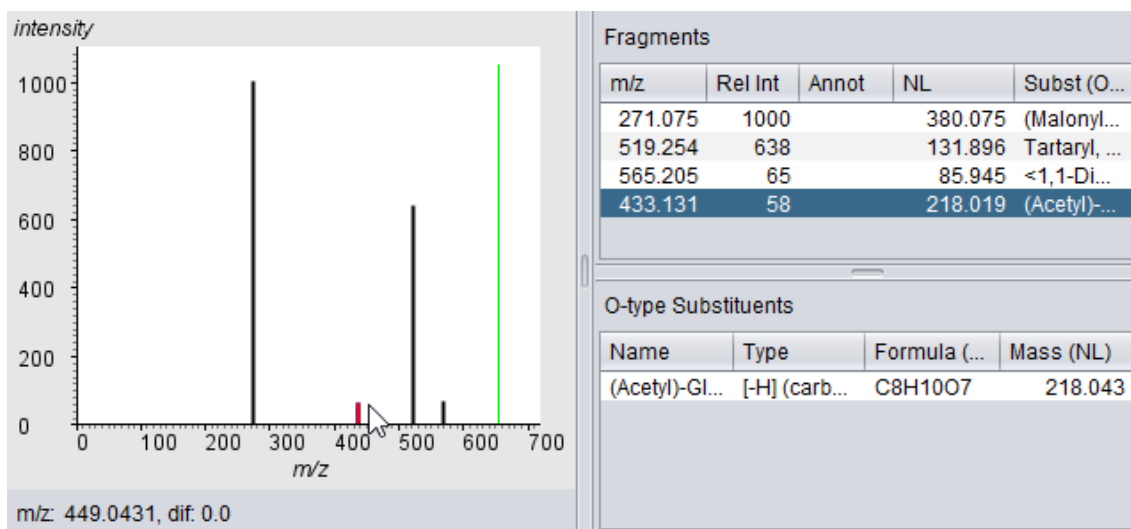
上記の例では、既知のフラボノイドの置換基として、carboxyl-sugar-sugar の様式を持つ Malonyl-Xylosyl-Galactosyl あるいは Malonyl-Xylosyl-Glucosyl があることを示しています。

## スペクトルパネル上の操作

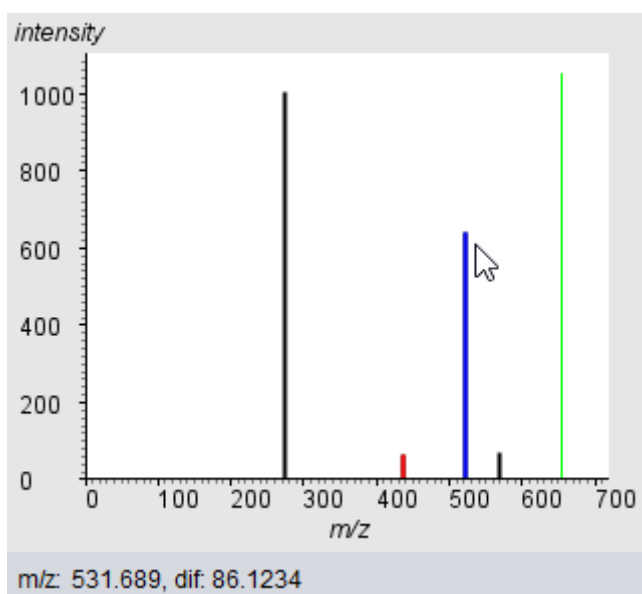
マウスホイール回転	スペクトルを拡大・縮小します。 SHIF キーを押しながら操作すると、 <i>m/z</i> 方向のみが変化します。 CTRL キーを押しながら操作すると、intensity 方向のみが変化します。
左ボタンドラッグ	左右方向に移動します。
右ボタンダブルクリック	全体表示に戻ります。
右ボタンドラッグ	選択領域が拡大されます。
左ボタンクリック	イオンの近傍でクリックすると、そのイオンが選択状態になります (下記イオンの選択をご参照ください)。

## イオンの選択

スペクトルパネル上でフラグメントイオンの近傍をクリックするか、Fragments テーブル中で行を選択すると、該当するイオンが赤色で示されます。



この状態でスペクトルパネル上でマウスカursorを動かすと、近傍のイオンが青で表示され、パネル下部の  $m/z$  の欄に、赤のイオンとの質量差分が dif として表示されます。



## 使い方：コマンドラインツールとして

FsTool をコマンドラインツールとして使用することで、ファイルとして準備したスペクトルデータをサーバー上などで検索させることができます。大量のスペクトルデータをコンピュータプログラムで検索したい場合などに便利です。検索結果には、GUI ツールでは

表示されていなかった、MSMS-category ID などの情報が得られます。

## スペクトルデータの準備

スペクトルデータを、NIST 形式に近い下記のフォーマットで準備します。

PrecursorMS: プリカーサーのマス値

Num peaks: フラグメントイオンの数

以降の行は、フラグメントイオンのマス値および強度を、一行ずつ、単一スペースで区切って記載します。

例)

PrecursorMZ: 287.0550145047

Num peaks: 10

153.0179 14430

121.026 7115

287.0556 4687

213.0555 3860

165.0185 3685

157.0646 2671

137.022 2665

258.053 2058

68.9872 1822

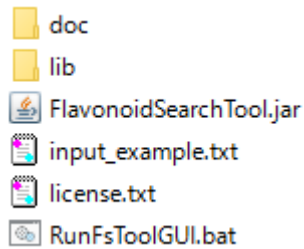
107.0454 1744

同梱されている `input_example.txt` ファイルをご参照ください。

## FsTool の準備

ダウンロードした zip ファイルを、ファイル解凍ソフトウェア (7zip 等) で解凍します。

以下のファイルが生成されます。



## 検索の実行

ターミナルソフトで、ツールを解凍したディレクトリに移動し、以下のコマンドを実行します。

```
java -jar FlavonoidSearchTool.jar -i INFILE
```

INFILE は、上記で準備したスペクトルファイルへのパスです。

プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの  $m/z$  値の許容誤差範囲を指定する場合は、以下のオプションを付けて実行します。

```
java -jar FlavonoidSearchTool.jar -i INFILE -p MARGIN_PRE -m MARGIN_MSN
```

MARGIN\_PRE はプリカーサーイオンのマージン（デフォルト値 0.01）、MARGIN\_MSN はフラグメントイオンのマージン（デフォルト値 0.5）を示し、単位はそれぞれ Da です。オプションを指定しない場合は、デフォルト値が使用されます。

例として、同梱の `input_example.txt` を、プリカーサーの許容誤差だけデフォルト値の 0.5 から 0.2 に変更して検索する例を示します。

```
java -jar FlavonoidSearchTool.jar -i input_example.txt -p 0.2
```

下記のような結果が得られます。

ID	JaccardScore	IonizedAglyconeFormula	IonizedAglyconeMass	MSMS-CategoryID	MSMS-CategoryName	SymbolizedAglyconeID	SymbolizedAglyconeName	MSMS-AglyconeID
----	--------------	------------------------	---------------------	-----------------	-------------------	----------------------	------------------------	-----------------

	MSMS-AglyconeName	RelatedID	RelatedCAS		
3218	0.3 C15H11O6 [Flavonol]-A(2OH)-B(1OH) 480-15-9	287.0550145 A2050	C059 Flavonol Datiscetin FL5FA8NS0001	S1441	
3200	0.2857142857142857 C15H11O6 S1441 [Flavonol]-A(2OH)-B(1OH) 3,7,8,4'-Tetrahydroxyflavone	287.0550145 A2033 FL5F3ANS0001	C059 Flavonol 1429-28-3		
3259	0.2857142857142857 C15H11O6 S1441 [Flavonol]-A(2OH)-B(1OH) FL5FAANS0001	287.0550145 A2078	C059 Flavonol Kaempferol 520-18-3		
1438	0.25 C15H11O6 [Flavone]-A(1OH)-B(3OH) FL3F1GNS0001	287.0550145 A1110	C038 Flavone 7,3',4',5'-Tetrahydroxyflavone 67858-31-5	S0853	

...

RelatedID は、そのアグリコンを持つフラボノイドの例として、metabolomics.jp のフラボノイドデータベース (<http://metabolomics.jp/wiki/Category:FL>) に記載のフラボノイドの ID が示されています。

RelatedCAS は、そのフラボノイドの CAS-ID です。

検索結果は標準出力に出力されます。結果をファイルに保存したい場合は、下記のようにリダイレクトを使ってファイルに記録してください。

```
java -jar FlavonoidSearchTool.jar -i input_example.txt -p 0.2 > output.txt
```

簡単な使い方は、-h オプションで見ることができます。

```
java -jar FlavonoidSearchTool.jar -h
```

## 公開論文

Akimoto N et al., submitted



# 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)

# 引用文献

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