

修飾の定義方法 (mod_file)

Mascot 検索におけるアミノ酸の修飾 (Mascot 検索設定画面の **Fixed modifications** および **Variable modifications** リストに表示される修飾名に対応) は mod_file ファイルの中で定義されています。mod_file ファイルはテキストで構成されており、次の書式にしたがって既存の修飾の定義内容を変更したり、新規の修飾を追加することができます。

■ mod_file ファイルの存在場所 ■

C:\inetpub\wwwroot\mascot\config フォルダにあります。

■ 編集方法 ■

テキストエディタを使って mod_file を開き、編集してください。または、[スタート]メニュー → [プログラム] → [Mascot] → [config] → [Mascot modifications file]を選択するとメモ帳で開かれまので、編集してください。

ひとつの修飾の定義は数行で構成され、他の修飾定義の行ブロックとはアスタリスク (*) で区切ります。

```
Title:Acetyl (K)
Residues:K 170.105528 170.2090
*
Title:Acetyl (N-term)
Nterm:43.018390 43.0446
```

Mascot は次の3つのクラスの修飾定義をサポートしています。

■ クラス 1 - Residues ■

指定したアミノ酸残基に対して修飾を付与する場合に対応します。

アスパラギン酸残基 (D) とグルタミン酸残基 (E) に対するメチルエステル化 (-O-H → -O-CH₃、アスパラギン酸残基(115) $-1 + 15 = 129$ / グルタミン酸残基 (129) $-1 + 15 = 143$) の定義例を示します。

```
Title:Methyl ester (DE)
Residues:E 143.05825 143.142
Residues:D 129.04260 129.115
```

1 行目 : Title

タイトル行です。Title キーワードの後に文字列 **Methyl ester (DE)** が続きます。この文字列は Mascot 検索設定画面の **Fixed modifications** および **Variable modifications** リストおよび Mascot 検索結果の中で表示されます。短くかつ意味が把握できる文字列を定義してください。括弧内の文字は英数文字 (alphanumeric character) およびスペースに限られます。また、文字と文字の間のスペースは意味を持ちます (保持されます)。

2 行目 : Residues

残基定義行です。Residues キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ・ 1 文字表記のアミノ酸コード E
- ・ スペース " "
- ・ 修飾されたグルタミン酸 (E) 残基のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) 143.05825
- ・ スペース " "
- ・ 修飾されたグルタミン酸 (E) 残基の平均質量 (Average mass) 143.142

3 行目 : Residues

2 行目と同様です。

■ クラス 2 (ペプチド) - Nterm / Cterm ■

ペプチドの C 末端または N 末端に対して修飾を付与する場合に対応します。

ペプチドの C 末端に対するメチルエステル化 ($\sim\text{HN-R-CO-} \rightarrow \sim\text{HN-R-CO-O-CH}_3$, +31) の定義例を示します。

Title:Methyl ester (C-Term)

Cterm:31.01839 31.03422

1 行目 : Title

タイトル行です。Title キーワードの後に文字列 **Methyl ester (C-Term)** が続きます。この文字列は Mascot 検索設定画面の **Fixed modifications** および **Variable modifications** リストおよび Mascot 検索結果の中で表示されます。短くかつ意味が把握できる文字列を定義してください。括弧内の文字は英数文字 (alphanumeric character) に限られます。また、文字と文字の間のスペースは意味を持ちます (保持されます)。

2 行目 : Cterm

末端定義行です。Cterm (または Nterm) キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ・ メチルエステル基のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) 31.01839
- ・ スペース " "
- ・ メチルエステル基の平均質量 (Average mass) 31.03422

■ クラス2 (タンパク質) - ProteinNterm / ProteinCterm ■

タンパク質 (intact protein) の C 末端または N 末端に対して修飾を付与する場合に対応します。

タンパク質の N 末端に対するホルミル化 (-NH-CR-CO~ → HCO-NH-CR-CO~, +29) の定義例を示します。

Title:N-Formyl (Protein)

ProteinNterm:29.002740 29.0180

1 行目 : Title

タイトル行です。Title キーワードの後に文字列 N-Formyl (Protein) が続きます。この文字列は Mascot 検索設定画面の Fixed modifications および Variable modifications リストおよび Mascot 検索結果の中で表示されます。短くかつ意味が把握できる文字列を定義してください。括弧内の文字は英数文字 (alphanumeric character) に限られます。また、文字と文字の間のスペースは意味を持ちます (保持されます)。

2 行目 : ProteinNterm

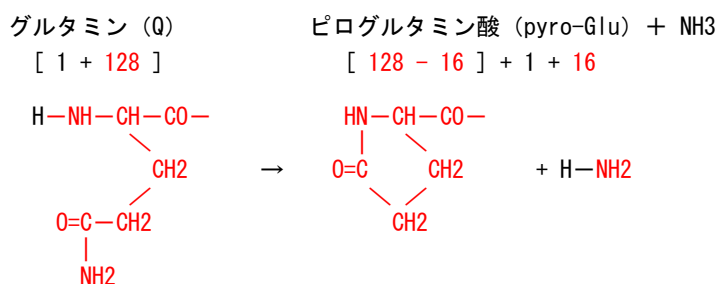
末端定義行です。ProteinNterm (または ProteinCterm) キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ホルミル基のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) 29.002740
- スペース " "
- ホルミル基の平均質量 (Average mass) 29.0180

■ クラス3 - ResiduesNterm / ResiduesCterm ■

指定した末端アミノ酸残基の C 末端または N 末端に対して修飾を付与する場合に対応します。

タンパク質の N 末端グルタミン (Q) 残基が環化されて Pyro-Glutamine になる場合 (NH₂ 相当分の消滅, -16) の定義例を示します。



Title:Pyro-glu (N-term Q)

ResiduesNterm:Q -16.01872 -16.023

1 行目 : Title

タイトル行です。Title キーワードの後に文字列 Pyro-glu (N-term Q) が続きます。この文字列は Mascot 検索設定画面の Fixed modifications および Variable modifications リストおよび Mascot 検索結果の中で表示されます。短くかつ意味が把握できる文字列を定義してください。括弧内の文字は英数文字 (alphanumeric

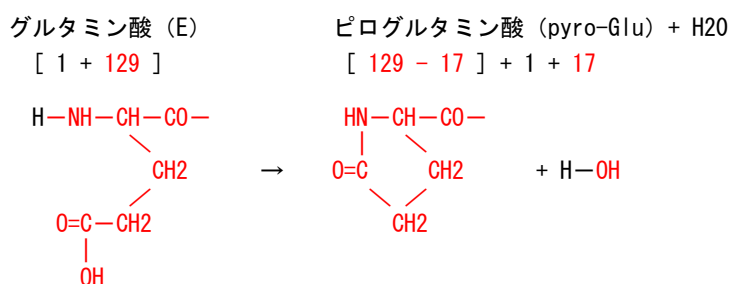
character) に限られます。また、文字と文字の間のスペースは意味を持ちます (保持されます)。

2行目 : ResiduesNterm

末端定義行です。ResiduesNterm (または ResiduesCterm) キーワードの後に次の文字列が続きます。

- 1文字表記のアミノ酸コード Q
- NH2分のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) -16.01872
- スペース " "
- NH2分の平均質量 (Average mass) -16.023

なお、クラス3では末端定義行にはひとつの残基のみを定義することができます。従いまして、N末端グルタミン酸 (E) 残基が環化されて Pyro-Glutamine になる場合 (OH相当分の消滅, -17) も考慮したい場合は独立に定義する必要があります。



Title:Pyro-glu (N-term E)
ResiduesNterm:Q -17.002740 -17.0074

別の例として、N末端グリシン残基 (G) のミリストイル化 (myristoylation) の例を示します。



Title:Myristoylaton (N-term Q)
ResiduesNterm:G 211.206191 211.3635

■ 定義した修飾を検索設定画面に表示させたくない場合 ■

定義した修飾を Mascot 検索設定画面の Fixed modifications および Variable modifications リストに表示させたくない場合は、次の例のように、Title キーワード行の次の行に Hidden を追加してください。

Title:Pyridyl (K)
Hidden
Residues:K 247.13208 247.29880

■ ニュートラルロス ■

フラグメンテーションの際に修飾がニュートラルロスを引き起こす場合は、**NeutralLoss** キーワードを使って指定することができます。

リン酸化されたセリン (S)、スレオニン (T) を含むフラグメントイオンがニュートラルロス (脱リン酸 H3P04、98) を引き起こす場合の定義例を示します。

```
Title:Phospho (ST)
Residues:S 166.998359 167.0572
Residues:T 181.014010 181.0838
NeutralLoss:97.976896 97.9952
```

1 行目 : Title

タイトル行です。Title キーワードの後に文字列 **Phospho (ST)** が続きます。この文字列は Mascot 検索設定画面の **Fixed modifications** および **Variable modifications** リストおよび Mascot 検索結果の中で表示されます。短くかつ意味が把握できる文字列を定義してください。括弧内の文字は英数文字 (alphanumeric character) に限られます。また、文字と文字の間のスペースは意味を持ちます (保持されます)。

2 行目 : Residues

残基定義行です。Residues キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ・ 1 文字表記のアミノ酸コード **S**
- ・ リン酸化されたセリン残基のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) **166.998359**
- ・ スペース " "
- ・ リン酸化されたセリン残基の平均質量 (Average mass) **167.0572**

3 行目 : Residues

2 行目と同様です。

4 行目 : NeutralLoss

脱リン酸 H3P04 の定義行です。NeutralLoss キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ・ 脱リン酸 H3P04 のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) **97.976896**
- ・ スペース " "
- ・ 脱リン酸 H3P04 の平均質量 (Average mass) **97.9952**

希に複数のニュートラルロスを同時に引き起こす場合があります。リン酸化の例がよく知られていますが、ニュートラルロスを引き起こさない場合と、80 Da (HP03) あるいは 98 Da (H3P04) のニュートラルロス引き起こす場合とが同時に生じることがあります。たとえば、0 Da と 98 Da のニュートラルロスが同時に起こりうる場合の設定は次のようになります。

```
Title:Phospho (STY)
Residues:S 166.998359 167.0572
Residues:T 181.014010 181.0838
```

```
Residues:Y 243.029660 243.1532
NeutralLoss:97.976896 97.9952 0
NeutralLoss:0 0 0
```

5行目と6行目の **NeutralLoss** 行の3番目の数字 (**0**: master または **1**: slave) を使ってニュートラルロスに起因するピークを Mascot のスコアに加味するかどうかを指定することができます。

5行目 : NeutralLoss

脱リン酸 H3P04 の定義行です。NeutralLoss キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ・脱リン酸 H3P04 のモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) 97.976896
- ・スペース " "
- ・脱リン酸 H3P04 の平均質量 (Average mass) 97.9952
- ・スペース " "
- ・ニュートラルロスに起因するピークをスコアに加味する (master ニュートラルロス) 0

6行目 : NeutralLoss

ニュートラルロスを引き起こさないこと (すなわちニュートラルロス "0") の定義行です。NeutralLoss キーワードの後に次の文字列が続きます。

- ・モノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) 0
- ・スペース " "
- ・平均質量 (Average mass) 0
- ・スペース " "
- ・ニュートラルロスに起因するピークをスコアに加味する (master ニュートラルロス) 0

なお、NeutralLoss 行の3番目の数字 (master=0 または slave=1) はオプションです。このオプションが存在しない場合は 0 と見なされます (すなわち指定したニュートラルロスに起因するピークは Mascot スコアに加味されます)。

Mascot は master ニュートラルロスに起因するピーク群の組合せの中で最もスコアの高い結果を表示します。もし slave ニュートラルロスに起因するピークが存在する場合はそれらのピークはノイズのピークリストからは除外され、その分 Mascot スコアは相対的に高くなります。次の Mascot 検索例は、

- (1) 修飾設定なし
- (2) Phospho (STY) + 0 Da master + 98 Da master
- (3) Phospho (STY) + 0 Da master + 98 Da slave

の例です。

[質量データ (MS/MS ピークリスト)]

```
# Enzyme          : Lys-C/P
# Modification    : Phospho (STY)
# Peptide Tol = 50 ppm, MS/MS tol = 0.3 Da
# Instrument       : ESI-QUAD-TOF
```

```
# PROTEIN KINASE ELM1 (EC 2.7.1.-), IPTPIK + Phospho (STY)
BEGIN IONS
TITLE=CID Spectrum of a Candidate of Phosphopeptide by Dr. Ken-ichi Yoshino
PEPMASS=748.43
CHARGE=1+
748.43 100
730.05 10
668.11 9
650.45 40
537.36 6
440.31 70
392.72 10
357.27 30
294.19 10
260.20 2
147.12 6
END IONS
```

[Mascot 検索結果]



リン酸化による翻訳後修飾では、98 Da のニュートラルロスによって生じたプロダクトイオンの強いピークが観測された場合は配列中にリン酸化されたセリンあるいはスレオニンの存在が期待されます。逆に、このプロダクトイオンのピークが観測されない場合はチロシンの存在が示唆されます。Mascot ではこれらの現象をサポートするために次の2つのキーワード (PepNeutralLoss、ReqPepNeutralLoss) を使うことができます。

PepNeutralLoss キーワードはニュートラルロスによって生じたピークをノイズのピークリストから除外します。したがって、その分 Mascot スコアは相対的に高くなります。

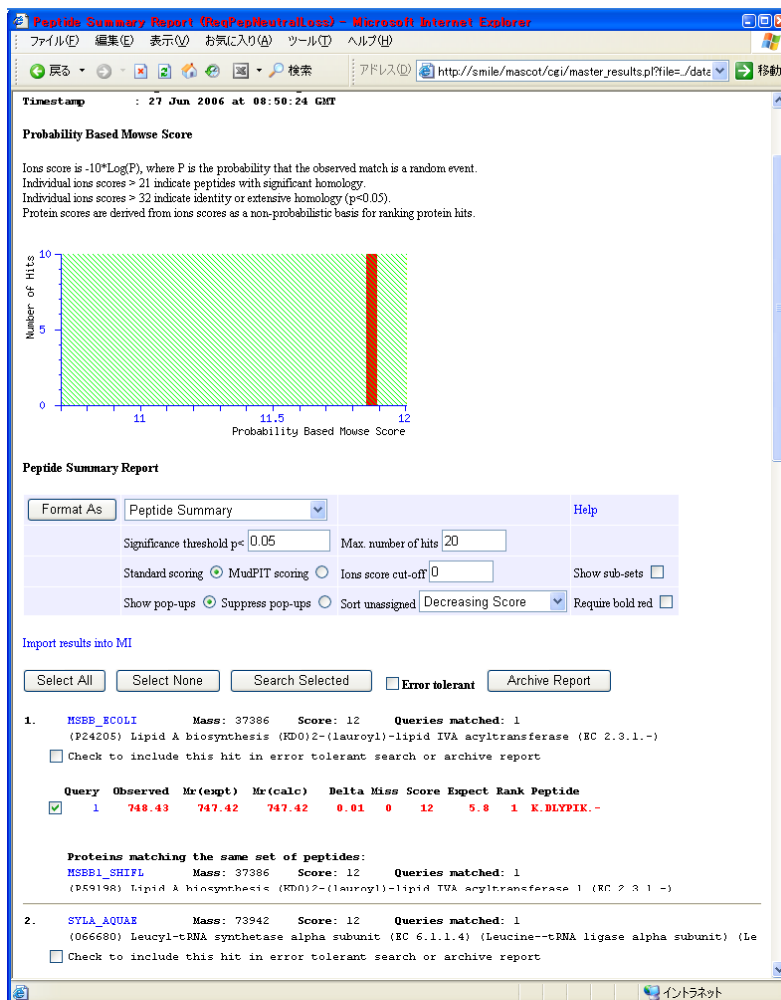
ReqPepNeutralLoss キーワードは **PepNeutralLoss** キーワードと同様の機能を持ちますが、スペクトルの中に

ニュートラルロスによって生じたピークが必ず存在しなければなりません。もしそのピークが存在しない場合はニュートラルロス由来のピークが存在したとしても Mascot スコアには反映されませんので ReqPepNeutralLoss キーワードを使用する際は注意が必要です。ReqPepNeutralLoss キーワードを含む定義例を示します。

Title:Phospho (ST-ReqPepNL)
 Residues:S 166.998359 167.0572
 Residues:T 181.014010 181.0838
 NeutralLoss:97.976896 97.9952 0
 NeutralLoss:0 0 0
 ReqPepNeutralLoss:97.976896 97.9952

また、前に示した質量データからニュートラルロスによって生じた 650.45 のピークを削除した質量データと Variable modifications として上に示した定義例の Phospho (ST-ReqPepNL) を使用した Mascot 検索例を示します。

[Mascot 検索結果]



■ アミノ酸配列に関係しないピーク ■

アミノ酸配列に関係しないピークの出現が予想される場合は、`Ignore` キーワードを使ってそれらを見逃すように定義することができます。

```
Title:ICAT_light
Hidden
Residues:C 545.23419 545.71100
NeutralLoss:345.17224 345.45600
Ignore:227.08543 227.30070
Ignore:284.14328 284.39570
Ignore:328.16950 328.44870
Ignore:403.23791 403.55890
Ignore:477.22055 477.65610
Ignore:501.22055 501.67810
```

■ キーワードのまとめ ■

`mod_file` ファイルの中で使用できるキーワードと書式は次の通りです。

```
Title:string
Hidden
Cterm:mono avg
Nterm:mono avg
ProteinCterm:mono avg
ProteinNterm:mono avg
Residues:X mono avg
ResiduesCterm:X mono avg
ResiduesNterm:X mono avg
NeutralLoss:mono avg flag (0/1)
PepNeutralLoss:mono avg
ReqPepNeutralLoss:mono avg
Ignore:mono avg
```

string は Mascot 検索設定画面の **Fixed modifications** および **Variable modifications** リストおよび Mascot 検索結果の中で表示される識別子 (identifier) です。括弧内の文字は英数文字 (alphanumeric character) に限られます。また、文字と文字の間のスペースは意味を持ちます (保持されます)。

mono はモノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass)、*avg* は平均質量 (Average mass) です。

X は一文字表記の残基名です。

NeutralLoss の *flag* は master=0 、slave=1 のどちらかの値をとります。

Mascot 検索設定画面にある ICAT をチェックすると自動的に ICATHeavy と ICATLight の2つの修飾が有効になります。デフォルトでは ICATHeavy は修飾名 ICAT_heavy に、ICATLight は修飾名 ICAT_light に設定されています。他の ICAT を指定したい場合は、mascot.dat ファイルの Option セクションに次の行を追加してください。

ICATHeavy ICAT_heavy

ICATLight ICAT_light

--- 修飾の定義方法 (mod_file) 説明ここまで

何かお困りのことがありましたら弊社技術サポートにご連絡ください。



マトリックスサイエンス株式会社

電子メール: support-jp@matrixscience.com

電話: 03-5807-7895

ファクシミリ: 03-5807-7896

住所: 〒101-0021 東京都千代田区外神田 6-10-12 KNビル 3階