

# Mass++ ビギナーズガイド

---

## Mass++ ビギナーズガイド

Copyright © 2006-2014 株式会社 島津製作所, エーザイ株式会社

Windows is a registered trademark of Microsoft Corporation in the United States and other countries.

Mascot is a registered trademark of Matrix Science Ltd.

Some functions of Mass++ (32bit) use programs developed using Matlab and their distributable library; MATLAB Compiler Runtime Libraries.

MATLAB 1984-2014 The MathWorks, Inc.

SIMCA is a product of Umetrics Inc.

Other company names and product names mentioned in this manual are trademarks or registered trademarks of their respective companies.

The TM and symbols are omitted in this manual.

---

---

# Table of Contents

1. Basic Operation .....	1
1.1. File Open and Processing .....	1
1.1.1. ファイルを開く .....	1
1.1.2. スペクトラムを開く .....	2
1.1.3. ウィンドウの整列 .....	3
1.1.4. ピーク検出 .....	5
1.1.5. 拡大・縮小・シフト .....	7
1.1.6. 軸のシンクロ .....	8
1.1.7. データ処理(スムージング) .....	8
1.1.8. スペクトラムの保存 .....	9
1.2. Heatmap and 3D Display .....	11
1.2.1. ファイルを開く .....	11
1.2.2. ヒートマップ表示 .....	11
1.2.3. 表示設定の変更 .....	12
1.2.4. 表示幅の変更(1) .....	13
1.2.5. 表示幅の変更(2) .....	14
1.2.6. 表示幅の変更(3) .....	14
1.2.7. 2次元ピーク検出 .....	15
1.2.8. 3D Display .....	16
1.2.9. 回転表示 .....	16
1.2.10. 表示設定の変更 .....	17
1.2.11. 表示幅の変更 .....	17
2. Differential Analysis .....	20
2.1. Create Peak Matrix .....	20
2.1.1. Peak Matrix Name .....	20
2.1.2. Group Settings .....	21
2.1.3. Normalization .....	24
2.1.4. RT Alignment .....	25
2.1.5. Peak Detection .....	26
2.1.6. Peak Analysis (1) ピークスケールリング .....	28
2.1.7. Peak Analysis (2) 統計解析 .....	28
2.1.8. Others (1) 同定 .....	29
2.1.9. Others (2) ピークマージ .....	31
2.1.10. 設定パラメーター一覧 .....	32
2.1.11. ピークマトリクス (1) 作成されたピークマトリクス .....	33
2.1.12. ピークマトリクス (2) ソート .....	33
2.1.13. ピークマトリクス (3) 同定結果の確認 (i) .....	34
2.1.14. ピークマトリクス (4) 同定結果の確認 (ii) .....	34
2.1.15. ピークマトリクス (5) ピーク波形、箱ひげ図表示 .....	35
2.1.16. ピークマトリクス (6) ピークマトリクスの出力 .....	36
2.1.17. Show Peak Matrix .....	36
2.2. SIMCA Display .....	38
2.2.1. Peak MatrixをSIMCAに受け渡す .....	38
2.2.2. 解析結果をSIMCA Plug-inにインポートする .....	45
2.2.3. バイオマーカー候補の吟味を行う .....	47
3. Data Analysis Tools .....	49
3.1. Identification .....	49
3.1.1. 準備(1)検索エンジンの設定 .....	49
3.1.2. 準備(2)データを開く .....	51
3.1.3. Mascot検索 .....	51
3.1.4. データベース検索設定 .....	52
3.1.5. 検索結果の確認 .....	55
3.2. SIMSE(de novo sequencing) .....	57
3.2.1. ファイルを開く .....	57
3.2.2. ピークを検出する .....	57

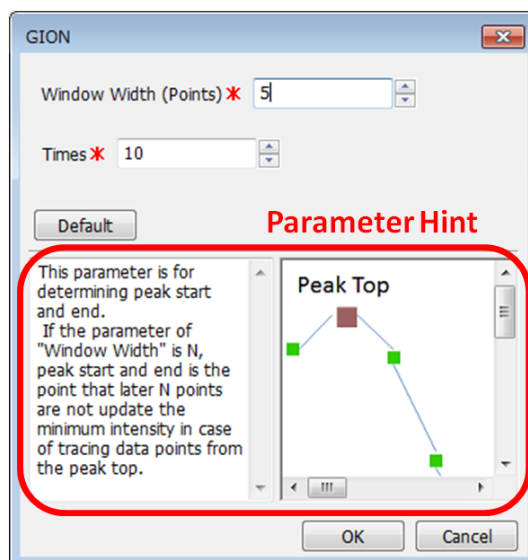
---

3.2.3.	de novo sequencingを開始する .....	57
3.2.4.	マニュアルでde novo sequencingを実行する .....	59
3.2.5.	自動でde novo sequencingを実行する .....	62
3.3.	Script Console .....	62
3.3.1.	スクリプトコンソールの動作要件 .....	63
3.3.2.	IronPython について .....	63
3.3.3.	スクリプトコンソールを開く .....	63
3.3.4.	スクリプトを入力する .....	65
3.3.5.	スクリプトを実行する .....	66
3.3.6.	スクリプトを登録する .....	67
3.3.7.	登録スクリプトを実行する .....	68
3.3.8.	スクリプトをファイルから読み込み、実行する。 .....	69
3.3.9.	スクリプトを編集する .....	71
3.3.10.	イベント駆動型のスクリプト実行 .....	73
4.	MassBank .....	76
4.1.	Create Spectrum Records .....	76
4.1.1.	はじめに .....	76
4.1.2.	[Create] ウィザード (Create Spectrum Records) を開く .....	76



# Chapter 1. Basic Operation

この章では、Mass++の基本的な操作方法について説明します。操作時における各パラメーターの詳細は、各ダイアログ下部に表示される[パラメーターヒント]を参照してください。



## 1.1. File Open and Processing

この節では、測定されたMSスペクトルに対して行われる、ピーク検出、複数MSスペクトルの比較、スムージングなどの基本操作について、Mass++での手順を説明します。

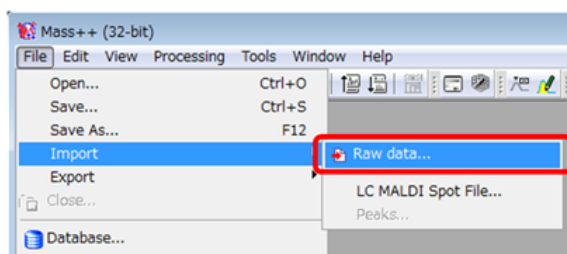
Mass++に同梱されているファイル（ないしサンプルPythonコード：「Script Console」節参照）は次の場所に保存されています。

[Mass++がインストールされているフォルダ] ¥Mass++¥data

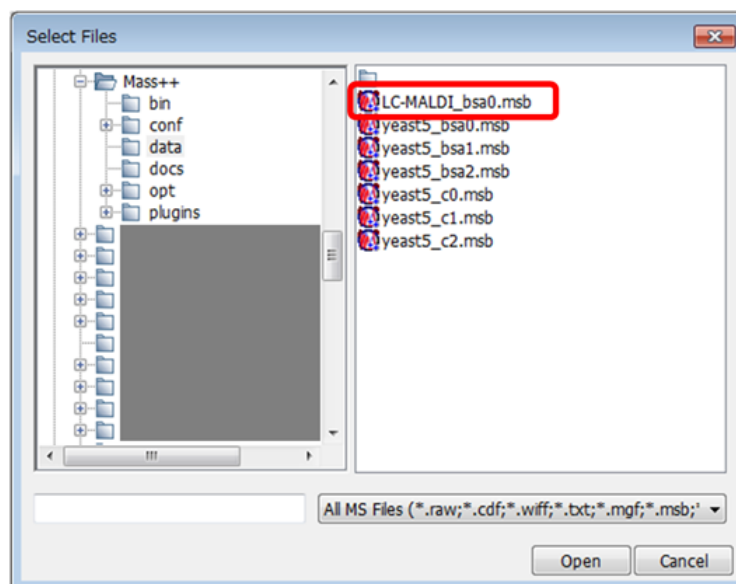
### 1.1.1. ファイルを開く

まずは、目的のファイルを開きます。

Mass++を起動後、[File] メニューから [Import] - [Raw Data] をクリックします。



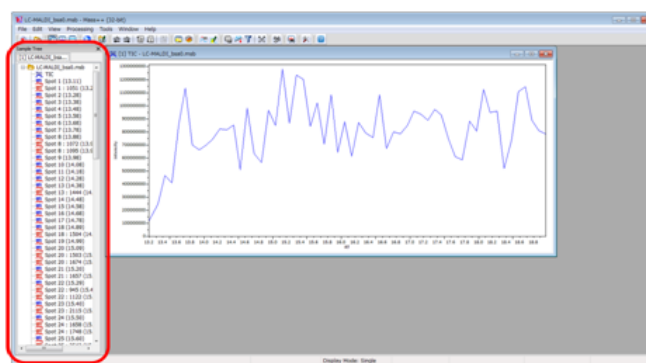
[Select Files] が開きます。



ここでは、Mass++に同梱されている「LC-MALDI\_bsa0.msb」を開きます。

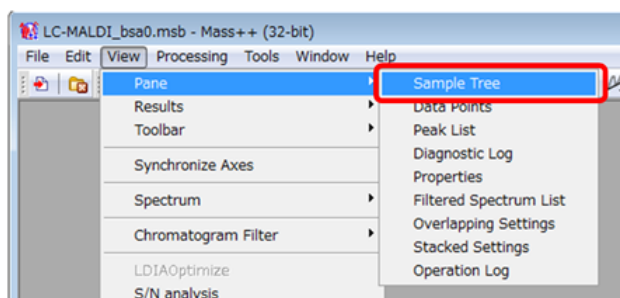
目的のファイルを選択し、[Open] をクリックします。

メインウィンドウの [Sample Tree] に開いたファイルの中のデータが表示されます。  
[Sample Tree] 上の一番上のクロマトグラム(ないしスペクトラム)が自動でメインウィンドウに表示されます。



このファイルではクロマトグラムが開きました。ここでは、ウィンドウ右上の [×] をクリックして閉じておきます。

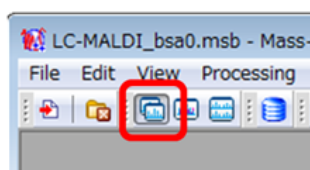
Note: [Sample Tree] が非表示の場合は [View] メニューから [Pane] - [Sample Tree] をクリックして表示します。



## 1.1.2. スペクトラムを開く

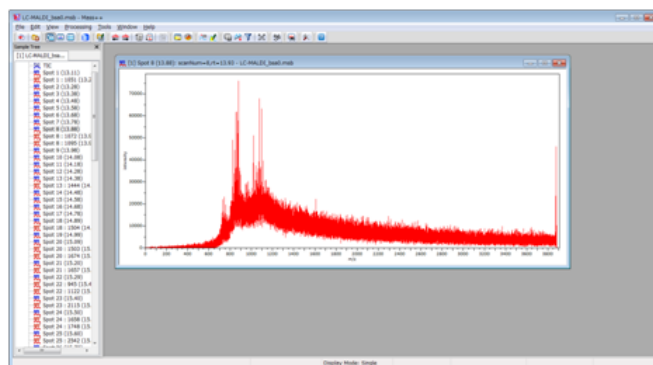
スペクトラムを開きます。

[Display Mode] が [Single] になっていることを確認します。



[Sample Tree] 内の目的のスペクトラムをクリックします。

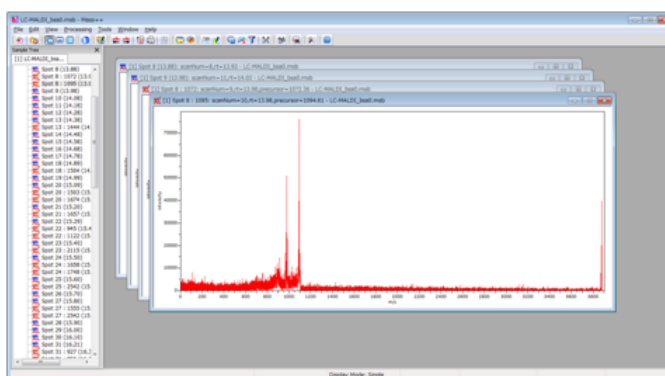
メインウィンドウにスペクトラムが表示されます。



スペクトラムを複数開き、整列させて比較することはよく行われます。ここでは例としてMS1スペクトラムを2つ、MS2スペクトラムを2つ開きます。MS1スペクトラム、MS2スペクトラムは、それぞれ図のようなアイコンで [Sample Tree] 内に表示されています。



[Display Mode] が [Single] の場合、図のように新しいウィンドウが追加されていきます。

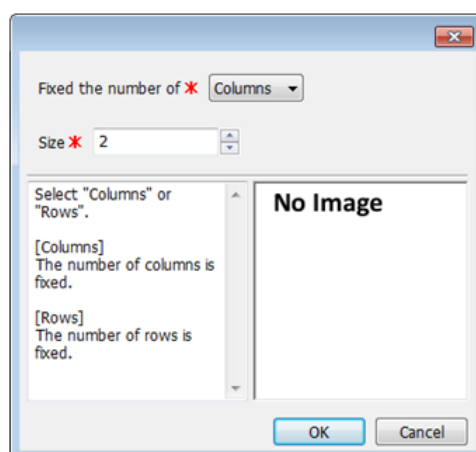


### 1.1.3. ウィンドウの整列

開いた4スペクトラムを、比較しやすくするために2ウィンドウ×2ウィンドウで整列します。整列方法はいくつかありますが、ここでは [Auto Arrange Mode] を用います。[Auto Arrange Mode] は2つのウィンドウの表示位置をドラッグ and ドロップで入れ替えることができる表示方法です。

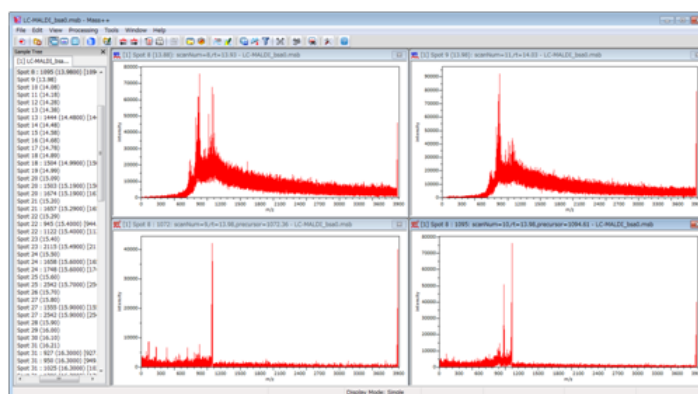
[Window] メニューから [Auto Arrange Mode] をクリックします。

設定ダイアログが開きます。

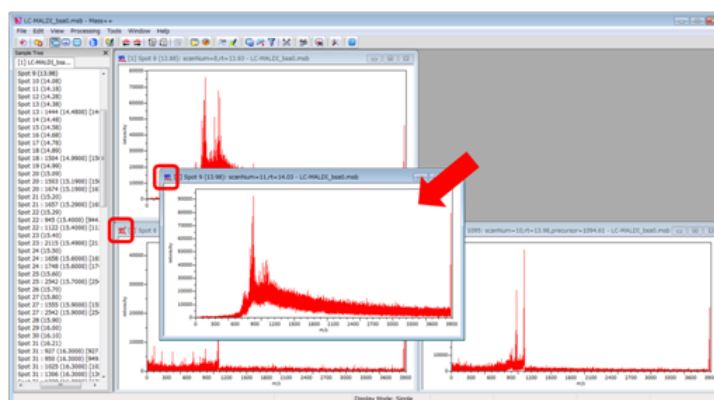


[Fixed the number of] の [Columns] [Rows] をそれぞれ2に設定します。 [OK] をクリックしてダイアログを閉じます。

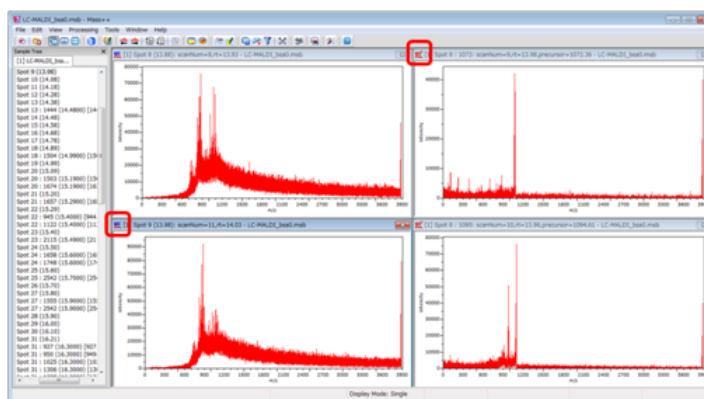
ウィンドウが整列されます。



[Auto Arrage Mode] において、あるウィンドウの表示場所と別のウィンドウの表示場所を入れ替える場合は、一方のウィンドウのヘッダ上でクリックし、入れ替えたいウィンドウと重ねるようにドラッグして放します。



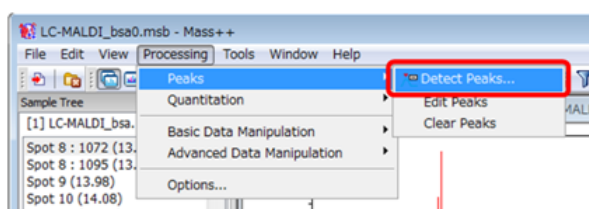
ウィンドウの表示位置が入れ替わります。



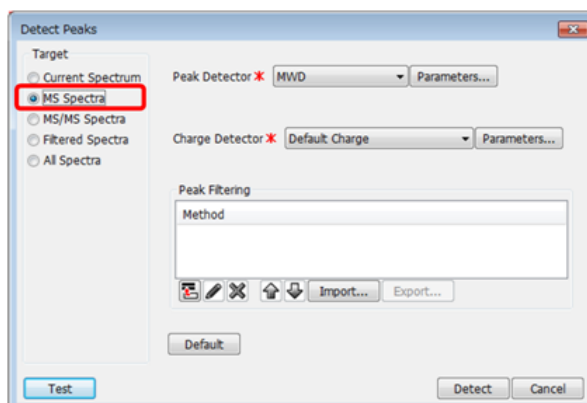
### 1.1.4. ピーク検出

スペクトラムのウィンドウを表示させた次は、スペクトラムのピークを検出します。

[Processing] メニューから [Peaks] - [Detect Peaks] をクリックします。



[Detect Peak] が開きます。



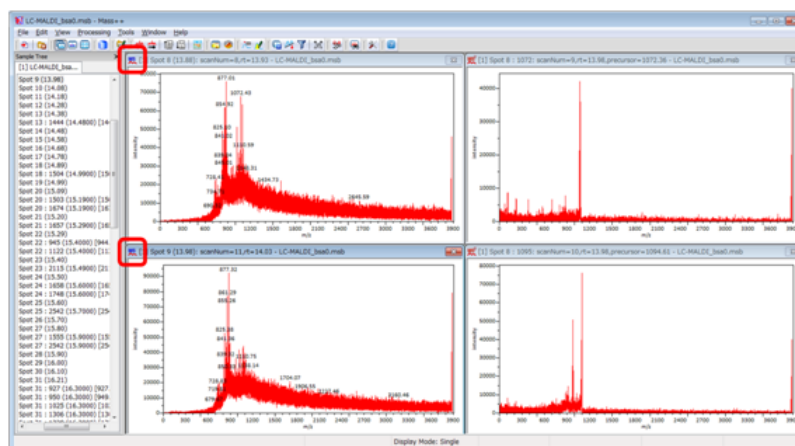
ここでは、データに含まれるMS1スペクトラムを全てピーク検出します。

[Target] の [MS Spectra] を選択します。

[Peak Detector] などのその他の各設定は各 [パラメーターヒント] を参照してください。

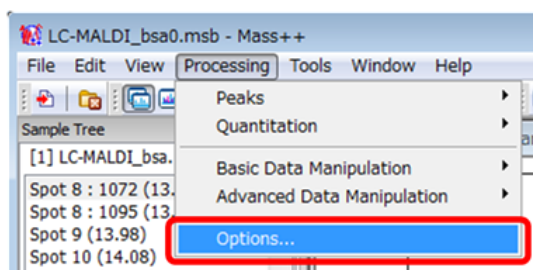
[Detect] をクリックします。

MS1スペクトラムのみがピーク検出されます。検出されたピーク上にはm/z値が表示されます。

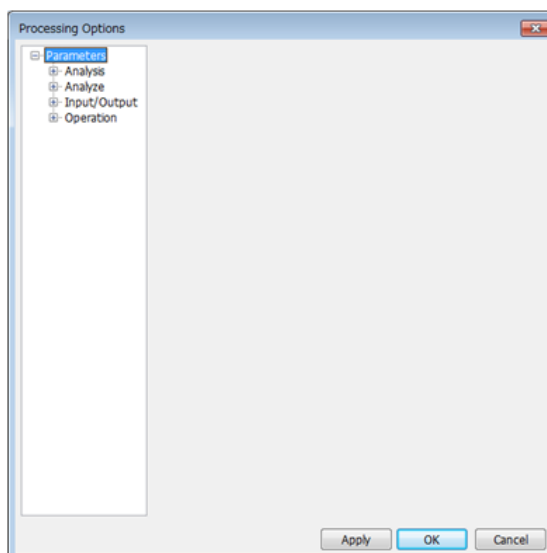


Note: スペクトラムのウィンドウを開いたときに、自動でその開いたスペクトラムのピーク検出をする場合は次のように設定を行います。

[Processing] メニューから [Options] をクリックします。

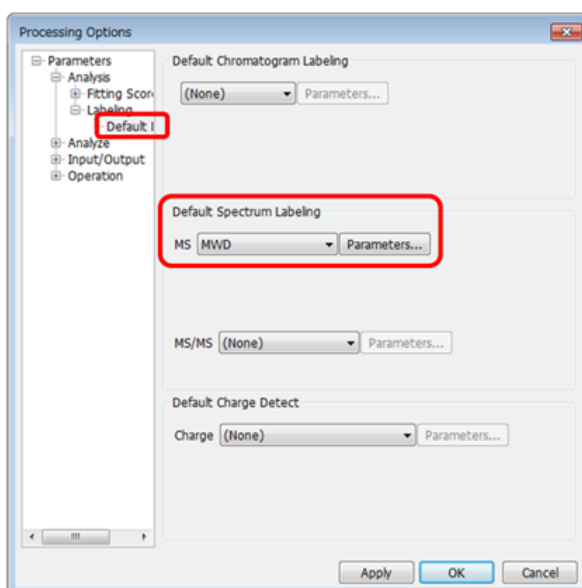


[Processing Options] が開きます。



[Parameters] メニューから [Analysis] - [Labeling] - [Default Labeling] をクリックします。

[Default Labeling] 設定画面が開きます。



この設定画面にて、スペクトラムやクロマトグラムを開いたときにピーク検出を行うかどうか、また、その際に用いるピーク検出関数を設定します。

[OK] をクリックして [Processing Options] を閉じます。

新しく、MS1スペクトラムを開いてみてください。設定した方法により自動でピーク検出が行われます。

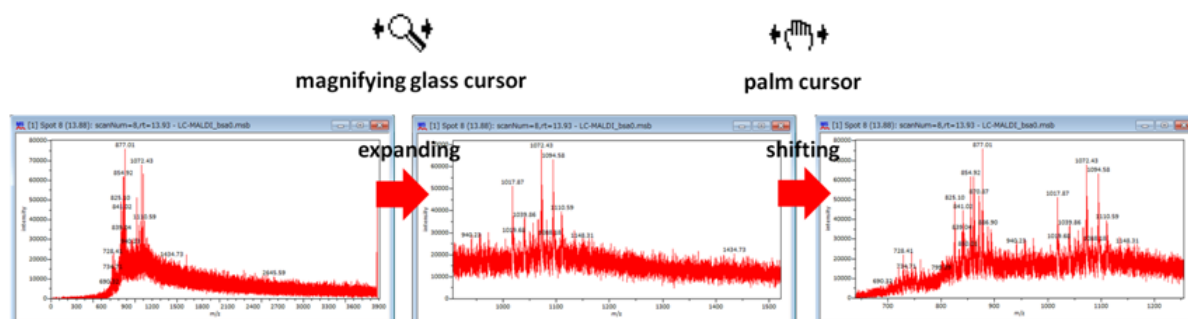
### 1.1.5. 拡大・縮小・シフト

次に、検出されたピークの詳細を確認するため、横軸 (m/zまたはRT)の拡大、縮小を行います。

マウスポインターをグラフ軸の下側に持って行きます。右クリックしたままにし、マウスポインターが虫眼鏡表示になることを確かめてください。そのまま右にドラッグすると拡大表示、左にドラッグすると縮小表示になります。

また、クリックしたままにし、マウスポインターが手のひら表示になることを確かめてください。

そのまま左右にドラッグすると表示領域がシフトします。

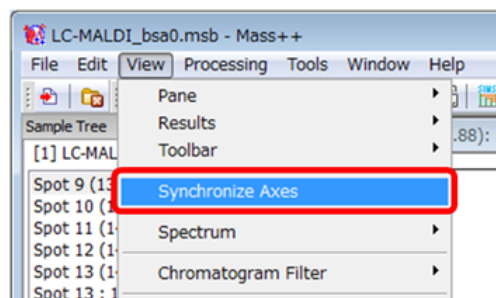


表示する縦軸 (ピーク強度) も同様に拡大、縮小、表示領域シフトすることができます。これらの拡大、縮小はピーク検出の有無に関係なく、操作ができます。

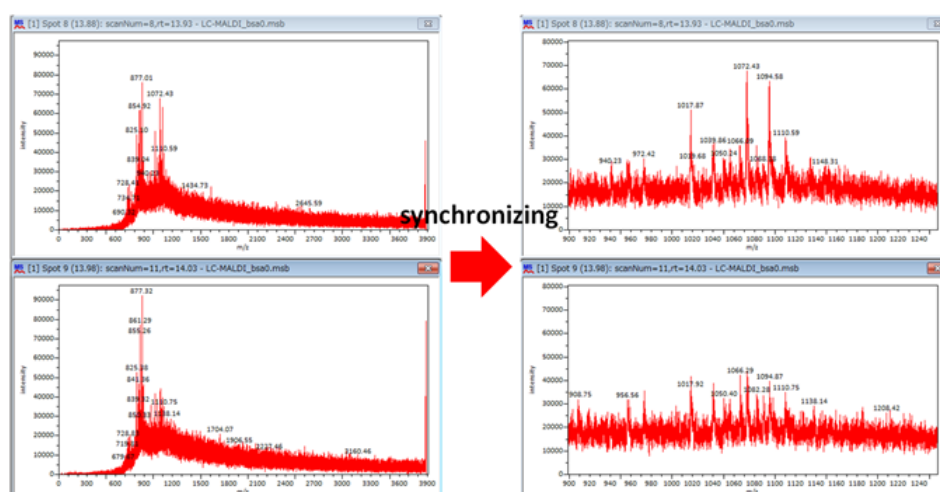
## 1.1.6. 軸のシンクロ

複数のスペクトラムを比較する場合、一つのスペクトラムの表示幅を変えたとき、同じように他のスペクトラムの表示幅も自動で変わると便利があります。ここでは、メインウィンドウ上に表示されているスペクトラムの軸の表示を同期させます。

[View] メニューから [Synchronize Axes] をクリックします。



あるスペクトラムの軸表示の拡大・縮小を行うと、他のスペクトラムの軸表示も同期して拡大・縮小することを確かめてください。

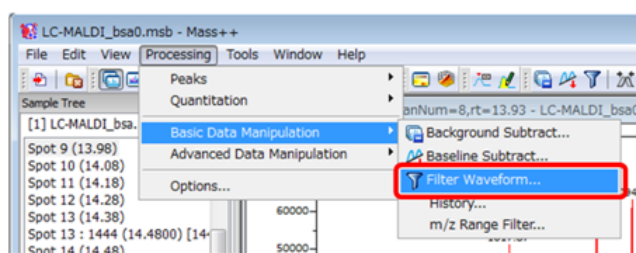


## 1.1.7. データ処理(スムージング)

スペクトラムに対して行う操作は、ピーク検出だけではありません。ここでは、スペクトラムに対するデータ処理の例として、スムージングによるノイズ除去について説明します。

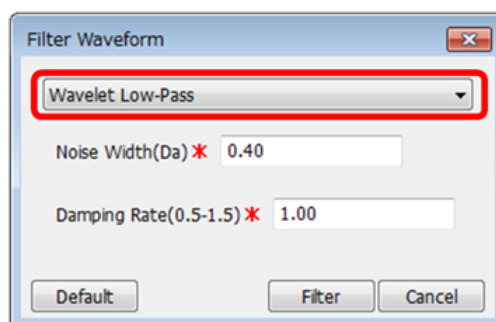
ここでは、表示中のスペクトラムに対しスムージングをかけてみます。

[Processing] メニューから [Basic Data Manipulation] - [Filter Waveform] をクリックします。





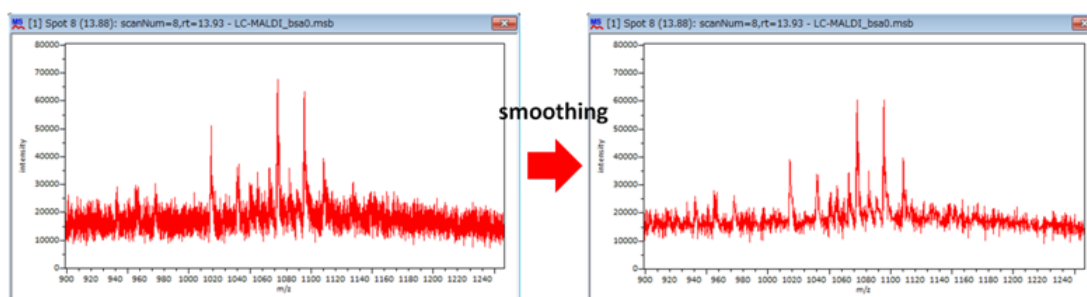
[Filter Waveform] が開きます。



ここでは、Wavelet を利用したスムージングを行います。[Wavelet Low-Pass] を選択してください。

[Filter] をクリックします。

選択状態にあったスペクトラムがスムージング処理されます。



必要に応じて、表示範囲を拡大・縮小して波形を確認してください。

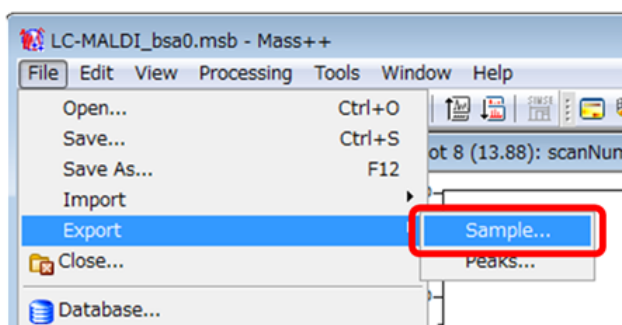
## 1.1.8. スペクトラムの保存

スペクトラムに対し必要な処理を行ったあとは、そのスペクトラムを保存しておきます。

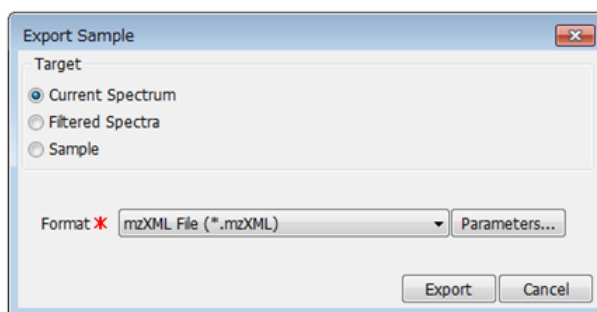
ここでは、スムージング後のスペクトラムをmzXML形式で保存します。

目的のスペクトラムが表示されているウィンドウを選択状態にしてください。

[File] メニューから [Export] - [Sample] をクリックします。



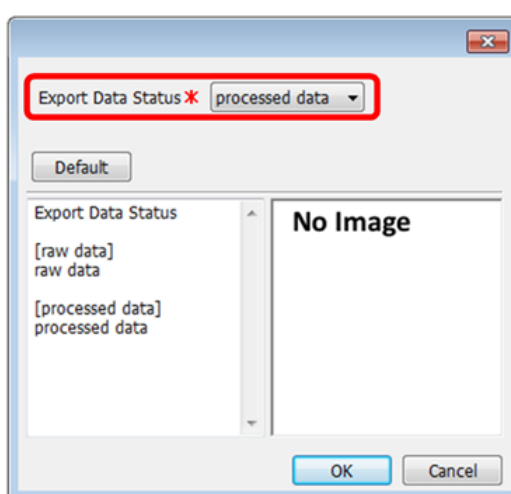
[Export Sample] が開きます。



[Target] を [Current Spectrum] に、 [Format] を [mzXML File (\*.mzXML)] にしてください。

[Parameters] をクリックします。

パラメータ設定ダイアログが開きます。



処理 (今回はスムージング) 後のスペクトラムを出力するため、 [Export Data Status] を [Processed Data] にします。

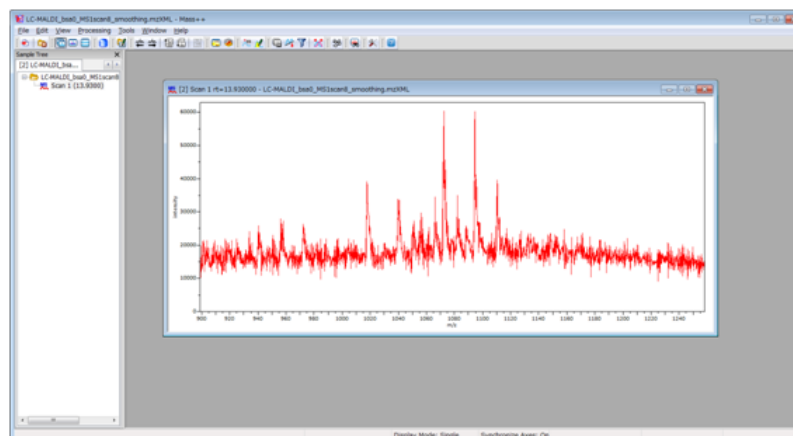
[OK] をクリックし、ダイアログを閉じます。

[Export Sample] の [Export] をクリックします。

[Save As] が開きます。名前を付けて保存します。

確認のため、先ほど出力したファイルを開きます。

スムージングされたデータが保存されています。

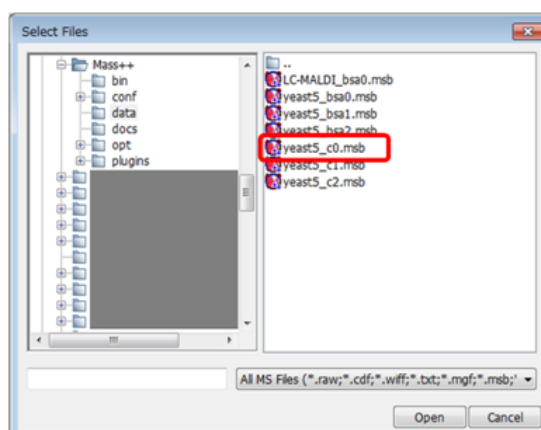


## 1.2. Heatmap and 3D Display

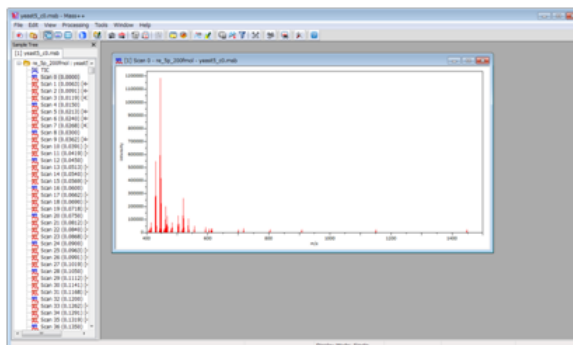
この節ではLC-MS、LC-MALDIのデータなどのRT×m/zの2次元データをヒートマップ表示、3D表示する操作について説明します。

### 1.2.1. ファイルを開く

まず、目的のデータを開きます。ここでは例として、Mass++に同梱されているLC-MSのデータのうち、「yeast5\_c0.msb」を開きます。



さらに、その中のスペクトラムないしクロマトグラムを一つ開きます。ここではスペクトラムを開きます。



これで準備は完了です。

### 1.2.2. ヒートマップ表示

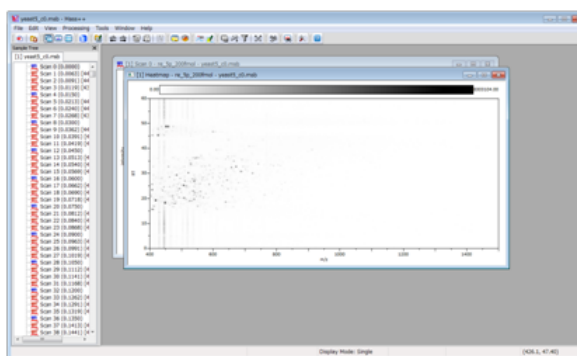
開いたLC-MSのデータをヒートマップ表示します。

スペクトラムが表示されているウィンドウ上でクリックし、アクティブ状態にします(メインウィンドウ中に一つしか開いていない場合は、すでにアクティブになっています)。アクティブになったスペクトラムが属するデータが、ヒートマップ表示の対象になります。

下記のアイコンをクリックします。



ヒートマップが表示されます。

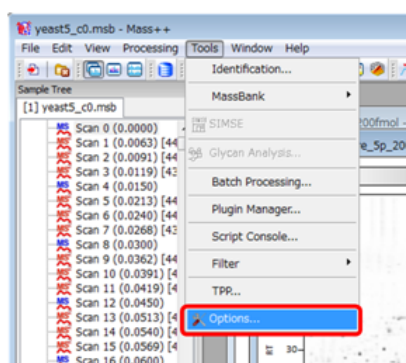


### 1.2.3. 表示設定の変更

Mass++をインストールしたデフォルトの設定では、先ほど示したようなヒートマップが表示されます。これは、表示形式として「Grayscale」、ピーク強度の表示スケールとして「Linear」になっています。

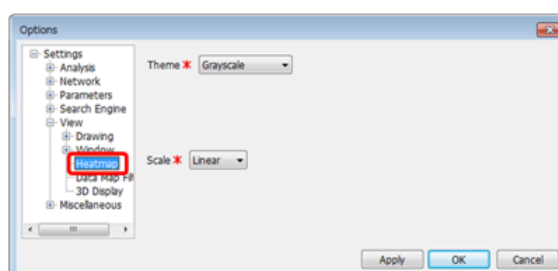
見やすさのために表示形式を変更したり、小さいピークを強調表示するためにScaleをLogにしたりする場合は次のようにします。

[Tools] メニューから [Options] をクリックします。



[Options] が表示されます。

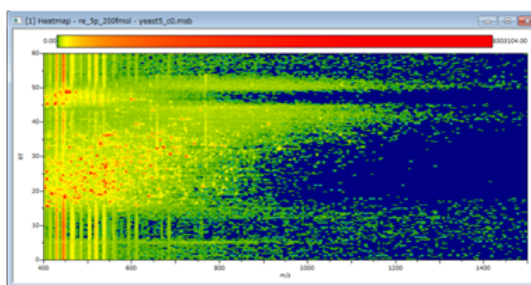
[Settings] - [Display] - [Heatmap] をクリックします。



目的にあった表示形式を [Theme] から、ピーク強度のScaleを [Scale] から選択します。

[Apply] をクリックすると、[Options] が閉じないまま、メインウィンドウのヒートマップに変更した表示形式が反映されます。

例として、[Theme] を [Thermography]、[Scale] を [Log] にして [Apply] をクリックすると、次のように表示が変わります。



適切な形式を選んで、[OK] をクリックして [Option] を閉じます。

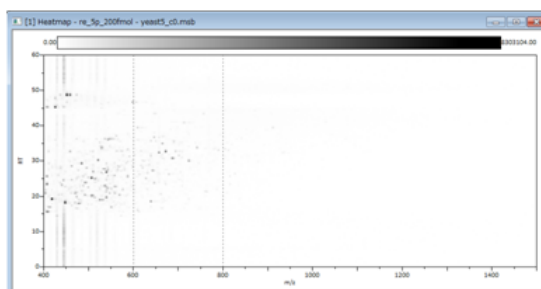
以降、[Theme] [Scale] をデフォルトの設定にしたまま説明を続けます。

## 1.2.4. 表示幅の変更(1)

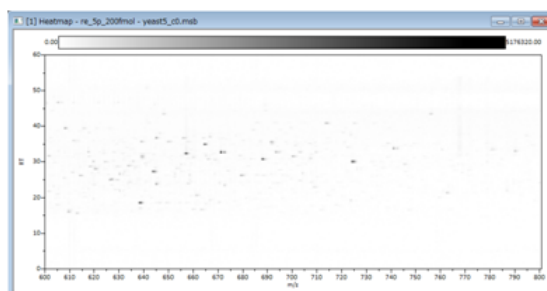
ヒートマップ上の特定のピークについて詳しく観察するための表示幅の変更方法は、3つあります。

1つめは、ヒートマップの表示軸の外側にマウスポインターを持っていき、拡大したい領域をドラッグアンドドロップする方法です。

下記は、m/z軸側でm/z = 600付近から800付近までドラッグした例です。m/z = 600付近と800付近に点線が描かれます。



ドロップすると、その領域が拡大表示されます。



RT方向も、同様に拡大表示操作ができます。

表示領域を最初に状態に戻すには、ヒートマップが表示されているウィンドウ上でダブルクリックします。

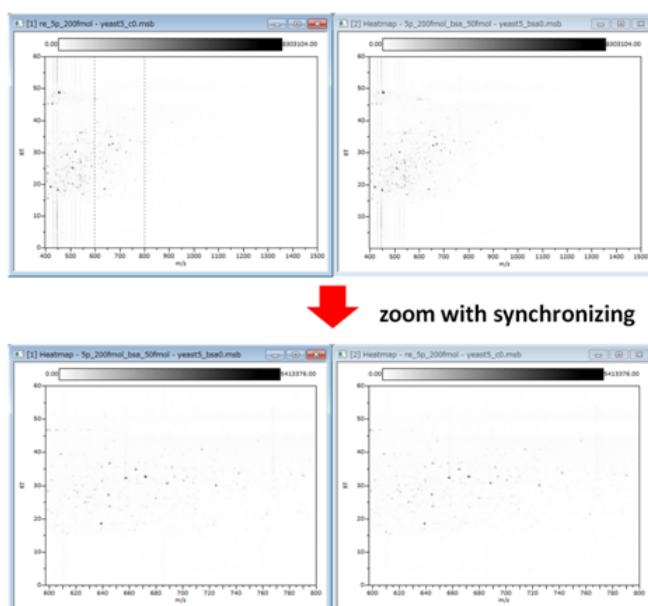
Note: 複数回拡大操作を行ったあとで、ヒートマップが表示されているウィンドウ上でダブルクリックすると、一気に最初の表示状態に戻ります。

「一つ前の表示状態に戻す」場合は [Edit] メニューから [Undo] をクリックします。

これらの表示領域を元に戻す方法は、すべての拡大操作において共通です。

Note: 複数のヒートマップにおいて、表示領域の拡大を同時に行いたい場合は [Display] メニューから [Synchronize Axes] をチェック状態にします。

拡大操作が連動します。

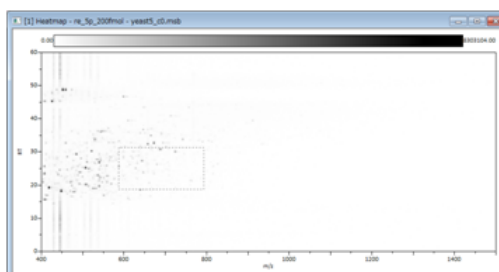


## 1.2.5. 表示幅の変更 (2)

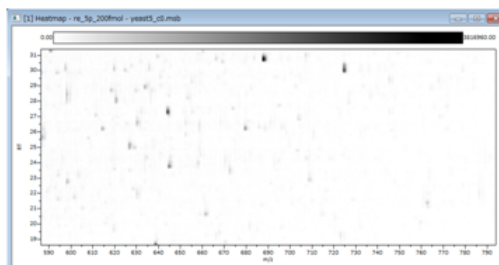
2つ目は、ヒートマップの表示軸の内にマウスポインターを持っていき、拡大したい領域 (RT×m/z) をドラッグアンドドロップする方法です。

ヒートマップの表示軸の内側にマウスポインターを持っていき、クリックするとアイコンが虫眼鏡表示になります。

下記は、m/z軸側で (RT, m/z) = (30, 600) 付近から (20, 800) 付近までドラッグした例です。その領域に点線が引かれています。



ドロップすると、その領域が拡大表示されます。

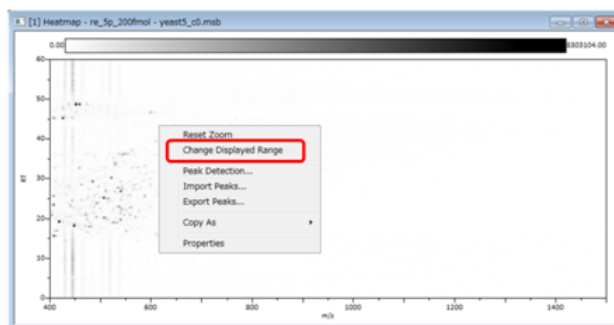


## 1.2.6. 表示幅の変更 (3)

これまでの2つは、拡大領域を大まかにしか指定することができませんでした。

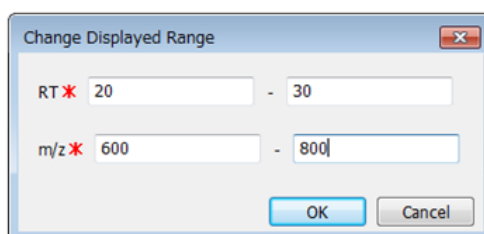
3つめは、拡大する範囲を数値で指定する方法です。

ヒートマップの表示軸の内にマウスポインターを持っていき、右クリックします。  
右クリックメニューが表示されます。



[Change Displayed Range] をクリックします。

[Change Displayed Range] が表示されます。RT幅、m/z幅を入力します。図は(RT, m/z) = (30, 600)から(20, 800)まで拡大表示する場合の設定です。



[OK] をクリックし、ダイアログを閉じます。表示範囲が拡大されていることを確認して下さい。

## 1.2.7. 2次元ピーク検出

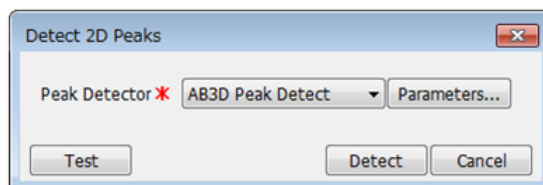
ヒートマップ上のピークを検出するため、2次元ピーク検出を行います。

2次元ピーク検出では、同位体分布を考慮したピーク検出を行います。

2次元ピーク検出対象のヒートマップが表示されているウィンドウをクリックし、アクティブ状態にします。

[Processing] メニューから [Peaks] - [Detect Peaks] をクリックします。

[Detect Peaks] が開きます。



目的にあったピーク検出関数を [Peak Detector] から選択します。

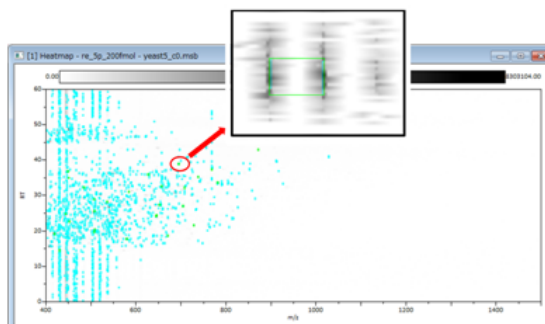
MRMデータに対しては「detect MRM3D Peaks」を選択します。

今開いているデータはMRMのデータではありませんので、ここでは「AB3D Peak Detect」を選択します。

[Detect] をクリックします。

ヒートマップ全体に渡って2次元ピーク検出が実行されます。

検出されたピークは青四角で囲われます。そのうち、同位体ピークであると判定されたピーク同士は緑四角で囲われます。



Note: データが大きい場合、データ全体を2次元ピーク検出するにはとても時間がかかる場合があります。特定の範囲のみの2次元ピーク検出は次のようにします。

まず、2次元ピーク検出したい領域を拡大表示します。

次に、[Detect 2D Peaks] を開き、設定を行ったのち、[Test] をクリックします。

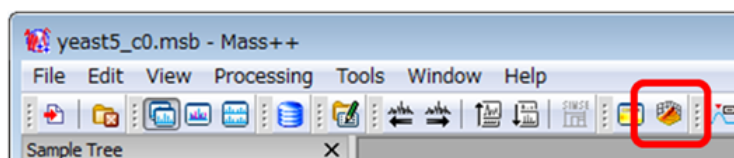
表示領域のみが2次元ピーク検出されます。

## 1.2.8. 3D Display

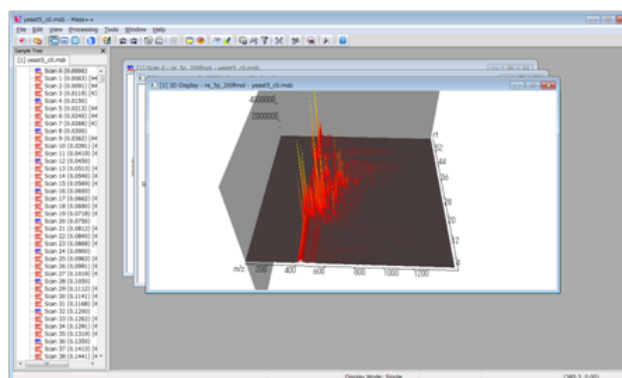
次は、3D Displayについて説明します。

ヒートマップと同じく、アクティブになったスペクトラムが属するデータが3D Display表示の対象になります。

次のアイコンをクリックします。



データ処理が行われたのち、3D Displayが表示されます。



## 1.2.9. 回転表示

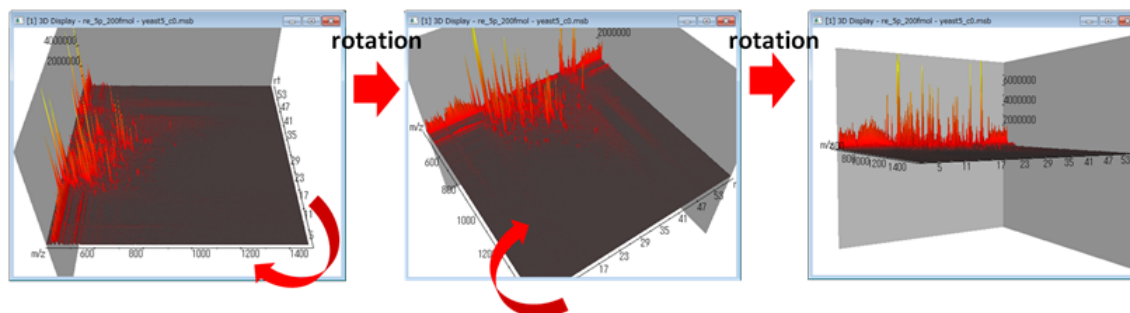
ピークの詳細を観察するために、3D Display表示を回転表示する場合は以下のようにします。



3D Displayの表示軸の内側にマウスポインターを持っていき、左クリックしたままにします。

マウスポインターが矢印表示になります。

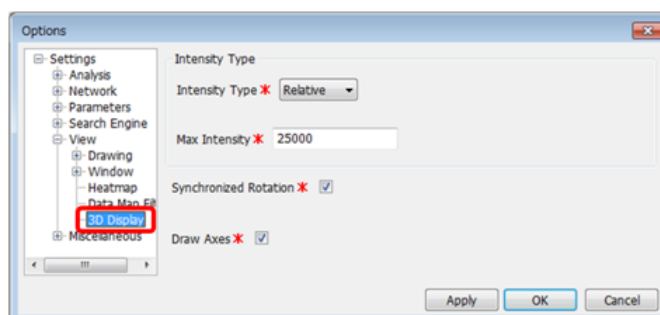
そのままドラッグすると、3D Displayが回転します。ドロップすると回転が止まります。



## 1.2.10. 表示設定の変更

表示設定の変更は、ヒートマップ表示と同じく [Options] で行います。

[Settings] - [Display] - [3D Display] をクリックします。



ピーク強度を絶対値表示するか相対値表示するか、さらに表示する最大強度の値を設定します。

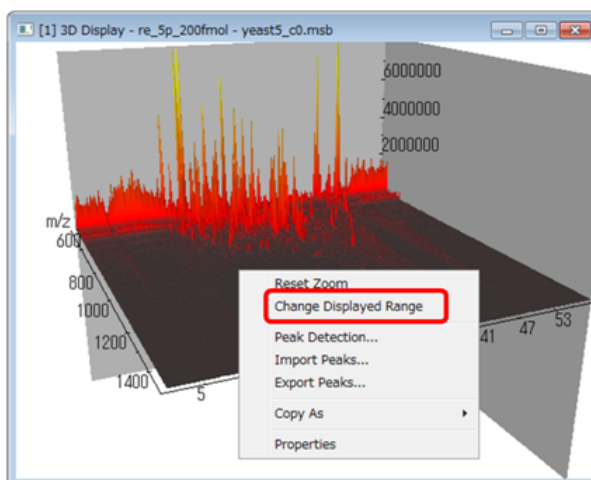
Note: 複数の3D Displayを開いているとき、[Synchronized Rotation] にチェックを入れると、回転表示が連動します。

## 1.2.11. 表示幅の変更

3D Displayの表示幅の変更は、右クリックメニューから行います。

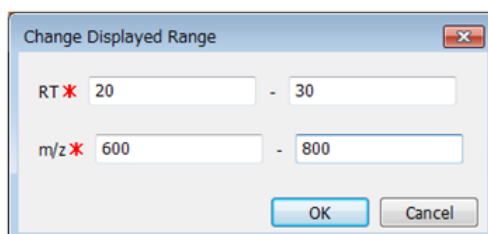
3D Displayの表示軸の内側にマウスポインターを持っていき、右クリックします。

右クリックメニューが表示されます。

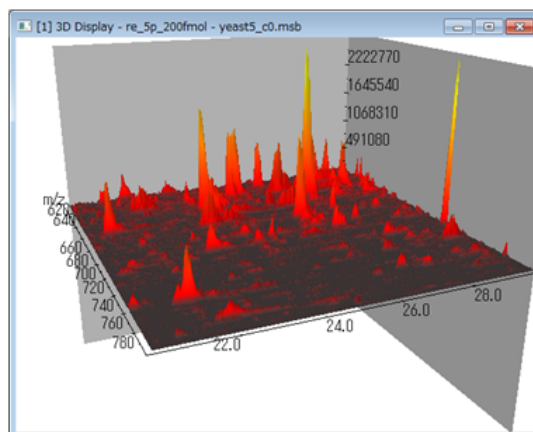


[Change Displayed Range] をクリックします。

[Change Displayed Range] が表示されます。RT幅、m/z幅を入力します。図は(RT, m/z) = (30, 600)から(20, 800)まで拡大表示する場合の設定です。



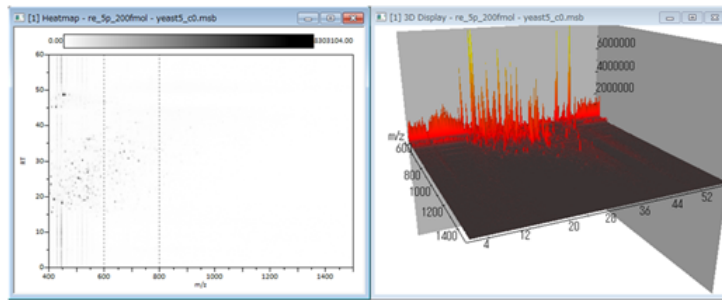
[OK] をクリックし、ダイアログを閉じます。表示範囲が拡大されてます。




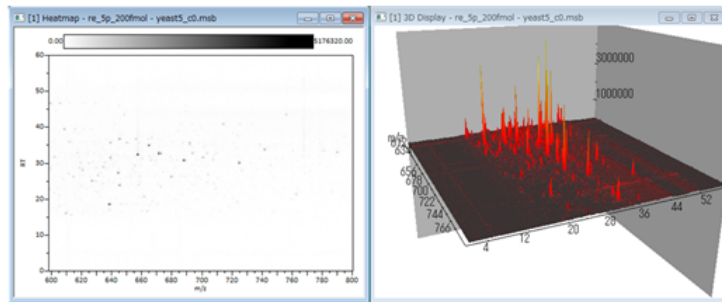
Note: 次のような方法で拡大することもできます。

ヒートマップを表示した上で [Display] メニューから [Synchronize Axes] をチェック状態にしておきます。

ヒートマップでの拡大操作をすると、連動して3D Displayも拡大されます。



 zoom with synchronizing



# Chapter 2. Differential Analysis

この章では、バイオマーカー探索を目的としたデータ群間の差異解析を行う方法について説明します。Mass++は、ピークの同定、統計解析、多変量解析を相補的に用いて差異ピークを探索することができます。

## 2.1. Create Peak Matrix

MS1データを用いたバイオマーカー探索においては、まず健常者グループ、患者グループ由来のサンプルを測定したMSデータからなる「ピークマトリクス」を作成します。

ピークマトリクスとは、それぞれのMSデータのデータ名、ピーク位置、そのピーク位置におけるピーク値、同定結果、検定結果等をまとめた行列です。

そのピークマトリクスで、健常者グループには共通して存在しないが、患者グループには共通して存在するピークがあったとき（もしくはその逆）、そのピークがその病気を特徴付ける「バイオマーカー候補」です。

この節では、Mass++に同梱されている次のLC-MSデータを使って、ピークマトリクスを作成します。

(1) yeast5\_c0~2.msb

5種類の酵母菌由来のペプチドからなる混合サンプルです。

(2) yeast5\_bsa0~2.msb

(1)にBSA（ウシ血清アルブミン）由来のペプチドを加えた混合サンプルです。

このとき、BSA由来のペプチドピークは、(2)にだけ存在するはずですが。

Mass++では、ピークマトリクスをウィザード形式で作成することができます。

Note: ピークマトリクスの中のピークをデータベース検索して同定する場合、用いるデータベースの設定をピークマトリクス作成前におこなかなければなりません。

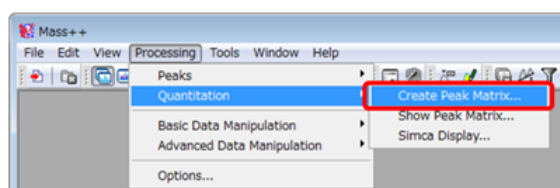
設定の方法は [Identification] 節を参照してください。

Note: Mass++のピークマトリクス作成機能は、LCありのMSデータ（LC-MS (ESI)）、LC-MALDI）、LCなしのMSデータ（MALDI）に対応しています。

Note: データの大きさによって、計算時間が大変かかる場合があります。

### 2.1.1. Peak Matrix Name

[Processing] メニューから [Quantitation] - [Create Peak Matrix] をクリックします。



[Create Peak Matrix] ウィザードが開き、 [Peak Matrix Name] が表示されます。



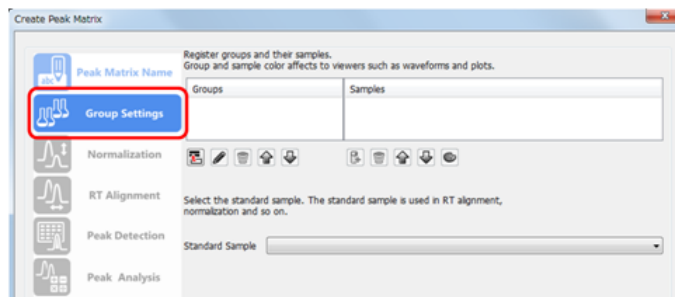
[Name] に、ピークマトリクス名を入力します。

次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。

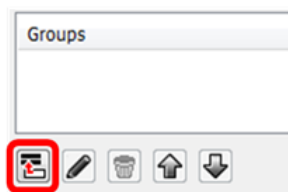
## 2.1.2. Group Settings

[Group Setting] が表示されます。

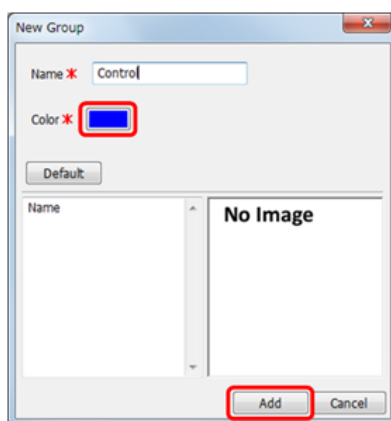


[Groups] に、グループ名を登録します。

次のアイコンをクリックします。



[New Group] が開きます。



[Name] にグループ名を入力します。

ここでは、「Control」と入力します。

[Color] を選択します。

四角く色が付いているところをクリックします。

[色の設定] が開きます。



ここでは、青色を選択します。

ピークマトリクスを作成後、それぞれのピーク位置 (RTまたはm/z) 周辺のピーク波形を描画することができます。

そのとき、それぞれのピークがグループごとに色分けされます。

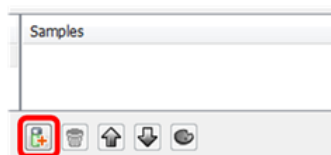
[New Group] の [Add] をクリックします。

グループ名が登録されます。

Groups	Samples
Control	

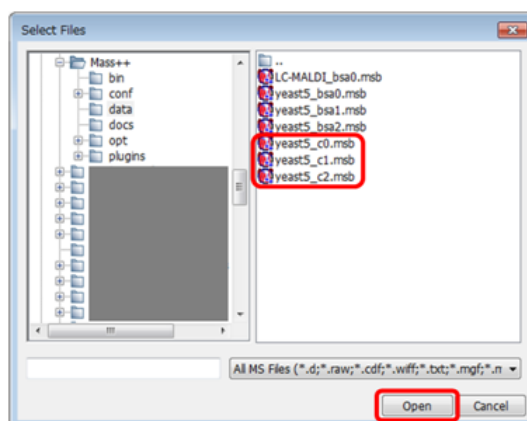
次に、そのグループに属するサンプルを登録します。

次のアイコンをクリックします。



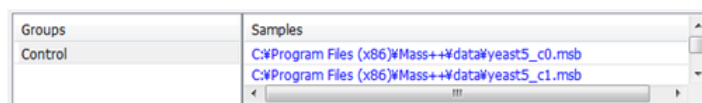
[Select Files] が開きます。

Mass++に同梱されている「yeast5\_c0.msb」「yeast5\_c0.msb」「yeast5\_c0.msb」を選択してください。



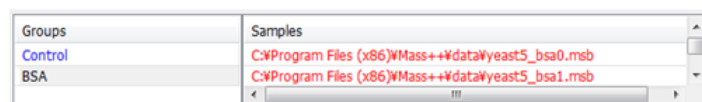
[Open] をクリックします。

サンプルが登録されます。



これらを必要な回数だけ繰り返します。

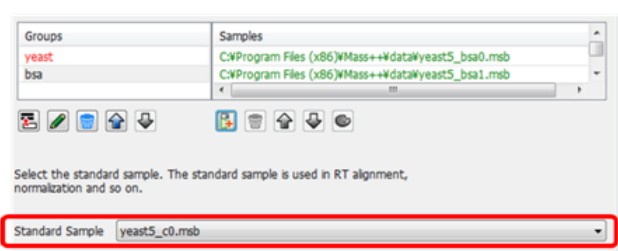
同様に、「yeast5\_bsa0.msb」「yeast5\_bsa1.msb」「yeast5\_bsa2.msb」が属する「BSA」グループを登録してください。



色は赤色にします。

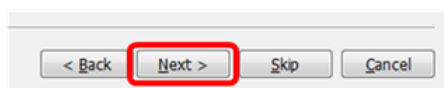
データを登録したあとは、RTアライメントのときに基準として使うサンプルを [Standard Sample] に登録します。

ここでは、「yeast5\_c0.msb」を選択してください。

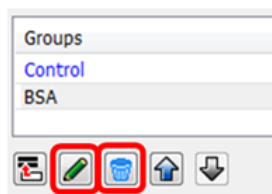


次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。



Note: グループ名を変更するときは、鉛筆マークのアイコンをクリックします。 [Edit Group Name] が開きます。登録したグループやサンプルを削除するときは、ごみ箱アイコンをクリックします。

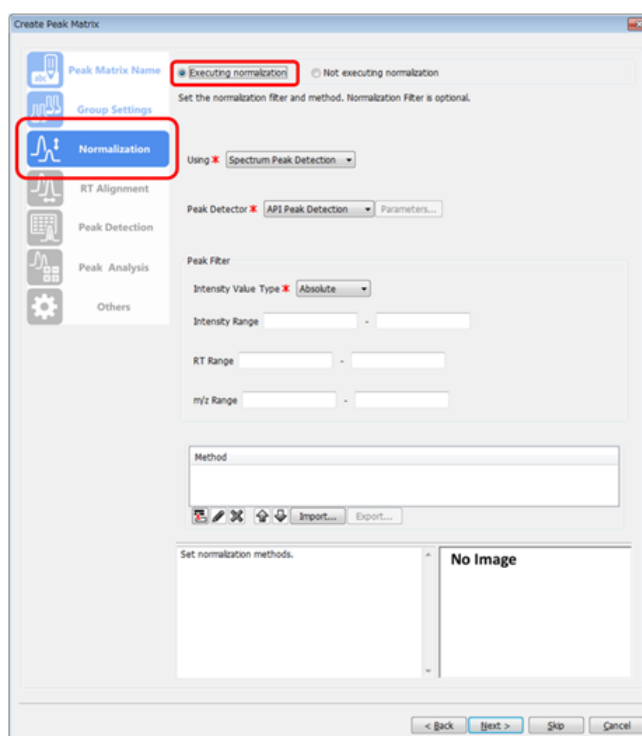


Note: 前の設定項目（ここでは [Peak Matrix Name]）に戻るときは、[Back] をクリックします。



## 2.1.3. Normalization

[Normalizaton] が表示されます。



このパネルでは、ピーク検出前に行うピーク強度の正規化のパラメーターを設定します。

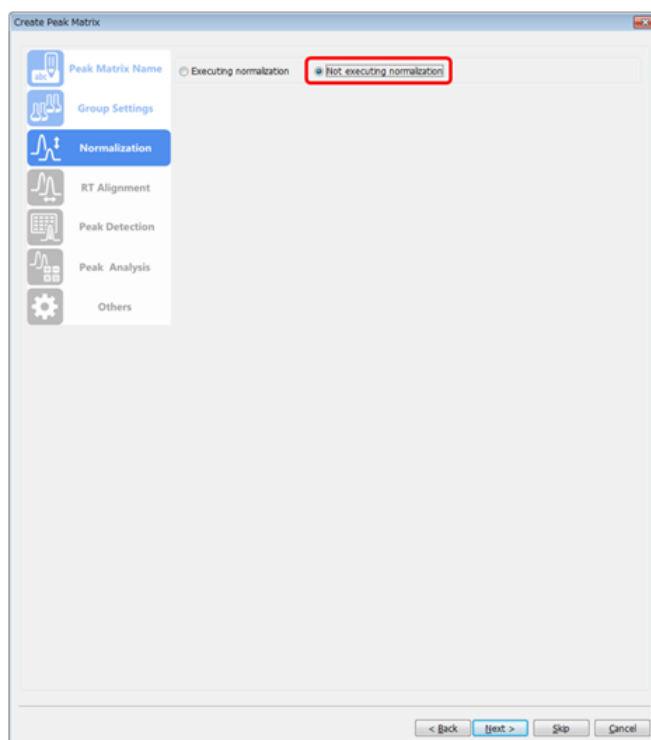
正規化を行う場合は、[Executeing normalization] を選択します。

ここでは、「ピーク強度の再現性は十分にある」と考えて正規化を行いません。

[Not executeing normalization] を選択してください。



パネル上のコントロールが表示されなくなります。

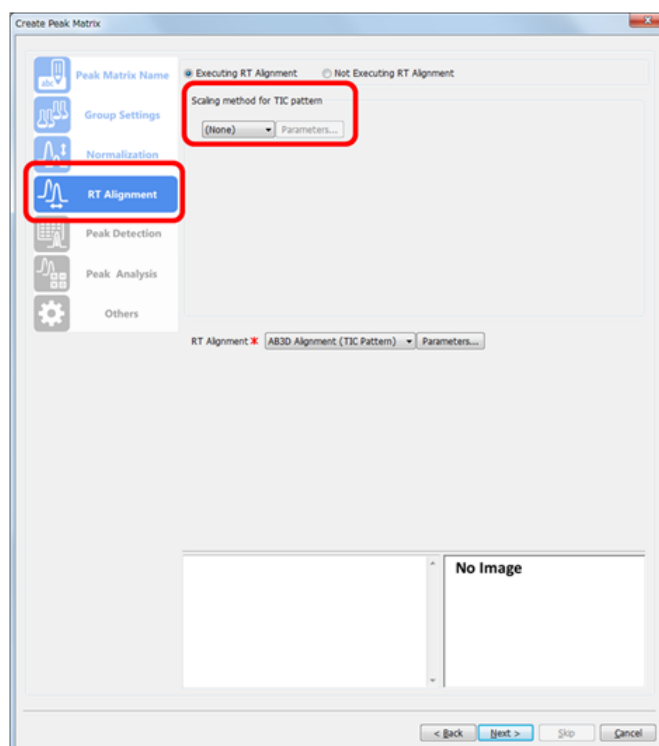


次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。

## 2.1.4. RT Alignment

[RT Alignment] が表示されます。



MSの再現性に比べて、LCの再現性が低い場合があります。

ここでは、データごとに少しずつれているRT（保持時間）を補正します。

Mass++は、それぞれのデータのTIC波形の類似性を利用して、RTの補正を行います。

データがLC-MALDIである場合、必要に応じて [Scaling method for TIC pattern] にてTIC波形をスケージングします。

このガイドでは、「RT方向の再現性は充分である」と考えて、RTアライメントは行いません。

[Not Executing RT Alignment] をクリックします。

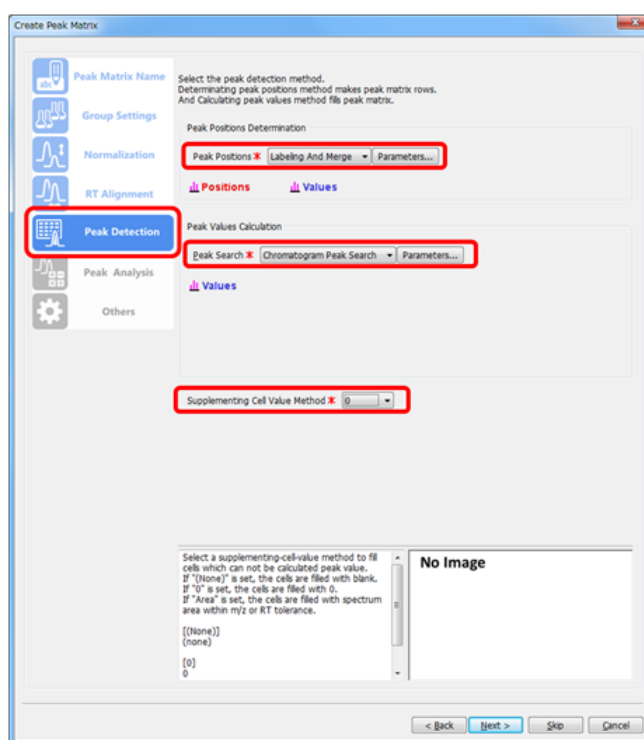
Note: RTアライメントを行う場合のパラメーターは、[Processing]メニューから [Advanced Data Manipulation] - [RT Align Sample]をクリックして開く [RT Align] ダイアログであらかじめ調整しておきます。

次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。

## 2.1.5. Peak Detection

[Peak Detection] が表示されます。



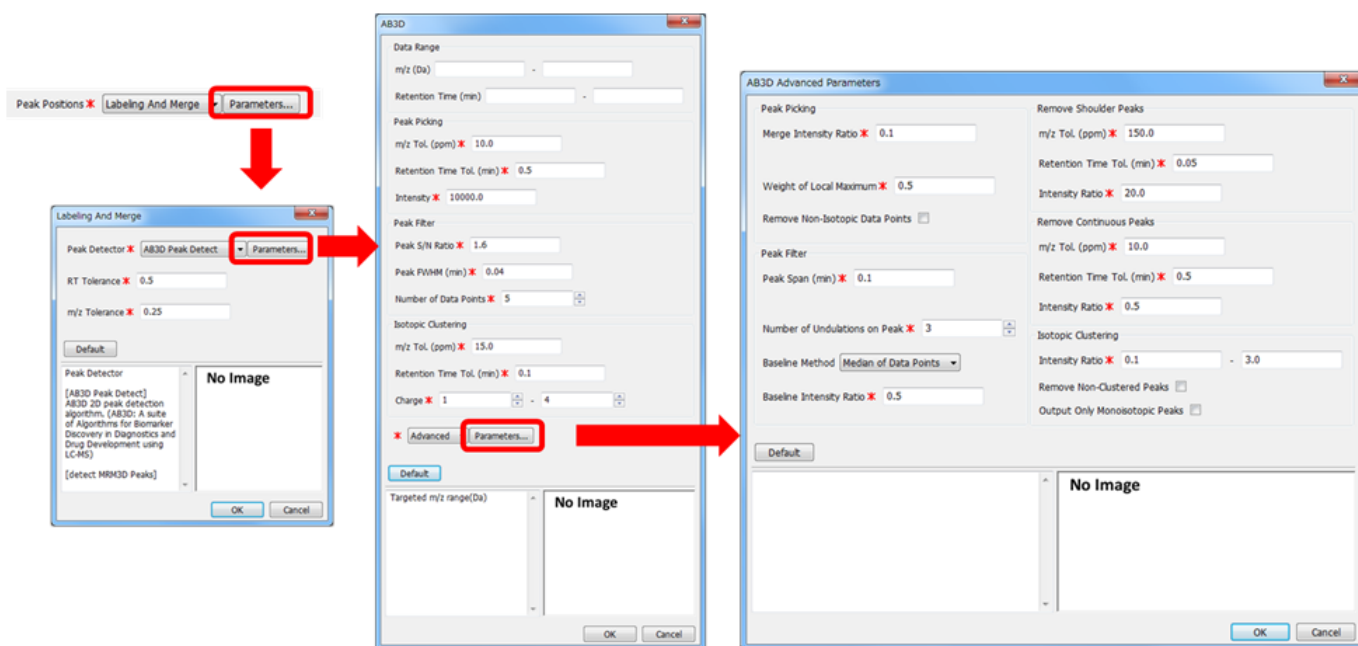
このパネルではピーク検出関数を設定します。

[Peak Positions Determination] ではピーク位置を検出します。

[Peak Values Determination] では検出されたピーク位置におけるピーク値（強度ないし面積）を検出します。

このガイドでは、[Peak Positions Determination] のピーク位置検出関数のうち、[Labeling And Merge] を選択します。

[Labeling And Merge] の設定は次のようにします。

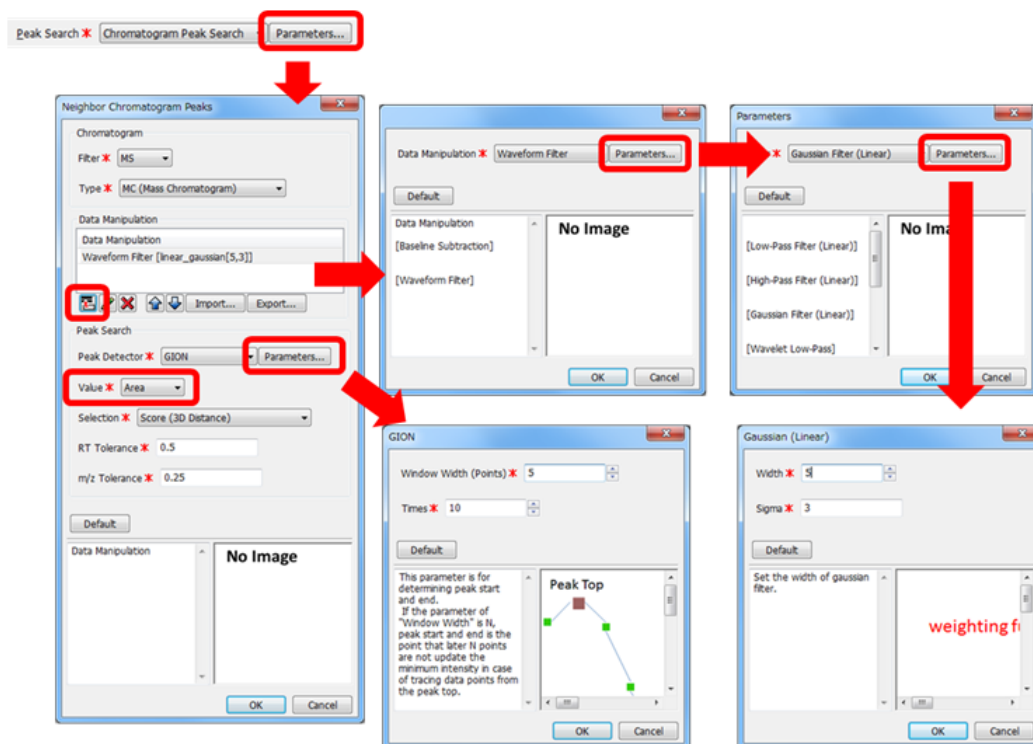


Mass++では、ピークマトリクスを作成にあたり、ピークの種類（スペクトラムピークかクロマトグラムピークか）を選択することができます。

ここでは、クロマトグラムピークのピークマトリクスを作成します。

[Peak Detection] パネルの [Peak Search] で、[Chromatogram Peak Search] を選択します。

[Chromatogram Peak Search] の設定は次のようにします。



ここで、「クロマトグラムピーク」とは、[RT Tolerance] で設定したm/z幅のMC (Mass Chromatogram) のピークです。

Mass++は、ピーク強度のピークマトリクスを作成するか、ピーク面積のピークマトリクスを作成するか選ぶことができます。

ここでは、ピーク面積のピークマトリクスを作成します。

[Peak Value] で [Area] を選択します。

[Peak Detection] ダイアログの [Supplementing Cell Value Method] を [0] にすると、ピークがないなどの理由でピーク面積が計算されなかったセルに、「0」が補完されます。

[Area]を選択すると、スペクトラムから直接求めたピーク面積の値を補完します。

ここでは、補完されたことを確認するため、「0」を選択します。

次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。

## 2.1.6. Peak Analysis (1) ピークスケーリング

[Peak Analysis] が表示されます。



[Peak Scaling] ではピークマトリクス中のピーク値に対して行うスケーリングのパラメータを設定します。

ここでは、スケーリングを行いません。

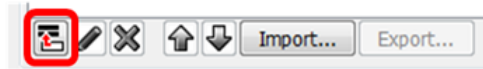
[Not Executing peak scaling] を選択します。

## 2.1.7. Peak Analysis (2) 統計解析

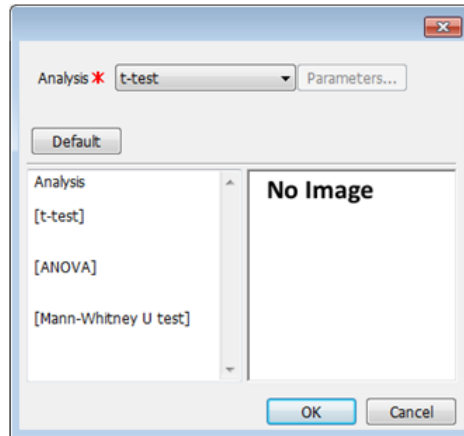
[Peak Analysis] ではピークマトリクス中のグループ間のピーク値を検定するパラメータを設定します。

ここでは、「ウェルチのt検定」を行います。

次のアイコンをクリックします。



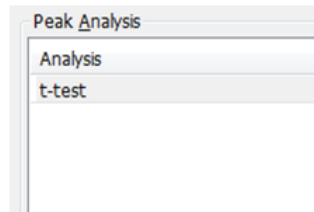
検定の種類を選択するダイアログが開きます。



[t-test] を選択してください。

[OK] をクリックします。

[Analysis] 一覧に [t-test] が追加されます。

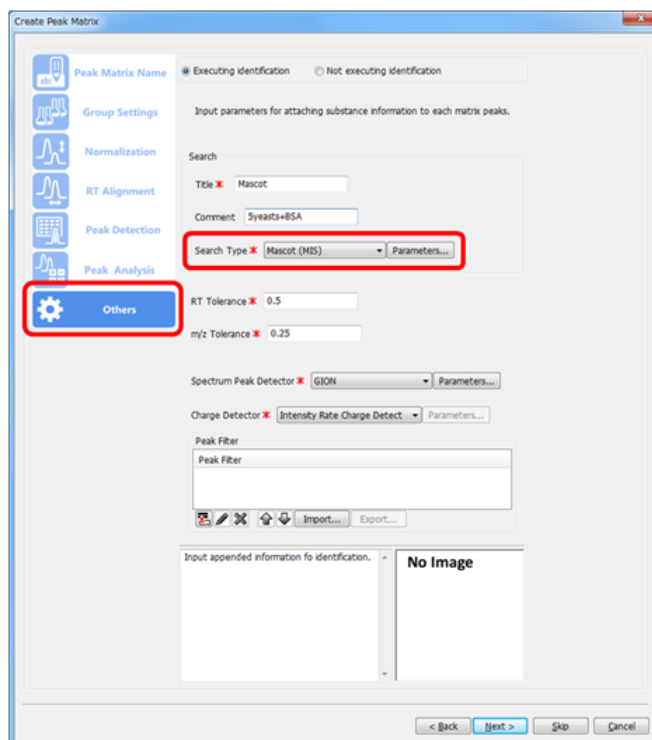


次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。

## 2.1.8. Others (1) 同定

[Others] が表示されます。



ここでは、データベース検索のパラメーターを設定します。

ここでは、MascotのMS/MS Ions Searchを使用します。

[Search Type] で [Mascot (MIS)] を選択します。

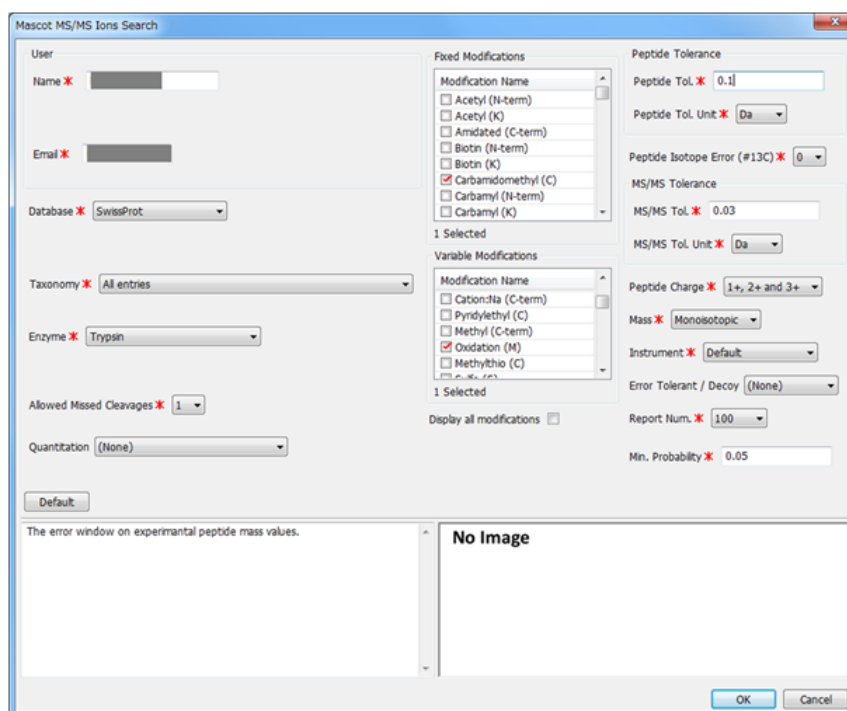
[Parameters] をクリックします。

[Mascot MS/MS Ions Search] が開きます。

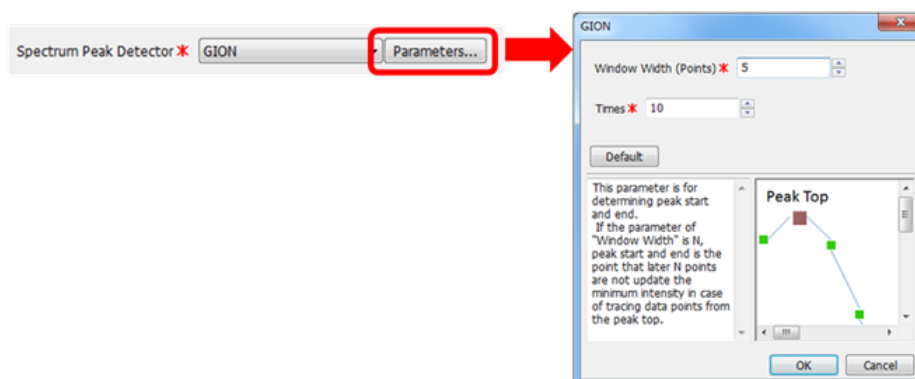
それぞれのパラメーターの詳細は、Matrix  
[www.matrixscience.com/](http://www.matrixscience.com/) を参照してください。

Scienceのwebサイト ([http://](http://www.matrixscience.com/)

ここでは、次のような設定で検索を行います。



ピーク検出関数の設定は、ここでは次のようにします。



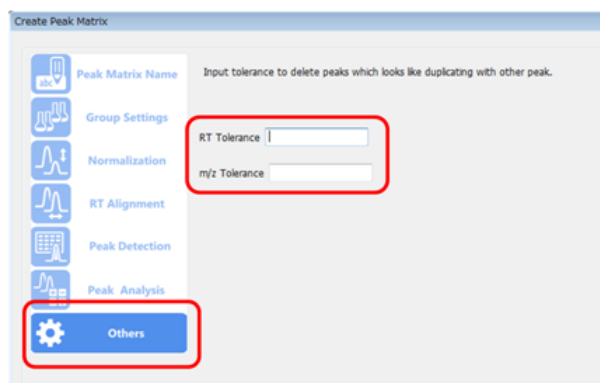
その他の設定は [Others] パネルの設定にします。

次の設定項目に進みます。

[Next] をクリックします。

## 2.1.9. Others (2) ピークマージ

ピークをマージするためのパラメーターを設定するパネルが表示されます。



ここでは、ピークのマージを行いません。

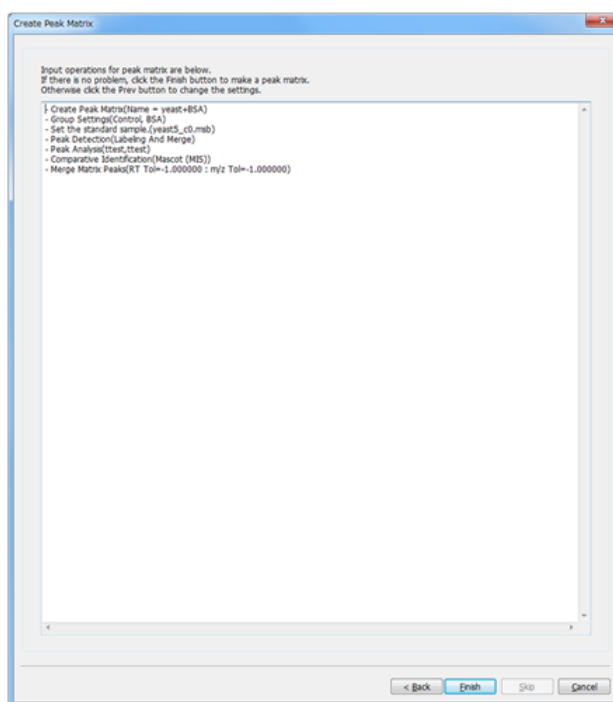
[RT Tolerance]、[m/z Tolerance] 共に空欄にします。

ピークマトリクス作成のための設定は以上です。

[Next] をクリックします。

## 2.1.10. 設定パラメーター一覧

設定パラメーター一覧が表示されます。

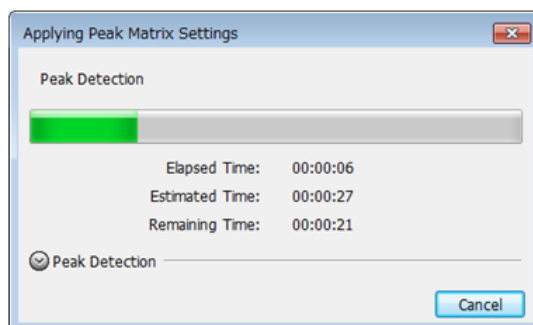


パラメーターを変更したい場合は、[Back] をクリックして目的の項目まで戻ってください。

設定に問題がない場合は、[Finish] をクリックします。

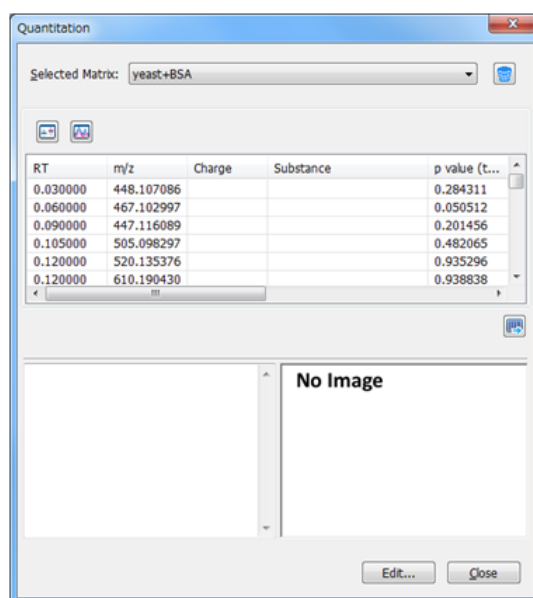
ピークマトリクス作成が実行されます。





## 2.1.11. ピークマトリクス (1) 作成されたピークマトリクス

ピークマトリクスが作成されました。



ピーク位置 (m/z)、同定結果 (Substance)、検定結果 (p value)、ピーク値が一覧表示されています。

## 2.1.12. ピークマトリクス (2) ソート

作成の時点では、m/zの昇順でソートされています。

ここでは、U検定のp値でソートし直します。

ピークマトリクスの [p value (u-Test)] ヘッダをクリックします。

ピークマトリクス全体がU検定のp値でソートされます。

Quantitation

Selected Matrix: yeast+BSA

RT	m/z	Charge	Substance	p value (t...	re_Sp_20...
26.956667	582.828491			0.000000	633.318...
18.988333	417.878510		UTP20_H...	0.000001	261.499...
24.350000	535.306274			0.000001	256.987...
25.958334	732.414673			0.000003	5380.83...
18.123333	490.530792			0.000004	212.626...
47.145000	411.089111			0.000008	26324.2...

No Image

Edit... Close

他のパラメーターについても、同様にソートができます。

Note: もう一度ヘッダをクリックすると、降順にソートされます。

## 2.1.13. ピークマトリクス (3) 同定結果の確認 (i)

それぞれのピークの同定結果は、[Substance] に記載されています。

同定されなかった場合は、空欄になっています。

特定のp値でBSA由来のペプチドが同定されていることを確認してください。

Quantitation

Selected Matrix: yeast+BSA

RT	m/z	Charge	Substance	p value (t...	re_Sp_20...
18.243334	447.274597		ADH4_KL...	0.200917	6658683...
18.988333	417.208588		ALBU_BO...	0.000895	3268.327...
27.033333	582.308472		ALBU_BO...	0.000575	6048.719...
22.576666	653.367310		ALBU_BO...	0.000142	1139.119...
20.184999	461.753296		ALBU_BO...	0.000430	2124.356...
26.520000	571.754883		ALBU CA...	0.000210	29561.62...

No Image

Edit... Close

## 2.1.14. ピークマトリクス (4) 同定結果の確認 (ii)

データベース検索結果の詳細は [Search Engine Results] ダイアログで確認することができます。

詳細は「Identification」節を参照してください。

## 2.1.15. ピークマトリクス (5) ピーク波形、箱ひげ図表示

「そのピークがバイオマーカーであるかどうか」「そのピークが由来する物質に、発現の差はあるか」をp値のみで判断するのは危険です。

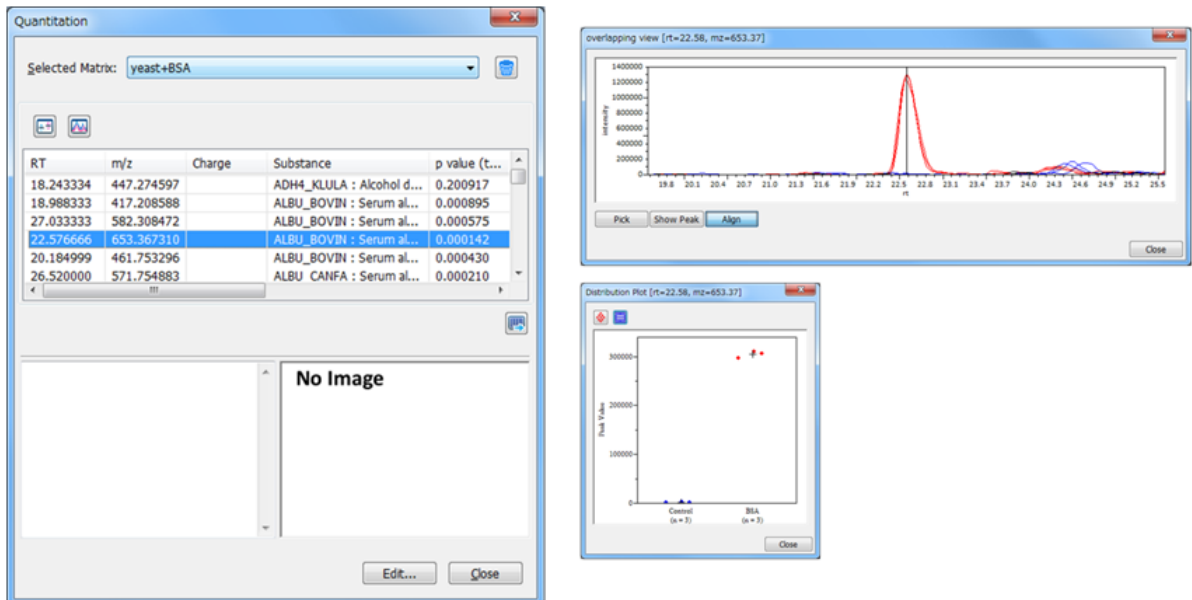
特定の値以下のp値であっても、それぞれのピーク値のばらつきが大きかったり、ピーク検出の際にただのノイズを拾ってしまった、ということもあり得ます。

検定の結果を踏まえつつ、ピーク波形に立ち戻って確認することが重要です。

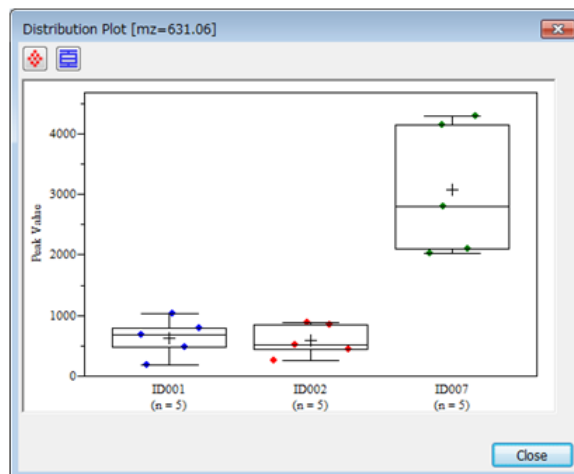
Mass++には、ピークマトリクス上のピーク位置周辺のピーク波形を表示する機能と、ピーク値を箱ひげ図表示する機能があります。

ピーク波形を確認したいピークの行をクリックします。

ピーク波形、箱ひげ図が開きます。



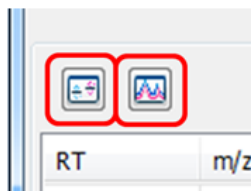
Note: このガイドでは、3 vs 3の解析を行っているため、箱ひげ図表示にはなっていませんが、例えば5 vs 5 vs 5の場合は次のように表示されます。



ピーク波形ダイアログの黒線は、ピーク位置です。

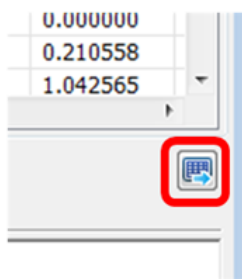
[Group Settings] で設定した色で、ピークが色分けされていることを確認してください。

Note: ピーク波形、箱ひげ図が表示されない場合は、次のアイコンをクリックしてください。



## 2.1.16. ピークマトリクス (6) ピークマトリクスの出力

ピークマトリクスをテキストファイル形式で出力したいときは、ピークマトリクス上の下記のアイコンをクリックします。

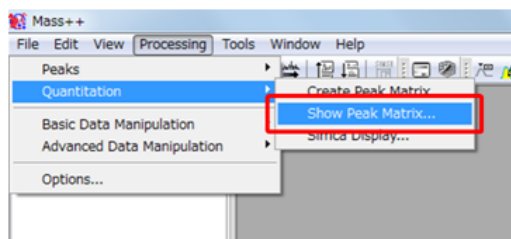


[Save] ダイアログが開くので、名前を付けて保存します。

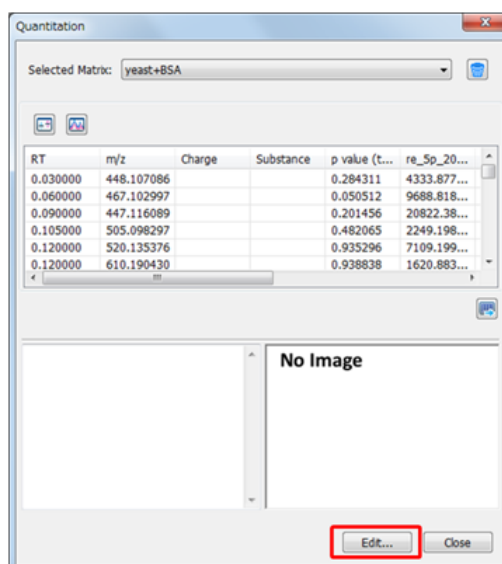
## 2.1.17. Show Peak Matrix

すでに作成済みのピークマトリクスを表示ないし編集する場合は、次のようにします。

[Processing] メニューから [Quantitation] - [Show Peak Matrix] をクリックします。



[Quantitation] が開きます。



確認・編集したいピークマトリクスを [Selected matrix] で選択します。

選択したピークマトリクスが表示されることを確認してください。

表示されたピークマトリクスを編集する場合は、次のようにします。

[Edit] をクリックします。

[Create Peak Matrix] が開きます。



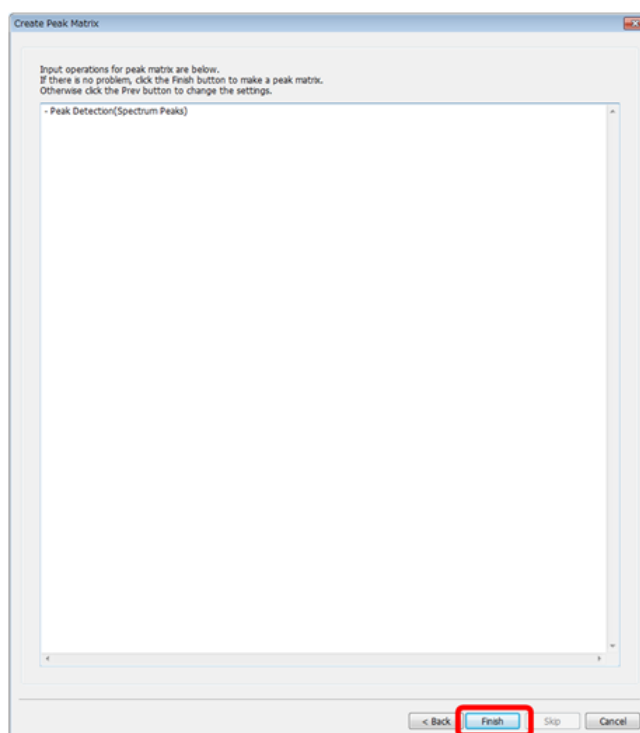
編集したい項目を選びます。

[Next] をクリックします。

それぞれの項目の画面に切り替わります。

設定変更後、 [Next] をクリックします。

設定変更パラメーター一覧が表示されます。



[Finish] をクリックします。

ピークマトリクスが再計算されます。

## 2.2. SIMCA Display

MSデータを用いたバイオマーカー探索のために作成したピークマトリクスを、統計解析ソフトSIMCAで解析して得られる3種のプロット (Score plot、loading plot、S plot) を取り込んで表示します。SIMCAで発見したバイオマーカー候補に対応するピークの元スペクトルを確認することで、バイオマーカー候補としての妥当性を検証します。本ガイドで示すSIMCAの活用法は一例です。詳細は「SIMCA 13 tutorial (インフォコム株式会社)」を参照して下さい。

### 2.2.1. Peak MatrixをSIMCAに受け渡す

「Create Peak Matrix」節でエクスポートした「yeast+BSA.txt」をエクセルから読み込み、先頭に「Number列」を追加します。「Number列」には、1から順に通し番号をつけます (最終行はサンプル数に等しい)。

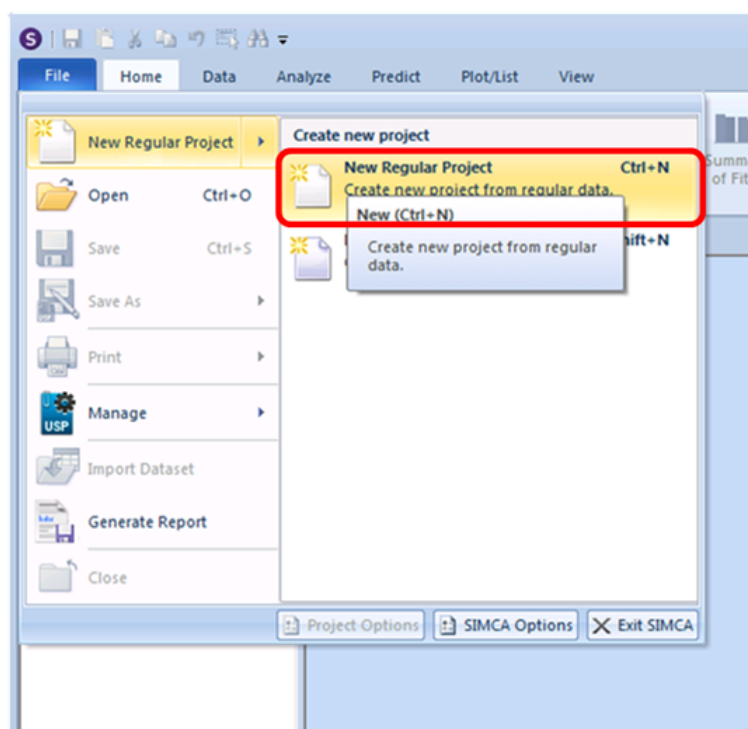
2行目に新しい空白行を挿入し、この行に以下の値を記入します。

- A列：「0」 (この値はダミーであり、空白以外なら可です)
- F列：「y-val」 (目的変数であることを示すタイトル)
- G～I列目：「0」
- J～L列目：「50」 (BSAの混入量)

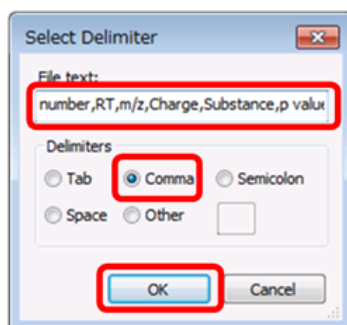
1	number	RT	m/z	Charge	Substance	p value	t-re_5p_200f	re_5p_200f	re_5p_200f	re_5p_200f	5p_200fmo	5p_200fmo	5p_200fmo
2	0					y-val	0	0	0	0	50	50	50
3	1	0.03	448.1071			0.284311	4333.878	5443.824	7121.269	974.163	5930.426	3642.542	
4	2	0.06	467.103			0.050512	9688.819	19310.07	22538.81	438.54	682.0787	2211.957	
5	3	0.09	447.1161			0.201456	20822.39	60752.64	25254.99	17436.8	11162.99	8115.728	
6	4	0.105	505.0983			0.482065	2249.198	1986.093	6804.04	7188.467	1824.193	7736.091	
7	5	0.12	520.1354			0.935296	7109.199	11473.66	9799.122	3191.118	7113.829	19450.31	
8	6	0.12	610.1904			0.938838	1620.883	3338.569	483.3511	1118.219	3167.845	886.4847	
9	7	0.15	432.0914			0.887554	6138.941	1721.496	5573.773	1324.721	3911.425	9471.86	
10	8	0.165	468.0956			0.276394	26892.21	2623.309	8187.103	1417.569	405.4763	3305.308	
11	9	0.165	503.1002			0.260446	11642.61	36220.1	11890.12	3517.43	4934.131	13675.38	
12	10	0.195	538.1711			0.854414	11609.47	7226.695	1826.942	13067.09	5432.136	4467.726	
13	11	0.252366	519.7861	1		0.886468	292.7503	860.8229	0	497.8872	399.8185	379.0732	
14	12	0.255	415.0301			0.388103	5338.359	980.6835	3476.376	11984.34	5052.619	2362.547	
15	13	0.255	536.1736			0.465779	51969.5	19520.61	5409.316	23943.85	2484.313	12261.67	
16	14	0.285	504.1093			0.291089	9835.941	10921.34	2875.269	1581.241	8535.655	555.1369	
17	15	0.285	521.14			0.210638	19498.58	10329.72	3274.463	3574.897	2832.154	1246.723	
18	16	0.33	519.1318			0.545923	107286.2	6224.151	3435.772	16752.59	2044.66	23877.03	

上記の修正が終わったら、csv形式で保存します。

SIMCA上で [File] メニューから [New Regular Project] をクリックします。ファイル選択ダイアログが開くので、上で保存した「yeast+BSA.csv」を選択します。

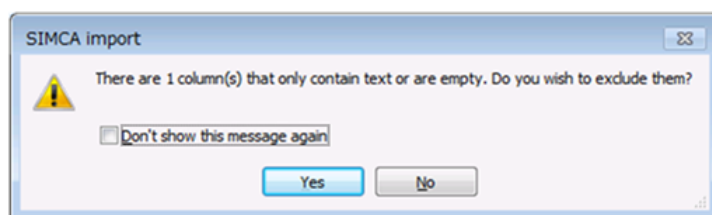


[Select Delimiter] が開きます。 [Delimiter] で [Comma] が選択されていること、 [File Text:] で選択したファイルの先頭行が表示されていることを確認して [OK] をクリックします。



Note: エクセル等で「yeast+BSA.csv」が開かれていると、正しく読み込めません。

以下の警告が出ますが、そのまま [Yes] をクリックします。

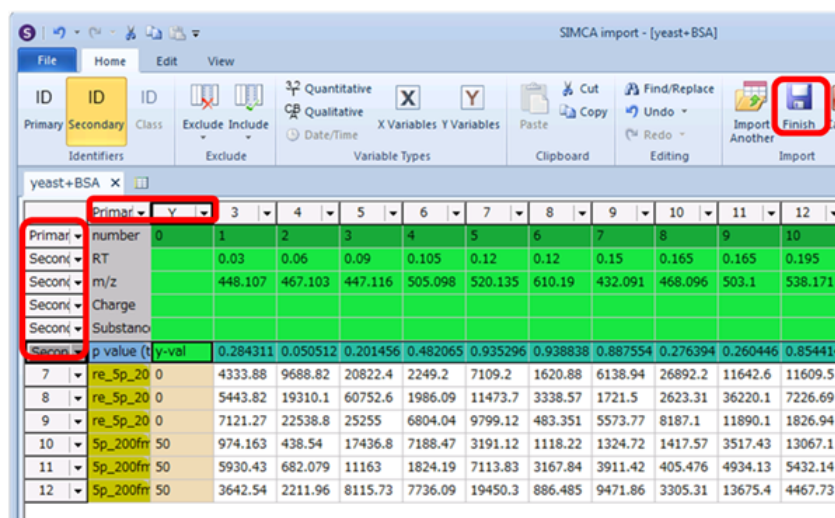


SIMCAのメインウィンドウ上のグリッドに「yeast+BSA.csv」の内容が表示されます。  
[Edit] メニューから [Transpose] をクリックします。

Primary ID	number	RT	m/z	Charge	Substance	p value	re_Sp_20	re_Sp_20	re_Sp_20	Sp_200fm	Sp_200fm	Sp_200fm
2	0					y-val	0	0	0	50	50	50
3	1	0.03	448.107			0.284311	4333.88	5443.82	7121.27	974.163	5930.43	3642.54
4	2	0.06	467.103			0.050512	9688.82	19310.1	22538.8	438.54	682.079	2211.96
5	3	0.09	447.116			0.201456	20822.4	60752.6	25255	17436.8	11163	8115.73
6	4	0.105	505.098			0.482065	2249.2	1986.09	6804.04	7188.47	1824.19	7736.09
7	5	0.12	520.135			0.935296	7109.2	11473.7	9799.12	3191.12	7113.83	19450.3
8	6	0.12	610.19			0.938838	1620.88	3338.57	483.351	1118.22	3167.84	886.485
9	7	0.15	432.091			0.887554	6138.94	1721.5	5573.77	1324.72	3911.42	9471.86
10	8	0.165	468.096			0.276394	26892.2	2623.31	8187.1	1417.57	405.476	3305.31
11	9	0.165	503.1			0.260446	11642.6	36220.1	11890.1	3517.43	4934.13	13675.4
12	10	0.195	538.171			0.854414	11609.5	7226.69	1826.94	13067.1	5432.14	4467.73
13	11	0.252366	519.786	1		0.886468	292.75	860.823	0	497.887	399.819	379.073
14	12	0.255	415.03			0.388103	5338.36	980.684	3476.38	11984.3	5052.62	2362.55

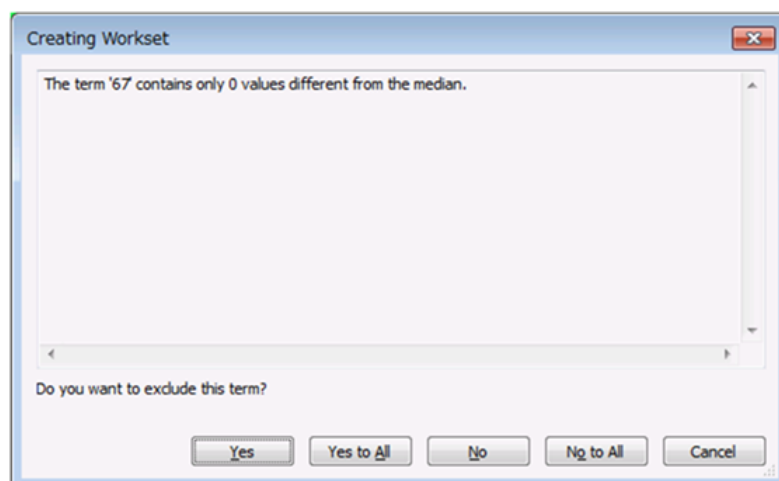
さらに、1、2列目の列ヘッダに対し、それぞれ [Primary ID]、[Y] を選択します。また、1、2~6行目の行ヘッダに対し、それぞれ [Primary ID]、[Secondary ID] を選択します。



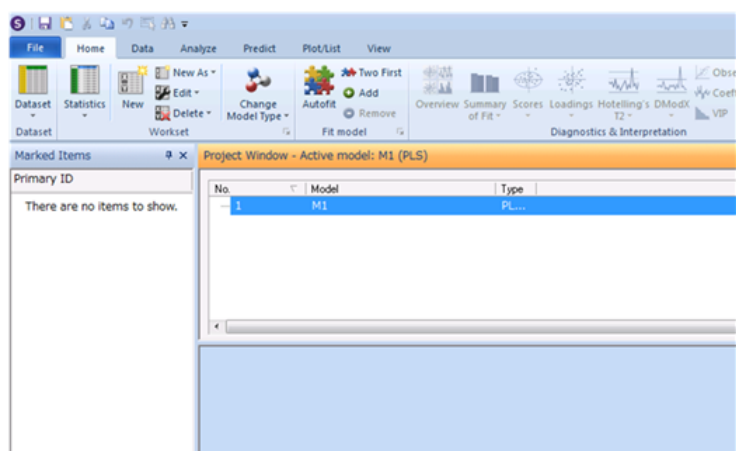


[Home] メニューから [Finish] をクリックすると、ファイル保存ダイアログが開きます。SIMCA projectファイル（ここでは、「yeast+BSA.usp」）を保存します。

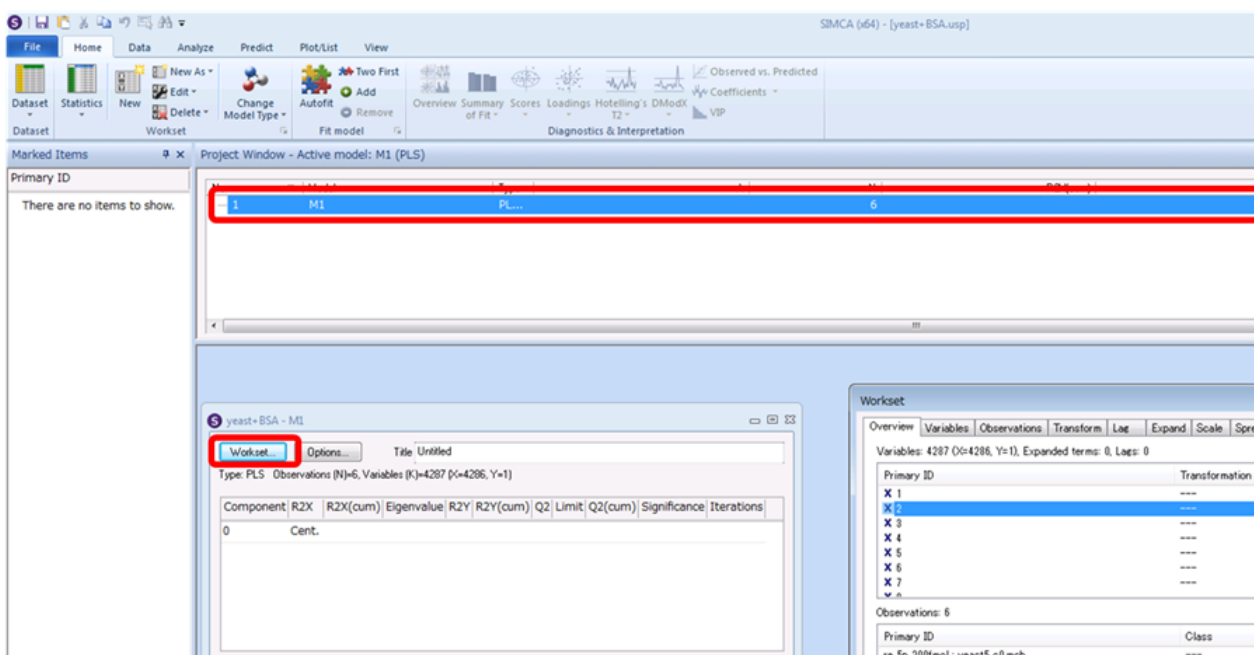
以下の警告が表示されますが、[Yes to All] をクリックしてそのまま進みます。



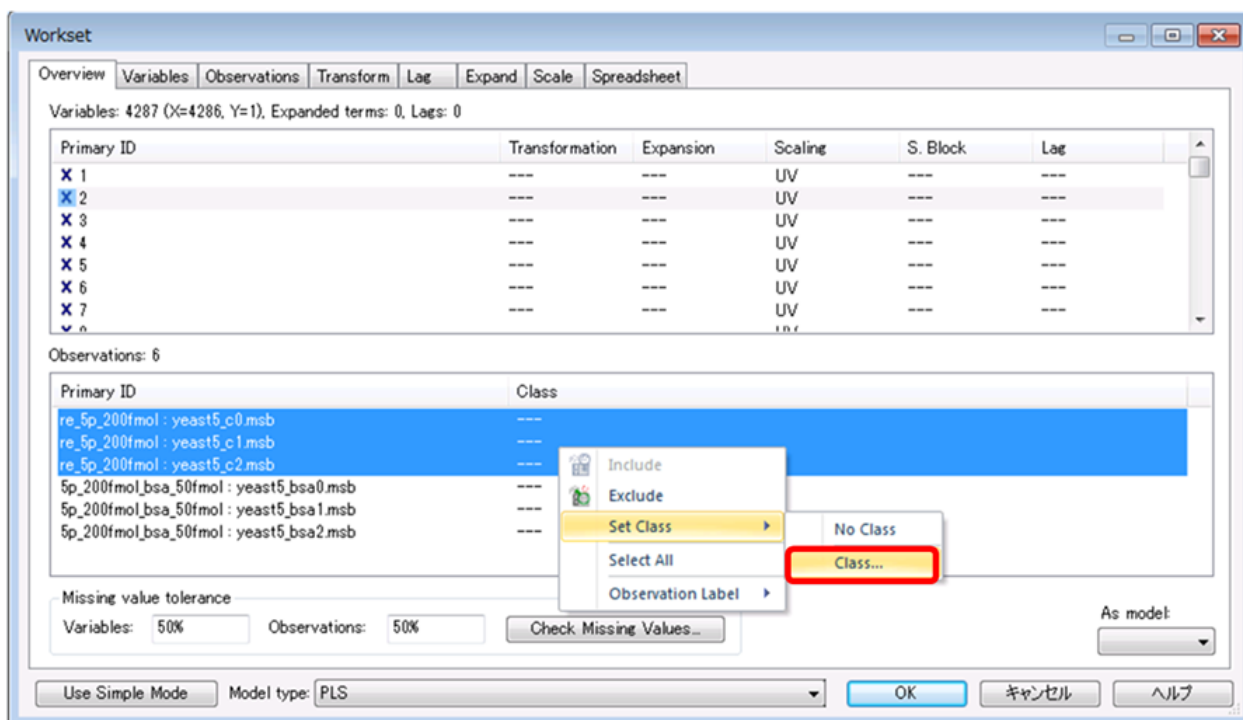
[Project Window] が開きます。



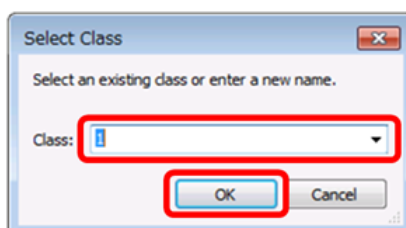
[Project Window] 内のリスト先頭行をダブルクリックします。[yeast+BSA] が開きますので、[Workset] ボタンをクリックします。[WorkSet] が開くので、[Overview] タブを開いていることを確認します。



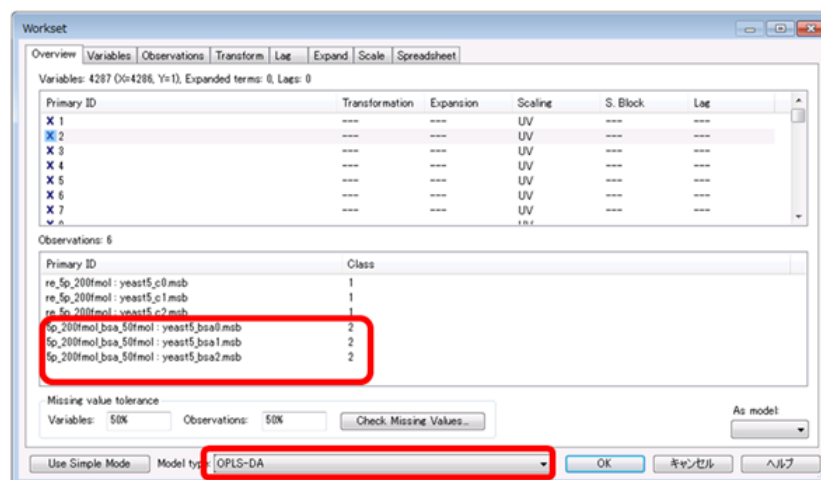
[Workset] 内のObservationsリストの「yeast5\_c0.msb」～「yeast5\_c2.msb」に対応する行を選択し、右クリックメニューから [Set Class] - [Class] をクリックします。



[Select Class] が開きます。[Class] コンボボックスで「1」を選択し、[OK] をクリックします。



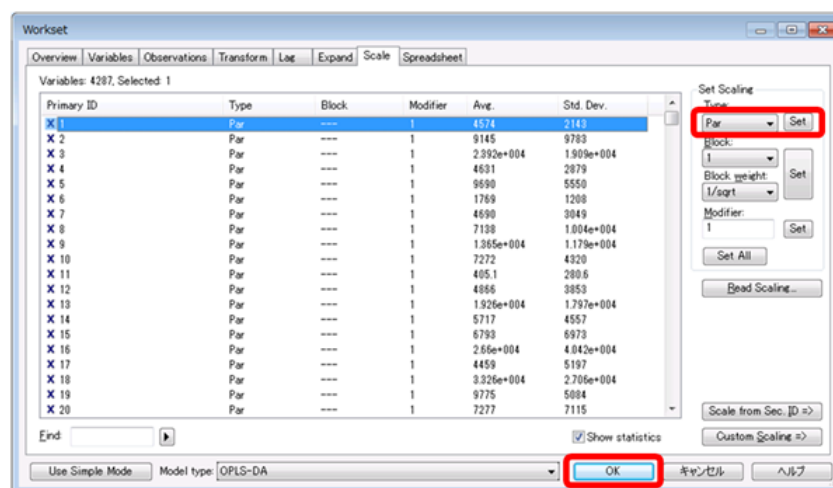
これにより、「yeast5\_c0.msb」～「yeast5\_c2.msb」の [Class] が「1」にセットされます。同様に「yeast5\_bsa0.msb」～「yeast5\_bsa2.msb」に対応する行のClassを「2」にセットします。



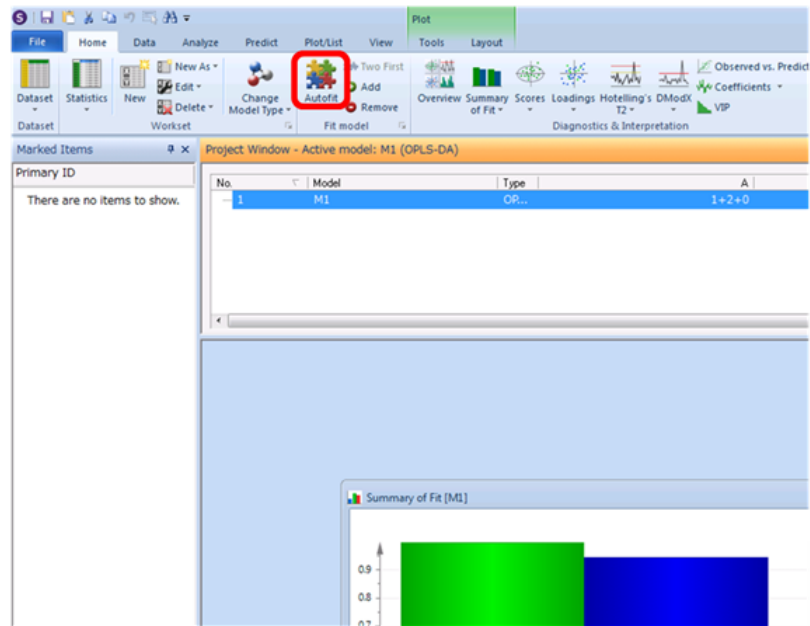
[Model Type] を選択することにより、統計解析の手法を選択することができます（各手法の詳細は、「SIMCA 13 日本語Tutorial」を参照してください）。ここでは、OPLS-DAを選択します。

[Scale] タブを開きます。[Set Scaling] で [Type] を [Par] に設定した後で、[Variables] リストの行を全選択します。[Par] の右にある [Set] をクリックします。

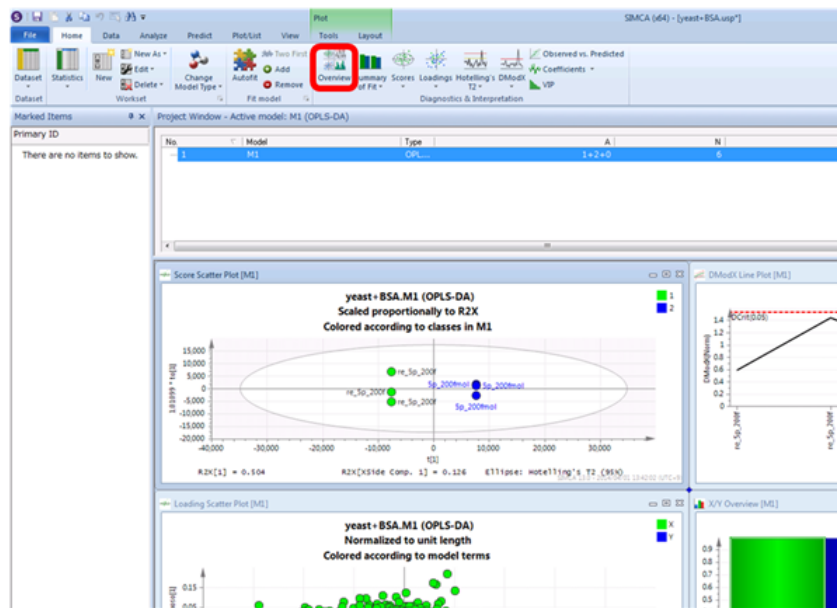
[Variables] リストの全行の [Type] が [Par] に設定されます。[OK] をクリックします。



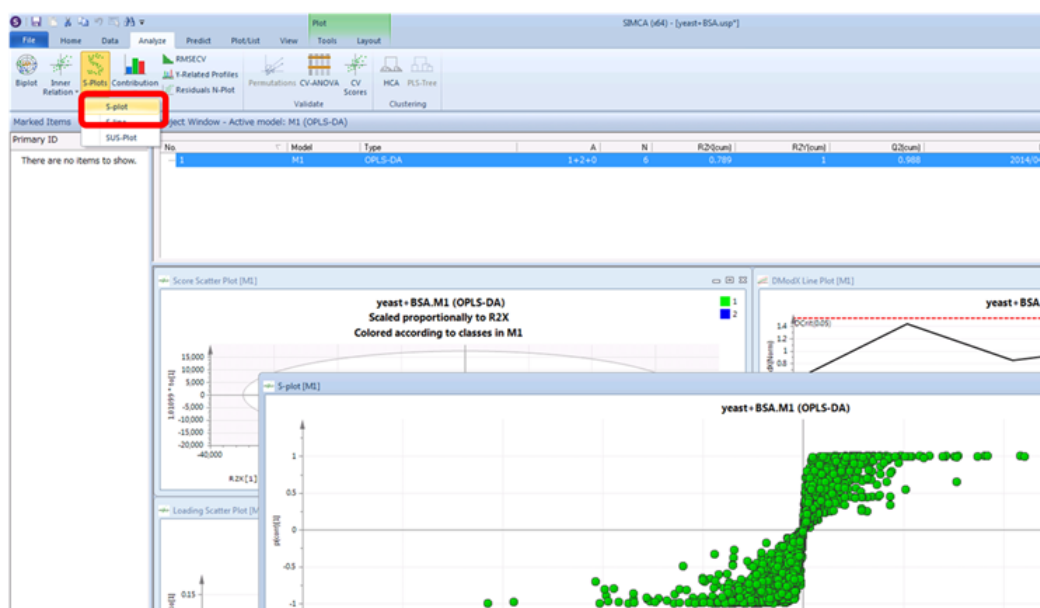
[Home] メニューから [Autofit] をクリックします。[Autofit] は、モデリングに必要な変数の次元を自動で求めます。ここでは、3成分が最適と判定されました。



[Home] メニューから [Overview] をクリックします。Score Plot、Loading Plotがそれぞれ左上、左下に開きます。

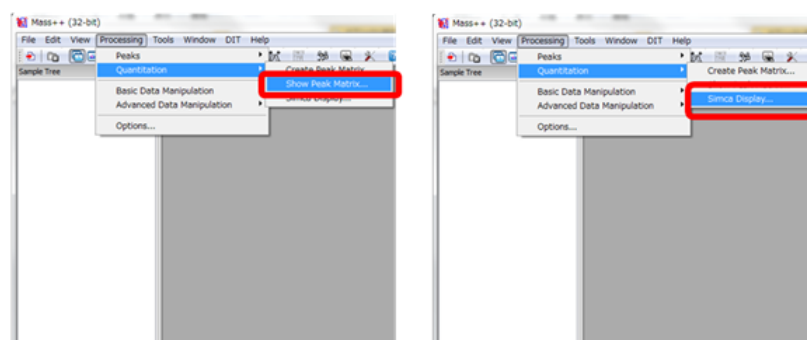


S Plotは、 [Analysis] メニューから [S-Plots] - [S-plot] をクリックすることで開きます。



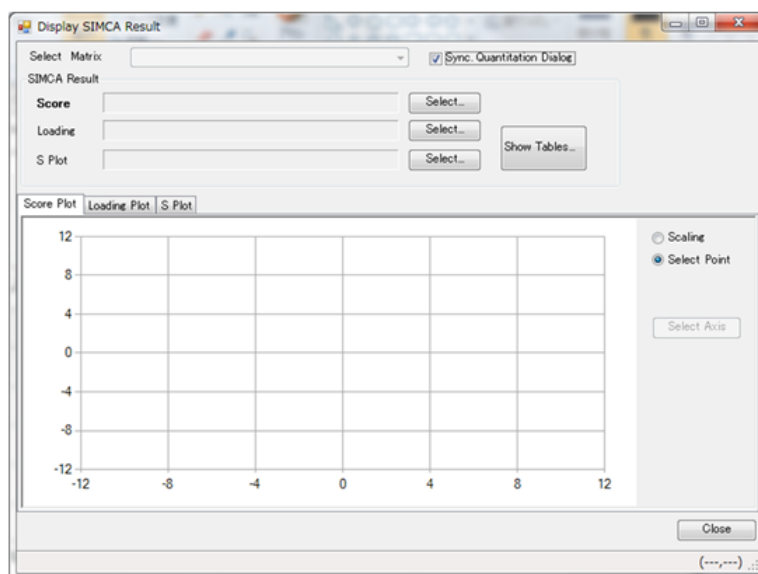
## 2.2.2. 解析結果をSIMCA Plug-inにインポートする

Mass++の [Processing] メニューから [Quantitation] - [Show Peak Matrix] および [SIMCA Display] をクリックします。

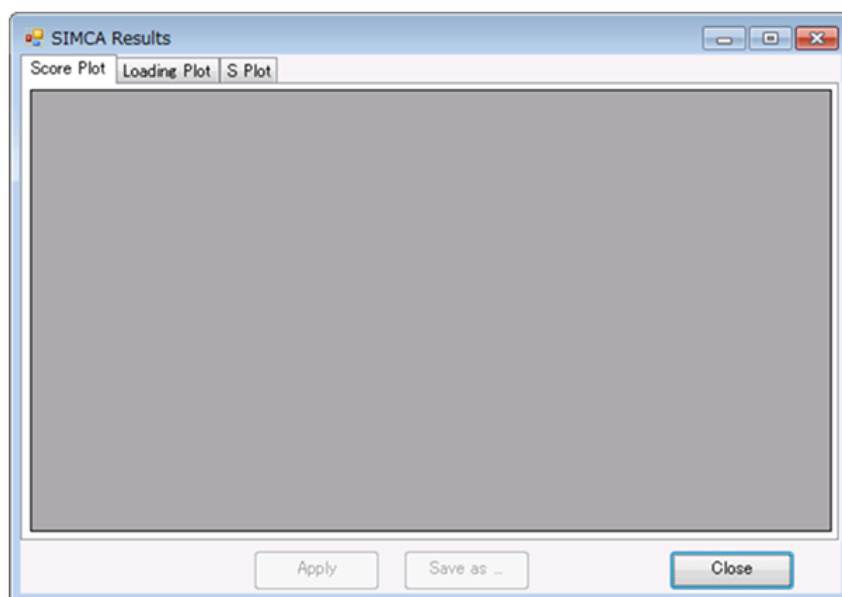


[Quantitation] および [Display SIMCA Result] が開きます。

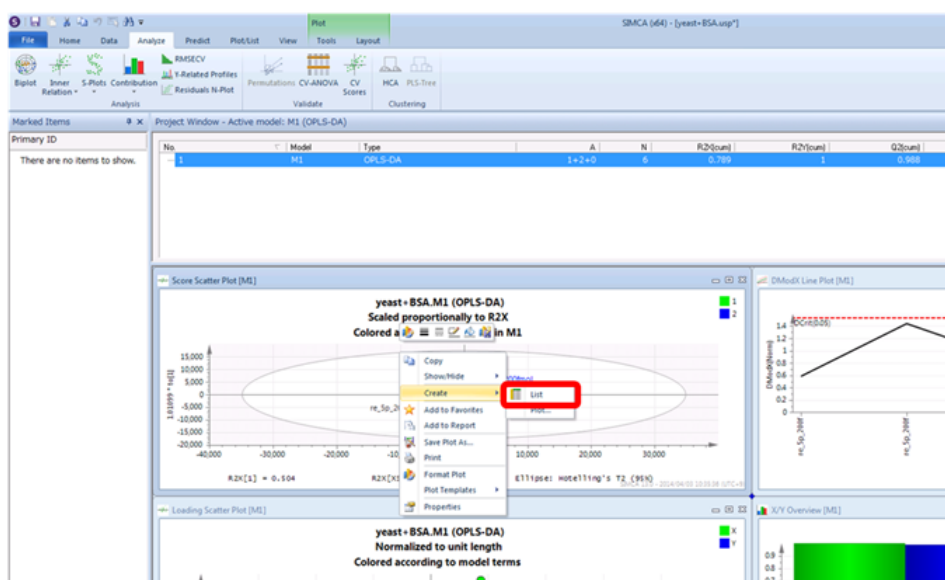
RT	m/z	Charge	Substance	p value (t...	re_5p_20...
0.030000	448.107086			0.284311	4333.877...
0.060000	467.102997			0.050512	9688.818...
0.090000	447.116089			0.201456	20822.38...
0.105000	505.098297			0.482065	2249.198...
0.120000	520.135376			0.935296	7109.199...
0.120000	610.190430			0.938838	1620.883...



[Show Tables] をクリックすると、 [SIMCA Results] が開きます。



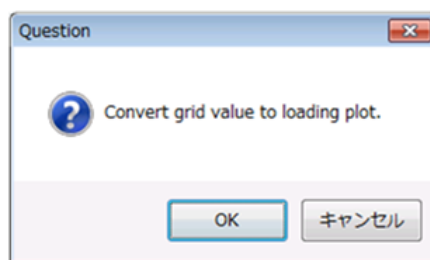
一方、SIMCA上には、Score plot（もしくは、Loading plot・S Plot）を表示させておき、その上で右クリックメニューから [Create-List] を選択します。



プロットされていた点のデータがテーブル形式で表示されるので、テーブル内のセルを全て選択して、クリップボードにコピー（Ctrl - C）します。

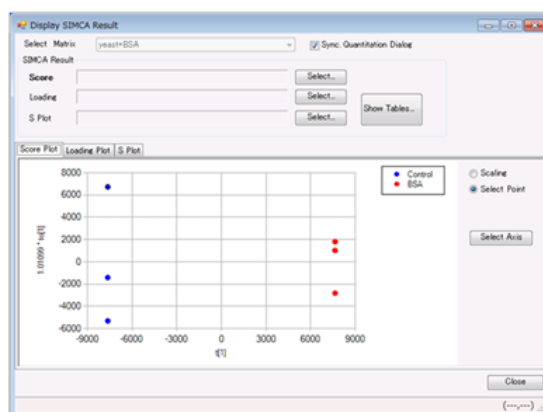
1	2	3	4
1	Obs ID (Primary)	Class	M1.t[1] 1.01099 * M1.tn[1]
2	re_sp_200fmod : yeast5_c0.msb	1	-7632.78 8724.92
3	re_sp_200fmod : yeast5_c1.msb	1	-7629.58 -1214.87
4	re_sp_200fmod : yeast5_c2.msb	1	-7631.87 -5312.05
5	sp_200fmod_bsa_50fmod : yeast5_bsa0.msb	2	7624.29 1799.94
6	sp_200fmod_bsa_50fmod : yeast5_bsa1.msb	2	7631.44 1014.09
7	sp_200fmod_bsa_50fmod : yeast5_bsa2.msb	2	7624.31 -2814.03

[SIMCA Results] の [Score Plot] タブ上で、クリップボードの中身を貼り付けると（Ctrl - V）、下記の確認ダイアログが表示され、[OK] をクリックすると、[Score Plot] タブ上に、Score Plotのデータが反映されます。



Obs ID (Primary)	Class	M1.t[1]	1.01099 * M1.to[1]
re_sp_200fmo1...	1	-7632.78	6726.92
re_sp_200fmo1...	1	-7639.58	-1414.87
re_sp_200fmo1...	1	-7631.87	-5312.05
Sp_200fmo1_bs...	2	7636.29	1799.94
Sp_200fmo1_bs...	2	7631.64	1016.09
Sp_200fmo1_bs...	2	7636.31	-2816.03

[Apply] を押すと、[Display SIMCA Result]にScore Plotが反映され、[Close] を押すと [SIMCA Results] が閉じます。

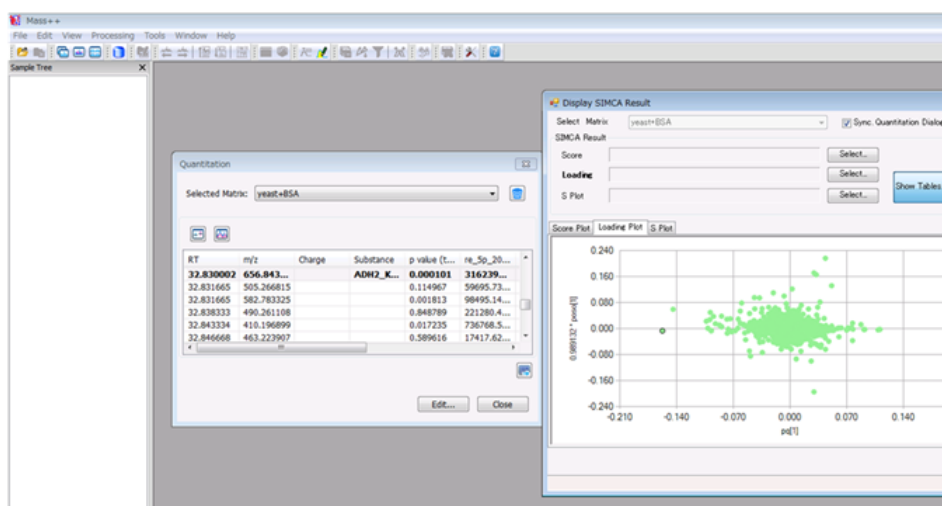


Loading Plot、S Plotについても同様にSIMCA上で表示されていたを反映させることができます。

Note: SIMCAで表示されていた点のデータを一旦csv形式で保存し、そのファイルを読み込んで反映させることもできます。その場合は、データ指定部の [Select] ボタンを押して、ファイル選択ダイアログを開き、csvファイルを選択します。

### 2.2.3. バイオマーカー候補の吟味を行う

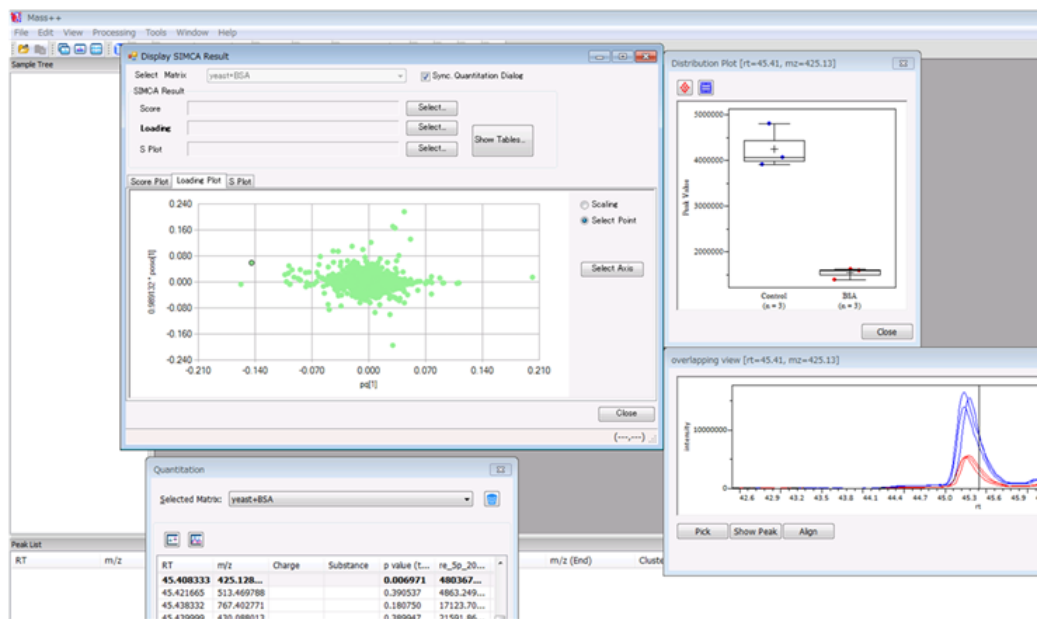
[Display SIMCA Result] 上で「Loading Plot」、「S Plot」が表示されている場合は、プロットされている一点をダブルクリックすると、[Quantitation] のピーク一覧の対応する行が強調表示されます。



[Quantitation] 上の下記アイコンをクリックすると、強調表示されているピークのピーク値の箱ひげ図、対応するRT付近のMC (Mass Chromatogram) もしくは対応するm/z付近のMSスペクトルが表示されます。詳細は「Create Peak Matrix」節を参照して下さい。



SIMCAでバイオマーカー候補とされたピーク近傍のスペクトルを確認することで、本当に有意な差があったかを簡便に確認することができます。





---

# Chapter 3. Data Analysis Tools

Mass++には、同定(データベース検索)やde novo sequencingなど、目的に合わせたデータ処理機能が多く用意されています。この章では、これらのデータ処理機能の操作方法について説明します。

## 3.1. Identification

この節では、スペクトラムのピークリストをデータベース検索にかけ、同定する手順について説明します。

Mass++は、次のデータベース検索などをMass++から直接行うことができます。

- Mascot
- X!Tandem
- MassBank

この節では、Mascot検索(MS/MS Ions Search:MIS)を行う手順を説明します。

“Mascot”はMatrix Science, Ltcの製品です。

この節では、トリプシン消化されたBSA(bovine serum albumin)のLC-MALDI TOF/TOF MS/MSのデータを使います。

他のデータベース検索についても、同様に行うことができます。

### 3.1.1. 準備(1)検索エンジンの設定

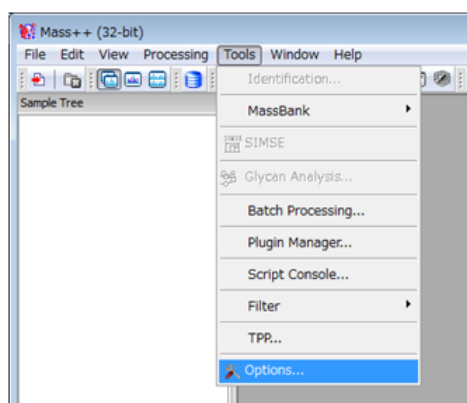
準備として、データベース検索をするための設定を行います。

まずは、プロキシサーバーの設定を行います。

次の場合は、プロキシサーバーの設定の必要はありません。

- プロキシサーバーを使用しない場合
- IE(Internet Explorer)でプロキシサーバーの設定が済んでいる場合

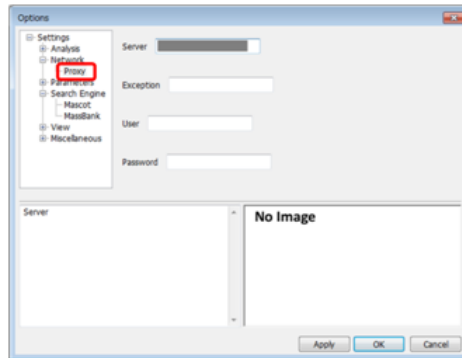
[Tools] メニューから [Options] をクリックします。



[Options] が開きます。

[Settings] メニューから [Network] - [Proxy] をクリックします。

[Proxy] 設定画面が表示されます。



[Server] にサーバーのアドレスを入力します。

ポート番号は、次のようにサーバーのアドレス（例えば「1111」）の後ろに「:」で繋げて入力します。

`http://xxx.xxx/:1111`

[Exception] に、プロキシサーバーを使わずアクセスするサーバー、webサイトのアドレスを入力します。

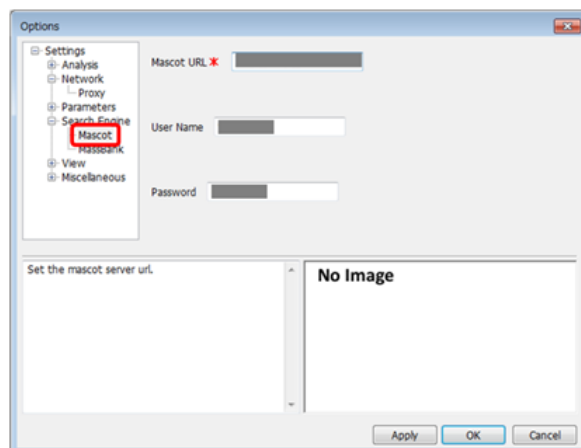
ローカルにMascotサーバーを設置しており、プロキシサーバーを使わずに使用したい場合は、Mascotサーバーのアドレスを入力します。

必要であれば、ユーザー名、パスワードを入力します。

次に、検索エンジンのwebサイトのアドレスを登録します。

[Search Engine] - [Mascot] をクリックします。

[Mascot] 設定画面が表示されます。



Matrix Scienceのwebサイト経由でMascot検索を行う場合は、[Mascot URL] に次を入力します。

`http://www.matrixscience.com/`

Mascotサーバを設置している場合は、Mascotサーバーのアドレスを入力します。

必要であれば、ユーザー名、パスワードを入力します。

準備は以上で終了です。

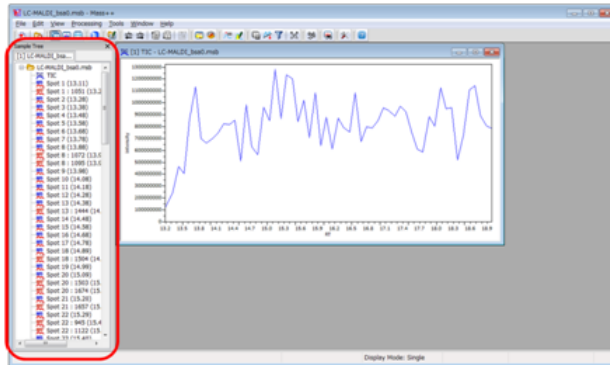
[OK] をクリックして、[Options] を閉じます。

### 3.1.2. 準備 (2) データを開く

データベース検索をしたいデータを開きます。

ここでは、Mass++に同梱されている「LC-MALDI\_bsa0.msb」を開きます。

[Sample Tree] に開かれているデータが、データベース検索の対象になります。



Note: [Sample Tree] に複数のデータが開かれている場合は、アクティブなデータのみがデータベース検索の対象になります。

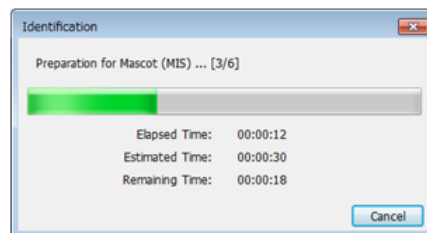
ここで、「アクティブなデータ」とは [Sample Tree] 上でスペクトラム一覧が表示されているデータです。

### 3.1.3. Mascot検索

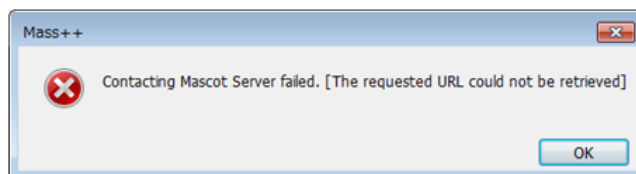
次は、実際にMascot検索を行います。

[Tools] メニューから [Identification] をクリックします。

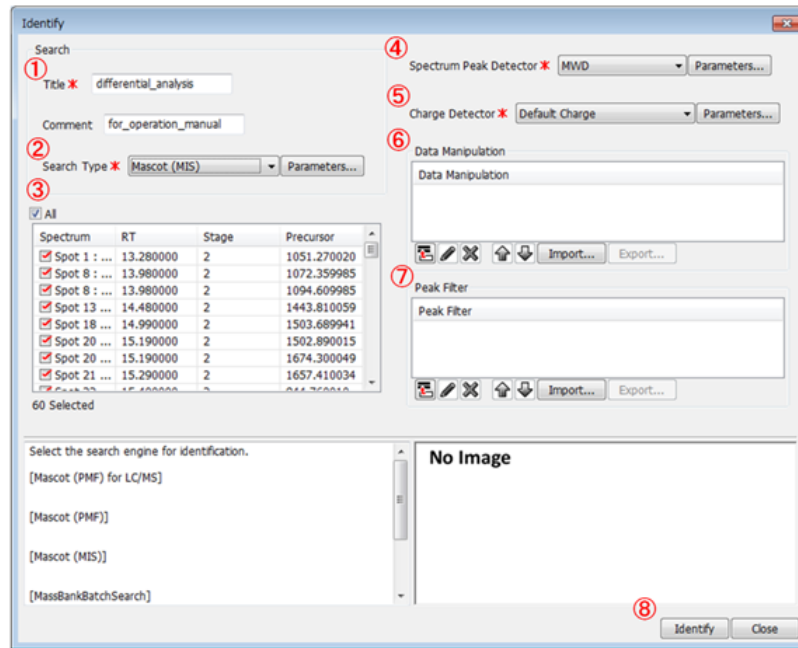
サーバないしwebサイトへの接続が開始されます。



Note: もし次のエラーメッセージが表示されたら、プロキシ、検索エンジンの設定を確認してください。



[Identify] が表示されます。

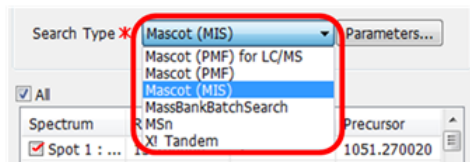


[Title]、[Comment] を入力します(①)。

ここでは、MS/MSピークを使ったペプチドの同定を行います。

[Search Type] で [Mascot (MIS)] を選択します(②)。

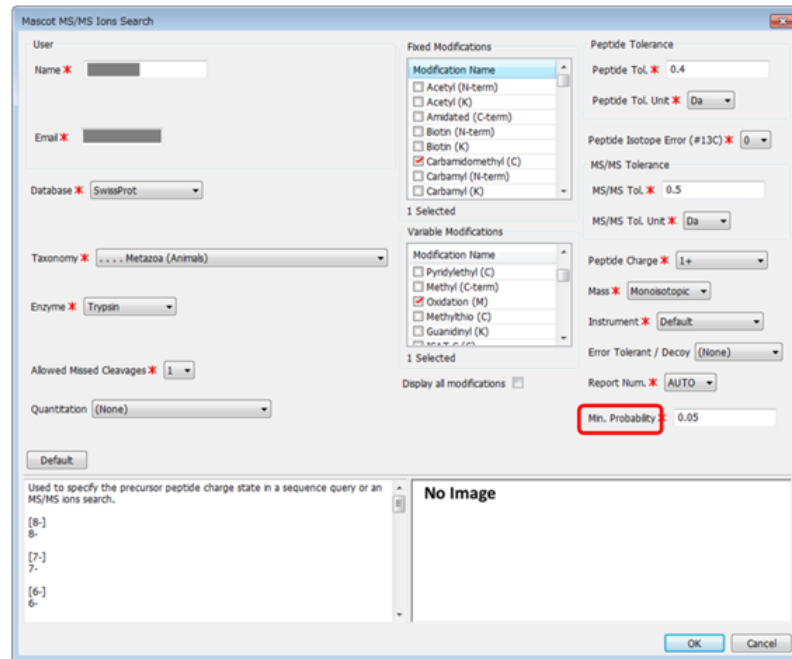
Note: [Search Type] では、さまざまなデータベース検索 (MassBankBatchSearchなど) を選択することが可能です。それぞれのパラメータの詳細は、それぞれのデータベース検索エンジンのマニュアルを参照してください。



### 3.1.4. データベース検索設定

[Parameters] をクリックします。

[Mascot MS/MS Ions Search] が開きます。



ここでは、画像に示したパラメータで検索を行います。

[Min. Probability] は、同定の際の閾値を設定します。

データベース検索の結果、設定した閾値以下のProbabilityをもつタンパク質(ないしペプチドなど)を一覧表示することができます(後述)。

[OK] をクリックして、[Mascot MS/MS Ions Search] を閉じます。

次に、データベース検索したいスペクトラムを選びます。

[Identify] ダイアログの中で、データベース検索にかけられるスペクトラムが一覧表示されています(③)。

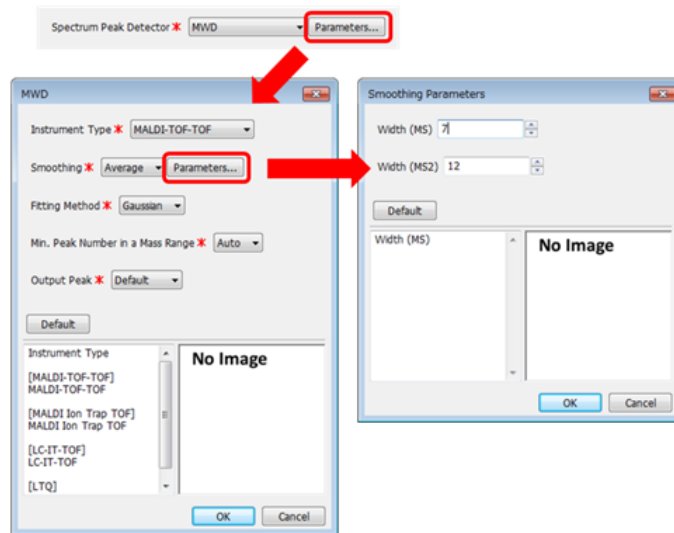
[Search Type] で [Mascot (MIS)] を選択したので、[Stage] が2、すなわちMS2であるスペクトラムのみ表示されています。

データベース検索したいスペクトラムを選びます。

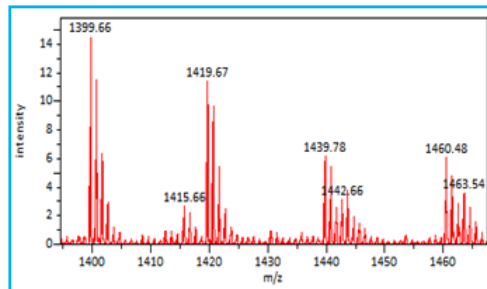
ここでは、全てのMS/MS スペクトラムをデータベース検索にかけます。

次に、ピーク検出方法を選択します(④)。

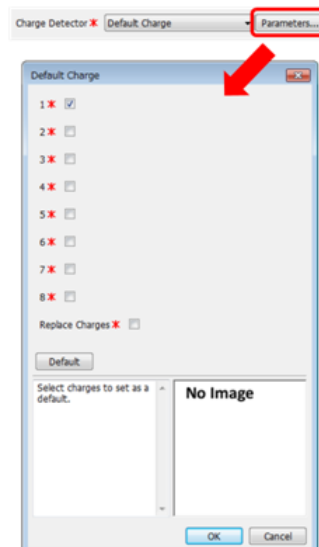
ここでは、[Spectrum Peak Detector] で [MWD] を選択し、次のように設定します。



Note: [MWD] はモノアイソトピックピーク検出用の、Mass++独自のピーク検出関数です。



チャージ検出(⑤)は、ここでは次のように設定します。



[Data Manipulation] では、ピーク検出前にスペクトラムに対してかける処理(スムージング、ベースライン除去など)を設定します(⑥)。

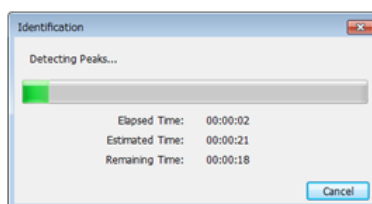
このガイドでは設定を行いません。

[Peak Filter] では、データベース検索にかけるピークのm/z範囲などを設定します(⑦)。

このガイドでは設定を行いません。

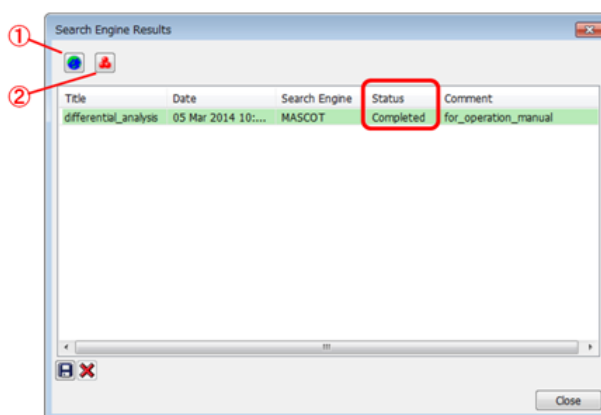
[Identify] をクリックします(⑧)。

ピーク検出、データベース検索が実行されます。



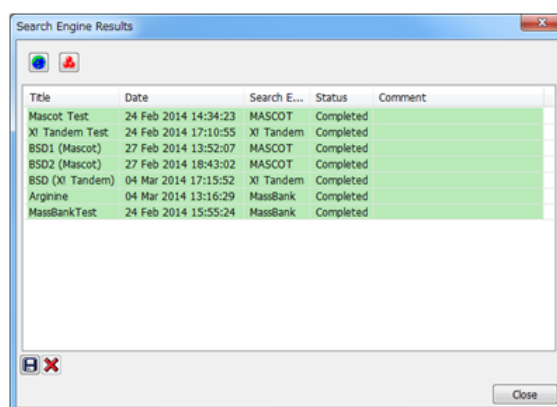
### 3.1.5. 検索結果の確認

検索が終了すると、[Search Engine Results] が自動で開きます。



今、掛けた検索の [Status] が [Completed] になっていることを確認してください。

Note: このダイアログには、過去に行ったデータベース検索が一覧表示されています。



過去の検索結果を確認するために、このダイアログを表示させたい場合は、[View] メニューから [Results] - [Search Engine] をクリックして表示させます。

検索結果の詳細を確認します。

詳細を確認したい検索行をクリックします。

①のアイコンをクリックします。

検索結果の詳細が、webブラウザで表示されます。





## 3.2. SIMSE (de novo sequencing)

この節では、MS/MSスペクトルに対してSIMSEによるde novo sequencingを行います。

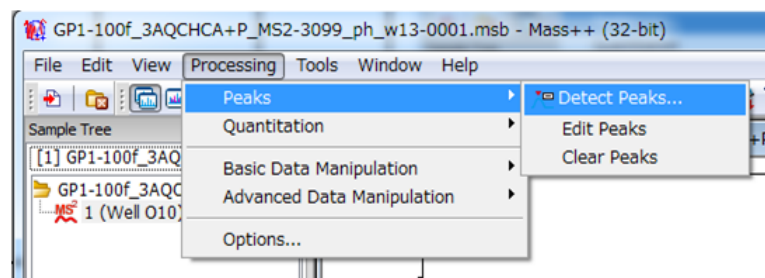
SIMSEではペプチドや核酸、糖鎖などのde novo sequencingが可能です。

### 3.2.1. ファイルを開く

まず、目的のデータを開きます。ここでは例として、Mass++に同梱されているMS/MSデータのうち、「GP1-100f\_3AQCHCA+P\_MS2-3099\_ph\_w13-0001.msb」を開きます。

### 3.2.2. ピークを検出する

[Processing] メニューから [Peaks] - [Detect Peaks] をクリックします。



[Detect Peaks] が開きます。

ここでは、例として「MWD」を選択します。

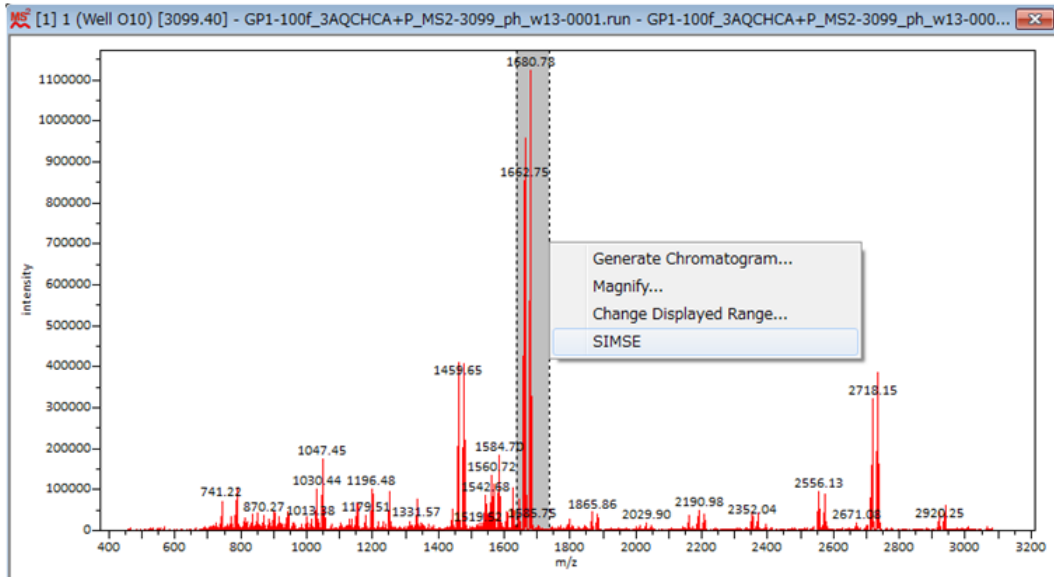
「MWD」はモノアイソトピックピークを検出可能なMass++独自のピーク検出法です。de novo sequencingは通常、モノアイソトピックピークを検出したピークリストに対して行います。

パラメーターを入力し、[Detect] をクリックすると、ダイアログが閉じ、アクティブなスペクトラムに対してピーク検出が実行されます。

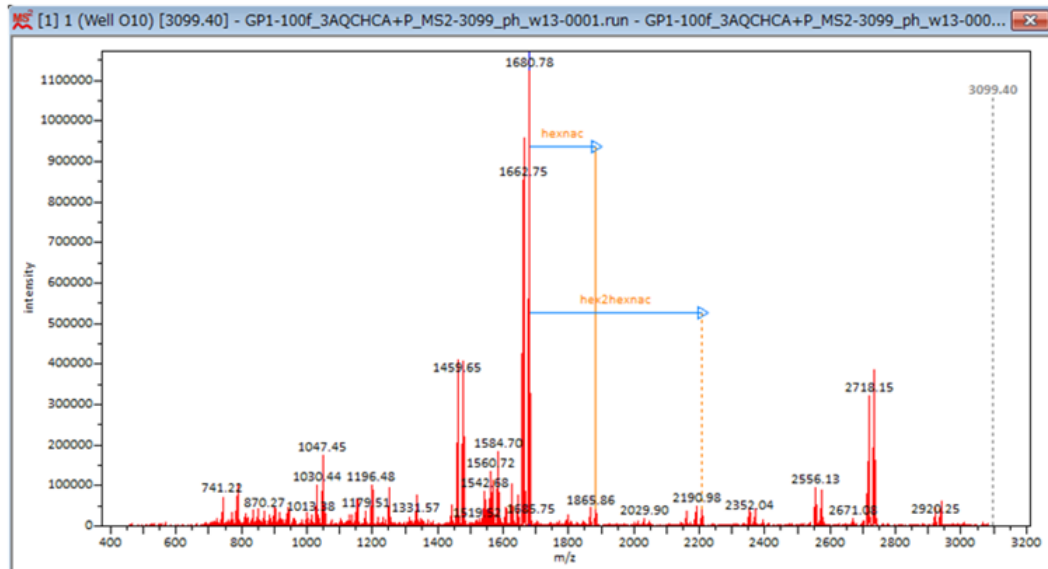
これで準備は完了です。

### 3.2.3. de novo sequencingを開始する

右ドラッグでde novo sequencingの開始ピークを選択し、[SIMSE] をクリックします。



[SIMSE] が表示され、スペクトル上でde novo sequencingが開始されます。



SIMSE 1 (Well O10) [3099.40] GP1-100f\_3AQCHCA+P\_MS2-3099\_ph\_w13-0001.run : GP1-100f\_3AQ...

Set Parameter

Start Peak: 1680.78

Compounds: Sugar

Sequencing Direction: To High Mass

Tolerance [Da]: 0.3

Automatic/Manual:

Terminal Check:  Check

Unknown

Delete Peak  Delete Sequence

Sequence Tag Search:  n-series  c-series

Display Data To Graph:  Display

Peak	Compound	Mass	Detail
1883.85	hexnac	203.08	N-acetylhexos...
2208.00	hex2hexnac	527.19	2 hexose and ...

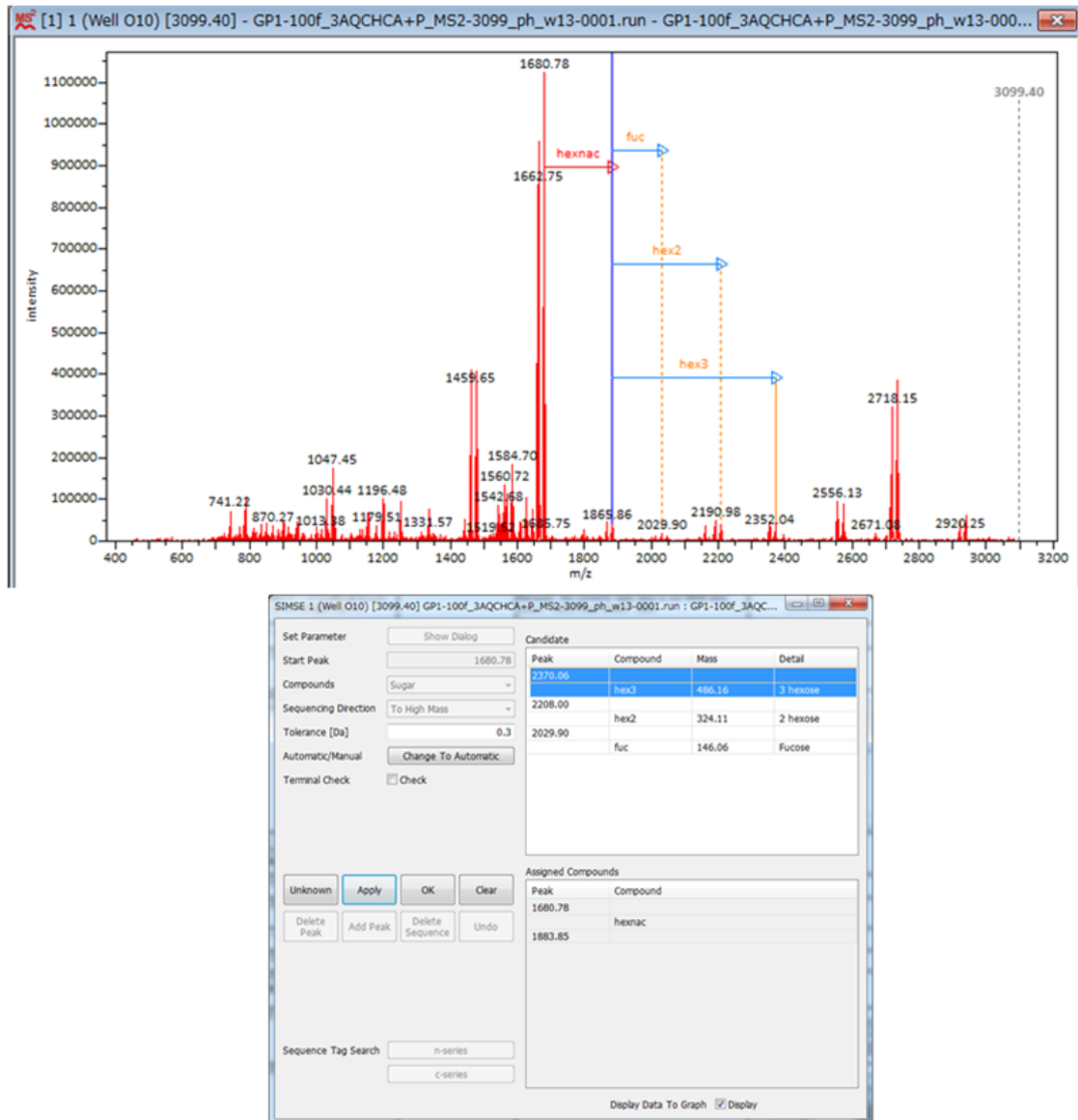
Peak	Compound
1680.78	

### 3.2.4. マニュアルでde novo sequencingを実行する

m/z 1680.78を開始ピークとして、高質量側にde novo sequencingを行います。化合物の種類に「Sugar」を選択すると、ピーク間の当てはまる質量の化合物候補が2種類表示されます。

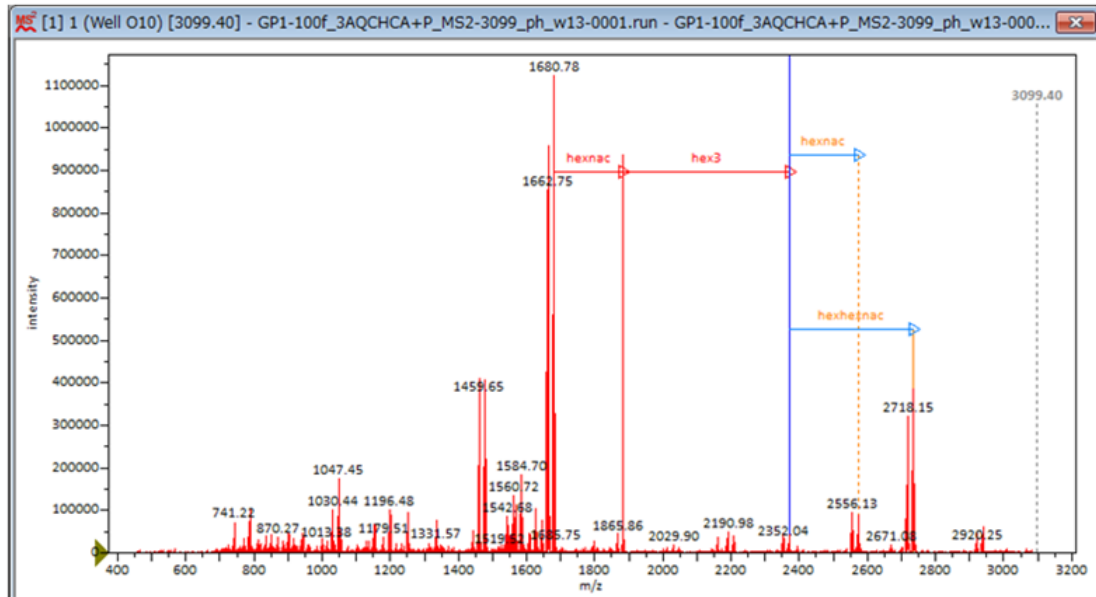
Candidateに表示された化合物hexnacが選択されています。[Apply] をクリックして、次の候補を探索します。

次の化合物の候補「hex3」、「hex2」、「fuc」が表示されます。



Candidateに表示された化合物「hexnac」が選択されています。[Apply] をクリックして、次の候補を探索します。

次の化合物の候補「hexhexnac」、「hexnac」、が表示されます。



SIMSE 1 (Well O10) [3099.40] GP1-100f\_3AQCHCA+P\_MS2-3099\_ph\_w13-0001.run : GP1-100f\_3AQ...

Set Parameter

Start Peak: 1680.78

Compounds: Sugar

Sequencing Direction: To High Mass

Tolerance [Da]: 0.01

Automatic/Manual:

Terminal Check:  Check

Sequence Tag Search:

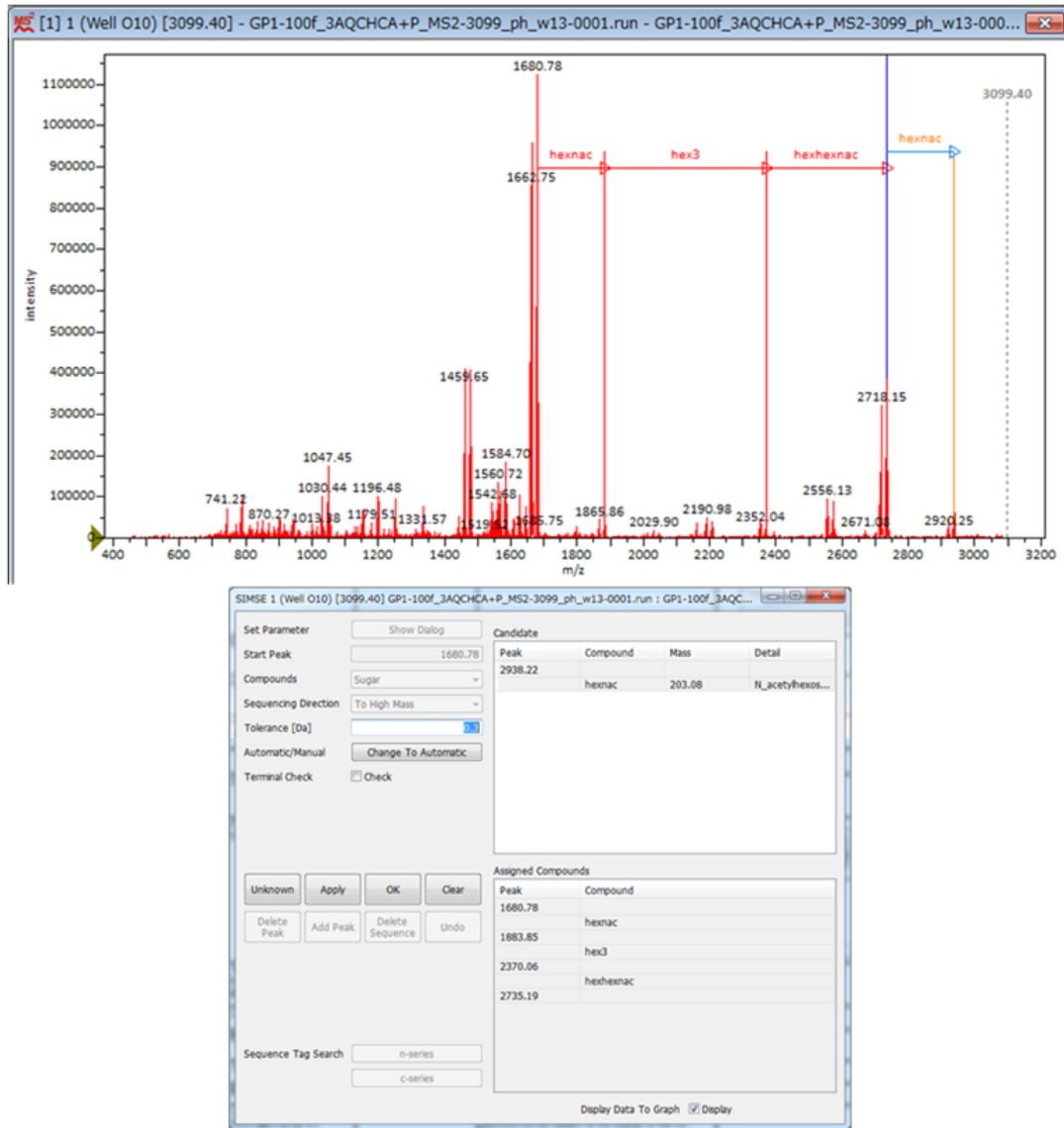
Display Data To Graph:  Display

Peak	Compound	Mass	Detail
2735.19	hexhexnac	365.13	1 hexose and ...
2573.11	hexnac	203.08	N_acetylhexos...

Peak	Compound
1680.78	hexnac
1883.85	hex3
2370.06	hexnac

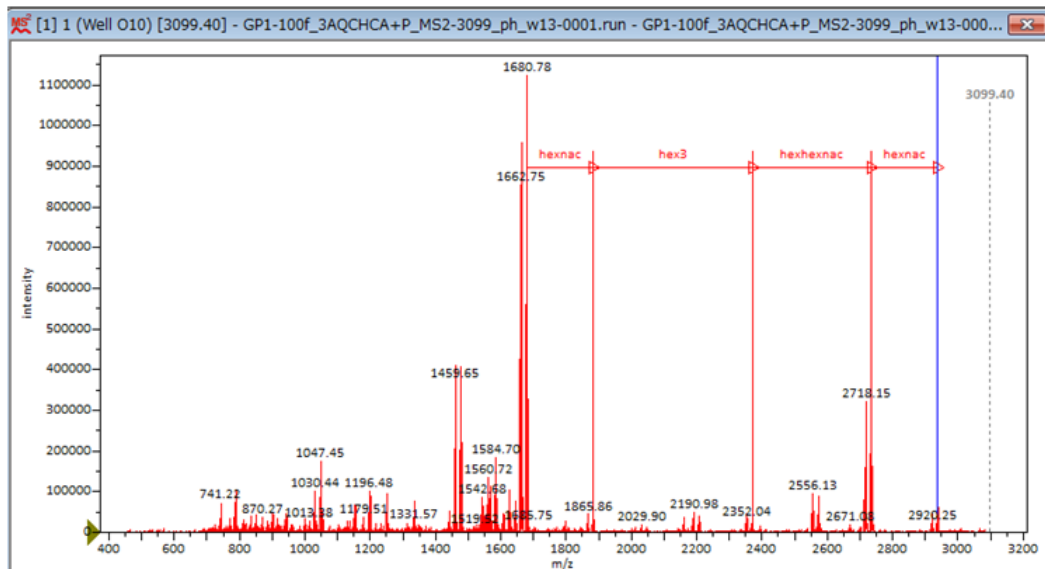
Candidateに表示された化合物「hexhexnac」が選択されています。[Apply] をクリックして、次の候補を探索します。

次の化合物の候補「hexnac」が表示されます。



[Apply] をクリックして、次の候補を探索します。

次の化合物の候補がなくなり、de novo sequencingが完了します。

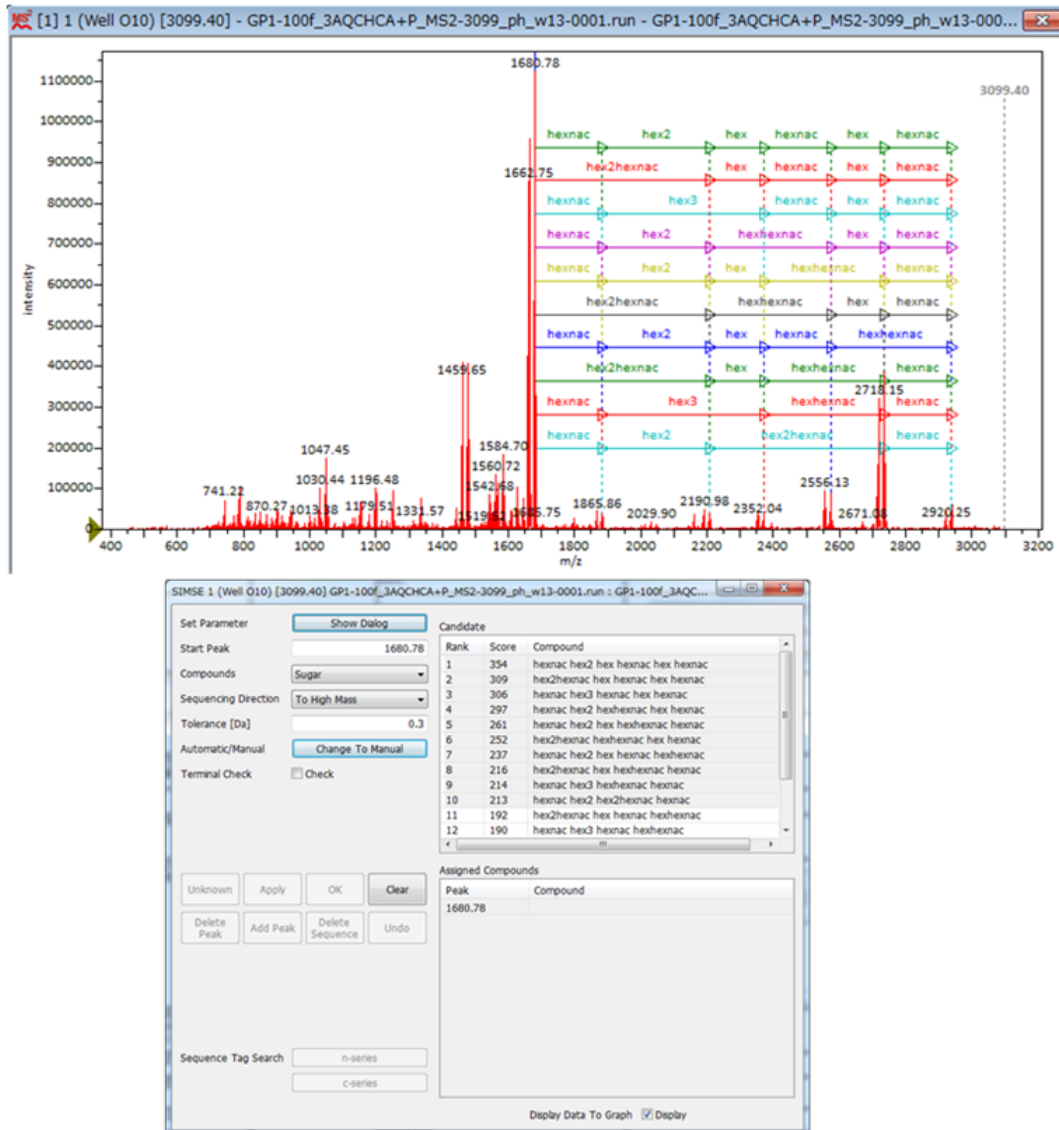


### 3.2.5. 自動でde novo sequencingを実行する

SIMSEでは、マニュアルではなく、自動でde novo sequencingを実行可能です。マニュアルで行ったde novo sequencingと同じ開始ピークから自動でde novo sequencingを行います。まず、開始ピークを先ほどと同じように右ドラッグで選択します。

[Change to automatic] をクリックします。

自動de novo sequencing結果が表示されます。



### 3.3. Script Console

この節では、スクリプトコンソールの使い方について説明します。

スクリプトコンソールは、スクリプトと呼ばれるプログラムを実行することにより、Mass++の機能拡張を行うためのツールです。スクリプトの実行に、Mass++の再起動やソースプログラムから実行プログラムへの変換といった処理は不要です。必要となった時にすぐにご利用することができます。スクリプトはスクリプト言語で書かれますが、その文法は至ってシンプルですので初めての方でも容易に習得することができます。Mass++では、.NET

Framework用のMass++ API (アプリケーション・プログラミング・インターフェース)により提供される拡張機能をスクリプトコンソールから利用することができます。

### 3.3.1. スクリプトコンソールの動作要件

スクリプトコンソールで利用可能なスクリプト言語は、IronPython 2.7.x (Mass++ ver 2.7.2)です。お手元の動作環境にIronPythonがインストールされていない場合は、<http://ironpython.net/> からIronPython 2.7の最新のインストーラをダウンロードし、インストールしてください。

### 3.3.2. IronPython について

IronPython(<http://ironpython.net/>)は、Python(<https://www.python.org/>)というスクリプト言語をWindows上の .NET Framework開発環境に移植したものです。Pythonは、Webアプリケーションを含む様々なソフトの開発に広く使われるスクリプト言語です。IronPythonは、Pythonと高い文法互換性を持つとともに、.NET Frameworkが提供する膨大なWindows APIを利用することができます。文法やAPIについては、以下のWebサイトを参照してください。

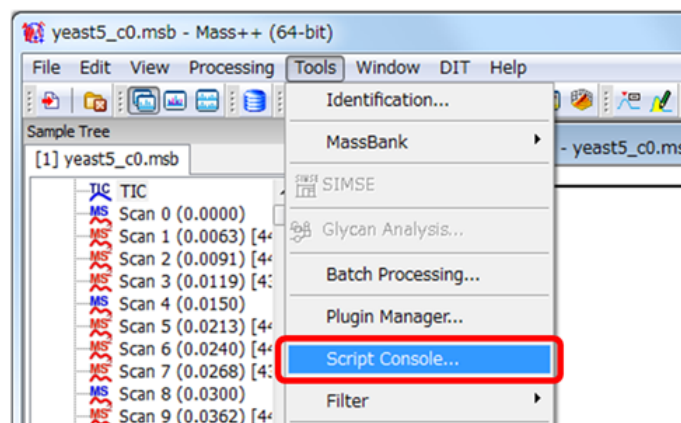
<http://ironpython.net/documentation/>

Pythonが初めての方は以下の Python tutorial を参照してください。

<http://docs.python.org/3/tutorial/index.html>

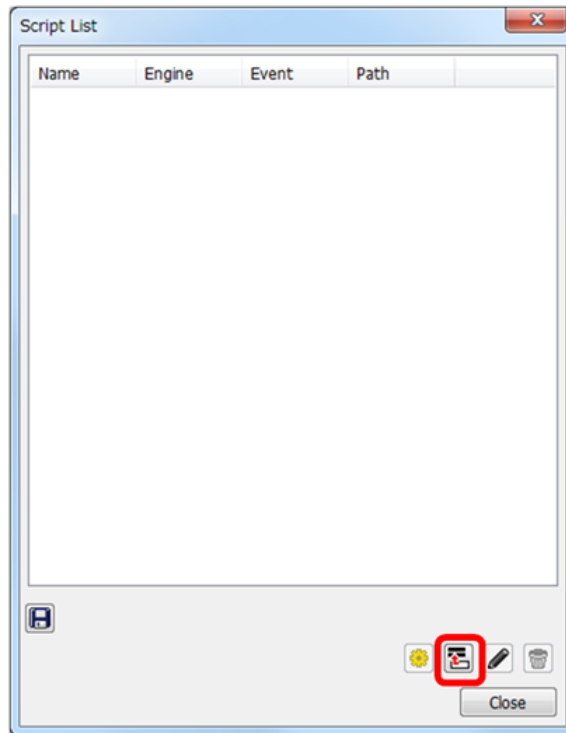
### 3.3.3. スクリプトコンソールを開く

スクリプトコンソールを開きます。まず、[Tools]メニューから[Script Console] をクリックします。



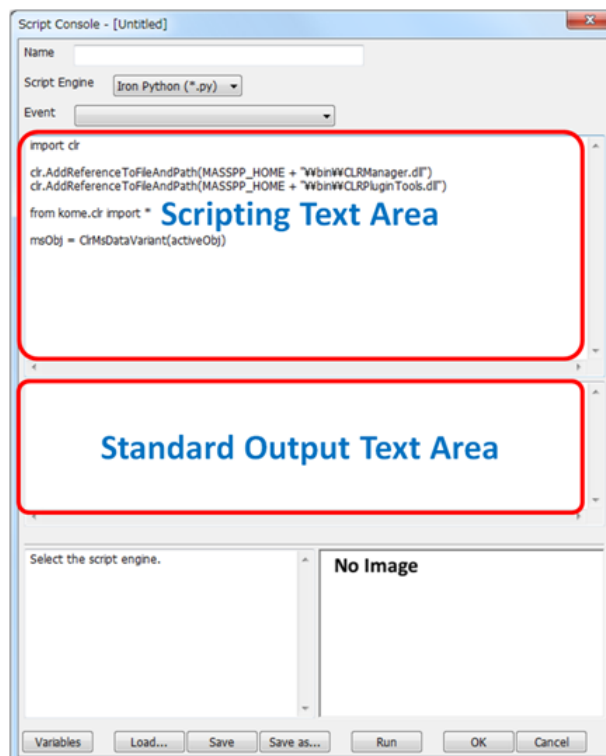
[Script List] が開きます。[Script List]では、複数個のスクリプトを登録しておき、必要な時に実行・編集することができます。

次に、[Add Script]をクリックします。



スクリプトコンソール([Script Console])が開きます。

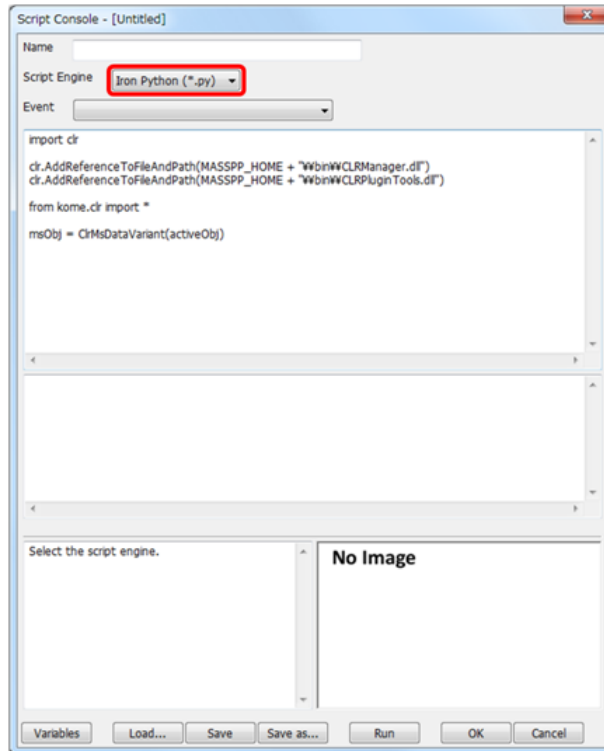
スクリプトコンソールでは、スクリプト記述テキストエリア (Scripting Text Area) に入力されたスクリプトを編集・実行することができます。スクリプトコンソールでは、標準出力テキストエリア (Standard Output Text Area) をスクリプトの標準出力として使用できます。



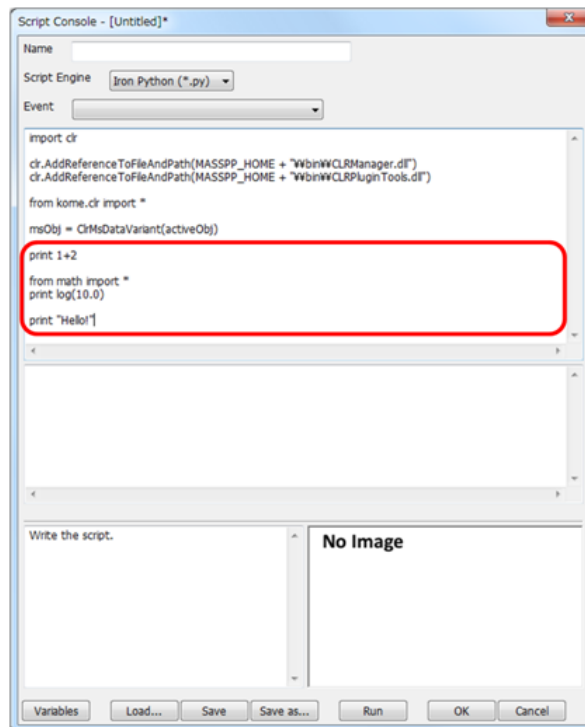


### 3.3.4. スクリプトを入力する

IronPython 言語を用いた簡単なスクリプトの記述について説明します。まず、[Script Engine] に 「Iron Python (\*.py)」 を選択します。



次に、スクリプト記述テキストエリアに下記のスクリプトを追記します。



print 1+2 # 1+2 の演算結果を標準出力に出力します

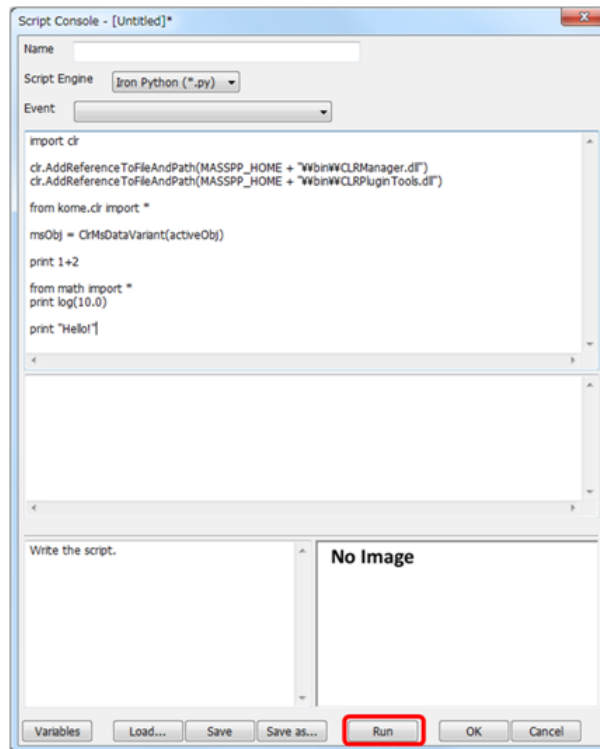
`from math import *` # log関数を使用するために math モジュールから全てのクラスや関数を読み込みます。

`print log(10.0)` # `log(10.0)` を標準出力に出力します。

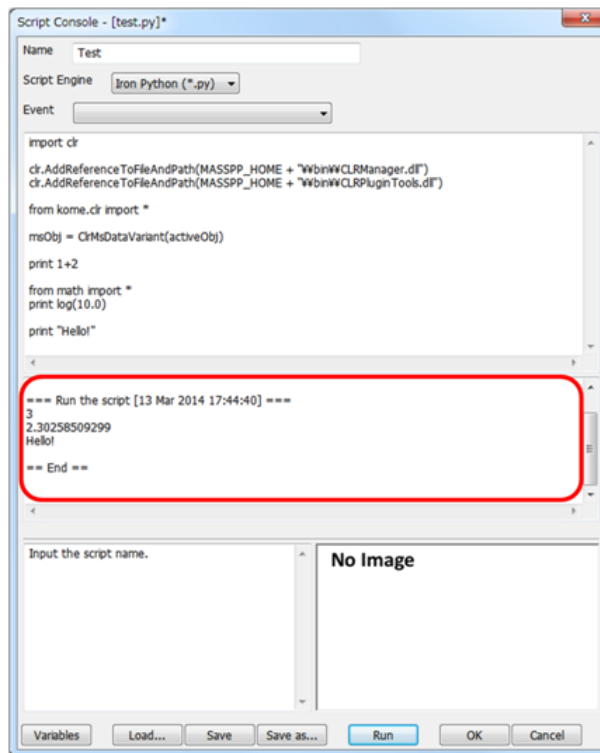
`print "Hello!"` # 文字列 `Hello!` を標準出力に表示します。

### 3.3.5. スクリプトを実行する

スクリプトを記述し終えたら、[Run]をクリックします。

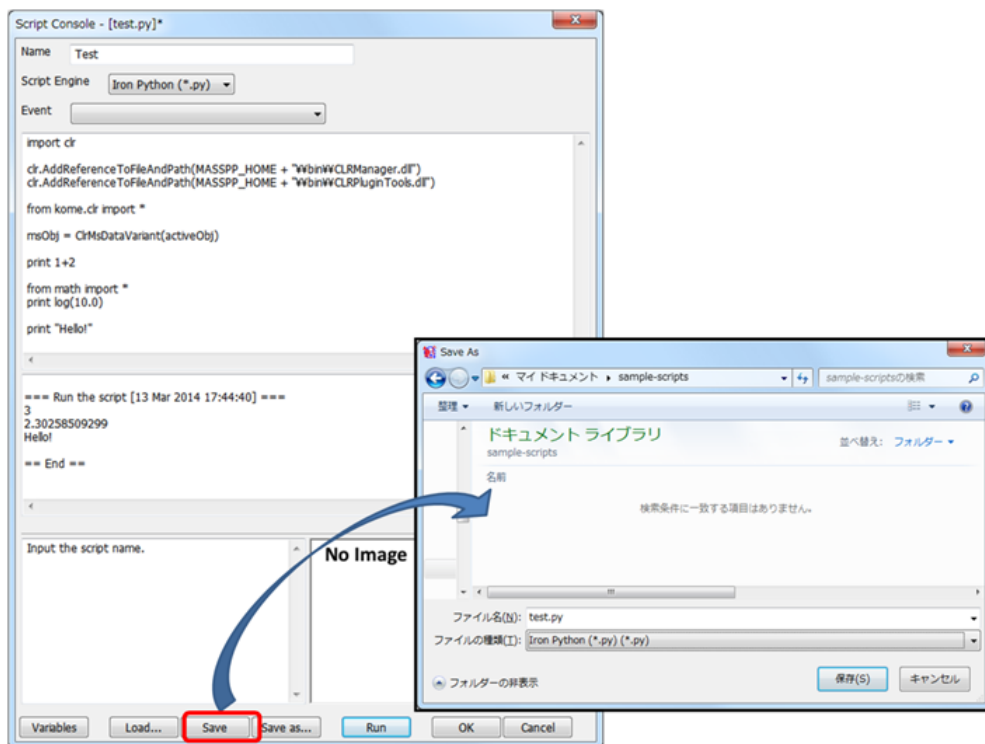


スクリプトが実行され、標準出力テキストエリアに `print` 文の出力内容が実行開始時間とともに表示されます。スクリプトコンソールを開けば、Mass++ を関数電卓として使うことができます。



### 3.3.6. スクリプトを登録する

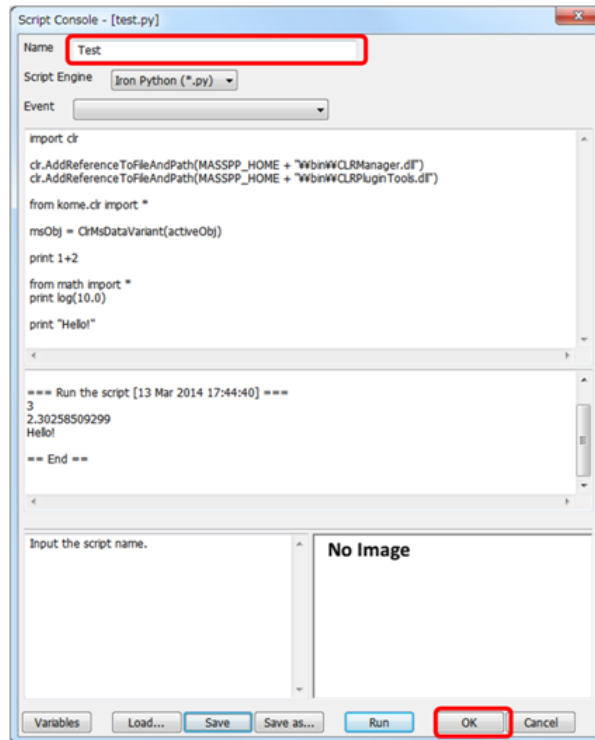
まず、書き終えたスクリプトをファイルとして保存するために、[Save]をクリックします。



[Save As] の[ファイル名]にファイル名(この例ではtest.py)を入力します。

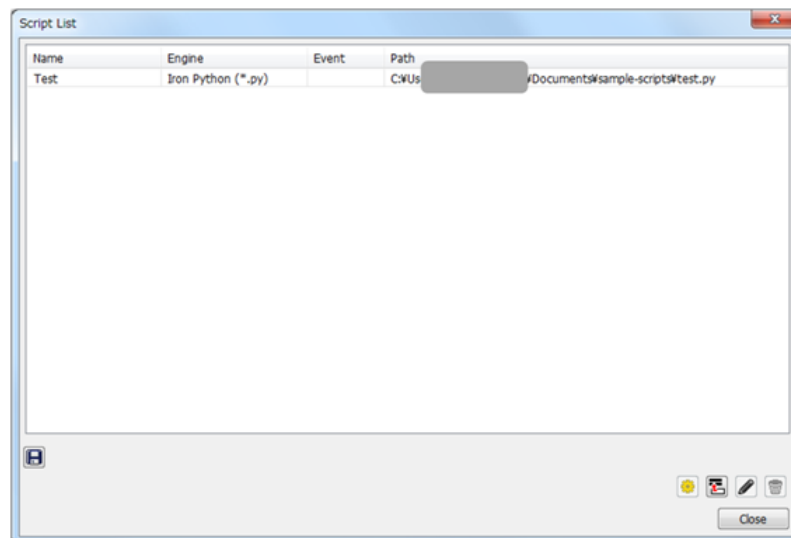
[保存]をクリックします。スクリプトがファイルに保存されます。

次に、[Name] に登録スクリプト名(この例では「テスト」)を入力します。



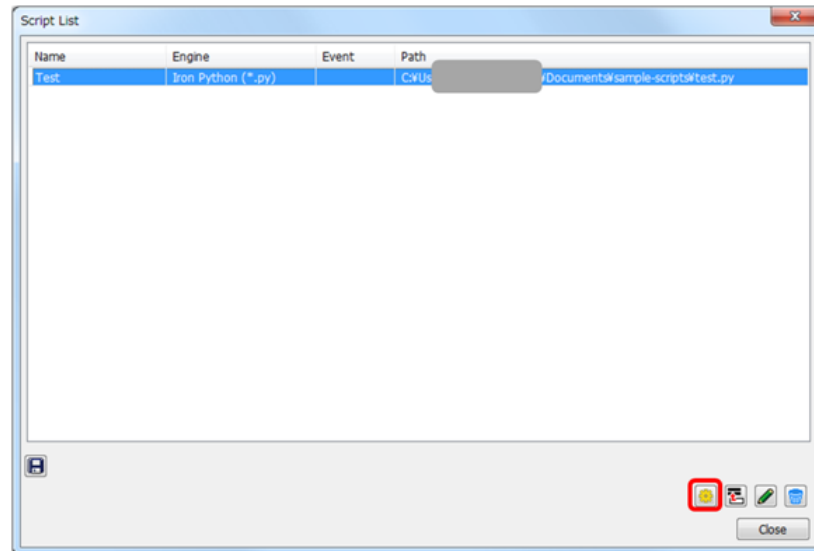
次に、スクリプトコンソールで[OK]をクリックします。

[Script List] にスクリプト “Test” が登録されました。Name に登録スクリプト名、Path に保存したスクリプトファイルの絶対パスが表示されます。

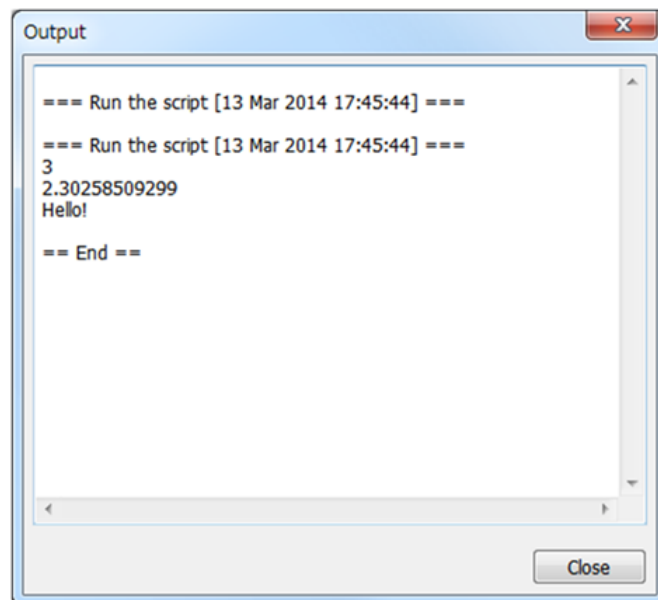


### 3.3.7. 登録スクリプトを実行する

先ほど登録したスクリプト “Test” をクリックします。次に、[Run Script] をクリックします。



[Output] に登録スクリプトの出力結果が表示されます。



出力内容を確認したら[Close]をクリックし、[Output]を閉じます。

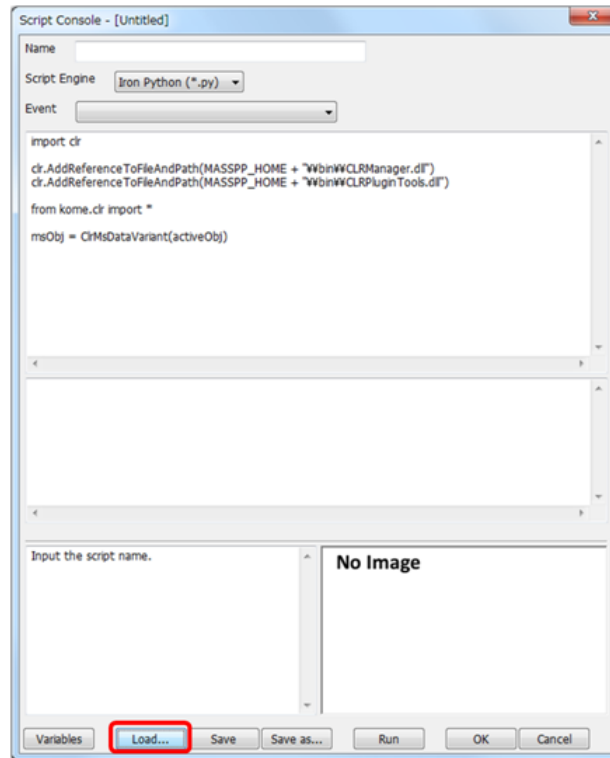
### 3.3.8. スクリプトをファイルから読み込み、実行する。

スクリプトファイルの読み込みについて説明します。この例では、測定データの概要を表示するスクリプトを実行します。

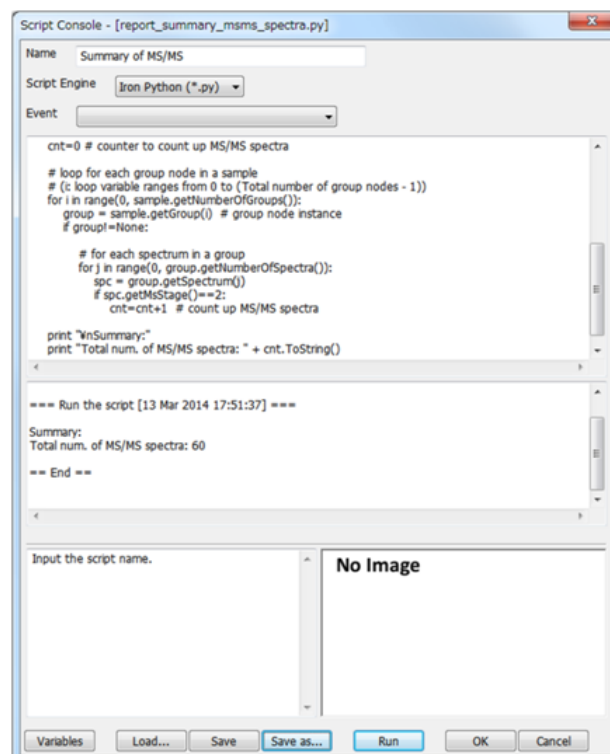
Mass++に同梱されているLC-MALDI データの「LC-MALDI\_bsa1.msb」を測定データとして開きます。

[Script List] で [Add Script] をクリックします。

[Script Console] が開きます。 [Load] をクリックします。

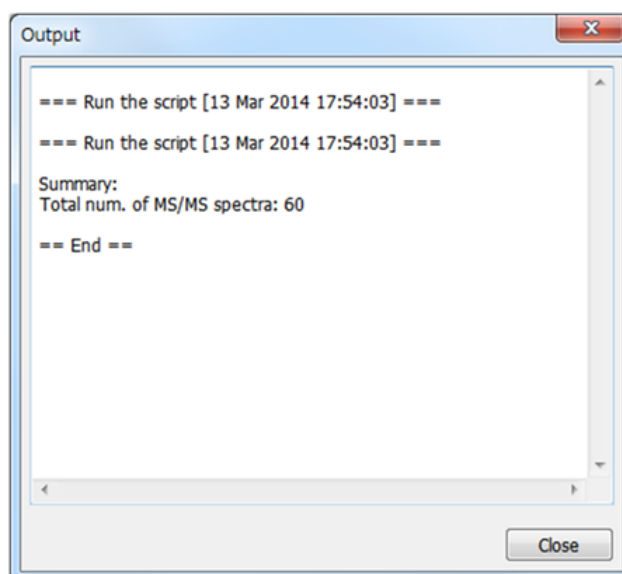


Mass++に同梱されているサンプルスクリプトの「report\_summary\_msms\_spectral.py」を選択し[Open] をクリックします。



読み込まれたスクリプトがスクリプトコンソールのスクリプト記述テキストエリアに表示されます。スクリプト名をつけて、登録します。

登録スクリプトを選択し、[Run Script] をクリックします。[Output]に、測定データ中のMS/MS スペクトル数が表示されます。



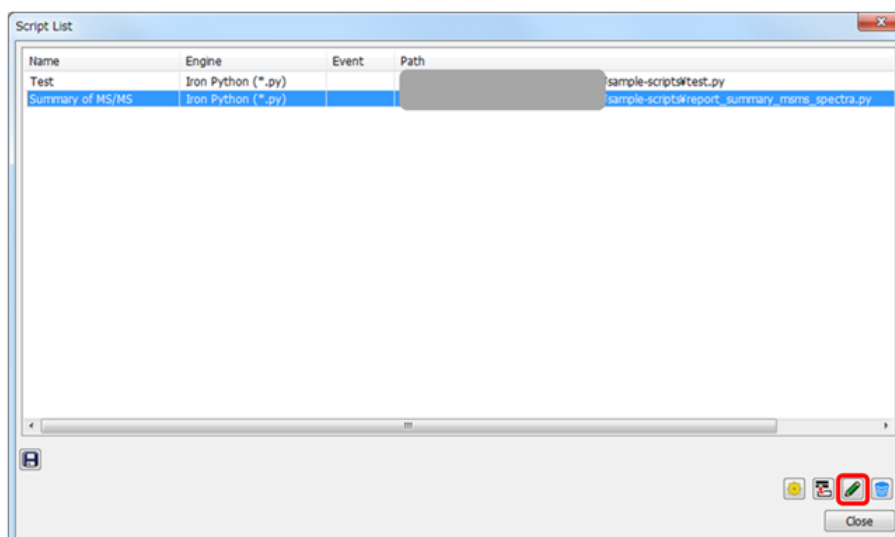
[Close]をクリックし、[Output]を閉じます。

### 3.3.9. スクリプトを編集する

スクリプトを編集し、データに含まれる以下の情報を表示します。

- MS/MS スペクトル名
- プリカーサーイオン質量
- プリカーサーイオン質量の範囲
- 保持時間

[Script List] で [Edit script] をクリックします。



スクリプトコンソールのスクリプト記述テキストエリアにスクリプトが表示されたら、  
"from kome.clr import \*" の次のコメント行を図のように修正します。  
この修正では、MS/MS スペクトルの属しているグループノードの名前、スペクトル名などの属性情報を納めるコンテナクラスを追加定義しています。編集後の内容を、同梱の  
"report\_summary\_msms\_spectra\_2.py" に納めていますので、ご利用ください。

```

import clr # load .NET library↵
↵
# load Mass++'s Application Programming Interface for .NET↵
clr.AddReferenceToFileAndPath(MASSPP_HOME + "\\bin\\CLRManager.dll")↵
clr.AddReferenceToFileAndPath(MASSPP_HOME + "\\bin\\CLRPluginTools.dll")↵
from kome.clr import *↵
↵
# definition of container class to store properties of a spectrum↵
class spec_feature:↵
    def __init__(self, group_name, name, pc_mass, rt):↵
        self.group_name = group_name↵
        self.name = name↵
        self.pc_mass = pc_mass↵
        self.rt = rt↵
    def __repr__(self): # default string representation of the instance↵
        return str(self.group_name + '\t' + self.name + '\t'↵
            + self.pc_mass.ToString() + '\t' + self.rt.ToString())↵
↵
list_spec_feature = [] # container to store properties of spectra↵
feature_sort_key = lambda spec_feature: spec_feature.pc_mass # sort key for spec_feature↵
↵
# access MS/MS spectra in active MS data instance of Mass++, and then↵
# store properties of spectra into list_spec_feature↵
↵
msobj = CLRMSDataVariant(activeobj) # active MS data instance of Mass++↵
sample = msobj.getSample() # sample node of MS data↵
↵
if sample == None: # active sample doesn't exist↵
    print "cannot obtain active sample."↵

```

cnt = cnt + 1 以降の行についても図の通り編集します。この修正箇所では、さきほど定義したコンテナに各 MS/MS スペクトルの属性情報を納めた後、その内容を標準出力に出力しています。

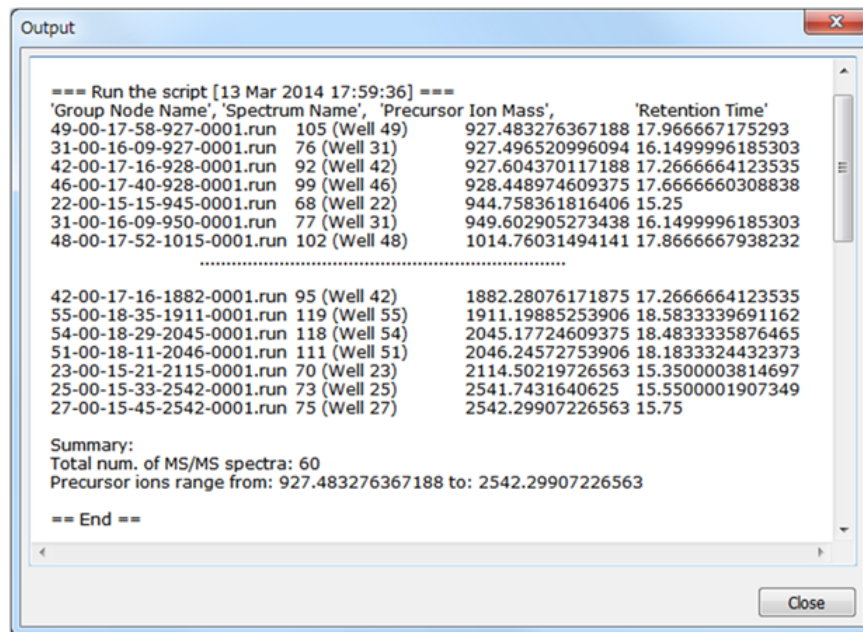
```

# for each spectrum in a group↵
for j in range(0, group.getNumberOfSpectra()):↵
    spc = group.getSpectrum(j)↵
    if spc.getMsStage()==2:↵
        cnt=cnt+1 # count up MS/MS spectra↵
↵
# store properties of MS/MS spectra into list↵
sf = spec_feature( group.getName(), spc.getName(),↵
    spc.getPrecursor(), spc.getRt() )↵
list_spec_feature.append(sf)↵
↵
# print out properties of MS/MS spectra↵
# sorted by precursor ion mass in ascending order↵
print "Group Node Name',\t'Spectrum Name',\t'Precursor Ion Mass',\t'Retention Time'"↵
for spc in sorted(list_spec_feature, key=feature_sort_key):↵
    print spc↵
print "\nSummary:"↵
print "Total num. of MS/MS spectra: " + cnt.ToString()↵
print ("Precursor ions range from: "↵
    + min(list_spec_feature, key=feature_sort_key).pc_mass.ToString() + " to: "↵
    + max(list_spec_feature, key=feature_sort_key).pc_mass.ToString())↵

```

編集が終わったら、実行します。MS/MS スペクトル数に加えて、個々のスペクトルの名前やプリカーサーイオン質量・溶出時間をプリカーサーイオン質量でソートした上で一覧表示し、末尾に全 MS/MS スペクトルのプリカーサーイオン質量の最小・最大値を表示します。





```
==== Run the script [13 Mar 2014 17:59:36] ====
'Group Node Name', 'Spectrum Name', 'Precursor Ion Mass', 'Retention Time'
49-00-17-58-927-0001.run 105 (Well 49) 927.483276367188 17.966667175293
31-00-16-09-927-0001.run 76 (Well 31) 927.496520996094 16.1499996185303
42-00-17-16-928-0001.run 92 (Well 42) 927.604370117188 17.2666664123535
46-00-17-40-928-0001.run 99 (Well 46) 928.448974609375 17.6666660308838
22-00-15-15-945-0001.run 68 (Well 22) 944.758361816406 15.25
31-00-16-09-950-0001.run 77 (Well 31) 949.602905273438 16.1499996185303
48-00-17-52-1015-0001.run 102 (Well 48) 1014.76031494141 17.8666667938232
.....
42-00-17-16-1882-0001.run 95 (Well 42) 1882.28076171875 17.2666664123535
55-00-18-35-1911-0001.run 119 (Well 55) 1911.19885253906 18.5833339691162
54-00-18-29-2045-0001.run 118 (Well 54) 2045.17724609375 18.4833335876465
51-00-18-11-2046-0001.run 111 (Well 51) 2046.24572753906 18.1833324432373
23-00-15-21-2115-0001.run 70 (Well 23) 2114.50219726563 15.3500003814697
25-00-15-33-2542-0001.run 73 (Well 25) 2541.7431640625 15.5500001907349
27-00-15-45-2542-0001.run 75 (Well 27) 2542.29907226563 15.75

Summary:
Total num. of MS/MS spectra: 60
Precursor ions range from: 927.483276367188 to: 2542.29907226563

== End ==
```

### 3.3.10. イベント駆動型のスクリプト実行

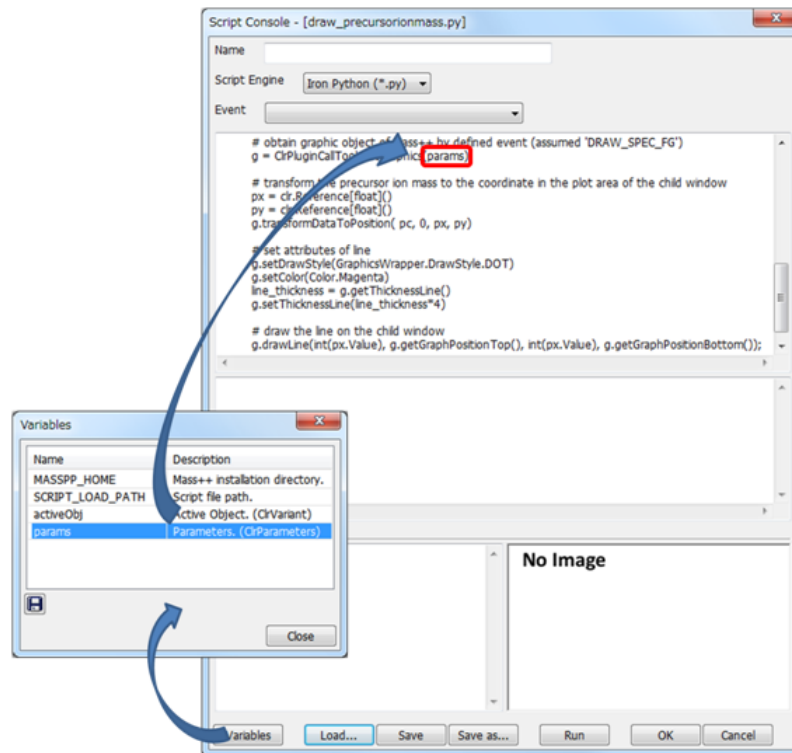
Mass++では、スペクトルの再描画や、ピーク検出などのイベント発生時にスクリプトを実行することができます。ここでは、MS/MS スペクトルへの描画を例にイベント駆動式のスクリプト実行方法について紹介します。

スクリプトコンソールを開き、Mass++に同梱されているサンプルスクリプトの「draw\_precursorionmass.py」を読み込みます。

[Variables] をクリックします。[Variables] が開き、「params」等の定義済変数が一覧表示されます。サンプル・スクリプトでは、イベント発生時にMass++ から渡されるパラメータ変数一式である params を使用しています。params で与えられるパラメータの種類は Mass++ プラグインのイベント型に従います。

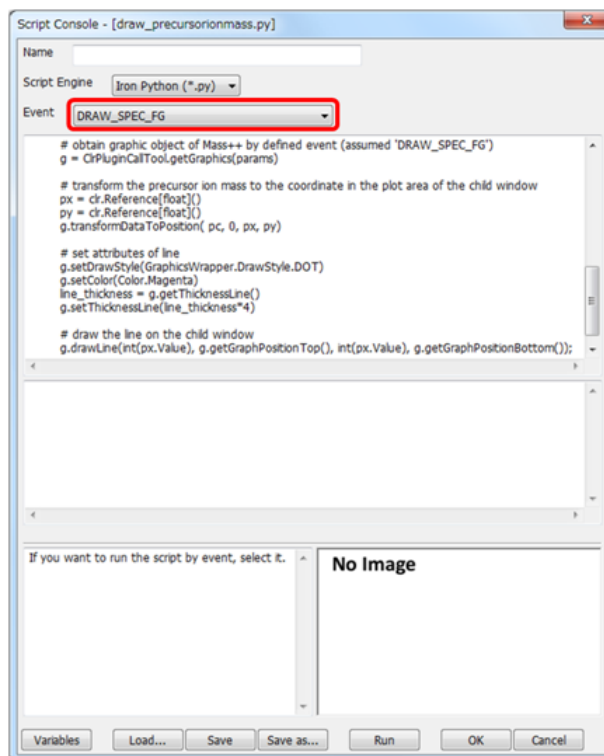
[Variables] には、他の定義済変数も表示されます。MASSPP\_HOME は、Mass++ 本体の実行ファイルの起動フォルダ(文字列)です。activeObj はアクティブなデータクラスのインスタンスです。SCRIPT\_LOAD\_PATH は、読み込まれたスクリプトファイルの絶対パスで、別のモジュールを読み込むなどの目的で使用します。

[Variables] に表示される変数をダブルクリックすると、スクリプトコンソールのカーソル上に変数名が挿入されます。

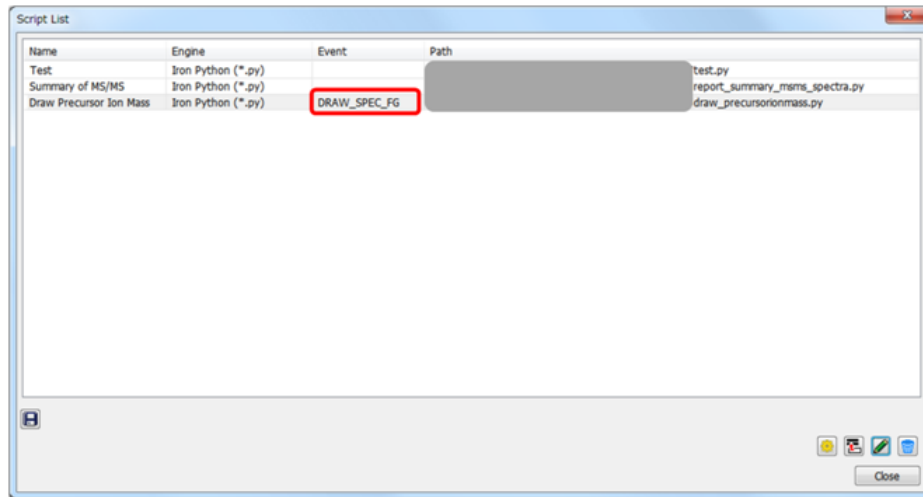


[Close] をクリックし、[Variables] を閉じます。

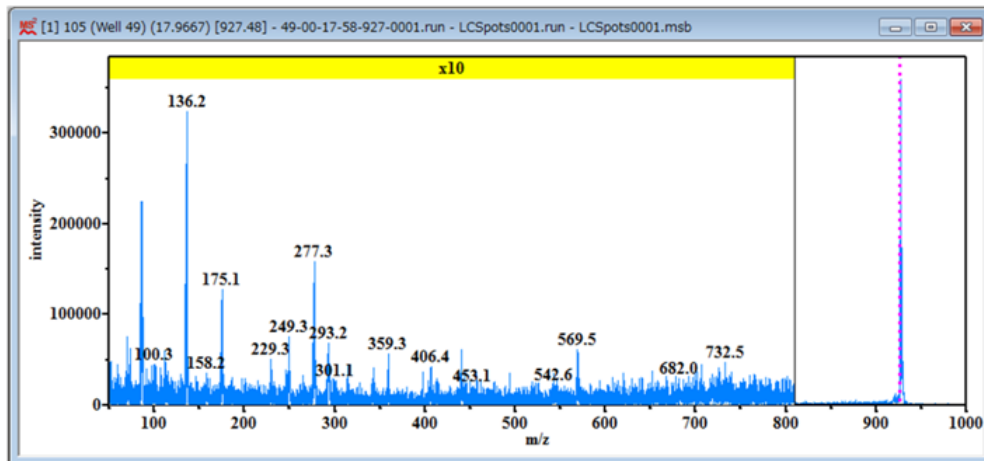
イベント駆動型のスクリプト実行を行うには、[Event]で駆動対象イベントを選びます。この例では、「DRAW\_SPEC\_FG」を選択します。「DRAW\_SPEC\_FG」は、スペクトル波形の前景の描画処理時に発生するイベントです。イベントを選んだら、スクリプトを登録します。



[Script List] の Event カラムに DRAW\_SPEC\_FG が表示されていることを確認したら、MS/MS スペクトルを開きます。



マゼンタ色の点線が、プリカーサーイオン質量の位置に鉛直方向に描画されます。



Mass++ のAPI については、Mass++ に同梱予定の開発者ズマニュアルを参照ください。

# Chapter 4. MassBank

MassBankは奈良先端科学技術大学院大学の西岡孝明教授のグループが開発しているpublicなMetabolomicsデータベースです。Mass++から、効率的なデータ登録や、直接的なデータベース検索などができます。

## 4.1. Create Spectrum Records

MassBank に登録するための MassBank レコードファイルを作成します。ここでは奈良先端科学技術大学院大学の金谷重彦先生 (<http://kanaya.naist.jp/joomla/>) よりご提供いただいたデータを使用しています。

### 4.1.1. はじめに

MassBankにデータを登録するためには、MassBankパッケージ付属のツール“レコード編集ツール”を使用してデータをMassBank形式に整形し、これをMassBankサーバ上のwebプログラム“管理者用ツール”を用いて登録します。しかしMassBankの一つのレコードには120を超える項目があり、すべてを手作業で入力するのは困難です。

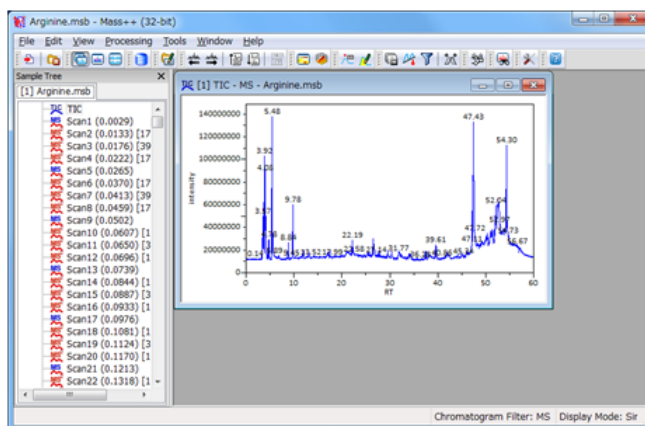
このために、rawデータからデータ形式を変換する作業など、データの自動生成を行うのがMass++のレコードファイル作成機能です。詳細についてはMassBankのマニュアルを参照してください。

MassBankサーバは、外部に公開する(public server)ことも、LAN内に対してのみ公開するin house使用とすることも可能です(in-house server)。外部に公開する場合には、MassBankプロジェクトに申請し、各ユーザーに固有の(後述する)Accessionの英3文字を指定してもらう必要があります。

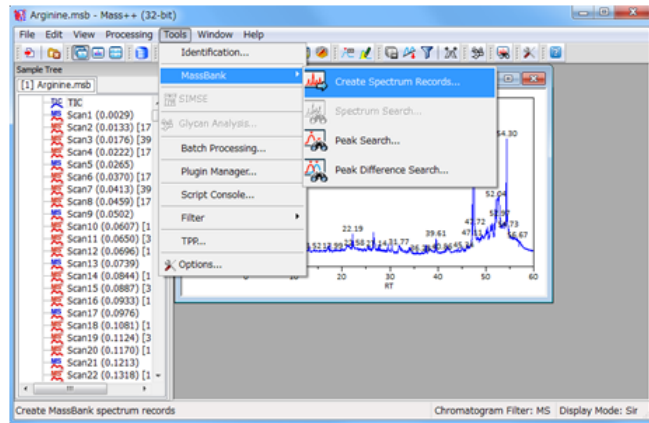
このユーザーズガイドでは、in house使用を前提に説明します。MassBankレコードの詳細については、MassBankのマニュアルを参照してください。

### 4.1.2. [Create] ウィザード (Create Spectrum Records) を開く

まず“Arginine.msb” ファイルを開きます。

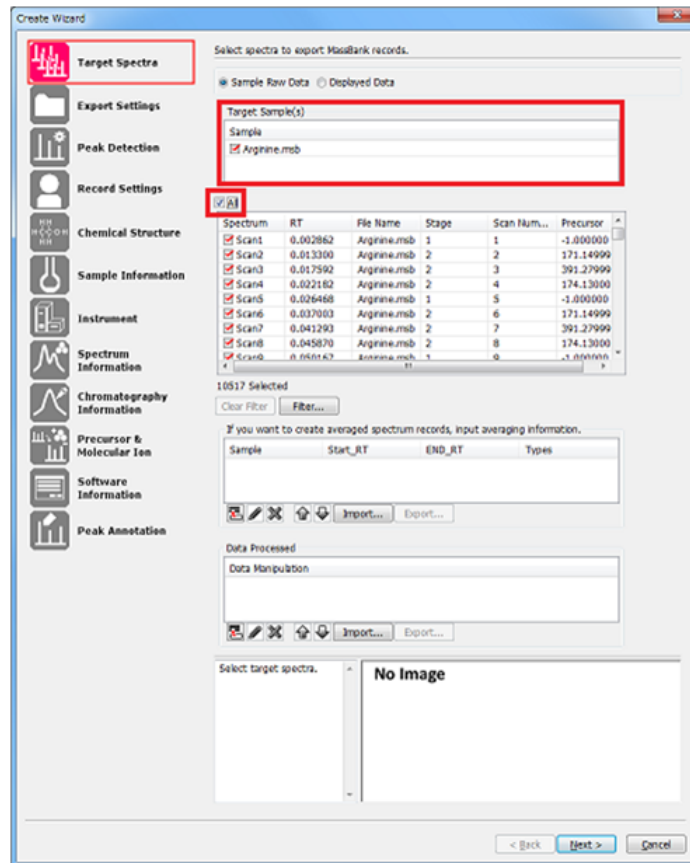


[Tools] メニューから [MassBank] - [Create Spectrum Records] をクリックします。

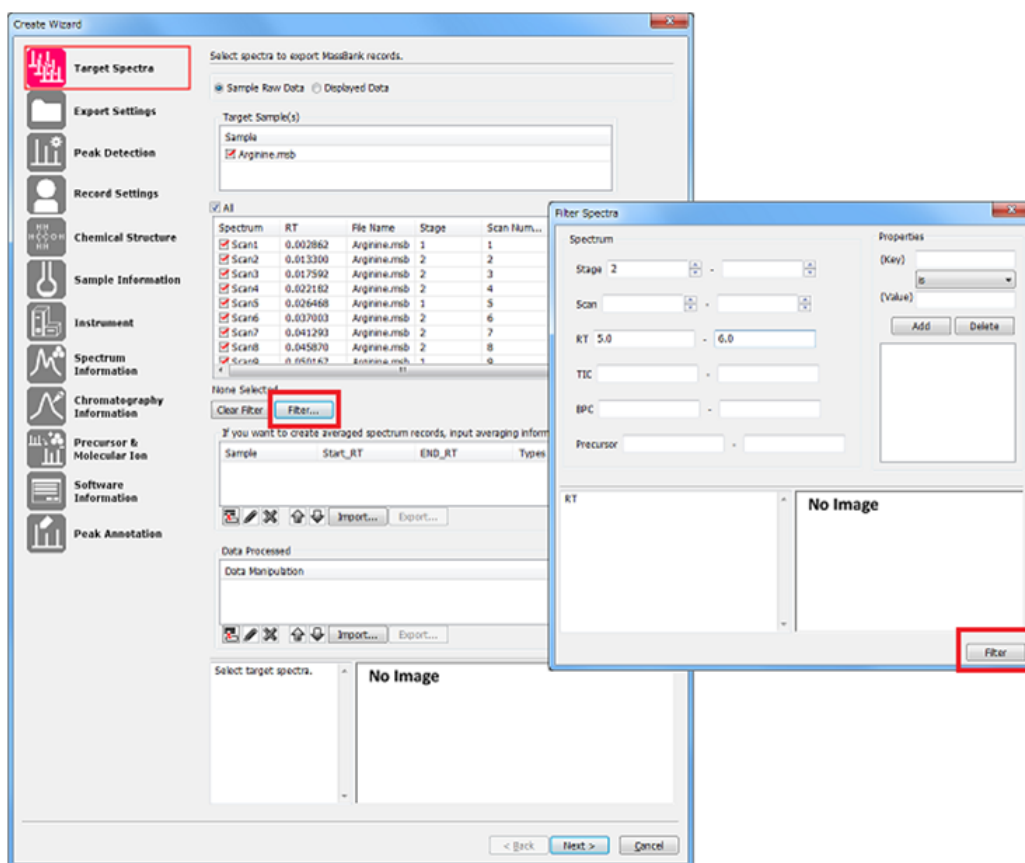


[Create] ウィザードが開きます。

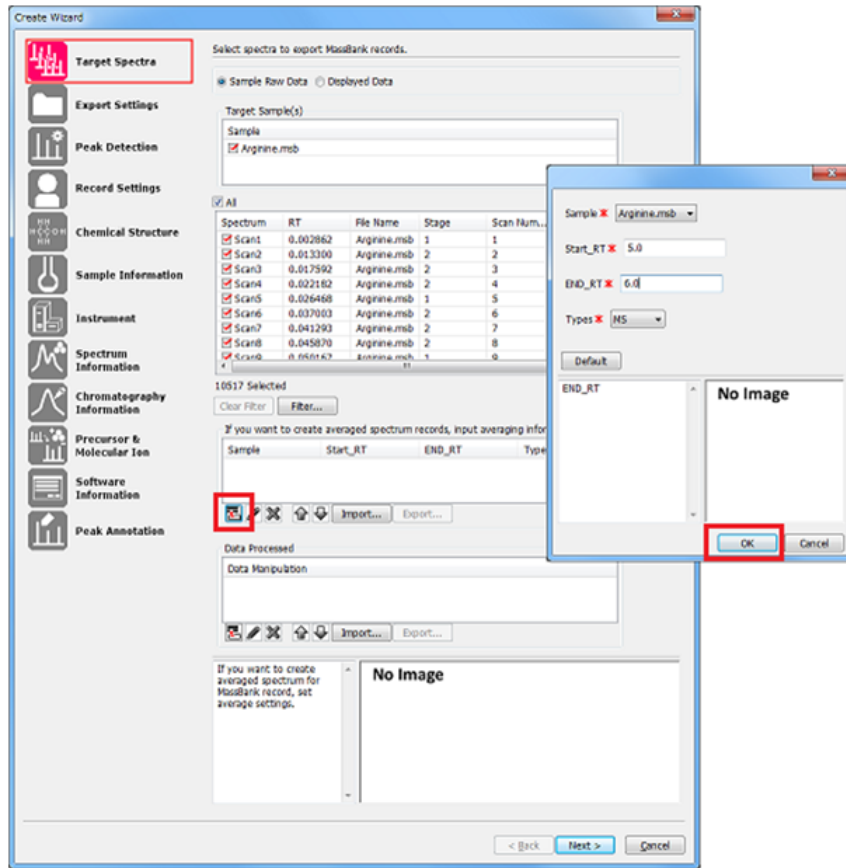
ここでは全てのスペクトルを選択します。[Target Sample(s)] で "Arginine.msb" をチェックすると、その下に "Arginine.msb" が持つスペクトルの一覧が表示されるので、その状態で [All] をチェックします。



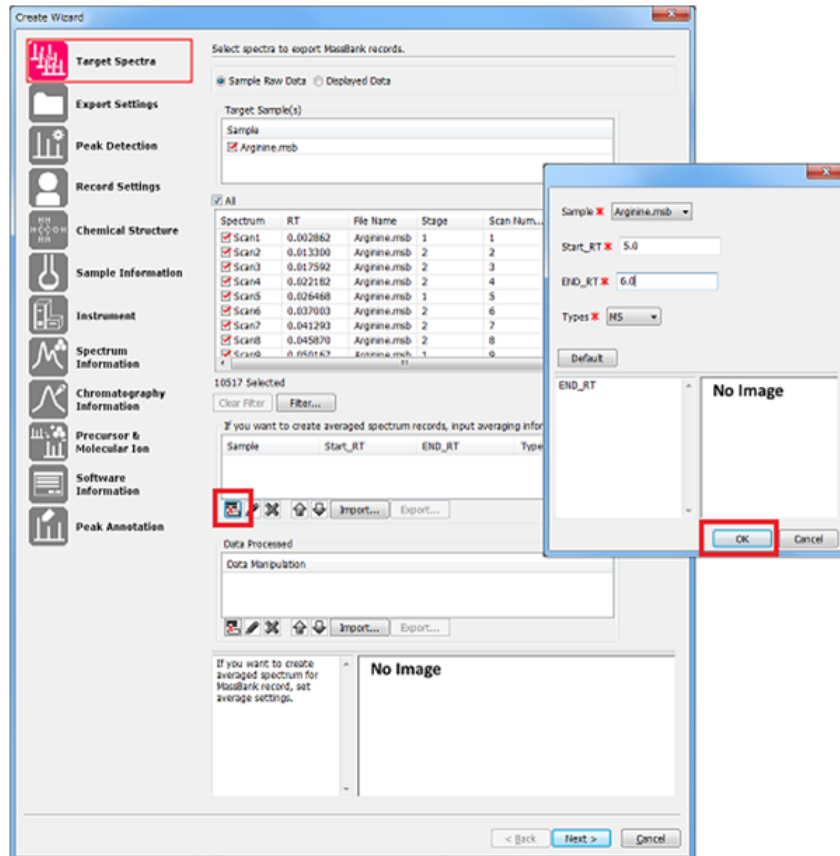
Note: リストに表示されるスペクトルを条件で絞りたい場合は、リスト下にある [Filter] をクリックします。[Filter Spectra] が表示されるので、ここに条件を入力後、 [Filter] をクリックします。



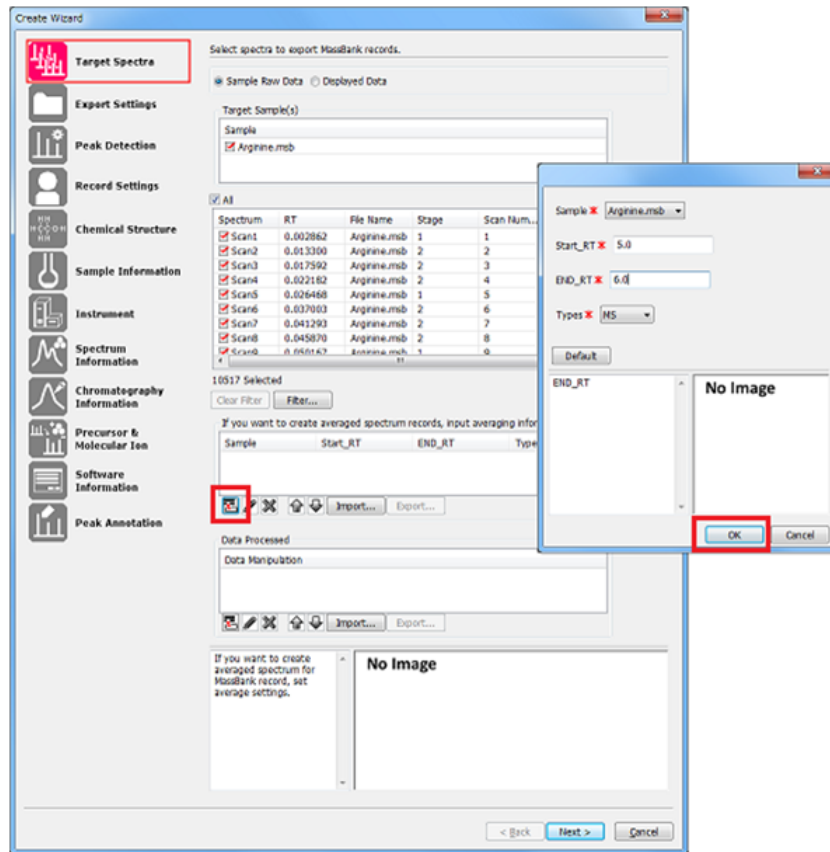
Note: 複数のスペクトルを平均したスペクトルをレコードとして作成したい場合は“Averaged spectra” リスト下の [Add] をクリックします。ダイアログが表示されるので、平均化に用いるスペクトルの範囲として、以下の内容を入力します：



・対象サンプル

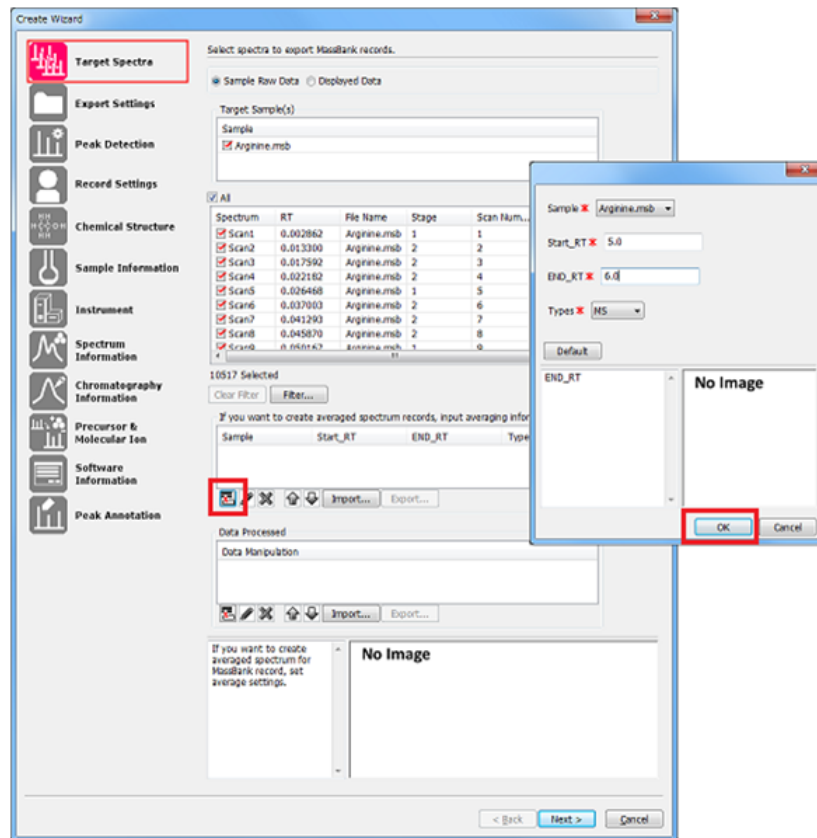


- RT範囲

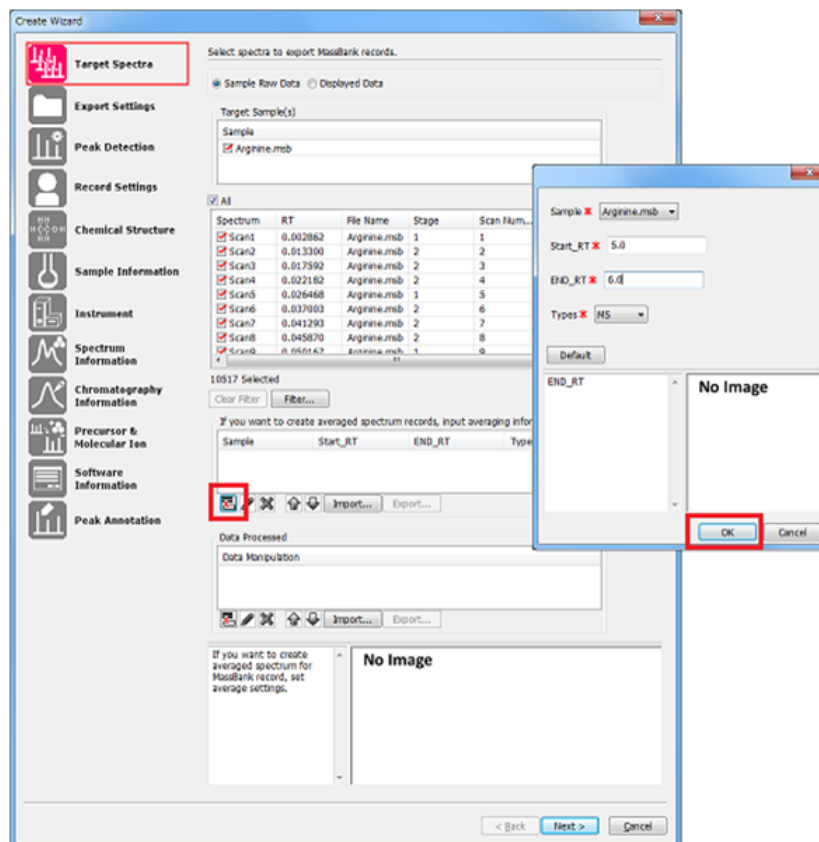


- スペクトルのタイプ (A11: 任意のスペクトル、MS: MSスペクトルのみ、MS/MS: MS<sub>n</sub> (n $\geq$ 2) スペクトルのみ)



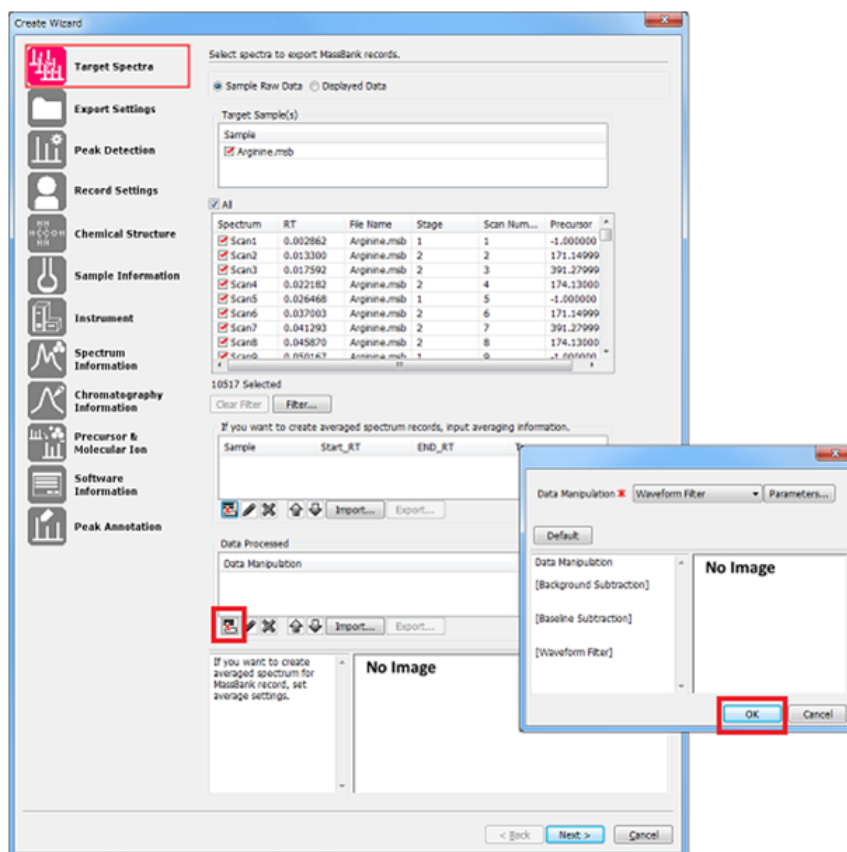


設定が終わったら [OK] をクリックします。

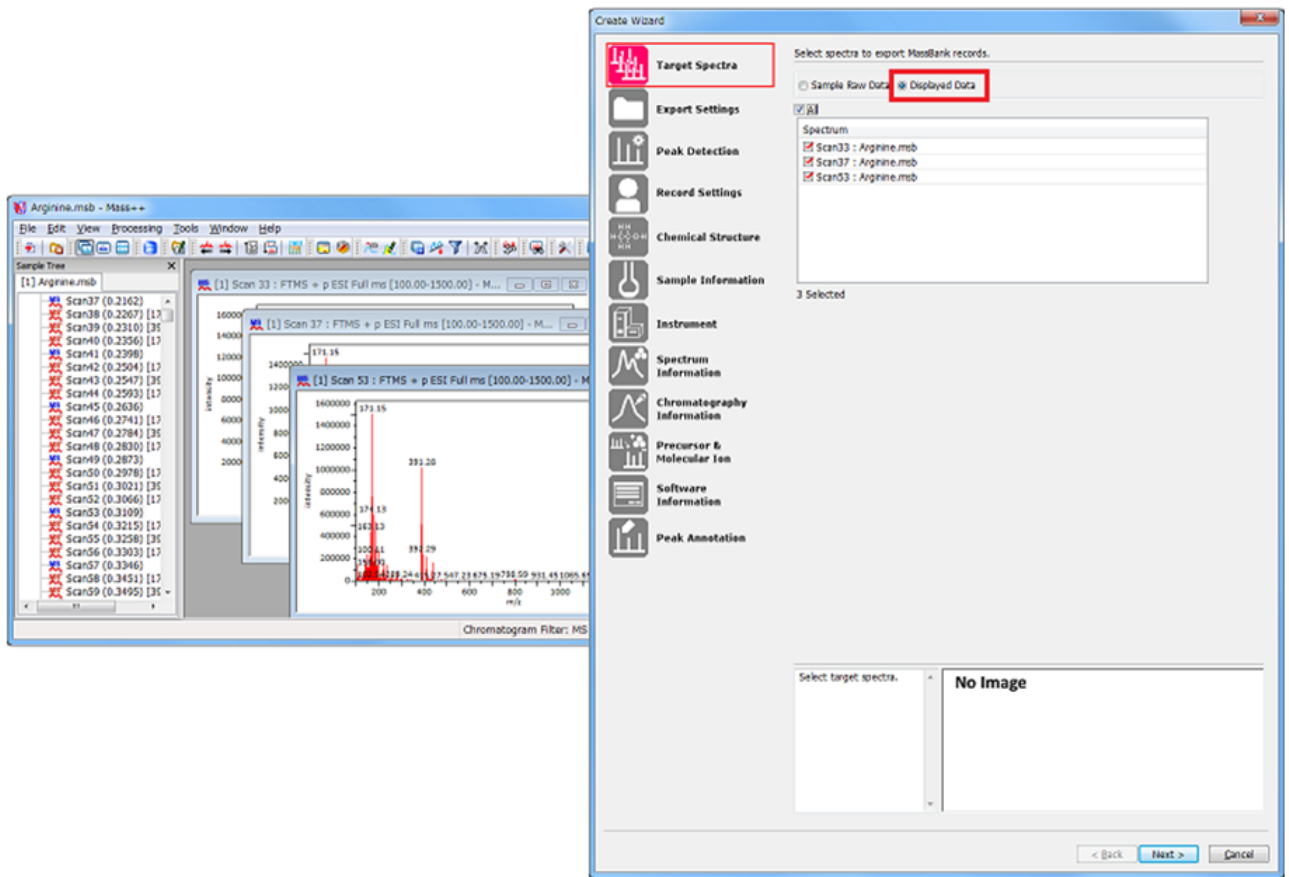


Note: 各々のスペクトルにベースライン除去やスムージング等の波形処理を施したい場合は、[Data manipulation] リスト下の [Add] をクリックします。ダイアログが表示され

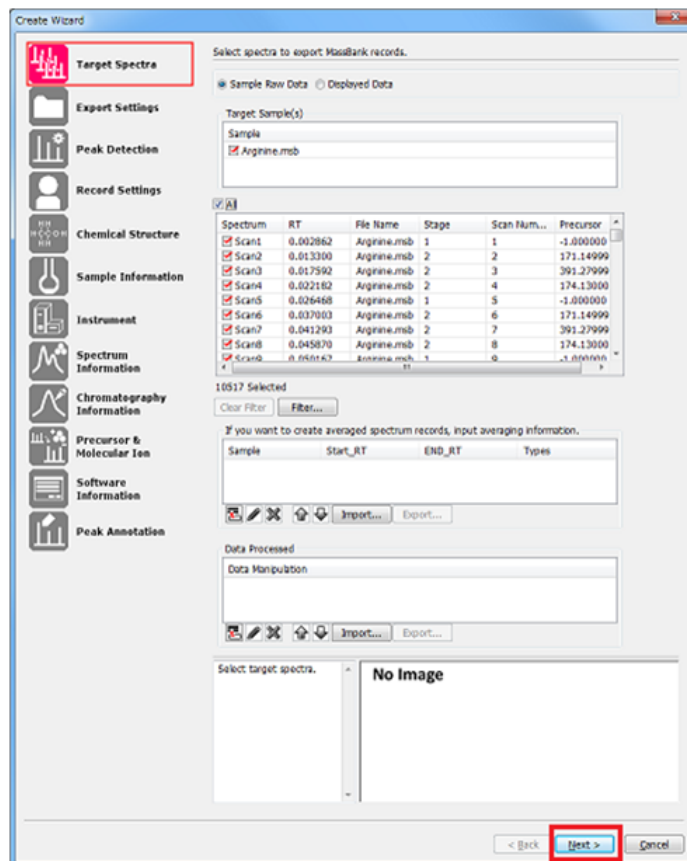
るので、行ないたい波形処理を選択して [Parameters] をクリックし、パラメータを設定します。設定が終わったら [OK] をクリックします。



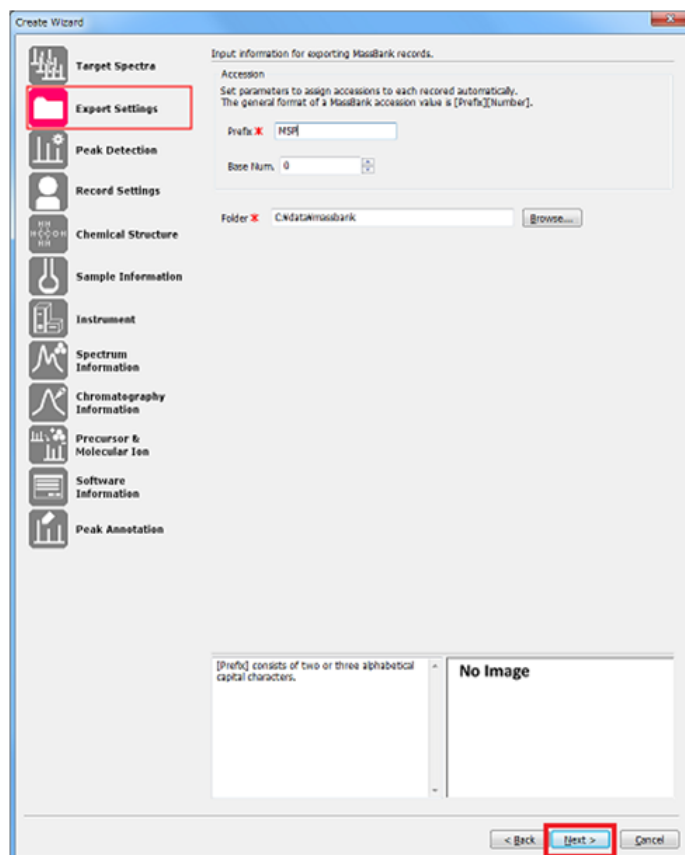
Note: 表示されている波形をそのままレコードにしたい場合は、一番上のラジオボタン [Displayed Data] を選択します。表示されているスペクトルの一覧がリスト表示されるので、レコード作成対象のスペクトルを選択します。



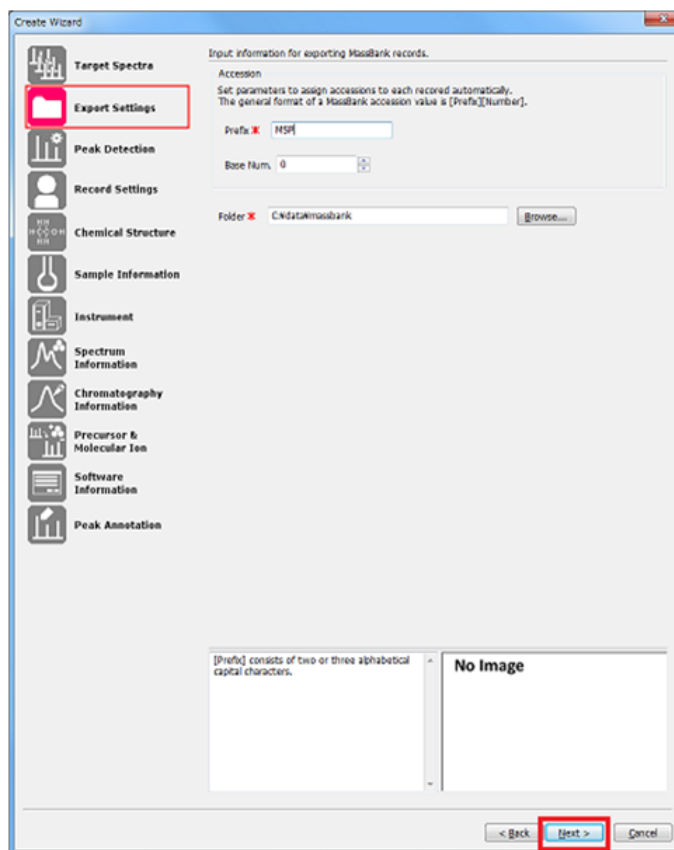
レコード出力対象のスペクトルを選択したら [Next] をクリックします。



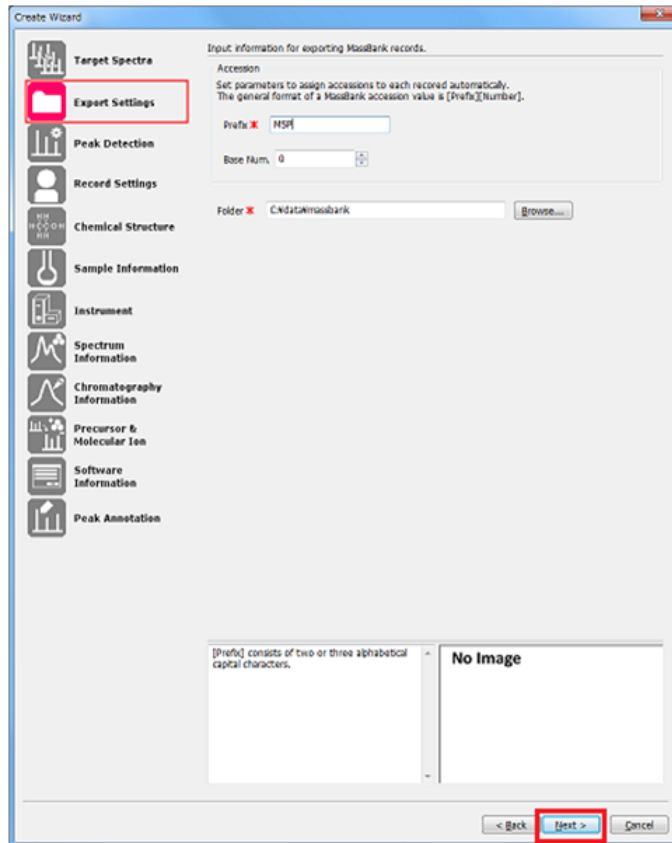
[Export Settings] で出力設定を行ないます。MassBank レコードには、それぞれ固有の Accession 即ち ID 番号が与えられます。Accession は最大 8 個の文字列から成り、英大文字 2 文字か 3 文字+数字 5 桁の形です（詳細は MassBank マニュアルを参照してください）。



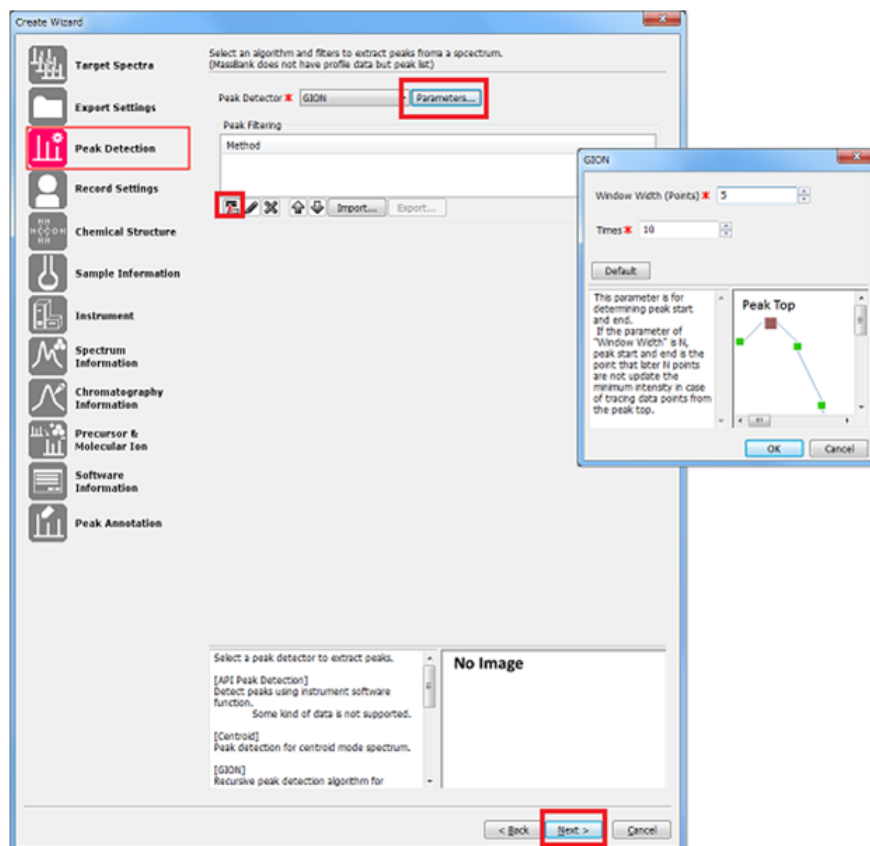
[Prefix] で大文字アルファベットを、[Base Num] で数字連番の初期値を入力します。



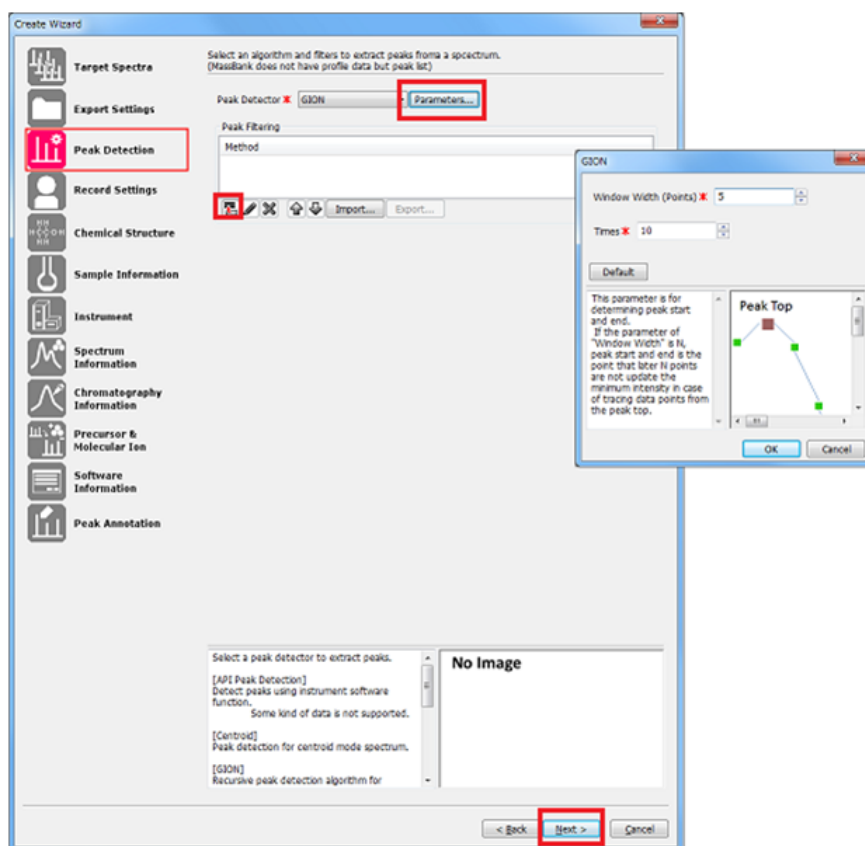
ここでは [Prefix] で "MSP" を、[Base Num] で 0を指定します。この場合、レコードの Accession は 1個目のスペクトルが MSP00000、2個目のスペクトルが MSP00001、以下 MSP00002, MSP00003, ... と続きます。[Folder] ではレコードを出力するフォルダを指定します。一通り入力したら [Next] をクリックします。



[Peak Detection] ページでピーク検出の設定を行ないます。ここでは「GION」を選択し [Parameters] をクリックします。



[GION] が開きます。ここで [Window Width] を 5, [Times] を 10 に設定します。ピークフィルタ条件を指定したい場合は [Peak Filtering] の [Add] をクリックします。一  
通り設定が終わったら [Next] をクリックします。



Record Settings でレコードの基本情報を入力します。データの表題、データ作成日、データ作成者、データの著作権ライセンス、著作権者、データ公開情報、コメントを入力します。このうち、表題とライセンスは必須入力です（省略できません）。この例では、入力済みの値のまま、[Next] をクリックします。

The screenshot shows the 'Create Wizard' dialog box with the following details:

- Record Settings (highlighted):**
  - Title: %FileName%
  - Date: 2014.02.26
  - Authors: [empty]
  - License: CC BY (commercial use; allowed, modify; allowed)
  - Copyright: [empty]
  - Publication: [empty]
  - Comments: [Raw Data] %File Name%
- Other tabs (from top to bottom):** Target Spectra, Export Settings, Peak Detection, Chemical Structure, Sample Information, Instrument, Spectrum Information, Chromatography Information, Precursor & Molecular Ion, Software Information, Peak Annotation.
- Buttons:** < Back, Next > (highlighted), Cancel.

Note: 公開版MassBankのデータはCreative Commonsライセンスで公開することが決まっており、各データ毎にCreative Commonsのどのサブカテゴリを選ぶかを、データ登録時に決める必要があります（サブカテゴリについては [パラメーターヒント] を参照してください）。更に詳細な情報はMassBankマニュアルを参照してください）。

[Chemical Structure] ページでは、入力しているデータにアサインされた物質の化学構造に関する情報を入力します。まず Category の [Product] で 天然物か人工物かを入力します。この項目は必須入力です。この例では“Natural Product” を選択します。



Input chemical information.

Category: Product \* Natural Product

Class Name: \_\_\_\_\_

Name: \_\_\_\_\_

Link: DB: \_\_\_\_\_ Accession: \_\_\_\_\_

Chemical Structure: Formula: \_\_\_\_\_ Exact Mass: \_\_\_\_\_ SMILES: \_\_\_\_\_ InChI Key: \_\_\_\_\_

Import from mol file... Import from external DB... Search...

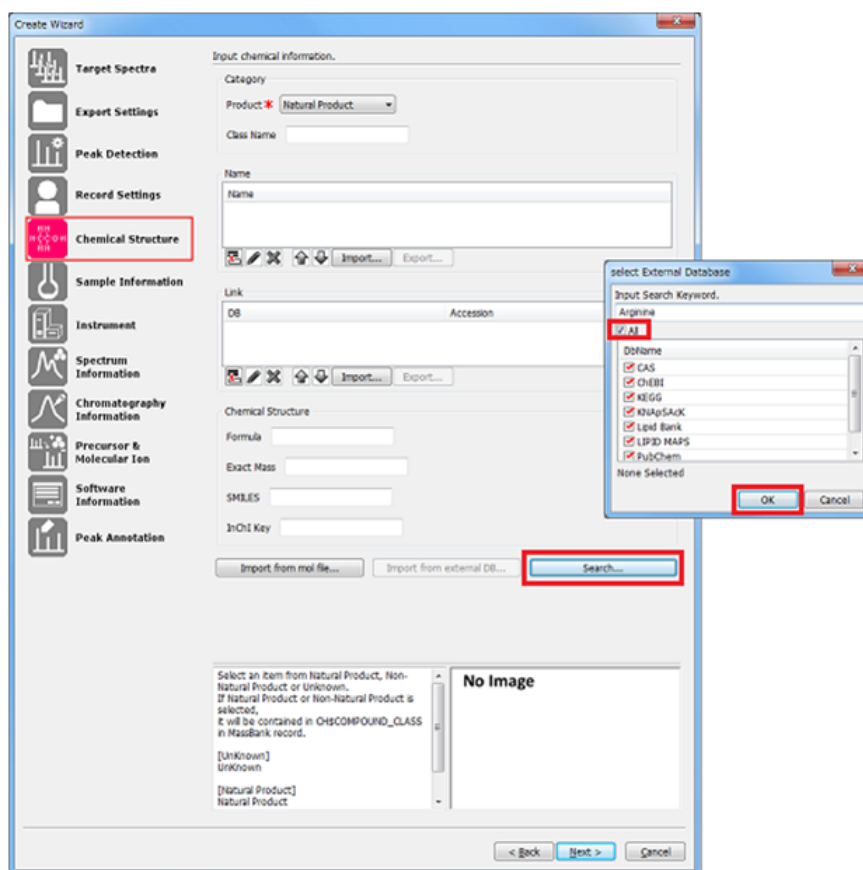
Select an item from Natural Product, Non-Natural Product or Unknown.  
If Natural Product or Non-Natural Product is selected, it will be contained in CHSCOMPOUND\_CLASS in MassBank records.

[Unknown]  
[Unknown]  
[Natural Product]  
Natural Product

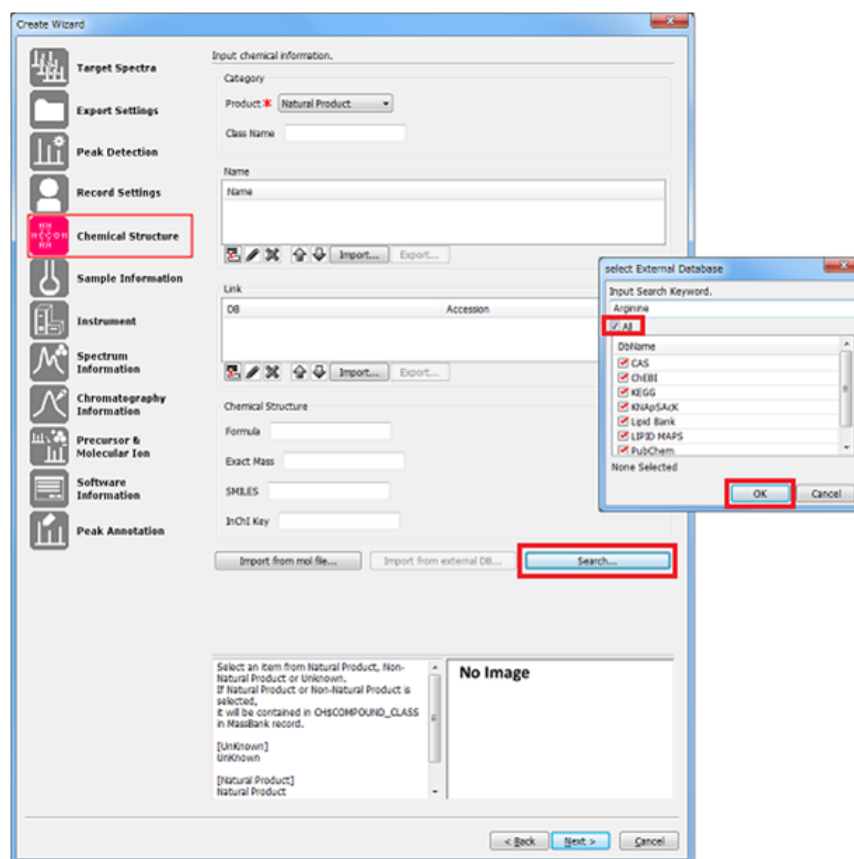
No Image

< Back Next > Cancel

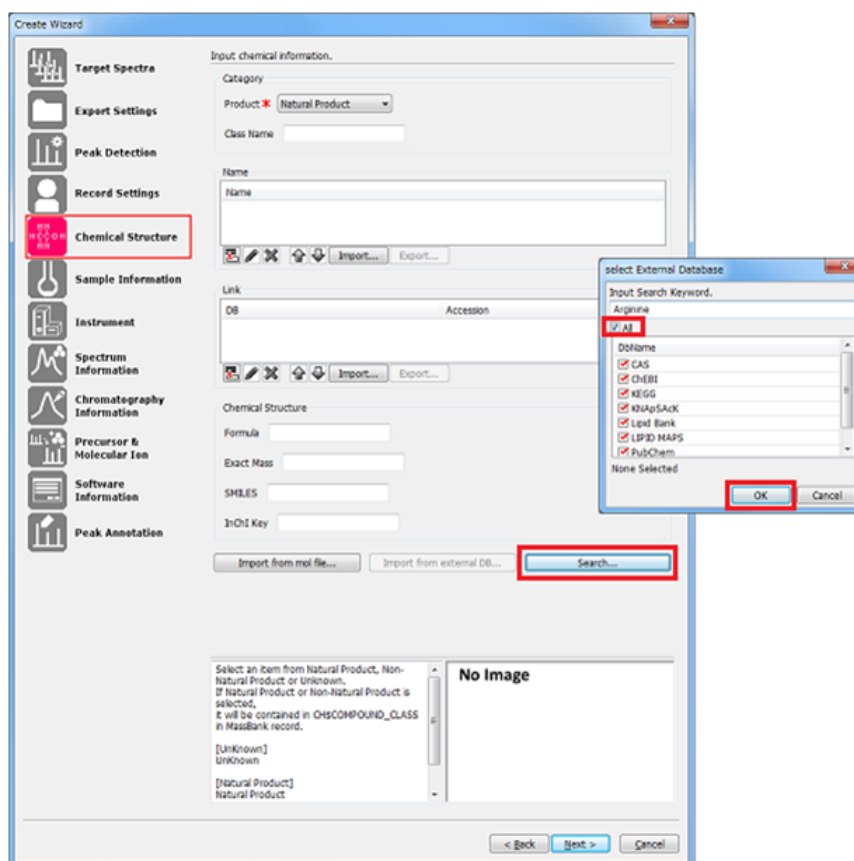
次に、化合物の名称や、化学構造、その化合物についての追加情報が記載された公的データベース（ここでは「外部データベース」と表記します）へのリンク情報などを入力します。



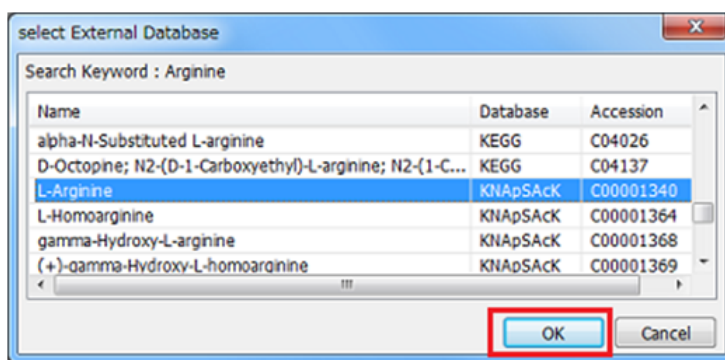
この作業は入力項目が多く煩雑なので、外部データベースの情報を利用して入力するのが簡便です。そこでこの例では、できるだけ外部データベースの情報を抽出して項目を埋めていく方法を採用します。



まず、外部データベースを検索するため、[Search] をクリックします。[select External Database] が開くので、キーワードに "Arginine" を入力します。さらに、事前登録されたすべてのデータベースを検索対象にするため、[All] にチェックを入れます。検索条件を入力し終わったら [OK] をクリックします。



検索結果が表示されるので、ここでは Name: L-Arginine, Database: KNAPSAcK, Accession: C00001340 を選択し、[OK] をクリックします。



[Name] に化合物名が、[Link] に外部データベース名とそのデータベースでの accession 情報が追加された事を確認します。

Input chemical information.

Category: Natural Product

Product: Natural Product

Class Name:

Name: L-Arginine

Link: KNAPsAcK : C00001340

Chemical Structure

Formula:

Exact Mass:

SMILES:

InChI Key:

Import from mol file... Import from external DB... Search...

Select an item from Natural Product, Non-Natural Product or Unknown.  
If Natural Product or Non-Natural Product is selected,  
it will be contained in CHSCOMPOUND\_CLASS  
in MassBank record.

[Unknown]  
Unknown  
[Natural Product]  
Natural Product

No Image

< Back Next > Cancel

次に、化学構造を取得するため [Import from external DB] ボタンをクリックします。  
[Select the link] が表示されるので、[Link] で “KNAPsAcK : C00001340” を選択して  
[OK] をクリックします。

The screenshot shows the 'Create Wizard' window with the following details:

- Left sidebar:** A vertical list of icons and labels: Target Spectra, Export Settings, Peak Detection, Record Settings, **Chemical Structure** (highlighted with a red box), Sample Information, Instrument, Spectrum Information, Chromatography Information, Precursor & Molecular Ion, Software Information, and Peak Annotation.
- Main area:** 'Input chemical information.' section with fields for Category (Natural Product), Class Name, Name (L-Arginine), and Link (DB: KNApSACK, Accession: C00001340). Below these are fields for Chemical Structure: Formula, Exact Mass, SMILES, and InChI Key. Buttons for 'Import from mel file...', 'Import from external DB...' (highlighted with a red box), and 'Search...' are present.
- Bottom section:** A list of items to select from: '[Unknown] Unknown', '[Natural Product] Natural Product'. A 'No Image' label is visible.
- Dialog box:** 'Select the link' dialog with 'Link: KNApSACK: C00001340' and 'OK' (highlighted with a red box) and 'Cancel' buttons.

[Chemical Structure] エリアに情報が入力された事を確認し、[Next] をクリックします。

Create Wizard

Input chemical information.

Category: Natural Product

Product: Natural Product

Class Name:

Name: L-Arginine

Link: DB: KNApSACK, Accession: C0001340

Chemical Structure

Formula: C6H14N4O2

Exact Mass: 174.11167568799999

SMILES: N=C(=O)NCCCC(=O)C(=O)O

InChI Key: InChI=1S/C6H14N4O2/c7

Import from mol file... Import from external DB... Search...

Input molecular formula of chemical compound.  
This value is set as CHEMFORMULA item in MassBank record.  
e.g., C9H10O9

No Image

< Back Next > Cancel

Note: 既に MOL ファイルを持っている場合は [Import from mol file] をクリックし、対象の MOL ファイルを指定します。

Input chemical information.

Category: Natural Product

Product: Natural Product

Class Name:

Name: L-Arginine

Link:

DB	Accession
KNApSACK	C0001340

Chemical Structure:

Formula: C6H14N4O2

Exact Mass: 174.11167568799999

SMILES: N=C(N)NCCCC(=O)O

InChI Key: InChI=1S/C6H14N4O2/c7

Buttons: Import from mol file..., Import from external DB..., Search...

Bottom: < Back, Next >, Cancel

Text box: Input molecular formula of chemical compound. This value is set as CHEMFORMULA item in MassBank record. e.g., C9H10O3

Image placeholder: No Image

[Sample Information] ページでは、測定サンプルが由来する生物についての情報を入力します。パラメータヒントを参照して入力してください。



The screenshot shows the 'Create Wizard' dialog box in MassBank, specifically the 'Sample Information' step. The left sidebar contains various options, with 'Sample Information' highlighted in red. The main area is titled 'Input biological sample information.' and contains the following fields:

- Scientific Name:
- Biological Species in External Database:
  - Database:
  - Accession:
- Sample Preparations: A large text area for entering sample preparation details.

At the bottom, there is a 'No Image' section with a text box containing instructions: 'Input the scientific name of the biological species. This value is set as SP\_SSCIENTIFIC\_NAME item in the MassBank record. e.g., Mus musculus'. The 'Next >' button is highlighted in red.

[Scientific Name] にはその生物種の学名を入力します。また、[Biological Species in External Database] エリアに入力するのは、この生物種の系統分類 (taxonomy) 情報が得られるデータベース名とアクセッション番号です。

また [Sample Preparations] には組織情報やサンプル調製手順などの任意の情報を入力します。

Note: [Biological Species in External Database] エリアのテキストボックスは、現在は自由入力なのでどのようなデータでも入力可能ですが、MassBankが対応しているデータベースである必要があります。MassBankマニュアルを参照してください (2014年4月1日時点で、NCBI TaxonomyとKNAPSAcKがサポートされています。特にNCBI Taxonomyは事実上の世界標準です)。

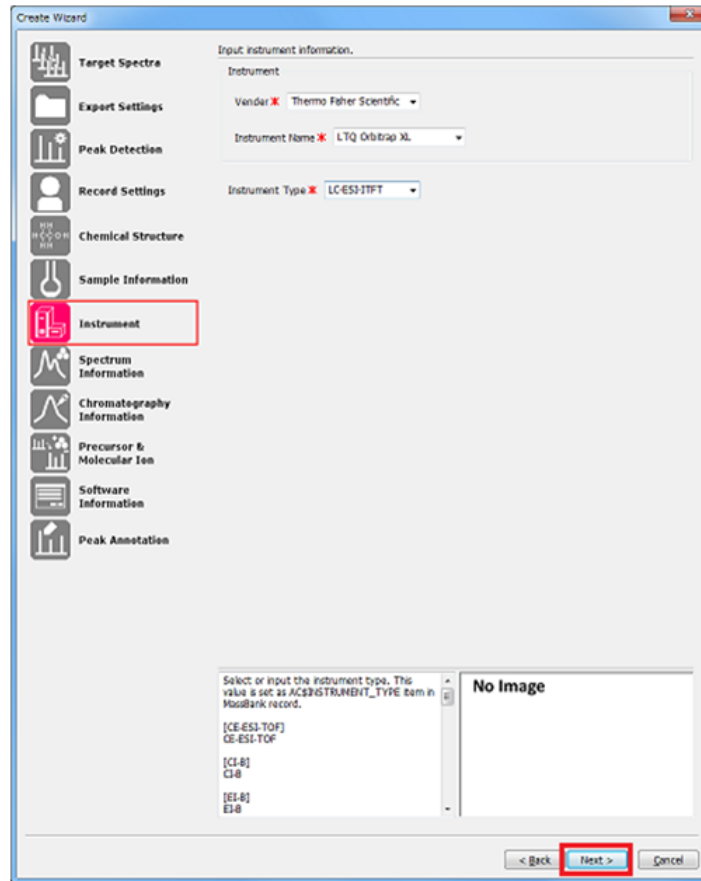
なお、サンプルが非生物由来の場合、これらの項目に入力する内容はありません。従って、これらの項目は必須入力ではありません。今回の例では特に何も入力せず [Next] をクリックします。

The screenshot shows the 'Create Wizard' dialog box in MassBank, currently on the 'Sample Information' step. The left sidebar contains various options, with 'Sample Information' highlighted in red. The main area is titled 'Input biological sample information.' and contains the following fields:

- Scientific Name:
- Biological Species in External Database
  - Database:
  - Accession:
- Sample Preparations: A large empty text area.

Below the 'Sample Preparations' area are 'Import...' and 'Export...' buttons. At the bottom of the dialog, there is a text box with instructions: 'Input the scientific name of the biological species. This value is set as SP\$SCIENTIFIC\_NAME item in the MassBank record. e.g., Mus musculus' and a 'No Image' label. The 'Next >' button at the bottom right is highlighted in red.

[Instrument] ページでは質量分析計の情報を入力します。全て必須入力です。今回の例では以下のように選択します：



- [Vendor] で “Thermo Fisher Scientific”、

The screenshot shows the 'Create Wizard' dialog box with the 'Instrument' step selected. The 'Instrument' section is highlighted with a red box. The 'Instrument Name' is set to 'LTQ Orbitrap XL' and the 'Instrument Type' is set to 'LC-ESI-TFT'. The 'Next >' button is also highlighted with a red box.

Target Spectra  
Export Settings  
Peak Detection  
Record Settings  
Chemical Structure  
Sample Information  
**Instrument**  
Spectrum Information  
Chromatography Information  
Precursor & Molecular Ion  
Software Information  
Peak Annotation

Input instrument information.  
Instrument  
Vendor \* Thermo Fisher Scientific  
Instrument Name \* LTQ Orbitrap XL  
Instrument Type \* LC-ESI-TFT

Select or input the instrument type. This value is set as ACQINSTRUMENT\_TYPE item in MassBank record.  
[CE-ESI-TOF]  
CE-ESI-TOF  
[CI-B]  
CI-B  
[EI-B]  
EI-B

No Image

< Back Next > Cancel

- [Instrument Name] で "LTQ Orbitrap XL"を、

This screenshot is identical to the one above, showing the 'Create Wizard' dialog box with the 'Instrument' step selected. The 'Instrument' section is highlighted with a red box. The 'Instrument Name' is set to 'LTQ Orbitrap XL' and the 'Instrument Type' is set to 'LC-ESI-TFT'. The 'Next >' button is also highlighted with a red box.

Target Spectra  
Export Settings  
Peak Detection  
Record Settings  
Chemical Structure  
Sample Information  
**Instrument**  
Spectrum Information  
Chromatography Information  
Precursor & Molecular Ion  
Software Information  
Peak Annotation

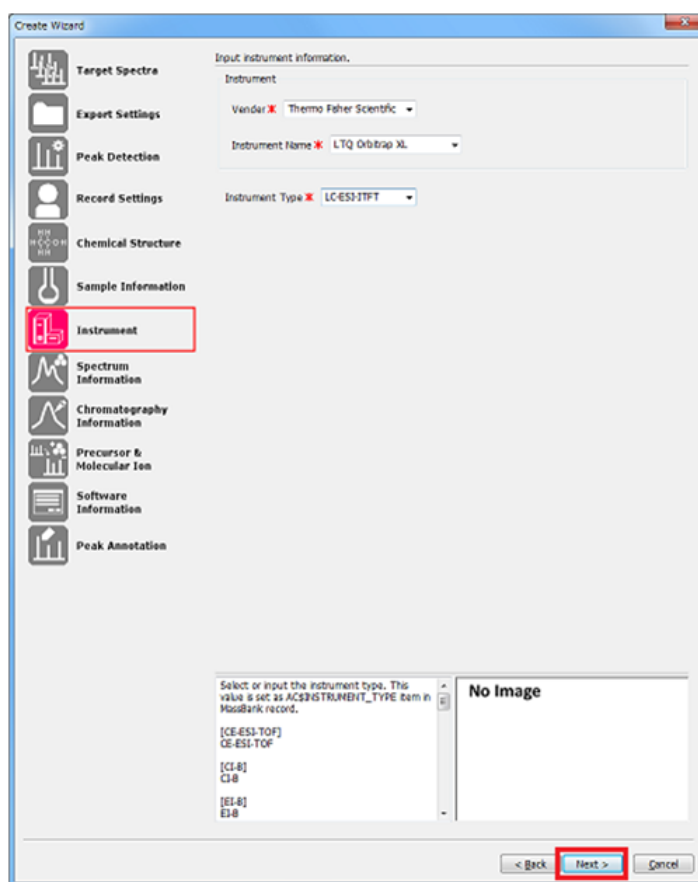
Input instrument information.  
Instrument  
Vendor \* Thermo Fisher Scientific  
Instrument Name \* LTQ Orbitrap XL  
Instrument Type \* LC-ESI-TFT

Select or input the instrument type. This value is set as ACQINSTRUMENT\_TYPE item in MassBank record.  
[CE-ESI-TOF]  
CE-ESI-TOF  
[CI-B]  
CI-B  
[EI-B]  
EI-B

No Image

< Back Next > Cancel

- [Instrument Type] で "LC-ESI\_ITFT" を選択します。



一通り設定を終えたら [Next] をクリックします。

Create Wizard

Input instrument information.

Instrument

Vendor \* Thermo Fisher Scientific

Instrument Name \* LTQ Orbitrap XL

Instrument Type \* LC-ESI-ITFT

Select or input the instrument type. This value is set as ACQ#INSTRUMENT\_TYPE item in MassBank record.

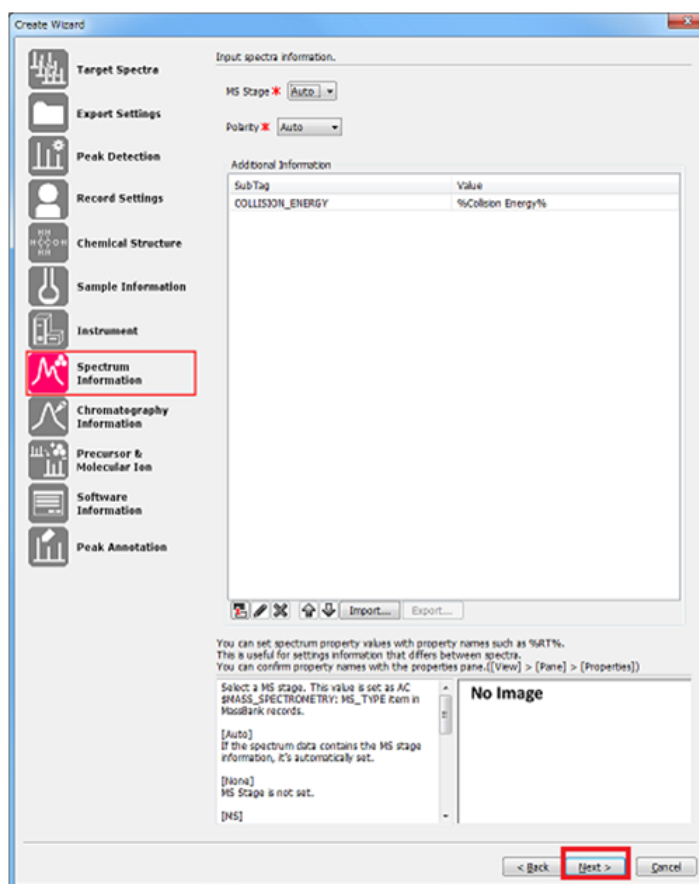
- [CE-ESI-TOF]
- CE-ESI-TOF
- [CI-B]
- CI-B
- [ESI-B]
- ESI-B

No Image

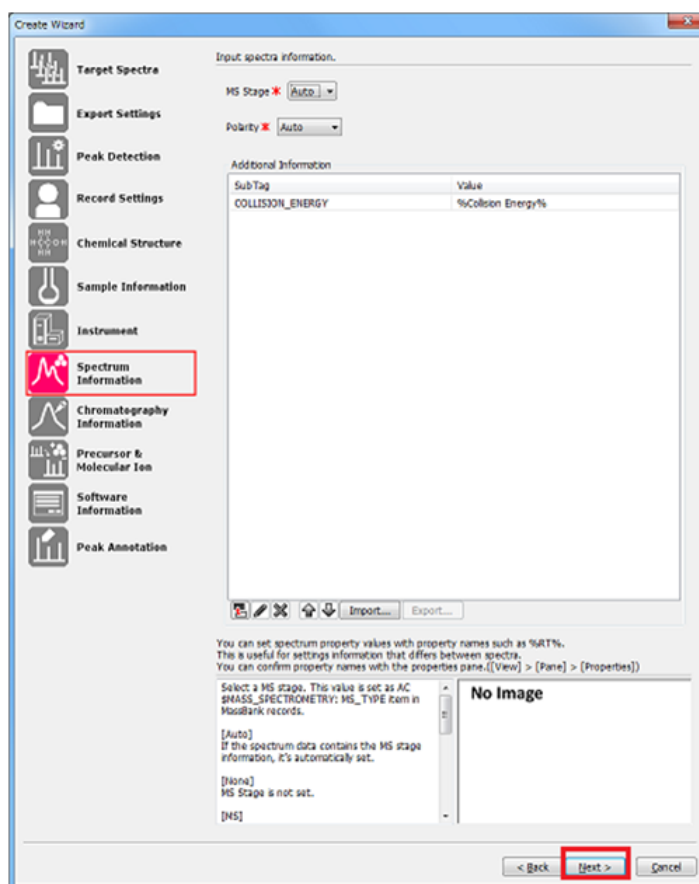
< Back Next > Cancel

Note: [Vendor] と [Instrument Name] については、スペクトル・データのメタデータから自動で情報を抽出しています。但し、機種の種類は多数存在するため、必ず正しい名称がセットされている保証はありません。確認して下さい。

[Spectrum Information] ページではスペクトル情報をセットします。

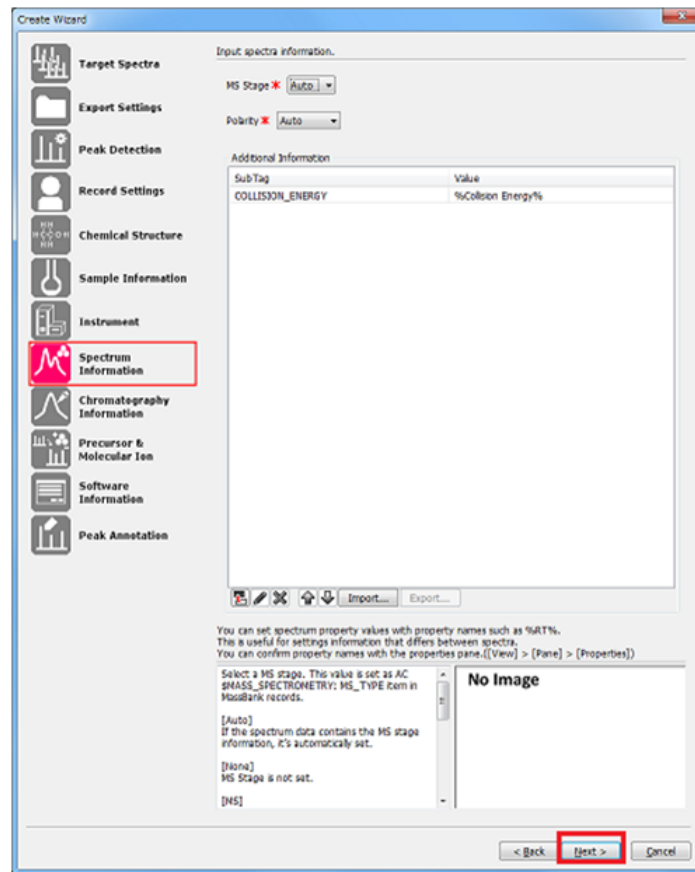


[MS Stage] でスペクトルのイオンの世代を、[Polarity] でイオン極性（イオンモード）を選択します。これら2つは必須入力ですが、[Auto] を選択することによって、スペクトル・データのメタデータから自動で情報を抽出します。

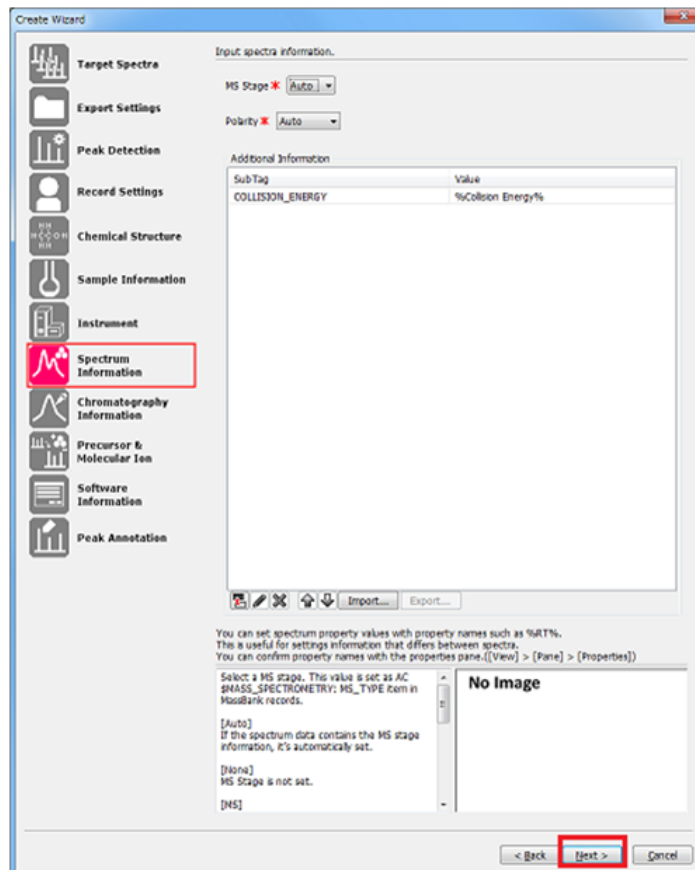


[Additional Information] ではそれ以外の追加情報を入力します。“COLLISION\_ENERGY”情報は、自動でメタデータから抽出・追加されています。

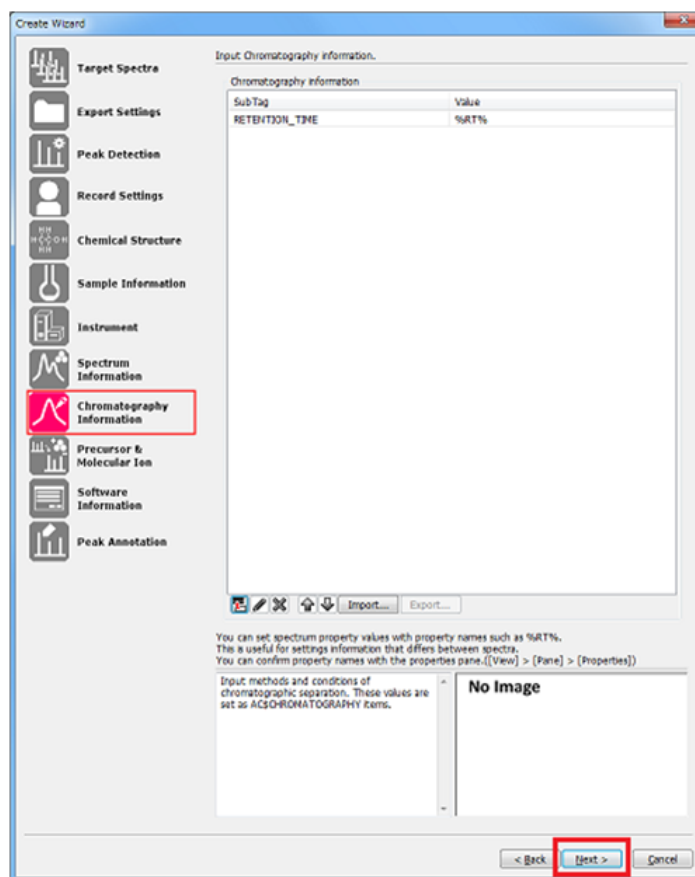




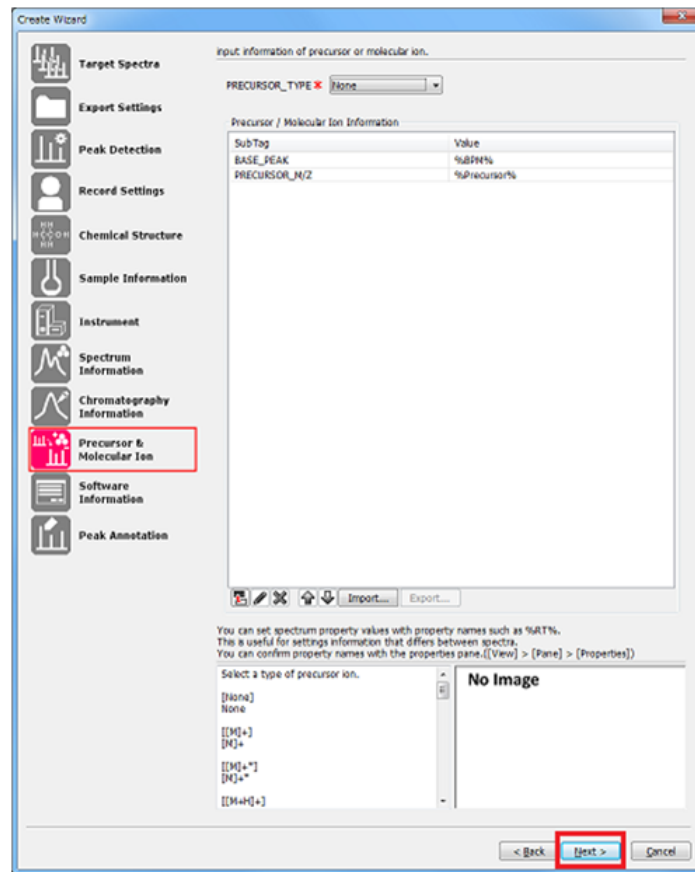
ここでは自動入力済みの値のまま、[Next] をクリックします。



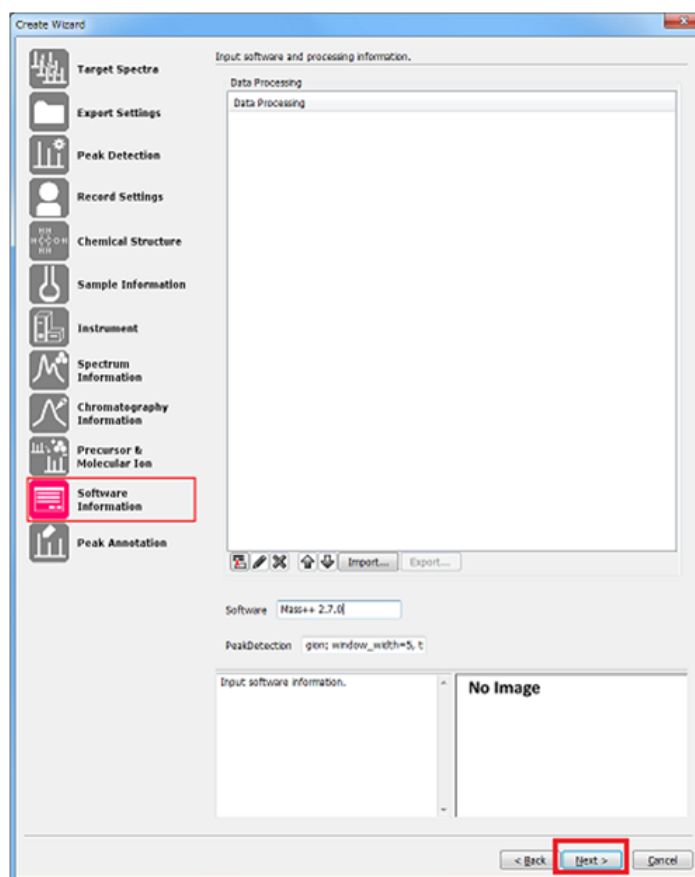
[Chromatogram Information] ページではクロマトグラム情報をセットします。ここでは自動入力済みの値のまま、 [Next] をクリックします。



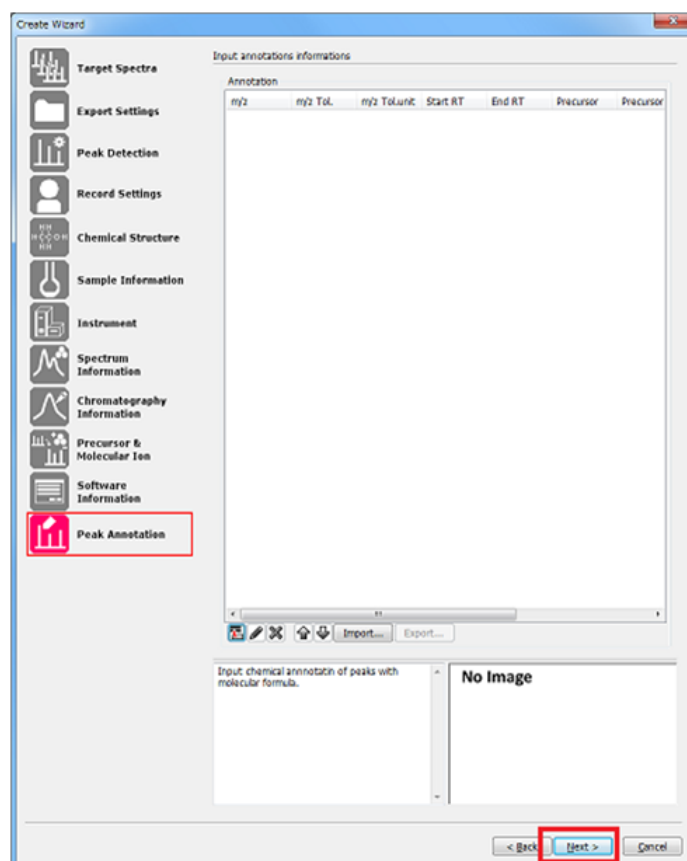
[Precursor > Molecular Ions] ページではイオンに関する情報を入力します。[PRECURSOR\_TYPE] ではプリカーサイオンのイオン種を選びます。この項目は必須入力です。ここでは自動入力済みの値のまま、 [Next] をクリックします。



[Software Information] ページではソフトウェアに関する情報をセットします。スペクトルからピーク抽出を行う前に何らかの処理を行った場合は、[Data Processing] に入力します。[Software] にはMass++の名前・バージョン名が、[PeakDetection] には [Peak Detection] ページで設定したパラメータが、最初から入力されています。書き換える必要がある場合には直接編集します。ここでは特に編集せず、[Next] をクリックします。



[Peak Annotation] ページではピークのアノテーション情報をセットします。ここでは何も入力せずに、[Next] をクリックします。

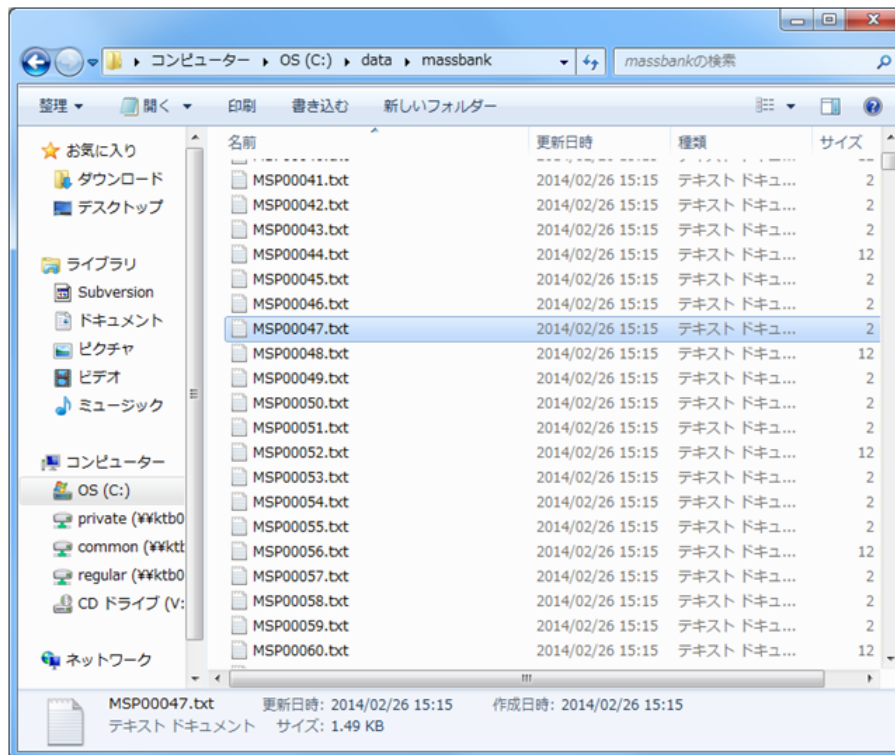


最後の確認ページでは、出力されるレコード一覧が表示されます。画面上部のリストでスペクトルを選択すると、出力されるレコードの情報が表示されます。問題がなければ [Finish] をクリックします。

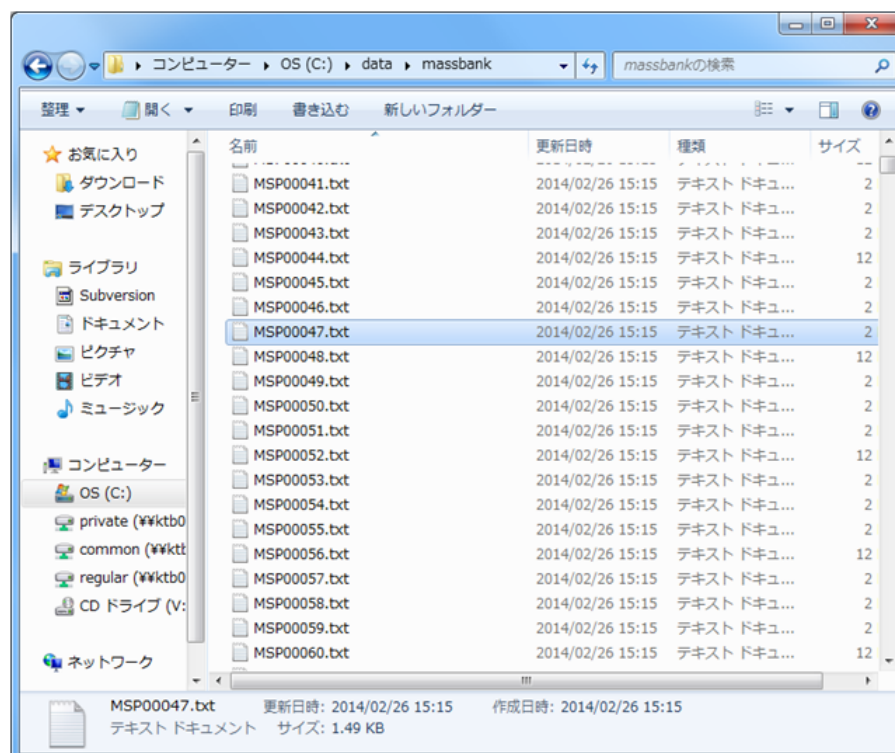
Spectrum	RT	File Name	Stage	Scan Number	Precursor
Scan1	0.002862	Arginine.mib	MS	1	-1.000000
Scan2	0.013300	Arginine.mib	MS2	2	171.149994
Scan3	0.017592	Arginine.mib	MS2	3	391.279999
Scan4	0.022182	Arginine.mib	MS2	4	174.130005
Scan5	0.026468	Arginine.mib	MS	5	-1.000000
Scan6	0.037003	Arginine.mib	MS2	6	171.149994
Scan7	0.041293	Arginine.mib	MS2	7	391.279999
Scan8	0.045870	Arginine.mib	MS2	8	174.130005
Scan9	0.050167	Arginine.mib	MS	9	-1.000000
Scan10	0.060682	Arginine.mib	MS2	10	171.149994
Scan11	0.064965	Arginine.mib	MS2	11	391.279999
Scan12	0.069577	Arginine.mib	MS2	12	174.130005
Scan13	0.073878	Arginine.mib	MS	13	-1.000000
Scan14	0.084390	Arginine.mib	MS2	14	171.149994
Scan15	0.088703	Arginine.mib	MS2	15	391.290009
Scan16	0.093315	Arginine.mib	MS2	16	174.130005
Scan17	0.097590	Arginine.mib	MS	17	-1.000000
Scan18	0.108132	Arginine.mib	MS2	18	171.149994
Scan19	0.115463	Arginine.mib	MS2	19	391.279999

ACCESSION: MS00000  
RECORD\_TITLE: L-Arginine; LC-ESI/IT/TOF; MS; Scan1  
DATE: 2014.02.26  
LXENSE: CC BY  
COMMENT: [Raw Data] Arginine.mib  
CHSNAME: L-Arginine  
CHSCOMPUND\_CLASS:  
CHSNAME: L-Arginine  
CHSFORMULA: C6H14N4O2  
CHSEXACT\_MASS: 174.11167568799999  
CHSMOLE: H=C(N)C(=O)N[C@@H](C(=O)N)C(N)=O  
CHSPAC: 1=CH=1S/OGH14N4O2/c7-4[S(1)1]12[2]-1-3-10-6  
ACQSTRUMENT: LTQ Orbitrap XL thermo  
ACQSTRUMENT\_TYPE: LC-ESI/IT/TOF  
ACQSTRUMENT\_TYPE: MS\_TYPER MS  
ACQSTRUMENT\_TYPE: ION\_MODE POSITIVE  
ACQSTRUMENT\_TYPE: COLLISION\_ENERGY  
ACQSTRUMENT\_TYPE: RETENTION\_TIME 0.002862  
MSFORUSED\_ION: BASE\_PEAK 171.149170  
MSFORUSED\_ION: PRECURSOR\_M/Z  
MSDATA\_PROCESSING: FID\_PEAK\_999; window\_width=  
MSDATA\_PROCESSING: WHOLE\_Mass++ 2.7.0  
PKSNUM: 385  
PKSPEAK: m/z INT. REL%

マウスカーソルが「待ち状態」表示になり、暫く待つと MassBank レコードが作成されます。MassBank レコードは、(Accession 名).txt という名前のテキストファイルで出力されます。



[Export Settings] ページで指定したフォルダを開き、レコードが作成されている事を確認します。以後の作業は、MassBank付属の「レコード編集ツール」とwebブラウザ経由での「管理者用ツール」を用いて続行します。MassBankマニュアルを参照してください。



Note: この「MassBankレコードファイル作成機能」は、MassBank開発グループと連携して開発していますが、MassBank「レコード編集ツール」に完全に代わるものではありません。MassBankへの登録の際には、複数のファイルをzipで固めますが、この作業はレコード編集ツールで行います。

Note: したがって、投稿用のMassBankスペクトル・レコードを作成するためには、Mass+での作業後、生成したファイルを改めて“レコード編集ツール”で開いてデータを確認し、必要ならば作業を続行した上で、最終的な登録用ファイルを完成する必要があります。