CLC Genomics Workbench
ハンズオントレーニング
RNA-seq

株式会社CLCバイオジャパン
シニアフィールドバイオインフォマティクスサイエンティスト
宮本真理　Ph.D.
mmiyamoto@clcbio.co.jp

- support@clcbio.co.jp

アジェンダ

- Genomics Workbench 概要
- 今日のデータ
- RNA-seq解析
  - データインポート
  - QC
  - RNA-seq
  - 発現差解析

CLC Genomics Workbench 概要

CLC Genomics Workbench

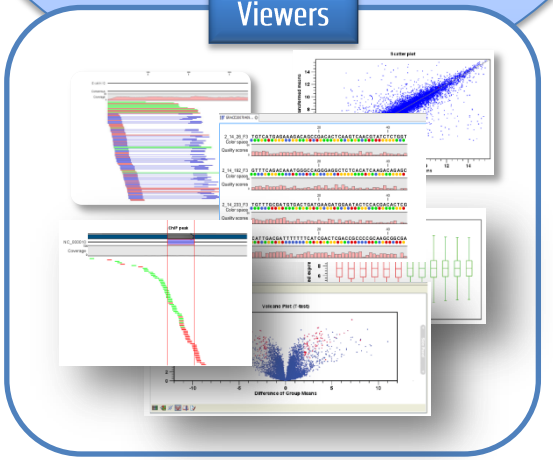
Internet

Download Plug-ins

- Server Plug-in

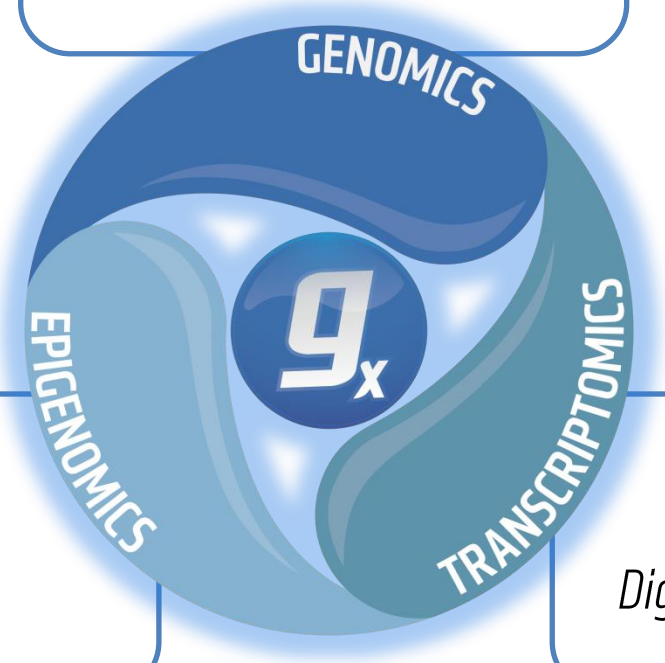
Download Plug-ins

- Transcript Discovery
- Structural Variation
- Transfac
- IPA integration
- BIOBASE integration



CLC Genomics Workbench

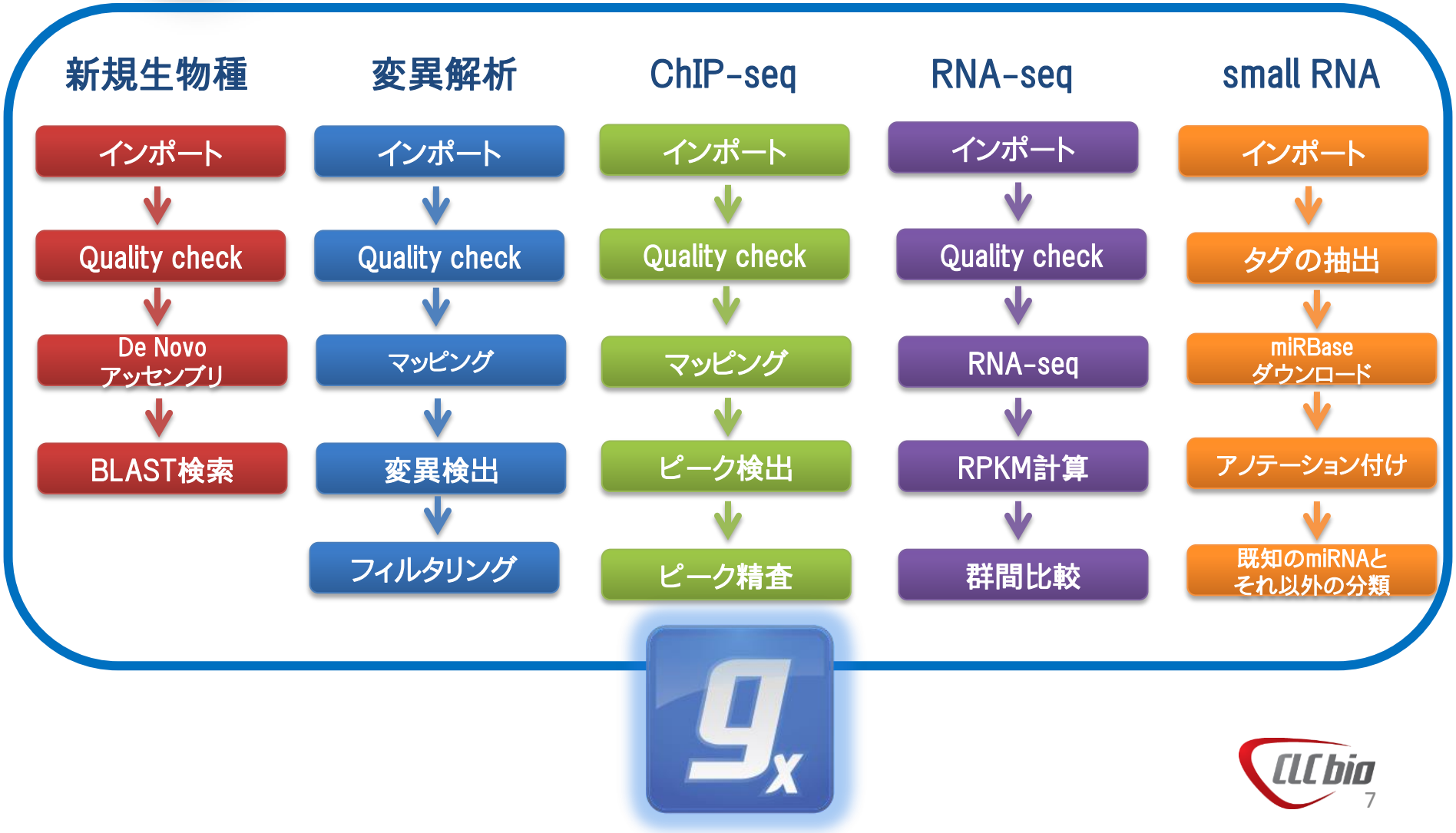
Genomics:
de novo assembly,
SNP detection



Epigenomics:
ChIP-seq,
Peak Finding

Transcriptomics:
RNA-seq,
Digital Expression analysis

解析ワークフロー


新規生物種
インポート
Quality check
De Novo アッセンブリ
BLAST検索
変異解析
インポート
Quality check
マッピング
変異検出
フィルタリング
ChIP-seq
インポート
Quality check
マッピング
ピーク検出
ピーク精査
RNA-seq
インポート
Quality check
RNA-seq
RPKM計算
群間比較
small RNA
インポート
タグの抽出
miRBase ダウンロード
アノテーション付け
既知のmiRNAと それ以外の分類

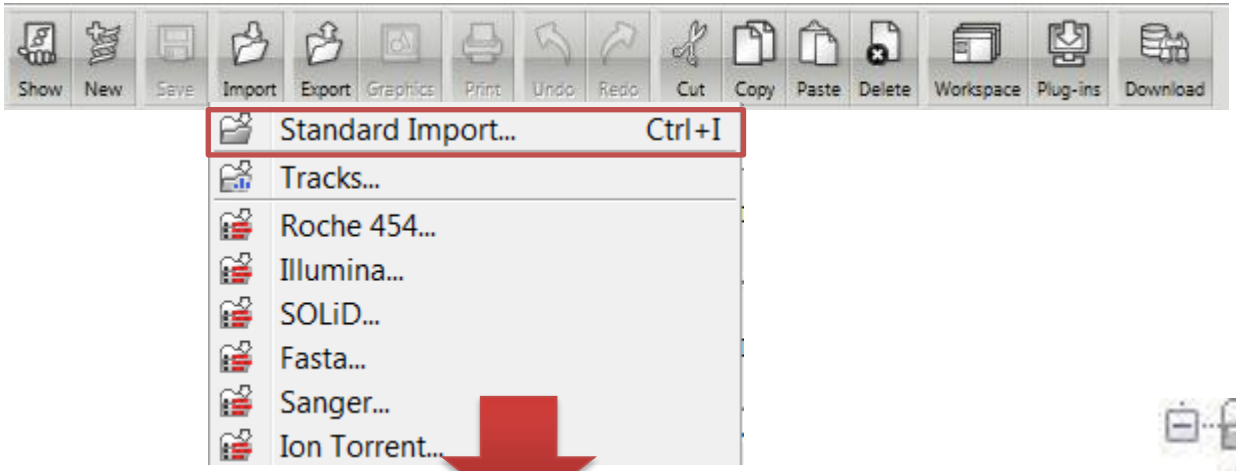
今日のデータ

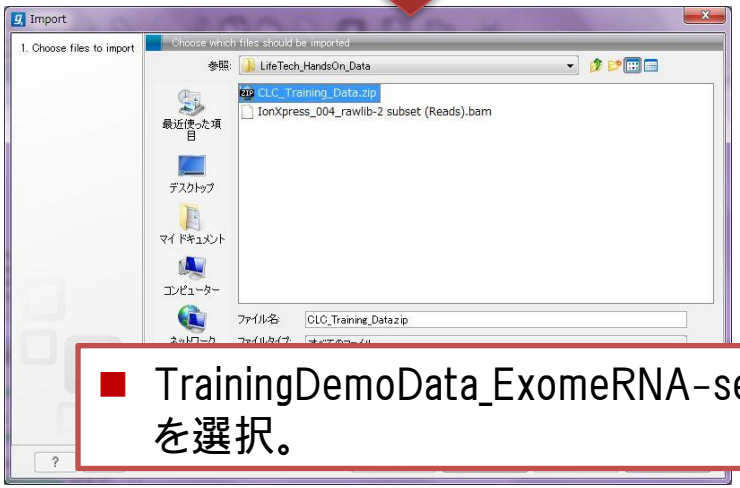
.zip のままGenomics Workbench へインポート

インポートすると変異検出とRNA-seqのデータ

デモデータインポート

- ImportからStandard Import を選択。



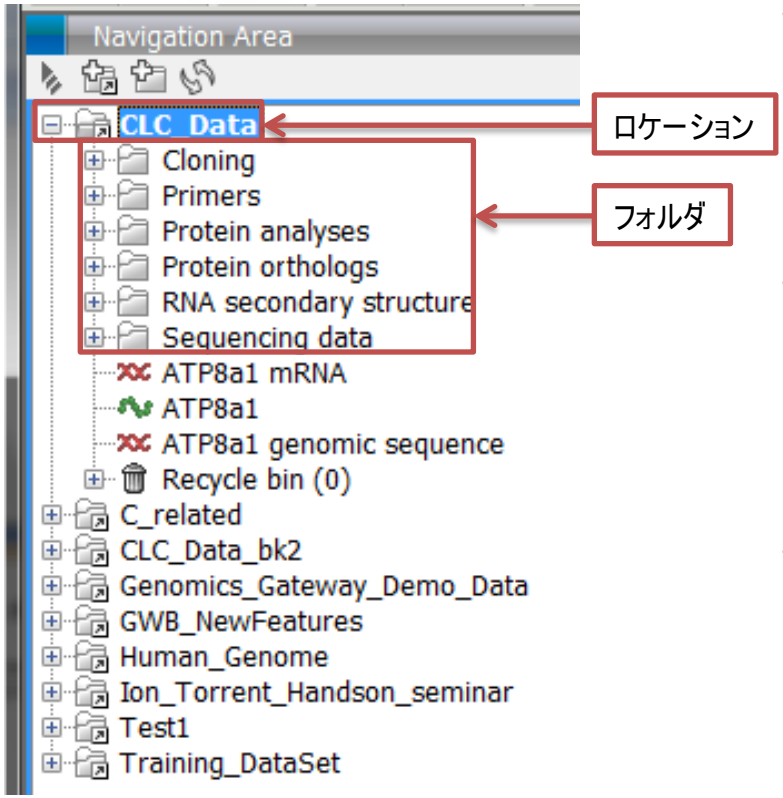


■ TrainingDemoData_ExomeRNA-seq.zip を選択。

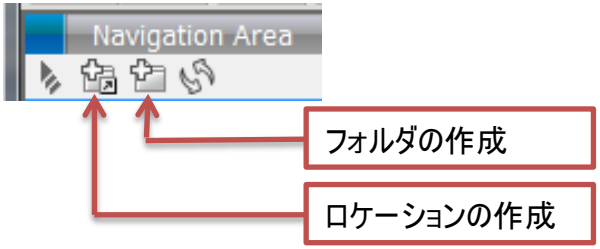
■ TrainingDemoData フォルダが作成

CLC Genomics Workbench 名称と注意事項

LocationとFolder

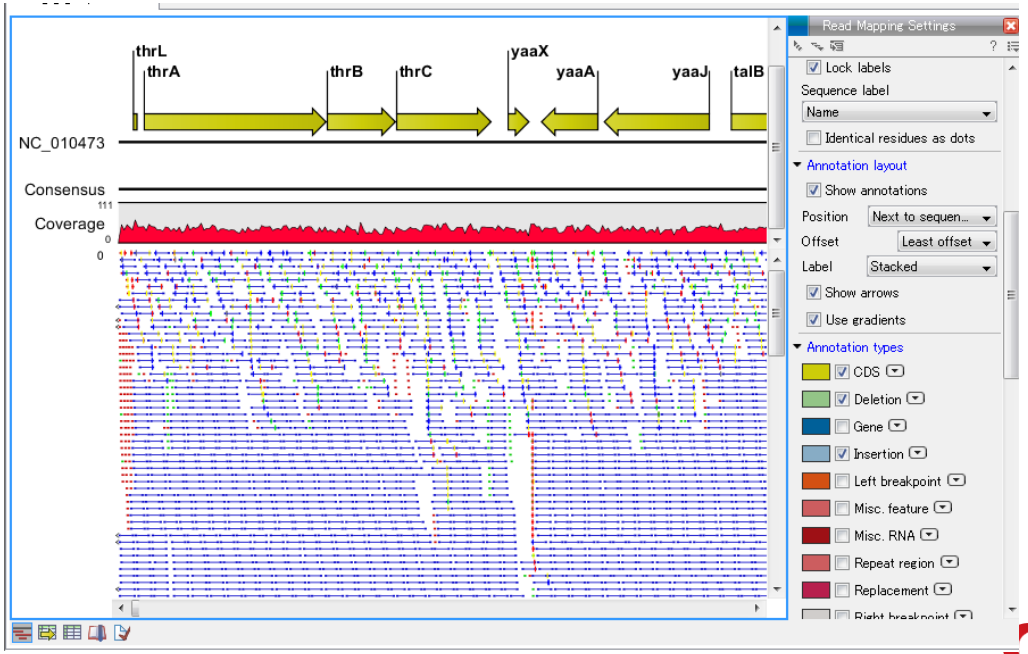


- Genomics Workbenchではデータを以下のような階層構造で保存可能です。フォルダの一番上位の階層を「Location」と呼び、その下の階層を「Folder」と呼びます。
- データの保存場所はロケーション毎に設定可能です。たとえばあるデータはCドライブに保存し、あるデータはDドライブに保存するといった事が可能です。
- ロケーション、フォルダの作成は以下のアイコンから作成できます。



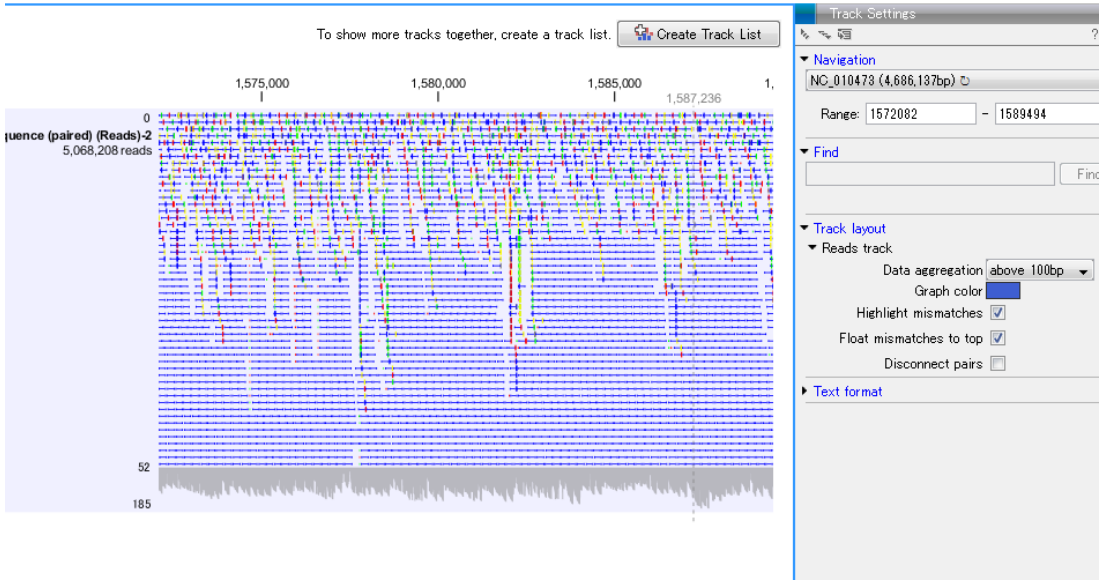
トラックとスタンドアロンフォーマット

- Genomics Workbenchはビューアにスタンドアロンフォーマットとトラックフォーマットがあります。
- スタンドアロンフォーマットでは、1つのデータに配列情報、アノテーションがセットになっています。



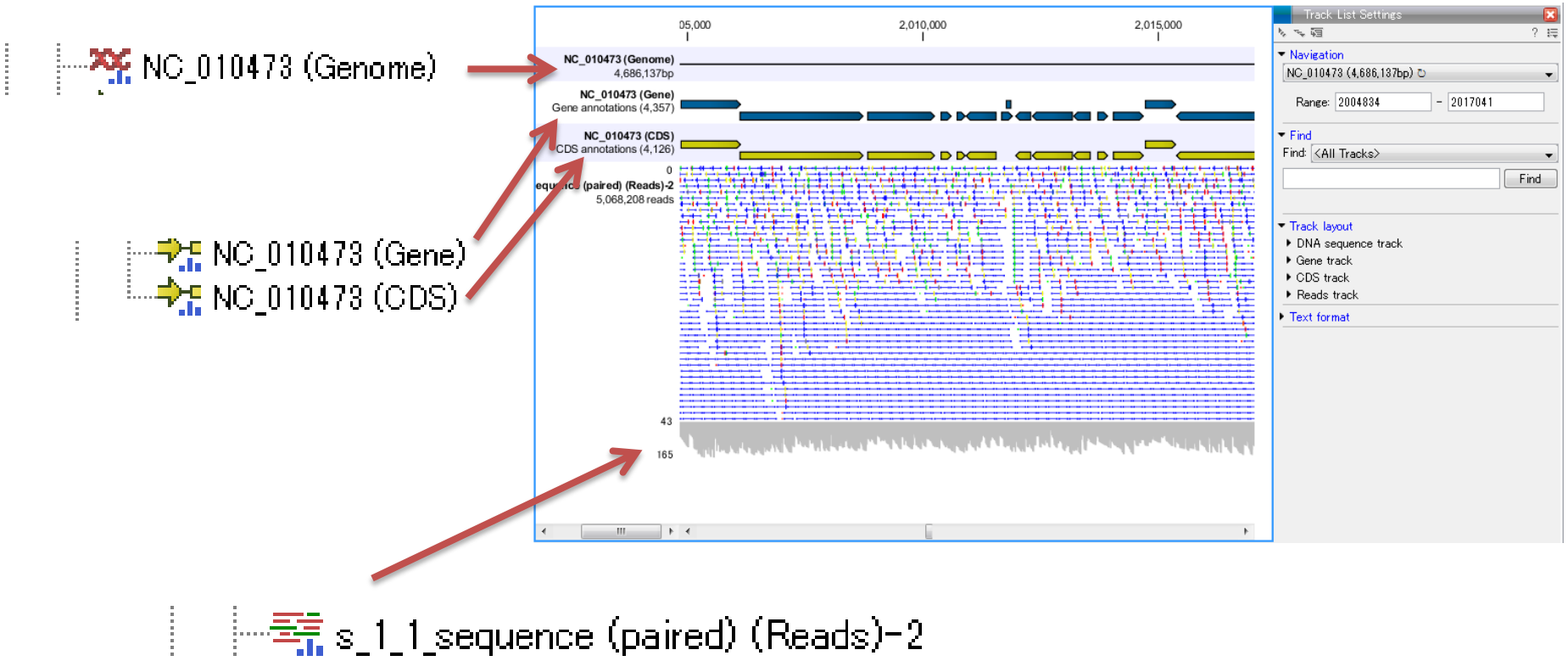
トラックとスタンドアロンフォーマット

- トラックフォーマットでは、リードやゲノム配列、アノテーションがばらばらのファイルになっており、好きに組み合わせて表示が可能です。



トラックとスタンドアロンフォーマット

- 複数のトラックを組み合わせることで好きなビューを作成できます。



トラックとスタンドアロンフォーマット

スタンドアロンフォーマット

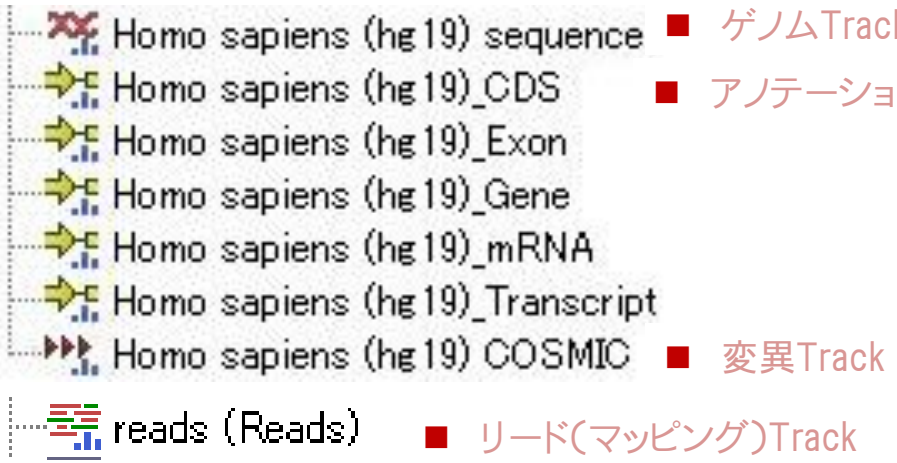
■ 染色体のセットやリード配列など配列のセット

■ 染色体1本など1つの配列

■ リードマッピング

トラックフォーマット

青いヒストグラムが目印



■ ゲノムTrack

■ アノテーションTrack

■ 変異Track

■ リード(マッピング)Track

- 解析によって必要とするフォーマットが異なります。
- スタンドアロン⇔トラックの変換は自由に行えます。

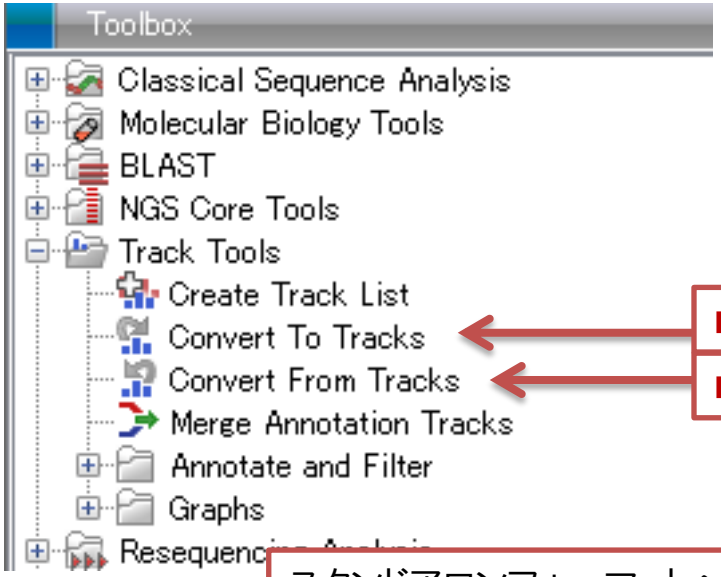
解析によって必要なフォーマット

- 以下に主な解析ツールで必要となるフォーマットをまとめています。解析の際にデータが選べないという場合、必要とするフォーマットに変換されていない場合がありますので、こちらをご参照ください。

解析方法	必要となるフォーマット
マッピング	参照配列はスタンドアロンフォーマット、トラックフォーマットのいずれも可。ただしある領域をマスクしたり、ある領域にのみマッピングさせるような場合、その領域を指定するファイルはトラックフォーマットの必要がある。
ターゲット領域のカバレッジ計算	ターゲット領域はトラックフォーマットの必要がある。
変異検出	変異検出に使うマッピングファイルは、スタンドアロンフォーマット、トラックフォーマットいずれも可。
RNA-seq	参照配列はスタンドアロンフォーマットが必要。またアノテーションとして、GeneとmRNAを含んでいることが必要。トラックから変換する際には、参照配列と、対応するGene, mRNAのアノテーションを選択し、トラックへ変換する必要がある。
ChIP-seq	インプットとなるマッピングファイルはスタンドアロンフォーマットの必要がある。

フォーマットの変換

- トラックフォーマットからスタンドアロンフォーマット、またスタンドアロンフォーマットからトラックフォーマットへはGenomics Workbench の Toolbox > Track tools の中のツールを使って変換可能です。

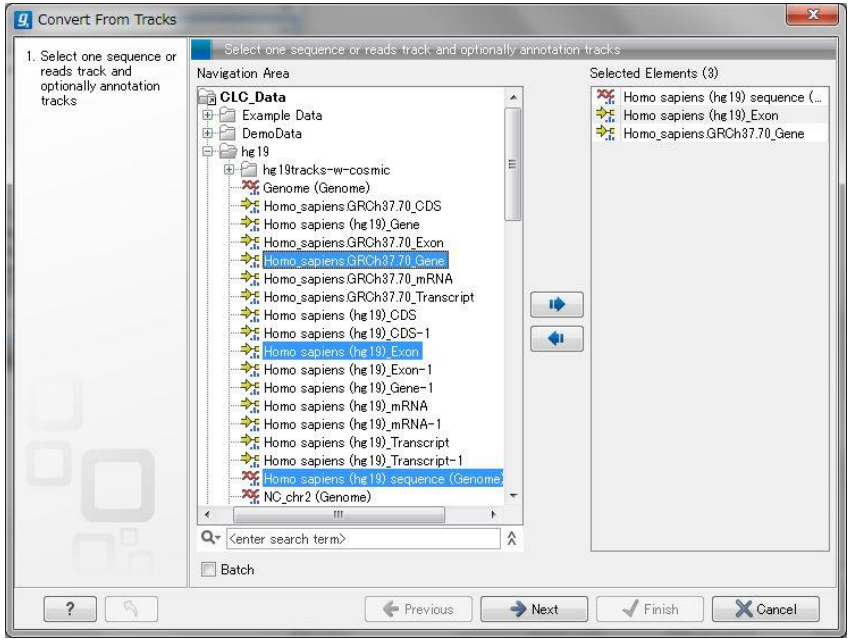


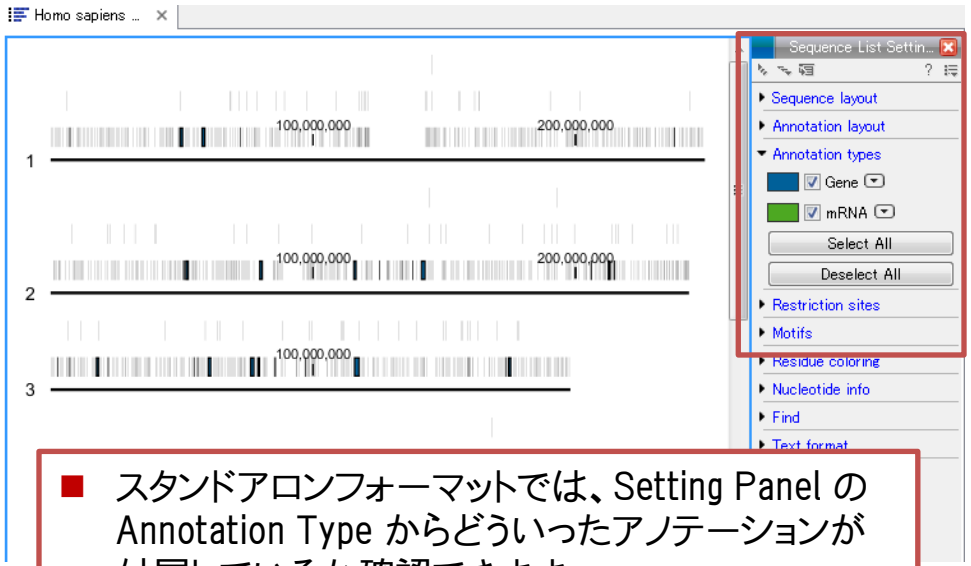
- スタンドアロンフォーマットからトラックへの変換。
- トラックからスタンドアロンフォーマットへの変換。

スタンドアロンフォーマットへ変換する場合、スタンドアロン内に含めるアノテーショントラックを含めて変換するようにしてください。

フォーマットの変換

スタンドアロンフォーマットへ変換する場合、スタンドアロン内に含めるアノテーショントラックを含めて変換するようにしてください。

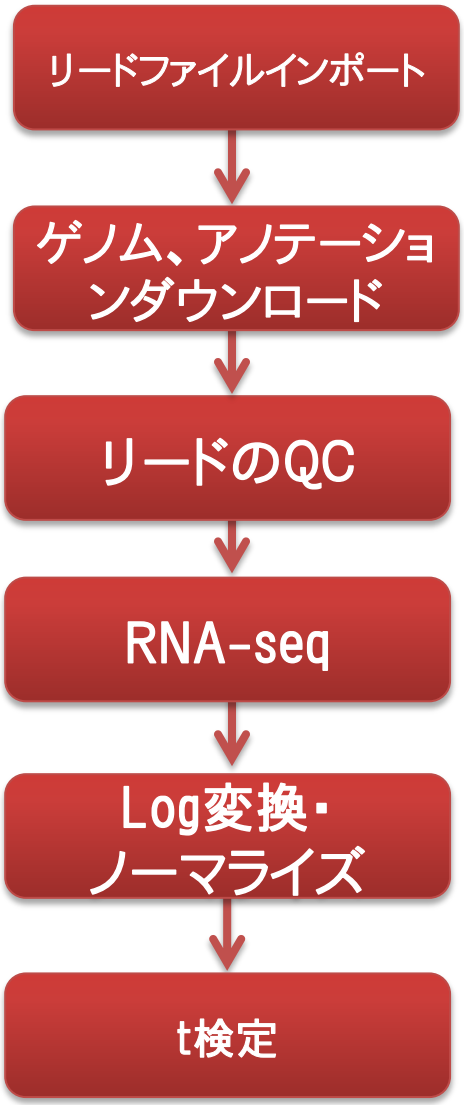




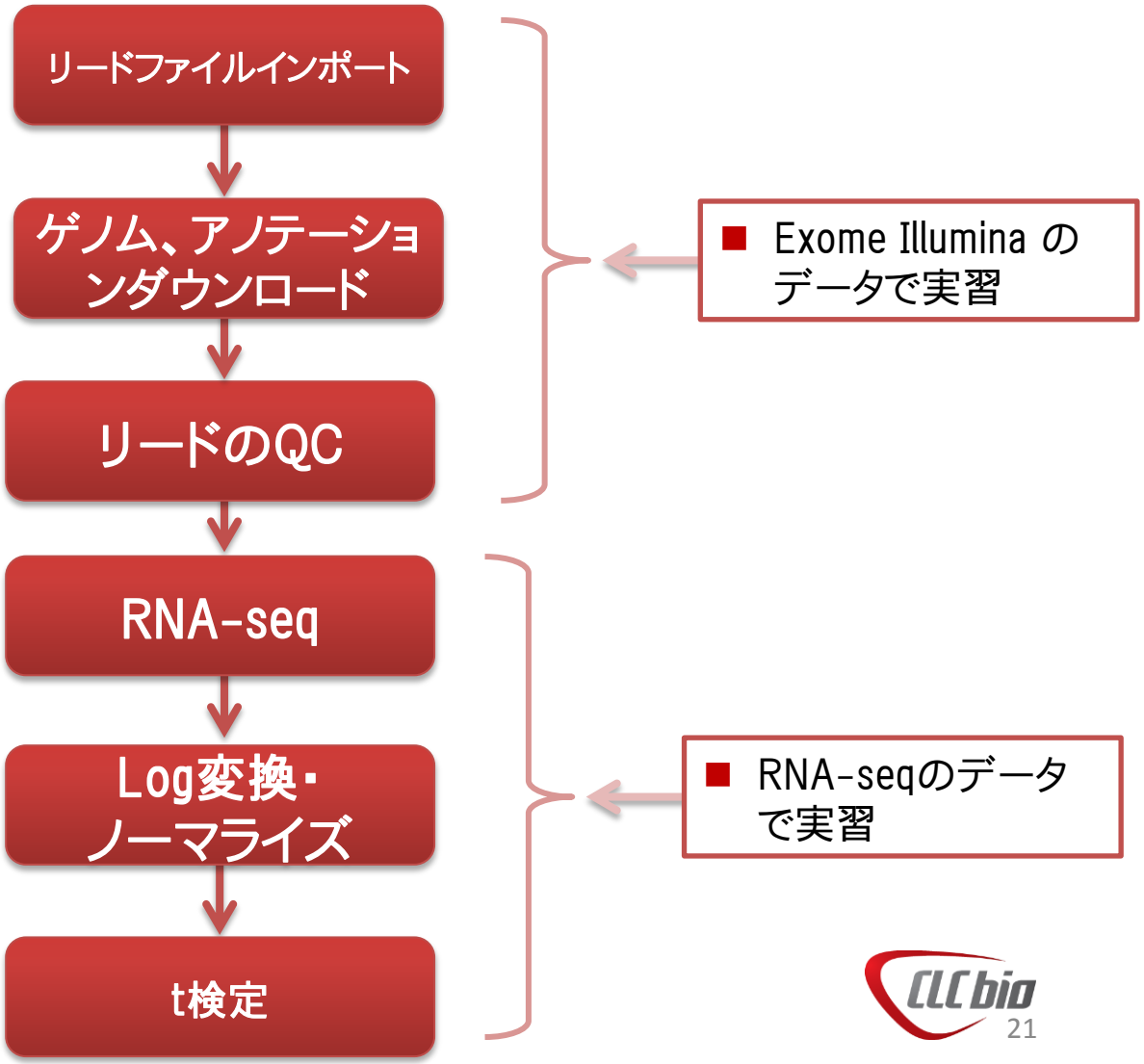
- スタンドアロンフォーマットでは、Setting Panel の Annotation Type からどういったアノテーションが付属しているか確認できます。

RNA-seq 解析

変異検出の流れ

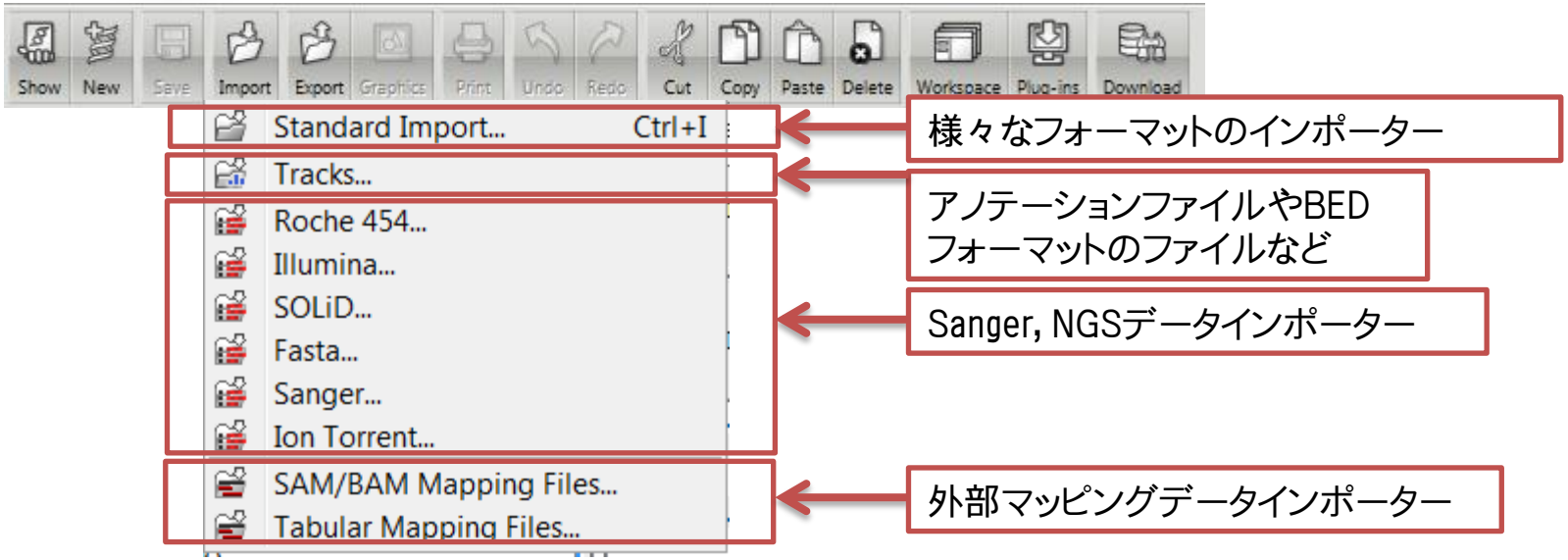

リードファイルインポート
ゲノム、アノテーションダウンロード
リードのQC
RNA-seq
Log変換・ノーマライズ
t検定

変異検出の流れ


リードファイルインポート
ゲノム、アノテーションダウンロード
リードのQC
RNA-seq
Log変換・ノーマライズ
t検定
Exome Illumina のデータで実習
RNA-seqのデータで実習

リード・ゲノム・アノテーションインポート

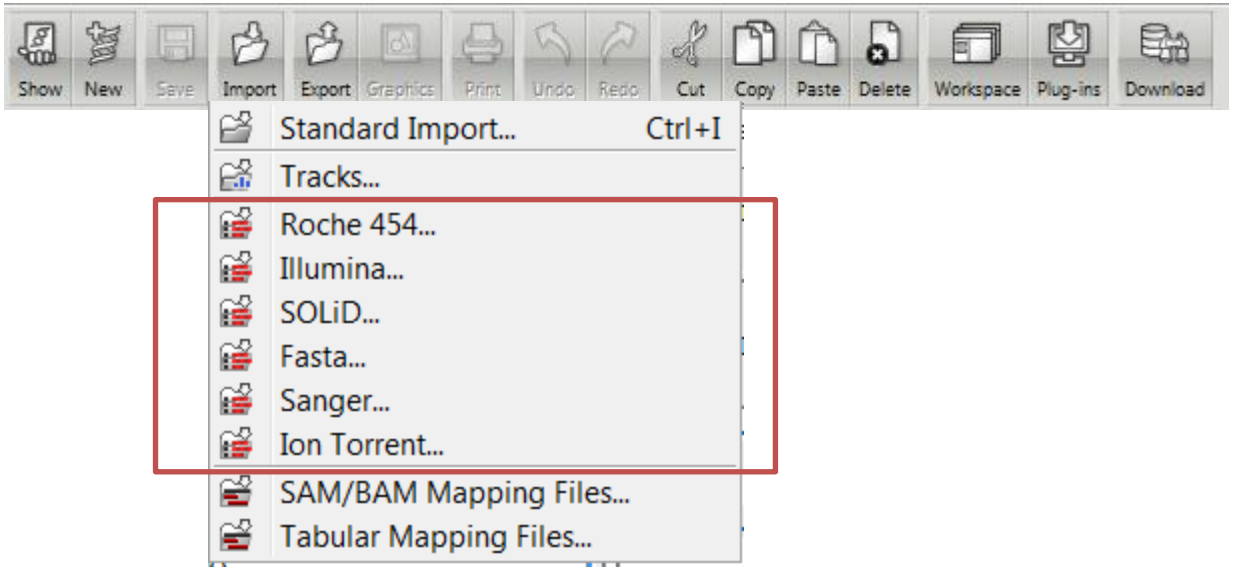
データインポート



- Standard Importは、サンガーシーケンサー、次世代シーケンサー以外のファイルのインポートに利用します。

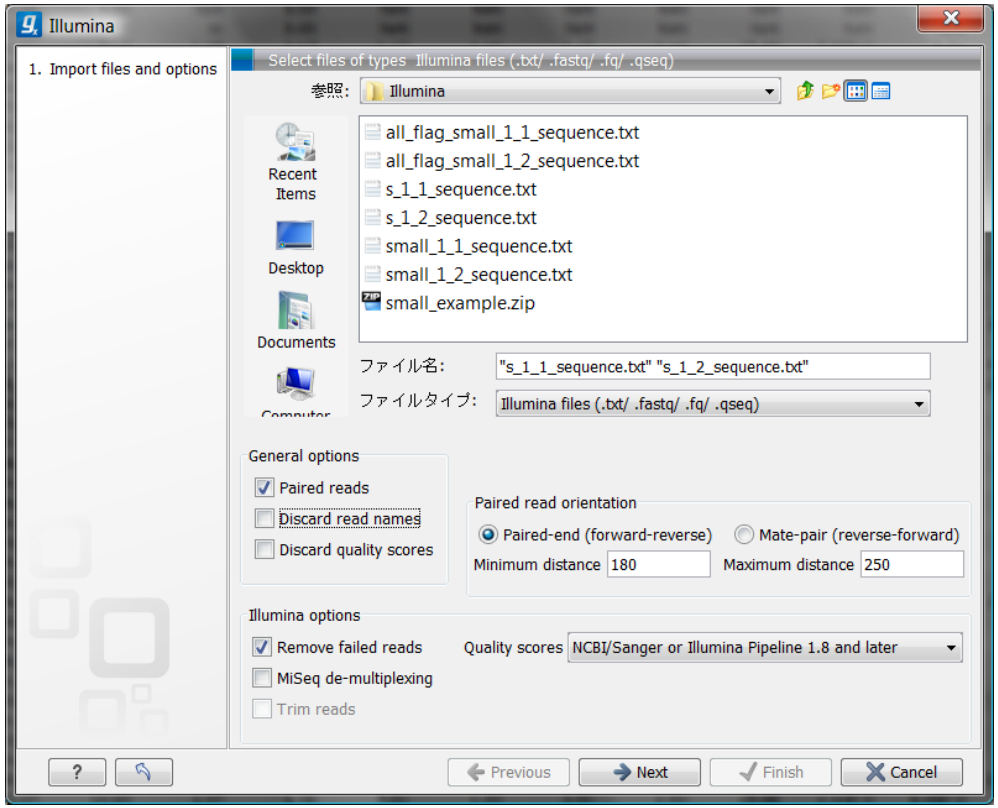
リードデータインポート

- Importからインポートしたいリードのシーケンサータイプを選択。



リードデータインポート

- Illuminaデータのインポート



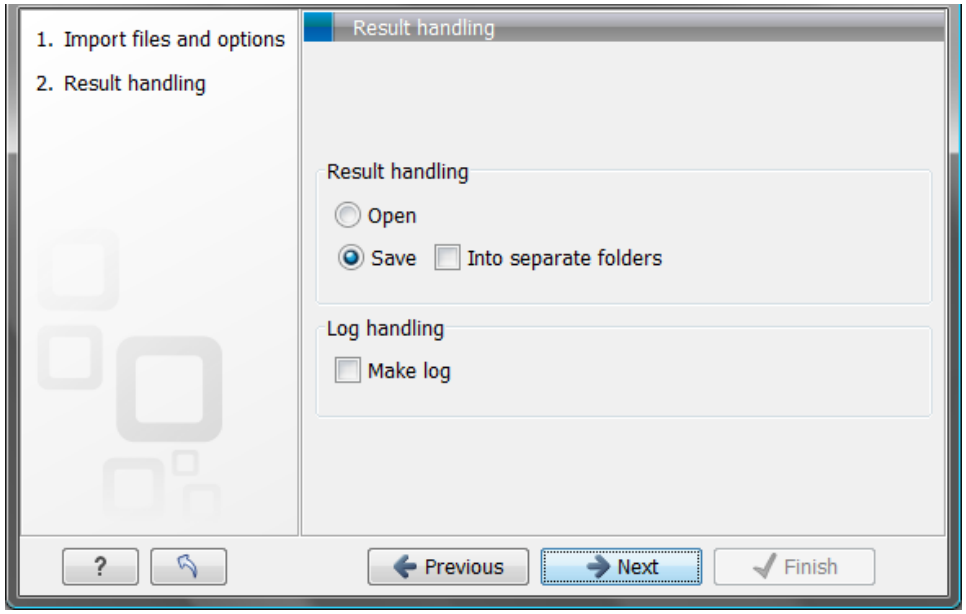
General options

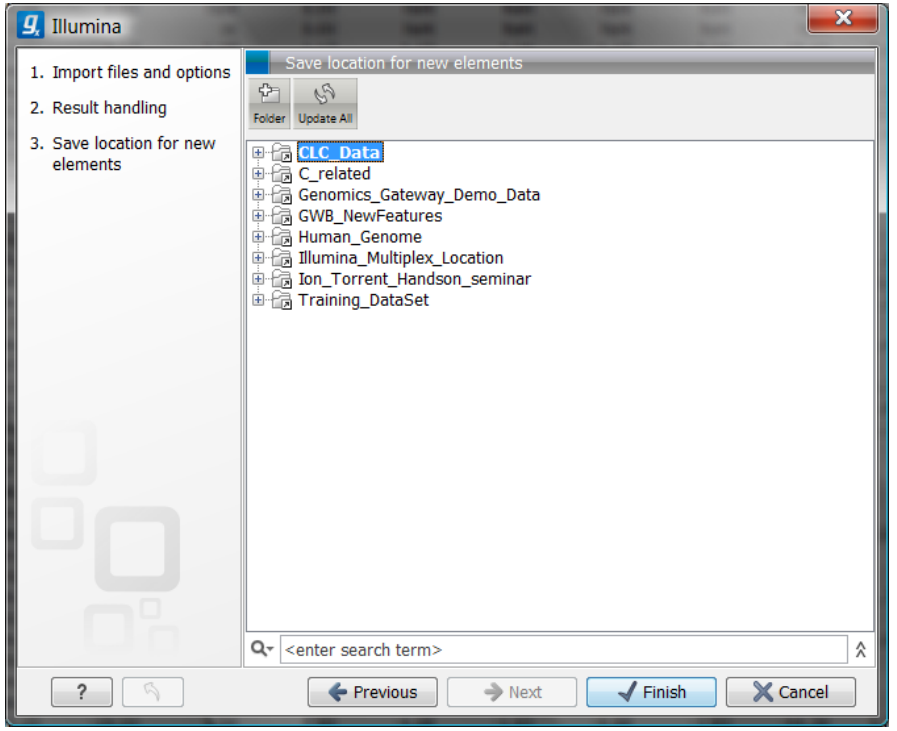
- Paired reads：ペアかどうか。
- Discard reads names：リードについている名前を捨てるかどうか。デフォルトでは捨てるとなっていますが、マッピング後、SAMにてExportした際など、リード名で確認したい場合があるため、最初は保存しておきましょう。
- Discard quality scores：Quality Scoreが必要ない場合はこのオプションにチェック。通常、インポート後にクオリティスコアが必要な事が多いです。
- Paired read orientation：ペアの距離と向きを指定。

Illumina options

- Remove failed reads：シーケンサーでfailとマークされたリードを除去するかどうか。
- Miseq de-multiplexing：Multiplexingされたデータを De-multiplexingするかどうか。
- Quality Score：使用するQuality Scoreのバージョンの選択。

リードデータインポート



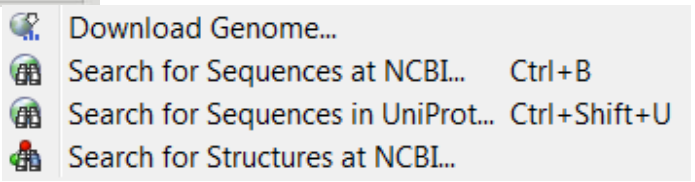


Result handling
- データを開くか、保存の選択
- Into separate folders では、別々のフォルダへ保存するかどうかを選択できます。バッチ処理を行う際に便利です。

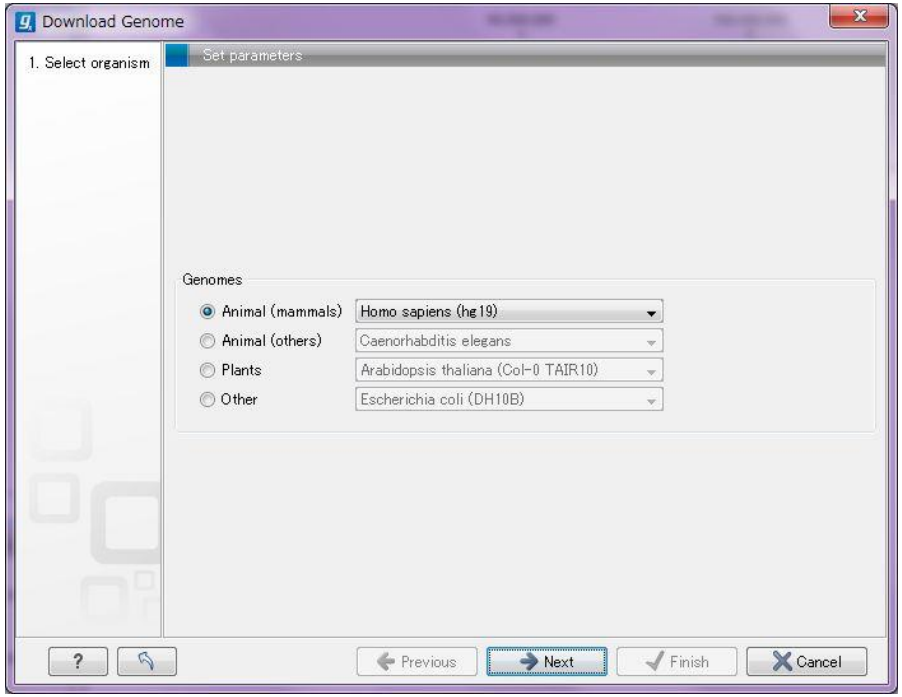
保存先の指定

ゲノム・アノテーションインポート

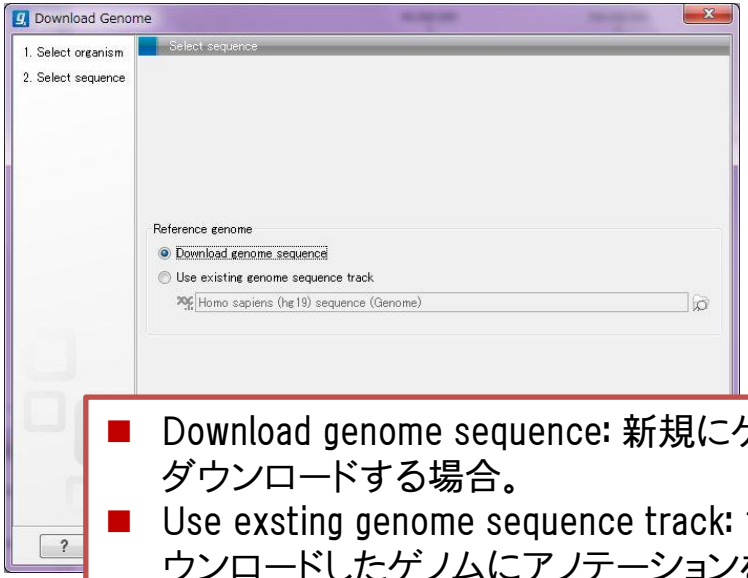
- ゲノムはダウンロードアイコンより、生物種を指定してアノテーションと共にインポートすることが可能です。
- ゲノム配列とともに、アノテーションファイルをダウンロードすることも可能です。
- すでにGenomics Workbenchへ取り込んでいるゲノム配列について、アノテーションを付加することも可能です。



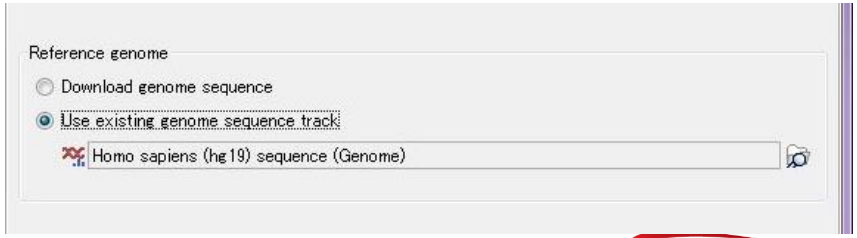
ゲノム・アノテーションインポート



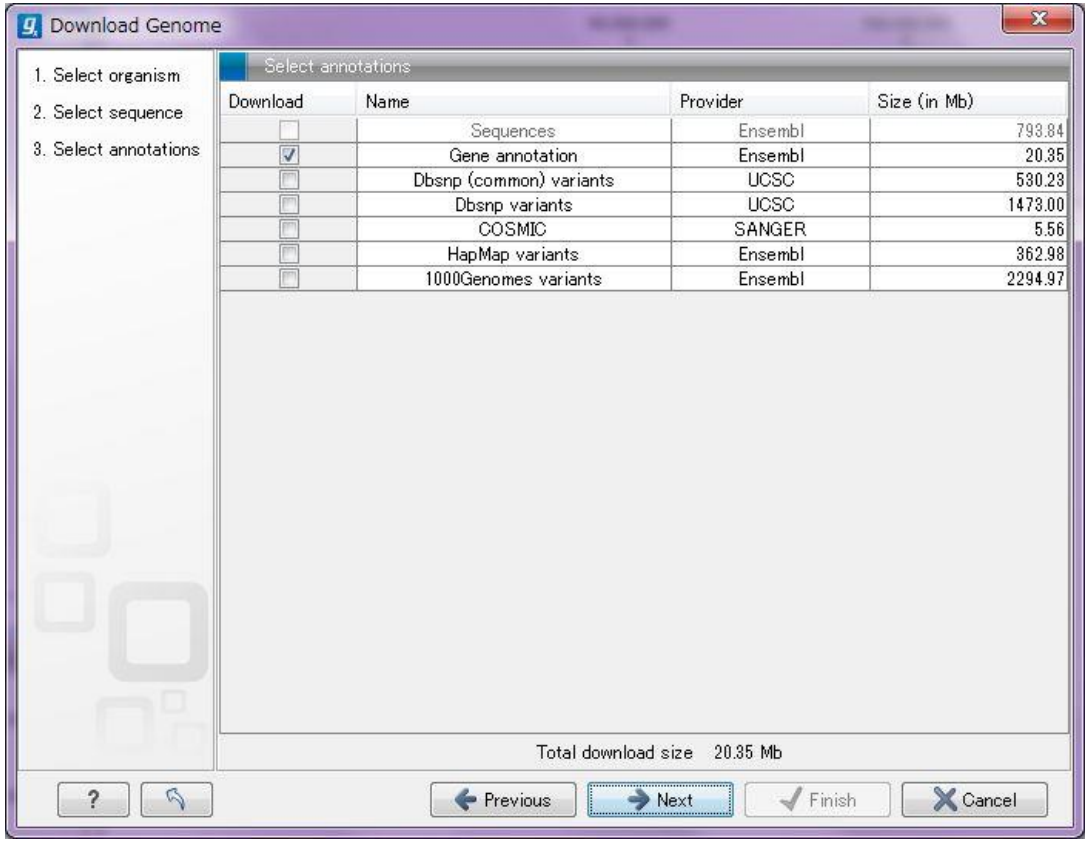
- ドロップダウンリストから生物種を選択。



- Download genome sequence: 新規にゲノムをダウンロードする場合。
- Use exsting genome sequence track: すでにダウンロードしたゲノムにアノテーションを追加する場合。以下のようにトラックのフォーマットになっているゲノムを選択。



ゲノム・アノテーションインポート

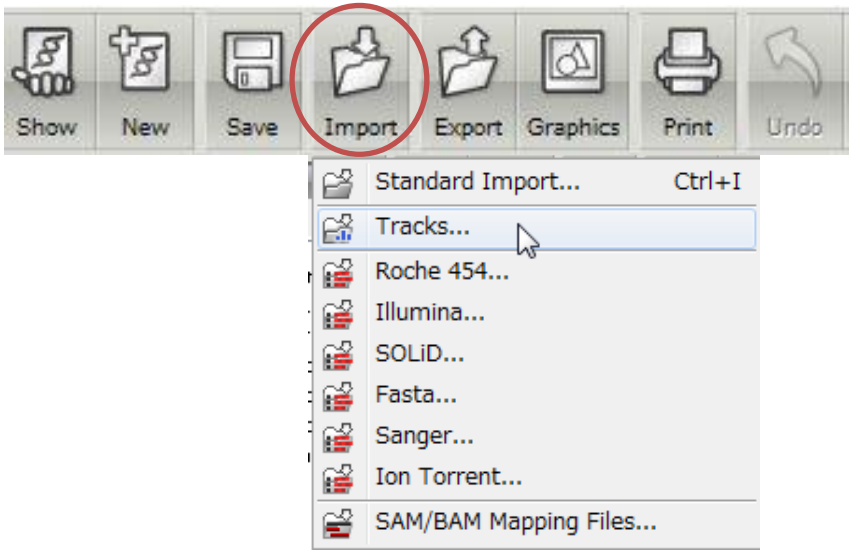


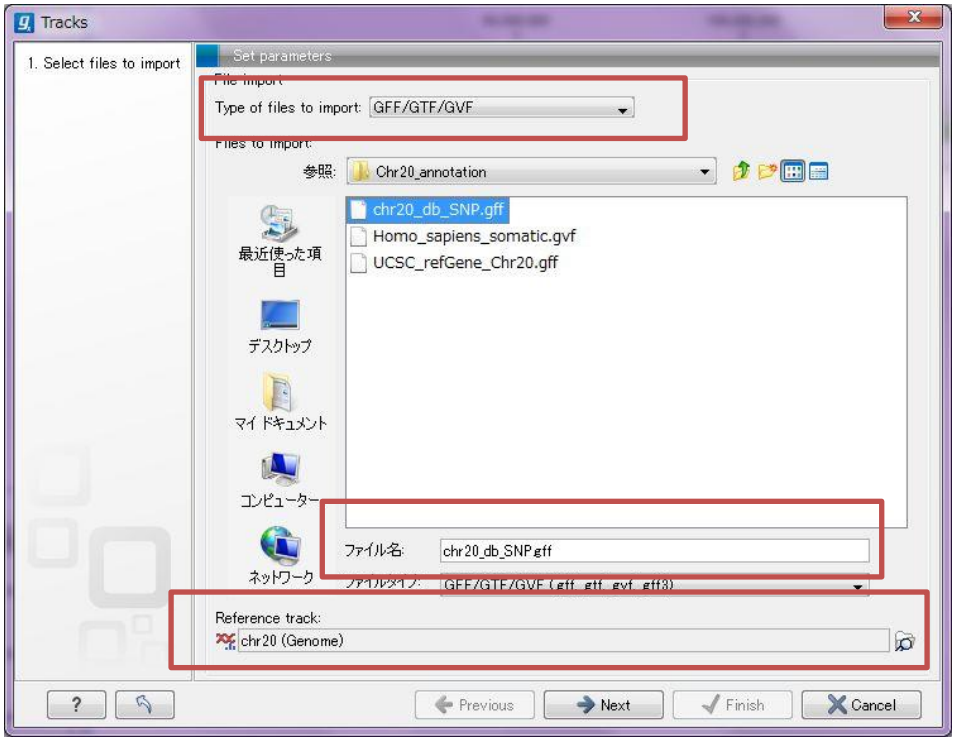
- 希望するアノテーションにチェックを入れる。ゲノム配列をダウンロードするときは、Sequences にもチェックを入れる。
- 選択した生物種により、表示されるアノテーションの種類は異なります。

アノテーションインポート

- Download Genome 以外にも、アノテーションファイルをインポート可能です。
- アノテーションとして取り込めるファイルは以下のフォーマットです。
- アノテーションファイルをインポートする際には、対象となるゲノム配列がすでにインポートされ、Trackのフォーマットになっていることが前提です。
  - VCF
  - GFF/GTF/GVF
  - BED
  - Wiggle
  - Complete Genomics Var file
  - UCSC Variation table damp
  - COSMIC variation database

アノテーションインポート





- Type of files to importを選択
- インポートするファイルを選択
- Reference Track を選択

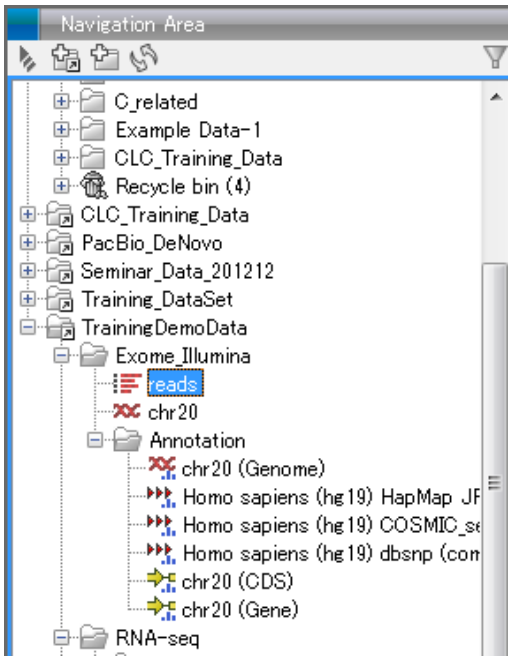
クオリティチェック

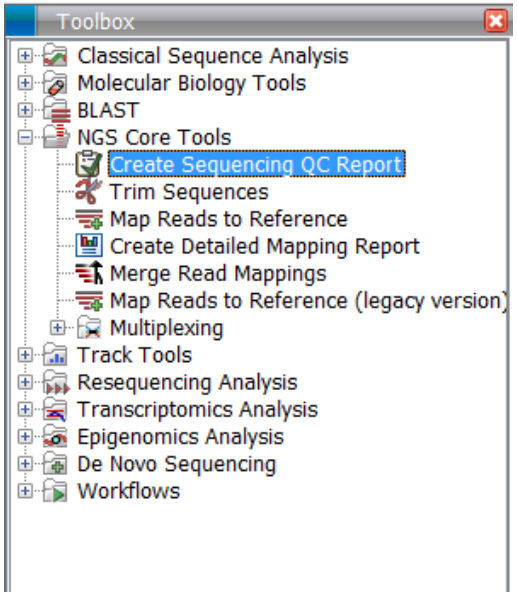
クオリティチェック流れ

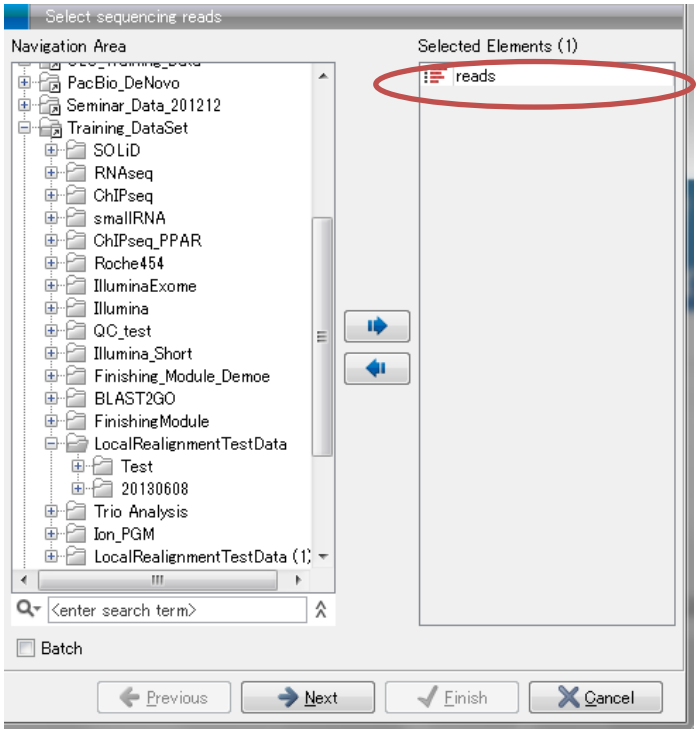
- Quality Report作成: Create Sequencing QC Report
  - インポートしたリードのクオリティがどのぐらいか、その後のトリミングや、PCR Duplicate の状況などを確認するためにレポートを作成。
- PCR Duplicate の除去: Remove Duplicate Reads
  - フラグメント作成の過程でPCRが異常にかかってしまったものを補正。
- トリミング: Trim Sequences
  - アダプターの除去、クオリティスコアによる除去、長さを指定した除去などを選択・組み合わせてトリミング。

  - 上記処理の後に再度Quality Reportを作成すると処理前と処理後でのリードのクオリティを比較でき、便利です。
  - PCR Duplicateの除去は本日は行いませんが、行い方はWebの日本語マニュアルを参照してください。

Create Sequencing QC Report

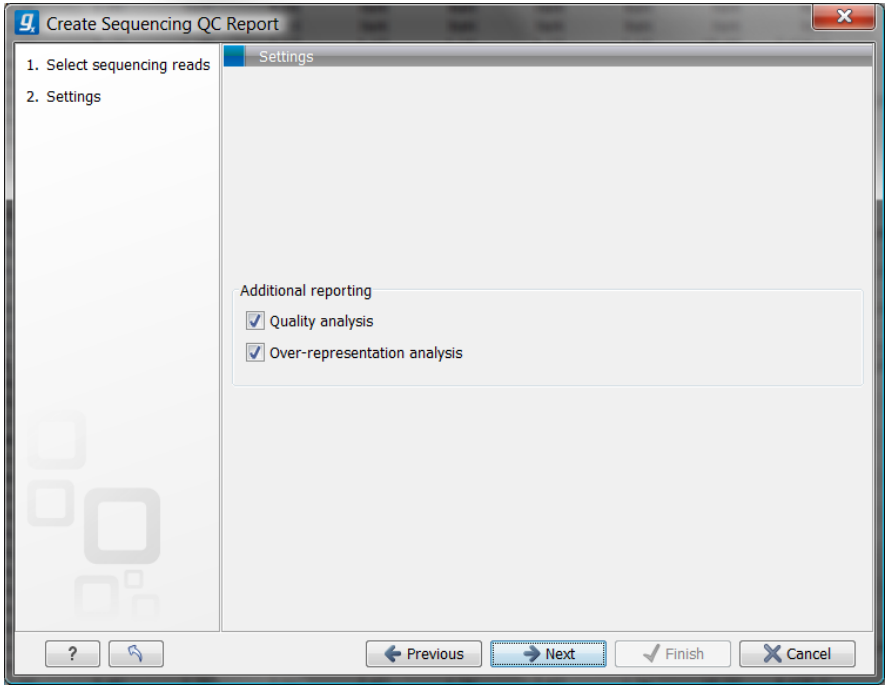




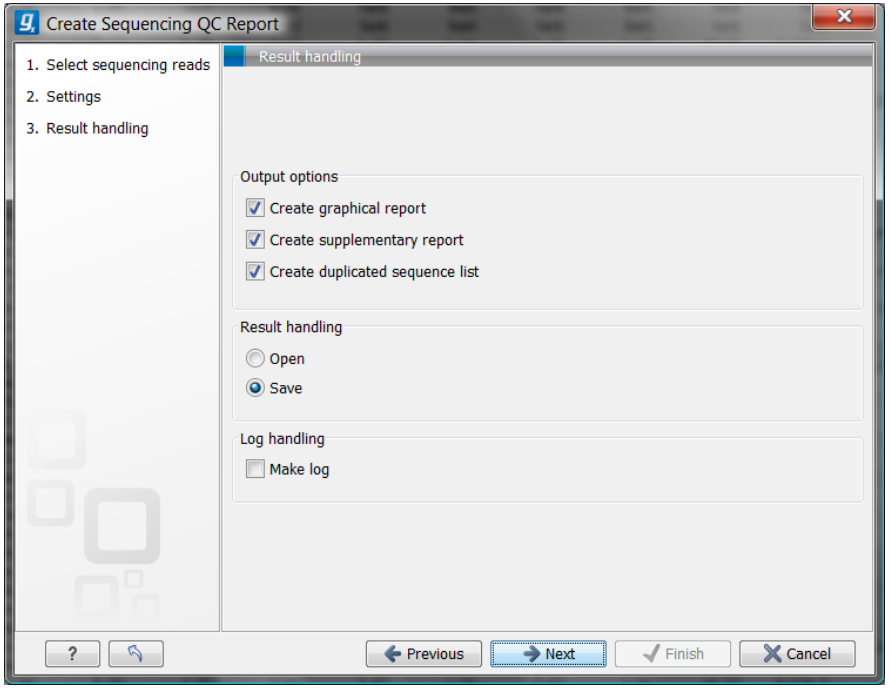


- Navigation Areaから使用するリードデータを選択。
- Toolboxから NGS Core Tools > Create Sequencing QC Report を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

Create Sequencing QC Report



- Quality analysis: クオリティスコアに関する解析。
- Over-representations analysis: 過度に現れているような塩基配列などの解析。

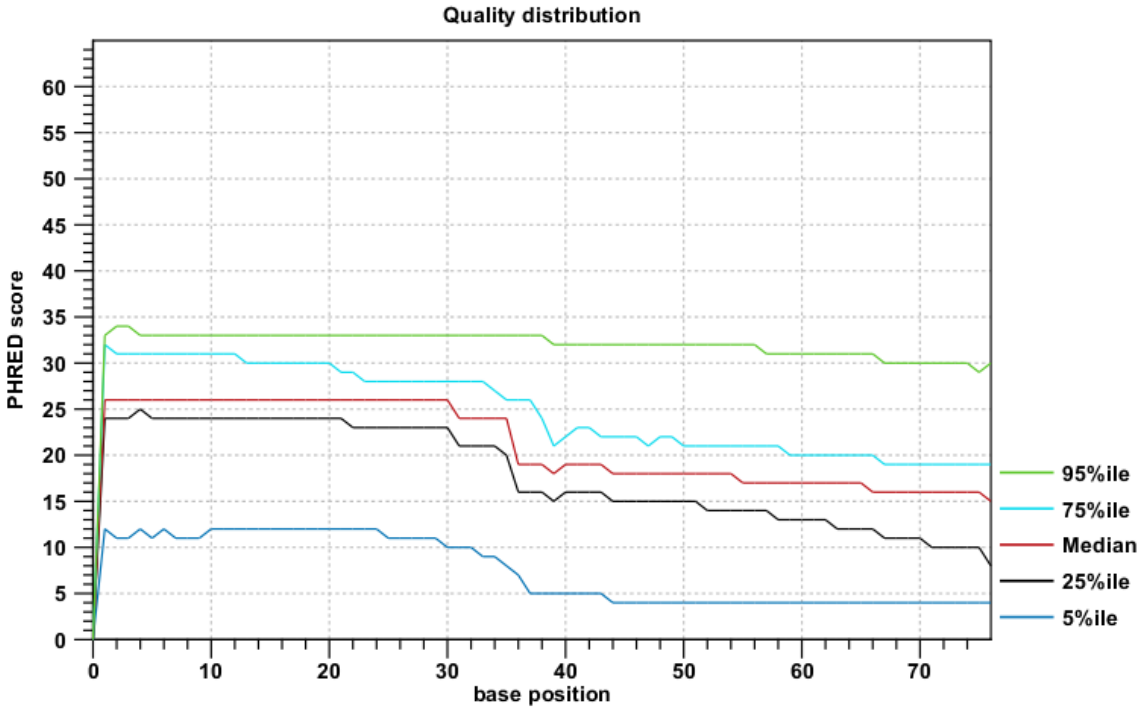


- Create graphical report: グラフィカルなレポート作成。
- Create supplementary report: 数値のレポート作成。
- Create duplicated sequence list: 重複のあった配列のリスト作成。

QCレポート　結果

reads – graphical QC report

3.5 Quality distribution



クオリティチェック

アダプター除去	• あらかじめ登録されているアダプターの除去 • 新規で独自の配列を登録することも可能
クオリティトリミング	• Quality Score を使い、Quality の低い配列が連続するようになる箇所からカット • 正確に読めていない塩基をいくつ許容するか
長さによる除去	• 塩基数を指定して、5末端、3末端をカット • Quality Scoreでカット後、短くなりすぎた配列をカット

クオリティトリミング原理

- Trimming ではQuality Score を使い、累積のQuality Score がある一定の値より大きいものが続いた場合に、その箇所を取り除く、という処理を行います。

- 具体的には以下：
  1. Phred Score をp値へ変換
  2. Trimming 中に設定するパラメータ(Limit)とp値の差を計算
  3. 差の累積和を計算。このとき、0以下の値は0とする
  4. Trimming後のリード開始点は累積和がはじめて0以上になった点。Trimming後のリード終了点は累積和が最大の点

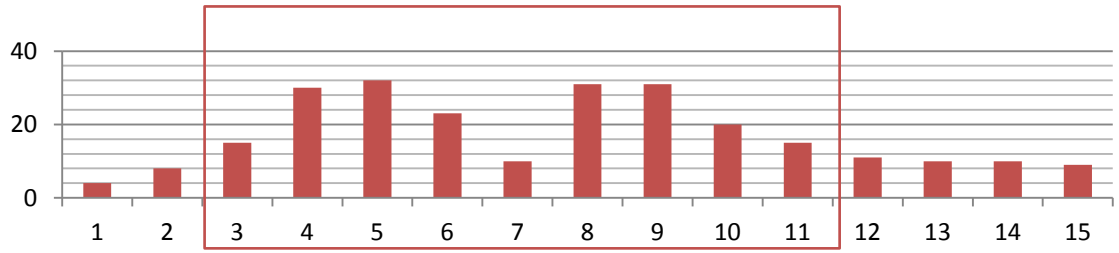
クオリティトリミング原理

リード配列	G	C	C	C	A	T	G	T	T	C	G	A	T	G	C
Phred score	4	8	15	30	32	23	10	31	31	20	15	11	10	10	9
p値	0.40	0.16	0.03	0.00	0.00	0.01	0.10	0.00	0.00	0.01	0.03	0.08	0.10	0.10	0.13
Limit - p値 (D)	-0.35	-0.11	0.02	0.05	0.05	0.04	-0.05	0.05	0.05	0.04	0.02	-0.03	-0.05	-0.05	-0.08
(D)の累積和	0.00	0.00	0.02	0.07	0.12	0.16	0.11	0.16	0.21	0.25	0.27	0.24	0.19	0.14	0.06

スタート点：
累積和が0より大
きくなった塩基

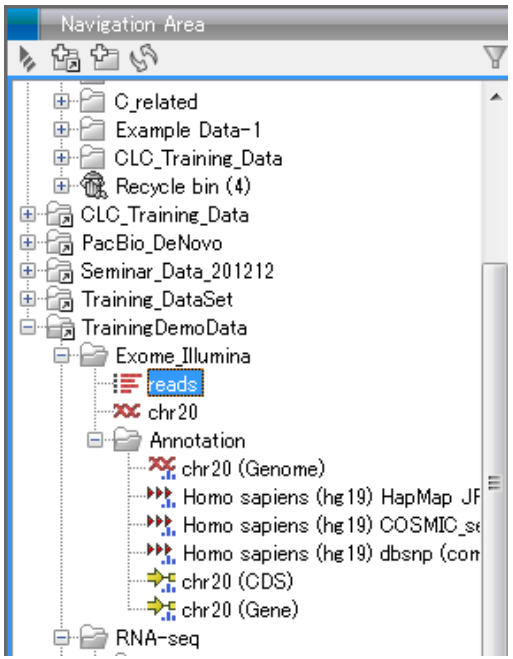
終了点：
累積和が最大を
示す塩基

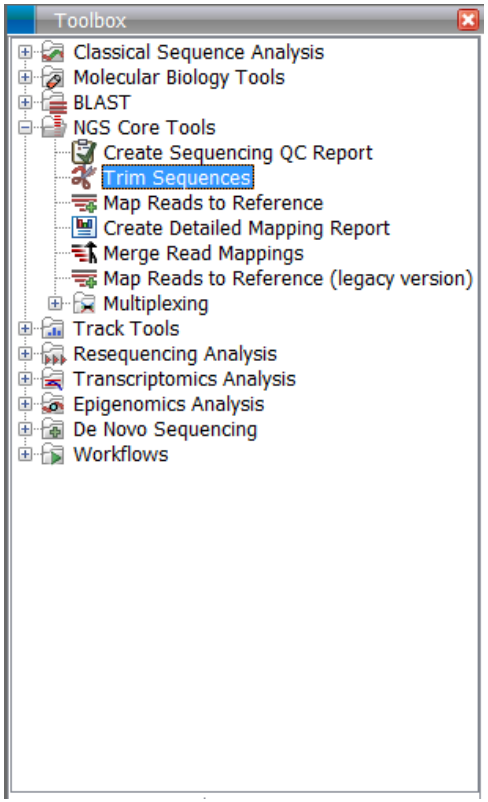
Phred score の棒グラフ

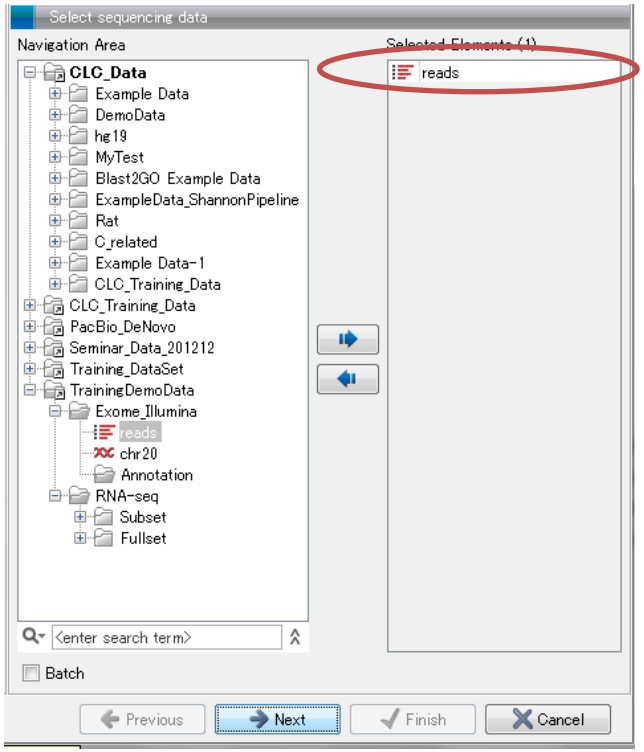


グラフより、ある程度クオリティが高くなった場所からリードを使い、クオリティが
連続して悪くなっている箇所からリードをトリムしていることがわかる。
※途中、1塩基のみクオリティが低いような場合は、必ずしもトリムされない。
これはできるだけリードを長く保とうとするため。

トリミング

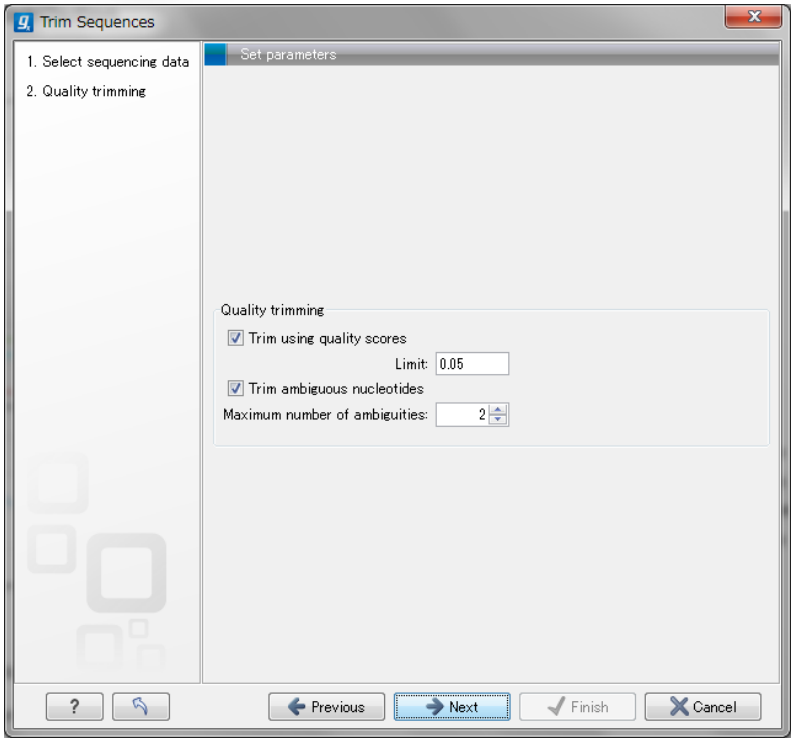


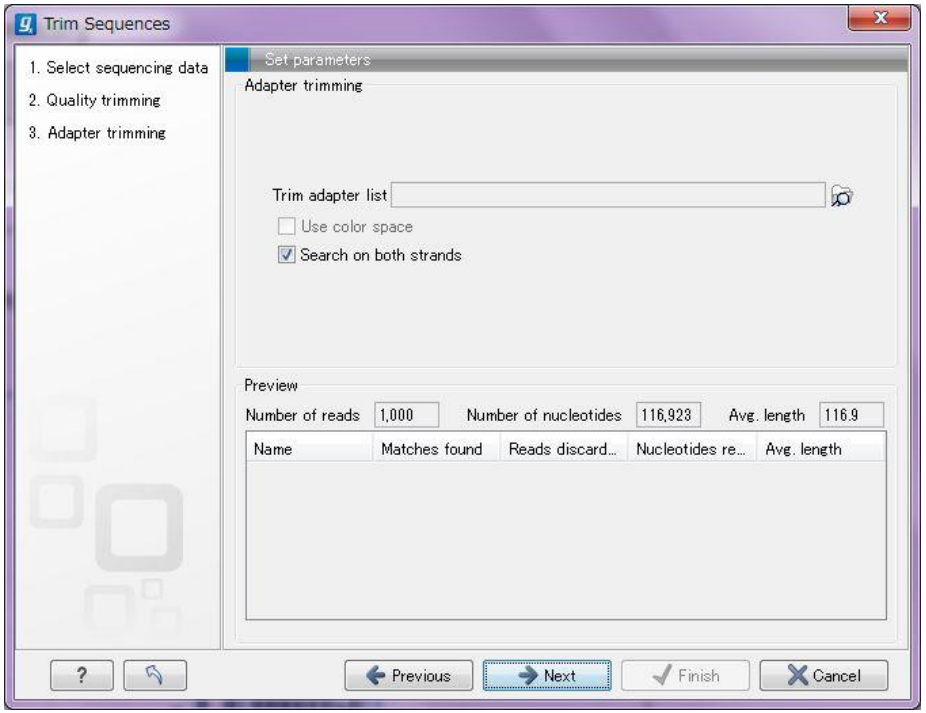




- Navigation Areaから使用するリードデータを選択。
- Toolboxから NGS Core Tools > Trim Sequences を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

トリミング

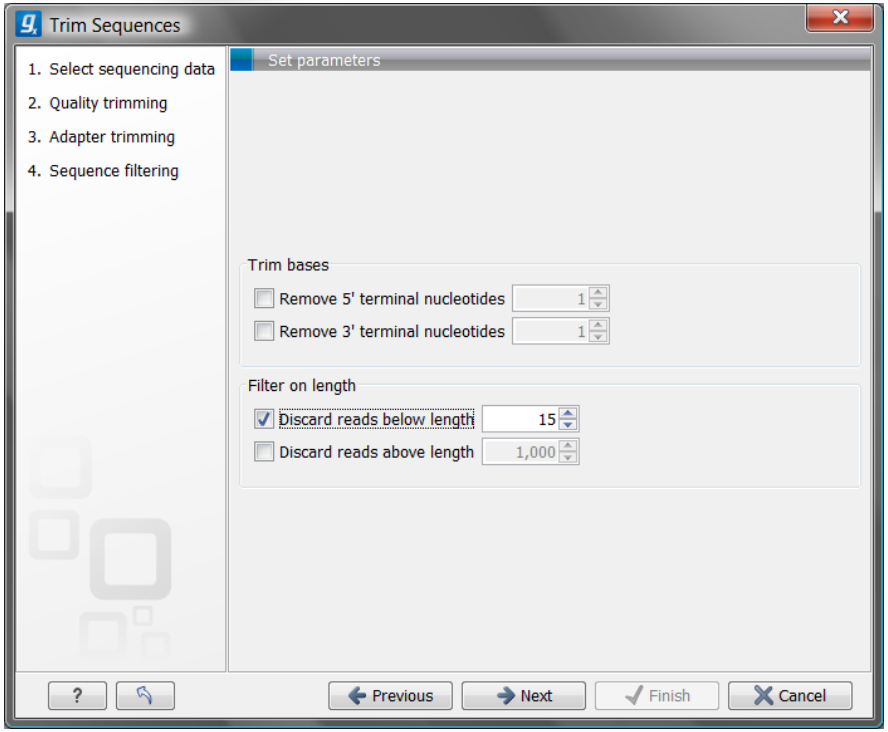


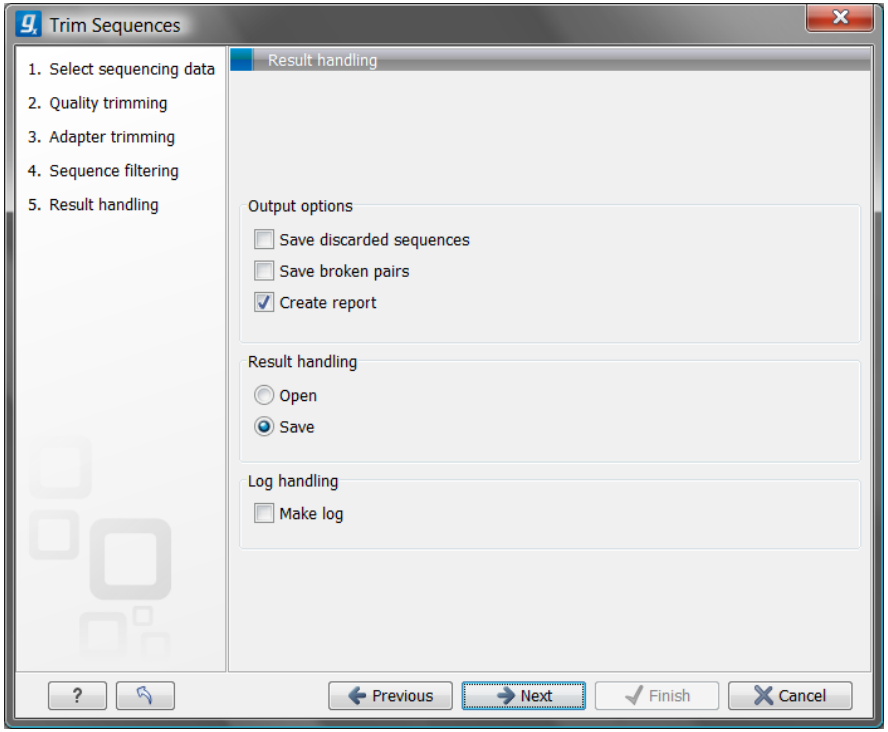


- アダプタートリミング

- Trim using quality scores :トリミングに使用するLimitパラメータを決定
- Trim ambiguous nucleotides:N表示される塩基について、最大何塩基まで保持させるか。

トリミング

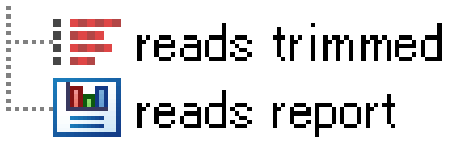




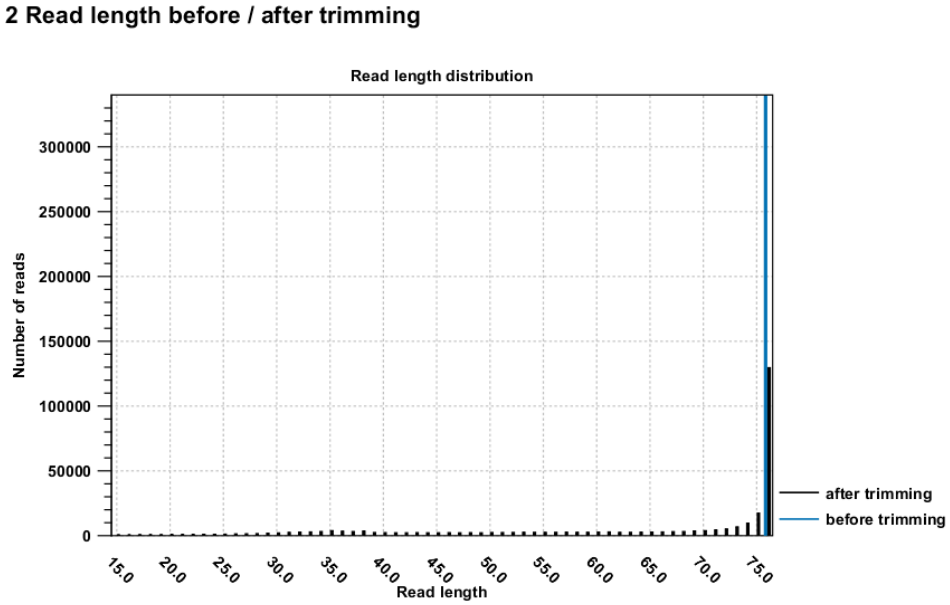
- Trim bases:リード配列の5’末、3’末から指定数の塩基を除去
- Filter on length:リード配列の5’末、3’末から指定数の塩基を除去

- Save discarded sequences: トリミングにより除去された配列の保存。
- Save broken pairs: ペアのリードでトリミングによりペアでなくなったリードを保存。
- Create report: レポートの作成。

トリミング結果



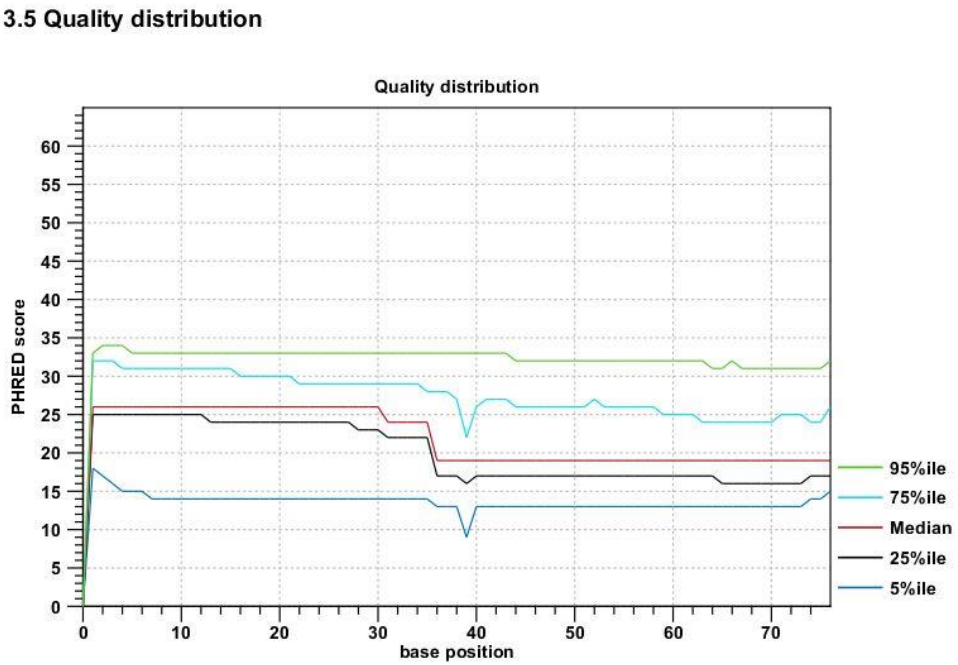
- トリミング結果のデータはファイル名の後に trimmed という名前が付いています。ファイル内容はインポート後のデータ同様に、配列と、クオリティスコアを含んだファイルとなっています。



- トリミング後は、トリムされたリードと、レポートを作成した場合は、そのレポートが作成されます。

QCレポート 再作成！

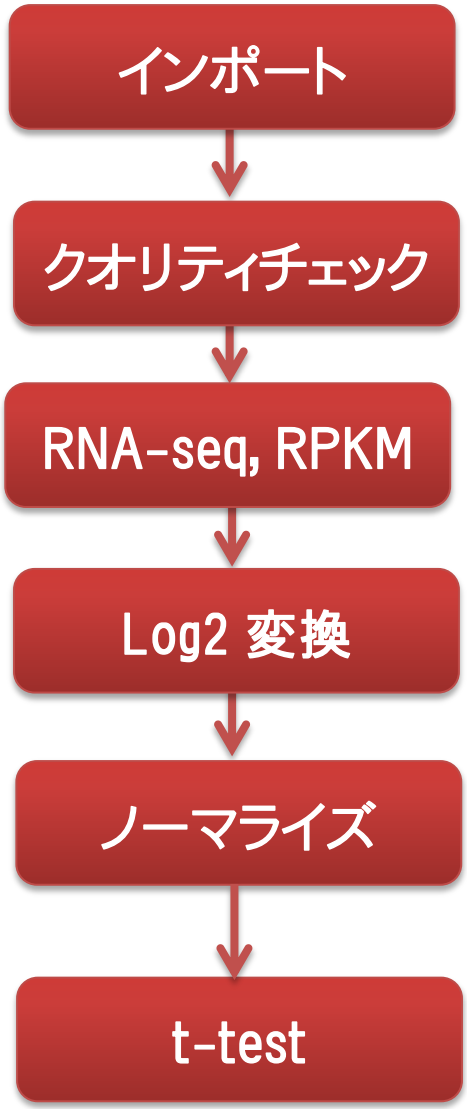
- トリミングされたリードを使って、QCレポートを再度作って、トリミング前と後を比較してみましょう。



RNA-seq

RNA-seq解析フロー

- RNA-seq



RPKM

- RPKM: Reads Per Killobases per Million
  - 長さが異なるトランスクリプト、実験で使われたリードの総数による違いについて正規化するための方法。

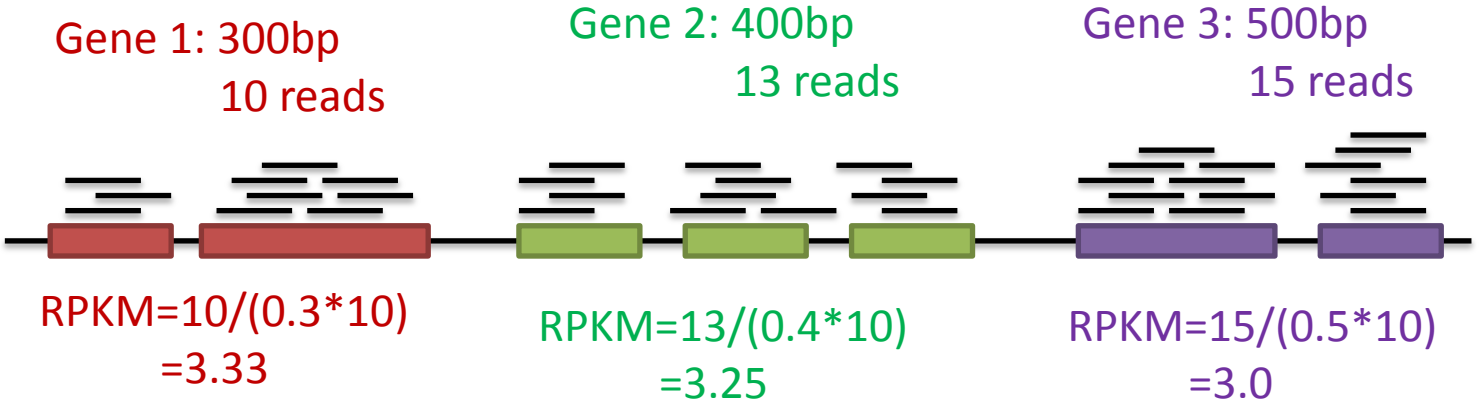
$$\mathrm{RPKM} = \frac{C}{LN}$$

- C: マップされたリードの総数
- N: リードの総数(Million)
- L: トランスクリプトの長さ(kbase)

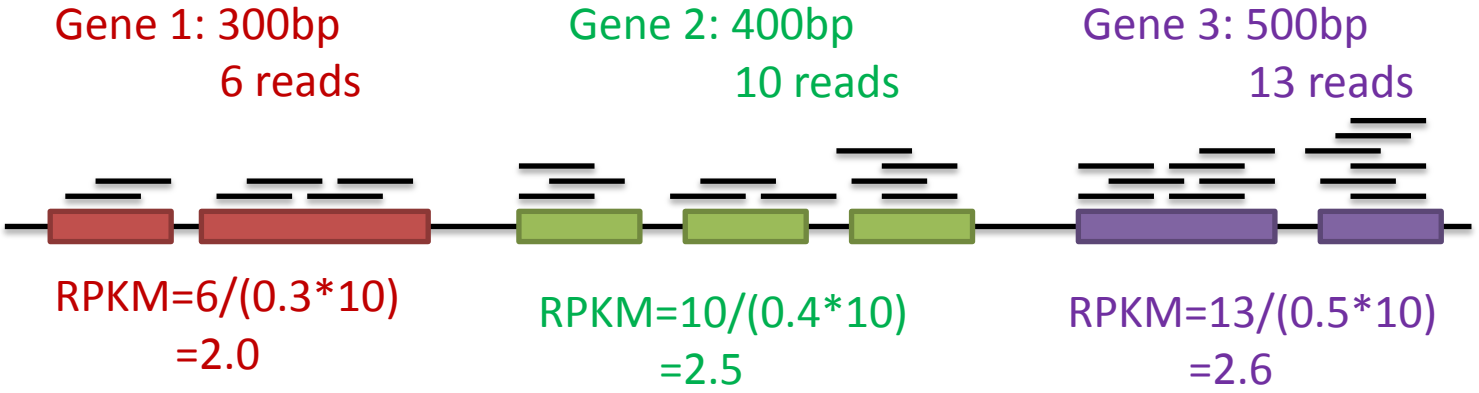
RPKM

- 例：

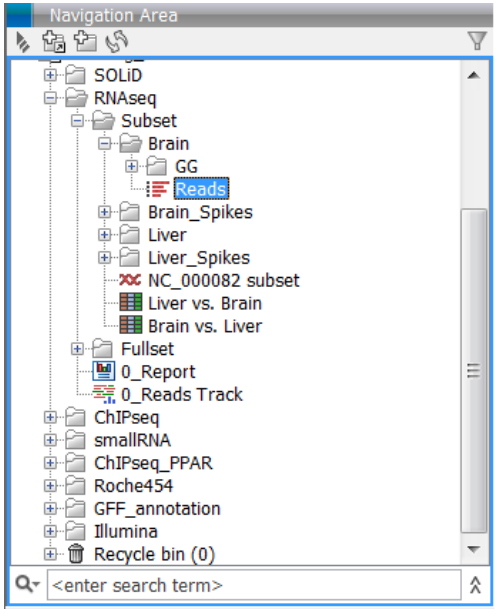
Sample A
Total reads:
6M

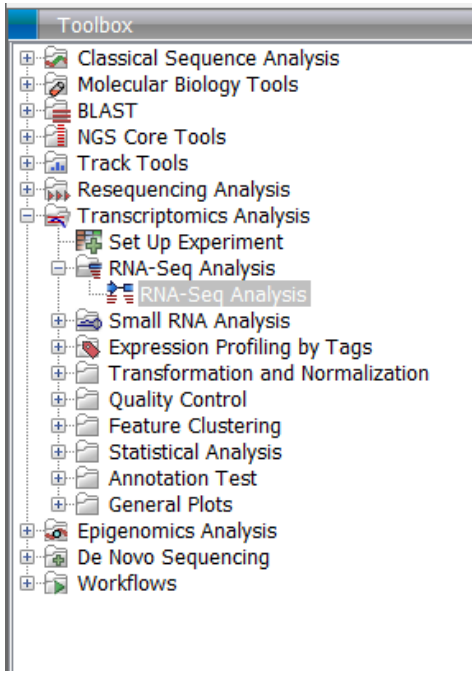


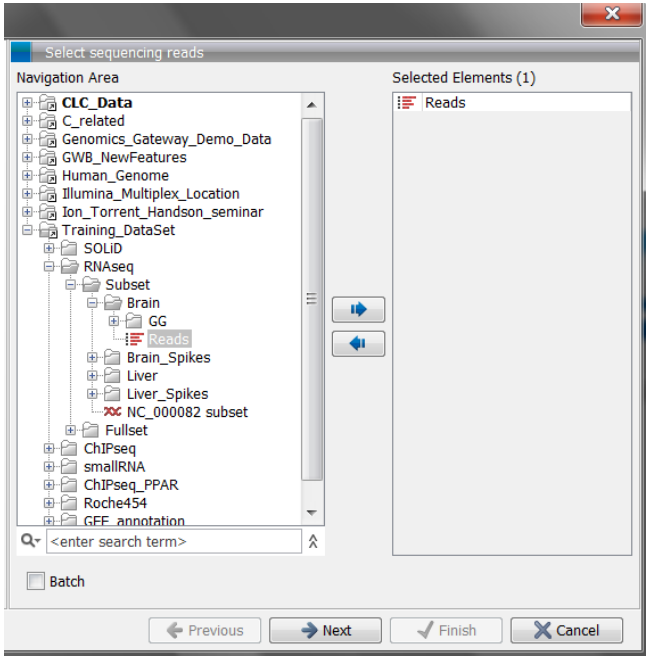
Sample B
Total reads:
4M



RNA-seq

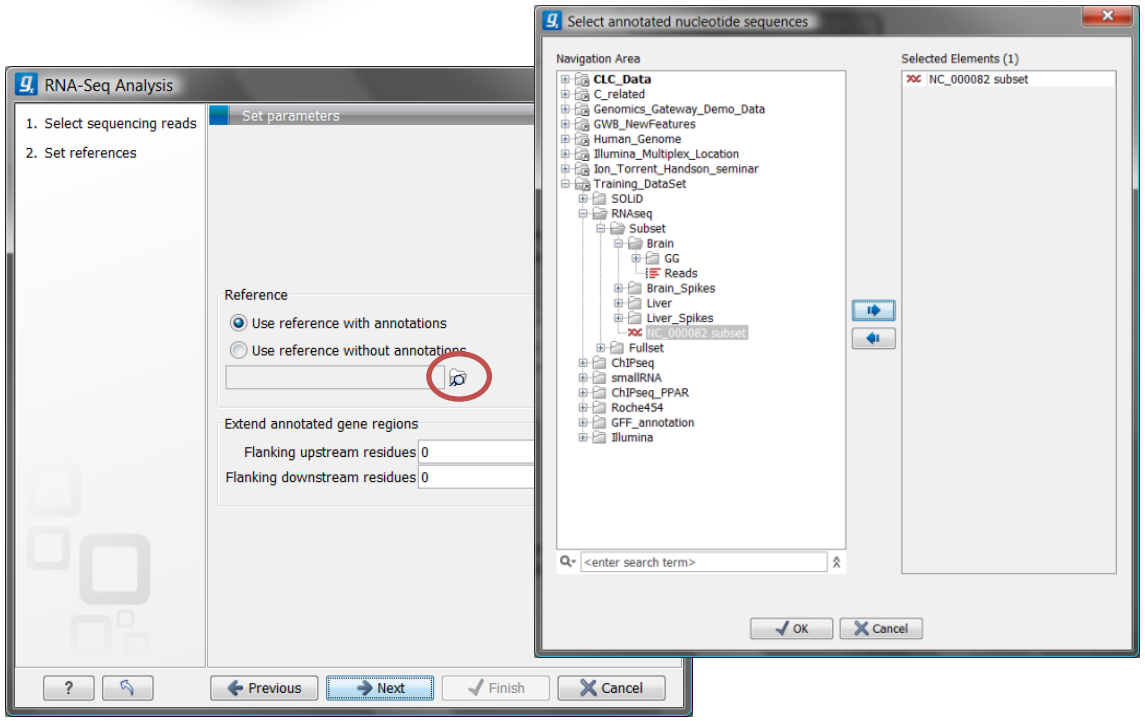


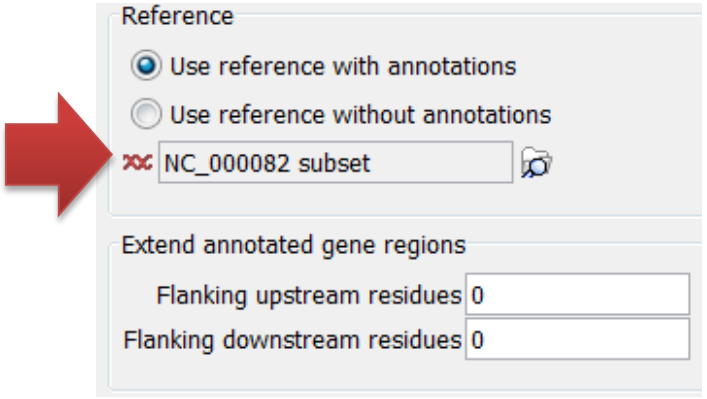




- Navigation Areaから使用するリードデータを選択。
- Toolboxから Transcript Analysis > RNA-seq Analysis > RNA-Seq Analysis を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

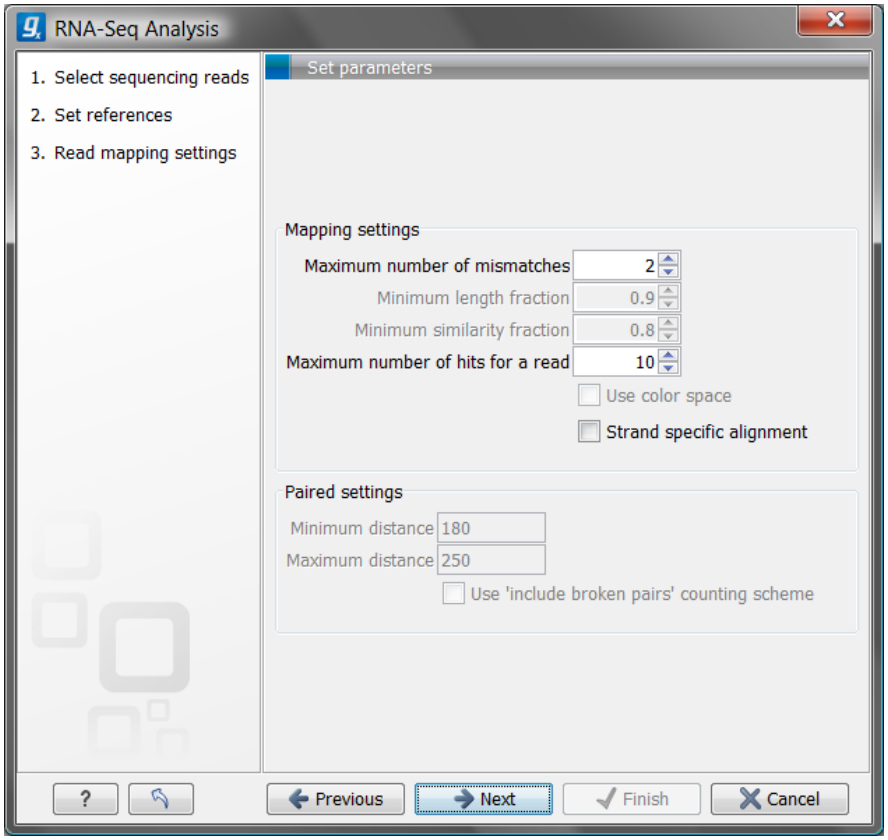
RNA-seq





- アノテーション付のデータ、アノテーション無しのリファレンス、いずれかを選択。
- インポートしているゲノムのデータを選択。

RNA-seq

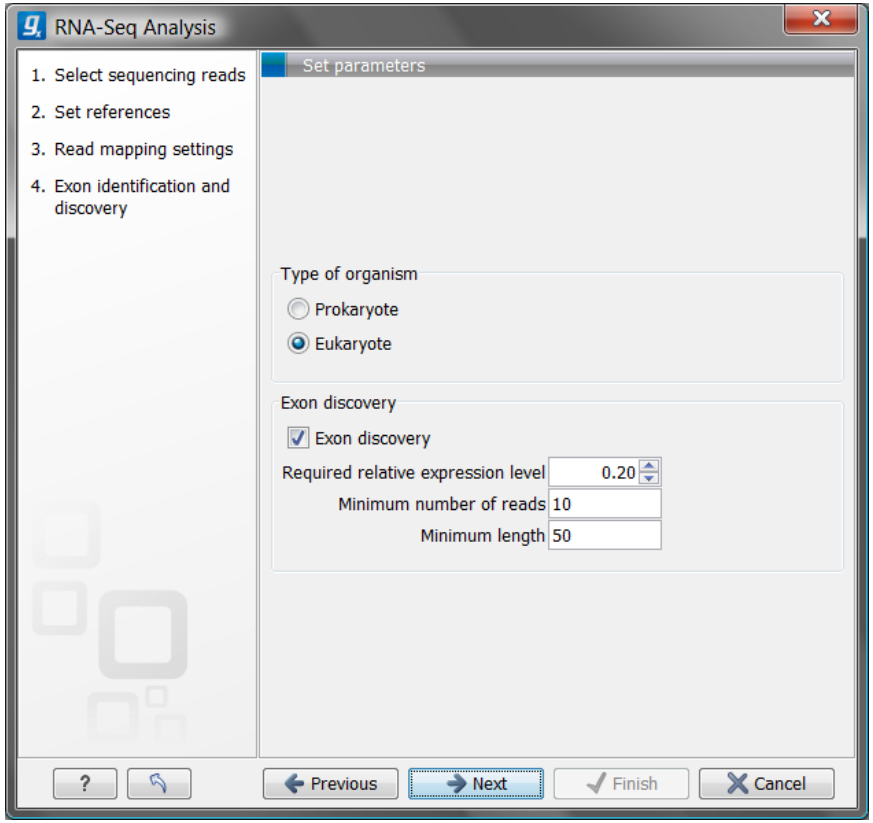


- Maximum number of mismatches: (Short read パラメータ) リード中に最大何個までのミスマッチを許容するか。
- Minimum length fraction: (Long read パラメータ)マッチする際に考慮するリードの長さの割合。
- Minimum similarity fraction: (Long read パラメータ) Minimum length fraction で指定した長さのうち、一致するべき割合。
- Maximum number of hits for a read:1つのリードがマッチする最大の数。この数以上の箇所にマップされたリードは、マップされません。

- Use color space:カラースペースを使用する場合
- Strand specific alignment:センス鎖特異的にマップさせたい場合のオプション

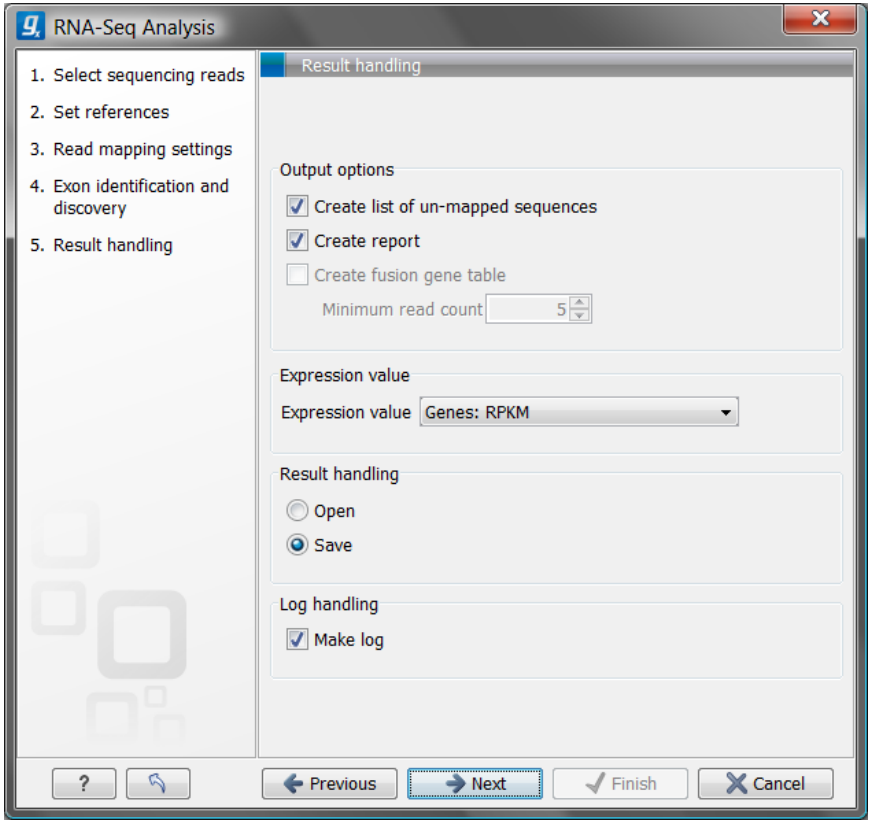
- Minimum distance:ペアの最小距離
- Maximum distance:ペアの最大距離
- Use ‘include broken pairs’ counting scheme:指定した距離に納まらなかったリードもカウントしたい場合

RNA-seq



- Exon discovery：新規エクソンの探索を行いたい場合
- Required relative expression level：新規エクソンとする場合に、その遺伝子の発現量のうち、どのぐらいの割合を持っている必要があるか。
- Minimum number of reads: 新規エクソンとする場合に最低限必要なリード数。
- Minimum length: 新規エクソンとする場合の最小の長さ。

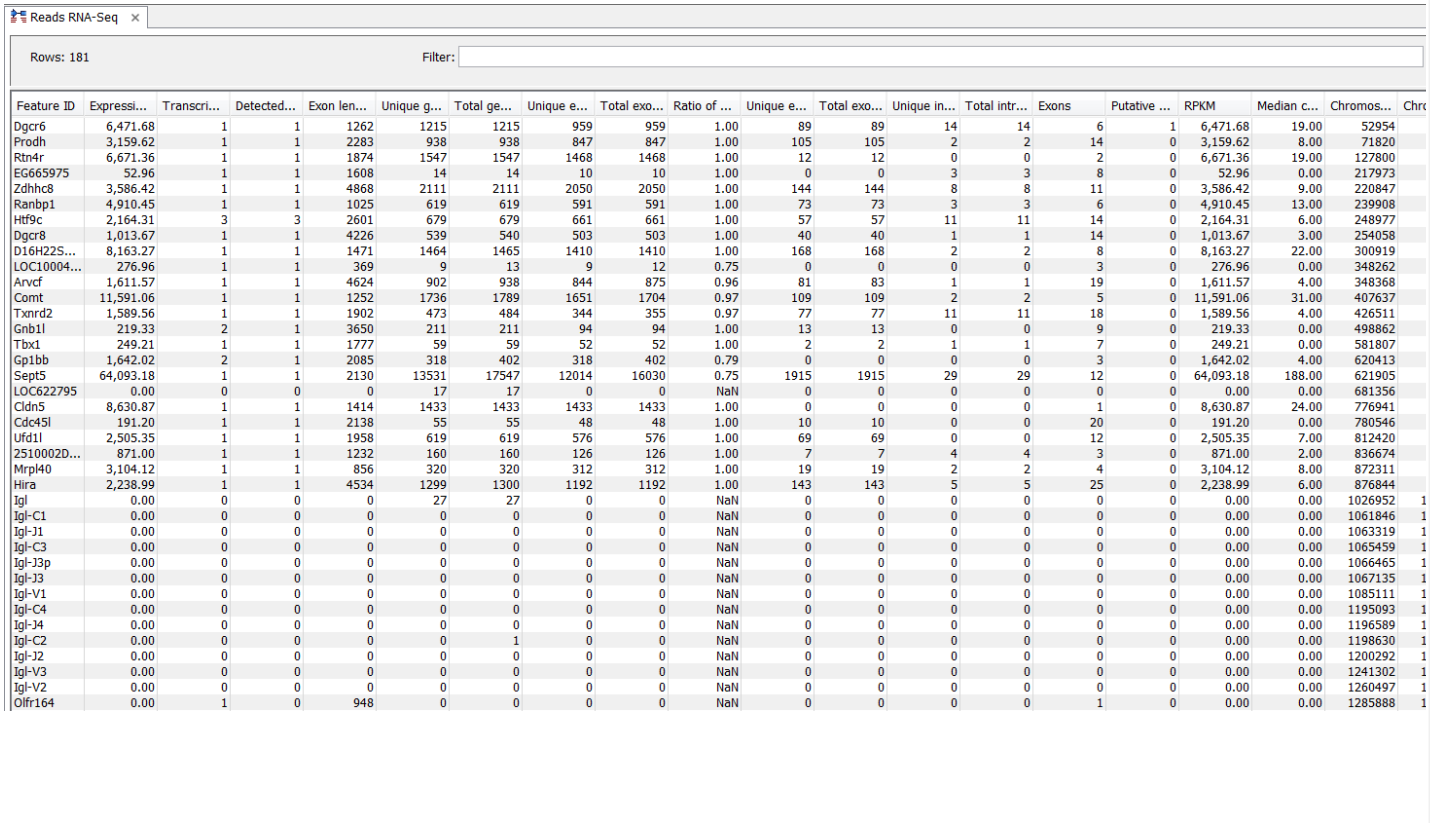
RNA-seq



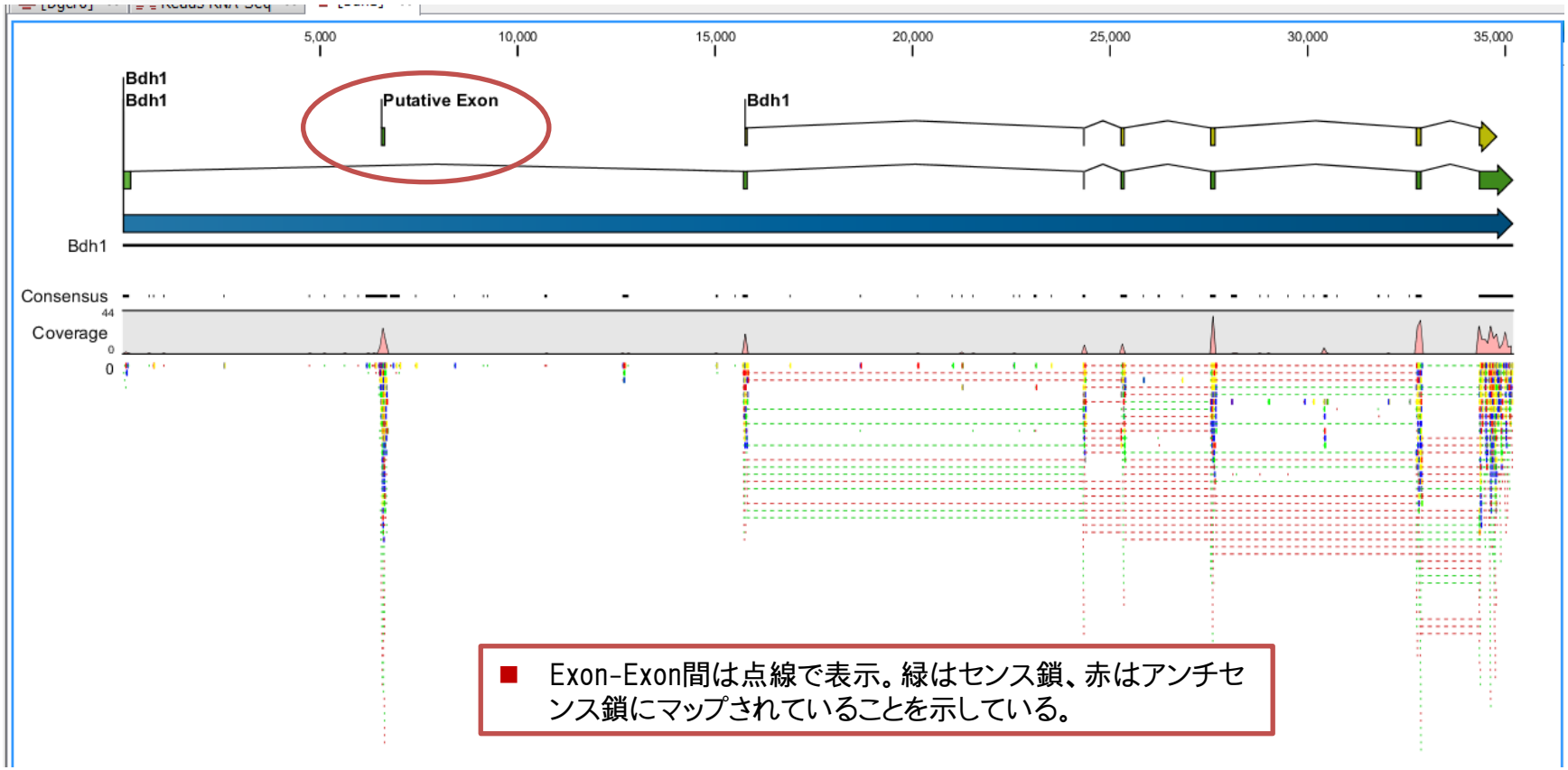
- Create list of un-mapped sequences: マップされなかったリードをリストとして回収するオプション
- Create report: レポート作成
- Create fusion gene table: Fusion gene の候補をリストで作成するかどうか。
- Minimum read count:(Pair-end オプション)作成する場合、Fusionとするための最小リードカウント。

- Expression value: デフォルトはRPKM。このほか、Total Exonなども選択可。後で変更も可能。

RNA-seq


Reads RNA-Seq
Rows: 181
Filter:
Feature ID | Expressi... | Transcri... | Detected... | Exon len... | Unique g... | Total ge... | Unique e... | Total exo... | Ratio of ... | Unique e... | Total exo... | Unique in... | Total intr... | Exons | Putative ... | RPKM | Median c... | Chromos...
Dgcr6 | 6,471.68 | 1 | 1 | 1262 | 1215 | 1215 | 959 | 959 | 1.00 | 89 | 89 | 14 | 14 | 6 | 1 | 6,471.68 | 19.00 | 52954
Prodh | 3,159.62 | 1 | 1 | 2283 | 938 | 938 | 847 | 847 | 1.00 | 105 | 105 | 2 | 2 | 14 | 0 | 3,159.62 | 8.00 | 71820
Rtn4r | 6,671.36 | 1 | 1 | 1874 | 1547 | 1547 | 1468 | 1468 | 1.00 | 12 | 12 | 0 | 0 | 2 | 0 | 6,671.36 | 19.00 | 127800
EG665975 | 52.96 | 1 | 1 | 1608 | 14 | 14 | 10 | 10 | 1.00 | 0 | 0 | 3 | 3 | 8 | 0 | 52.96 | 0.00 | 217973
Zdhhc8 | 3,586.42 | 1 | 1 | 4868 | 2111 | 2111 | 2050 | 2050 | 1.00 | 144 | 144 | 8 | 8 | 11 | 0 | 3,586.42 | 9.00 | 220847
Ranbp1 | 4,910.45 | 1 | 1 | 1025 | 619 | 619 | 591 | 591 | 1.00 | 73 | 73 | 3 | 3 | 6 | 0 | 4,910.45 | 13.00 | 239908
Htf9c | 2,164.31 | 3 | 3 | 2601 | 679 | 679 | 661 | 661 | 1.00 | 57 | 57 | 11 | 11 | 14 | 0 | 2,164.31 | 6.00 | 248977
Dgcr8 | 1,013.67 | 1 | 1 | 4226 | 539 | 540 | 503 | 503 | 1.00 | 40 | 40 | 1 | 1 | 14 | 0 | 1,013.67 | 3.00 | 254058
D16H22S... | 8,163.27 | 1 | 1 | 1471 | 1464 | 1465 | 1410 | 1410 | 1.00 | 168 | 168 | 2 | 2 | 8 | 0 | 8,163.27 | 22.00 | 300919
LOC10004... | 276.96 | 1 | 1 | 369 | 9 | 13 | 9 | 12 | 0.75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 276.96 | 0.00 | 348262
Arvcf | 1,611.57 | 1 | 1 | 4624 | 902 | 938 | 844 | 875 | 0.96 | 81 | 83 | 1 | 1 | 19 | 0 | 1,611.57 | 4.00 | 348368
Comt | 11,591.06 | 1 | 1 | 1252 | 1736 | 1789 | 1651 | 1704 | 0.97 | 109 | 109 | 2 | 2 | 5 | 0 | 11,591.06 | 31.00 | 407637
Txnrd2 | 1,589.56 | 1 | 1 | 1902 | 473 | 484 | 344 | 355 | 0.97 | 77 | 77 | 11 | 11 | 18 | 0 | 1,589.56 | 4.00 | 426511
Gnb1l | 219.33 | 2 | 1 | 3650 | 211 | 211 | 94 | 94 | 1.00 | 13 | 13 | 0 | 0 | 9 | 0 | 219.33 | 0.00 | 498862
Tbx1 | 249.21 | 1 | 1 | 1777 | 59 | 59 | 52 | 52 | 1.00 | 2 | 2 | 1 | 1 | 7 | 0 | 249.21 | 0.00 | 581807
Gp1bb | 1,642.02 | 2 | 1 | 2085 | 318 | 402 | 318 | 402 | 0.79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1,642.02 | 4.00 | 620413
Sept5 | 64,093.18 | 1 | 1 | 2130 | 13531 | 17547 | 12014 | 16030 | 0.75 | 1915 | 1915 | 29 | 29 | 12 | 0 | 64,093.18 | 188.00 | 621905
LOC622795 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 17 | 17 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 681356
Cldn5 | 8,630.87 | 1 | 1 | 1414 | 1433 | 1433 | 1433 | 1433 | 1.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 8,630.87 | 24.00 | 776941
Cdc45l | 191.20 | 1 | 1 | 2138 | 55 | 55 | 48 | 48 | 1.00 | 10 | 10 | 0 | 0 | 20 | 0 | 191.20 | 0.00 | 780546
Ufd1l | 2,505.35 | 1 | 1 | 1958 | 619 | 619 | 576 | 576 | 1.00 | 69 | 69 | 0 | 0 | 12 | 0 | 2,505.35 | 7.00 | 812420
2510002D... | 871.00 | 1 | 1 | 1232 | 160 | 160 | 126 | 126 | 1.00 | 7 | 7 | 4 | 4 | 3 | 0 | 871.00 | 2.00 | 836674
Mrpl40 | 3,104.12 | 1 | 1 | 856 | 320 | 320 | 312 | 312 | 1.00 | 19 | 19 | 2 | 2 | 4 | 0 | 3,104.12 | 8.00 | 872311
Hira | 2,238.99 | 1 | 1 | 4534 | 1299 | 1300 | 1192 | 1192 | 1.00 | 143 | 143 | 5 | 5 | 25 | 0 | 2,238.99 | 6.00 | 876844
Igl | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 27 | 27 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1026952
Igl-C1 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1061846
Igl-J1 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1063319
Igl-C3 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1065459
Igl-J3p | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1066465
Igl-J3 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1067135
Igl-V1 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1085111
Igl-C4 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1195093
Igl-J4 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1196589
Igl-C2 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1198630
Igl-J2 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1200292
Igl-V3 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1241302
Igl-V2 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1260497
Olfr164 | 0.00 | 1 | 0 | 948 | 0 | 0 | 0 | 0 | NaN | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.00 | 0.00 | 1285888
Gene-Level Expression Settings
Column width
Manual
Show column
Feature ID
Expression values
Transcripts annotated
Detected transcripts
Exon length
Unique gene reads
Total gene reads
Unique exon reads
Total exon reads
Ratio of unique to total (exon reads)
Unique exon-exon reads
Total exon-exon reads
Unique intron-exon reads
Total intron-exon reads
Exons
Putative exons
RPKM
Median coverage
Chromosome region start
Chromosome region end
Select All
Deselect All

RNA-seq



- Exon-Exon間は点線で表示。緑はセンス鎖、赤はアンチセンス鎖にマップされていることを示している。

Expression Analysis

発現解析

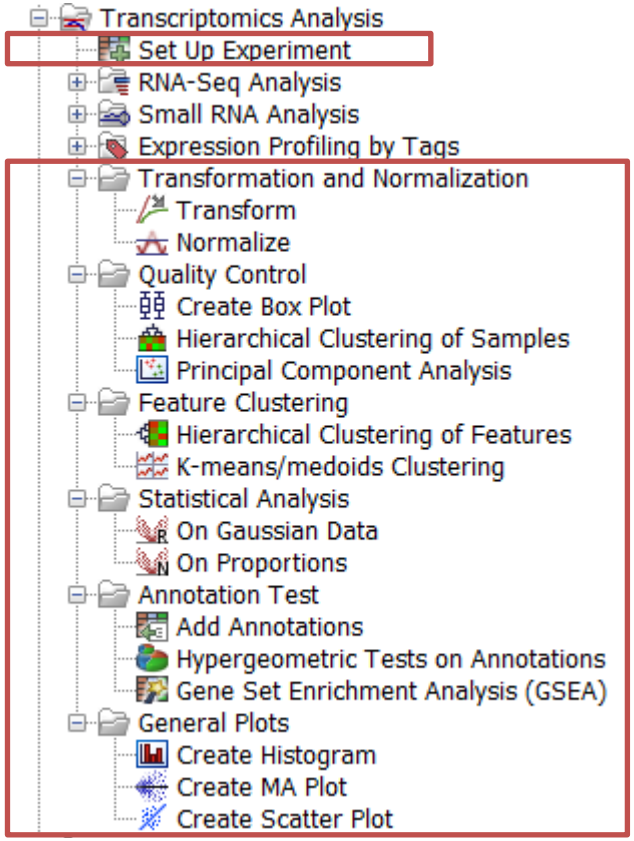
- RNA-seqの結果を使から、「BrainとLiverにおいて有意に発現している遺伝子は何か」といったことを調べます。
- 群間の比較を行う場合、RPKMの値をそのまま使う方法と、遺伝子に張り付いたリードの数をそのまま使う方法の2種類があります。

		群	群内のレプリケート
Gaussian Test	T-test	2群	**必須**
	ANOVA	3群以上	**必須**
Proportinal Test	Kal's test	2群	**不要**
	Baggerley's test	2群	**必須**

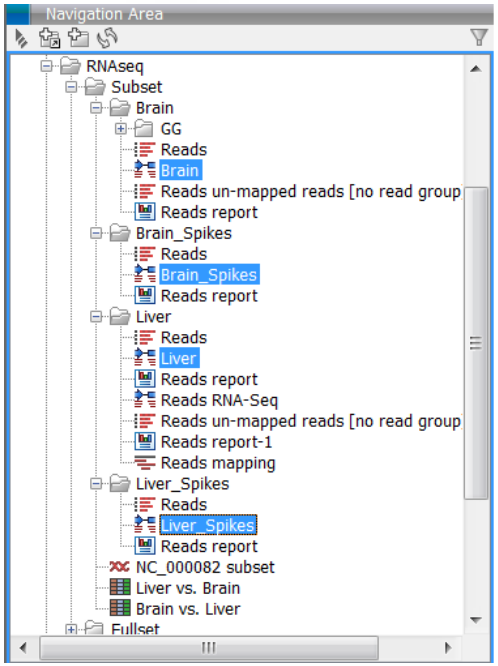
Expression Analysis

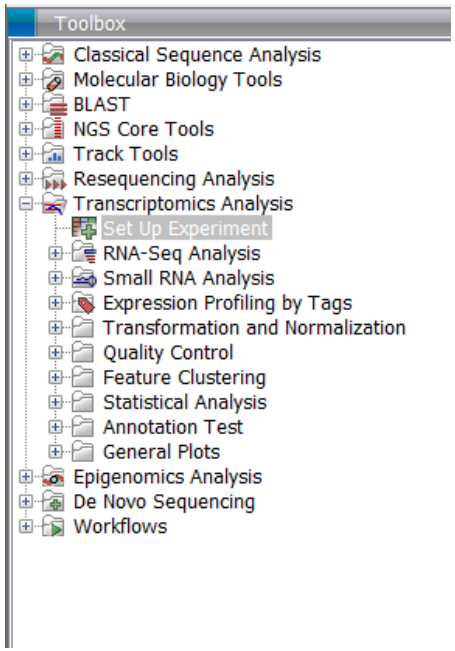
- RNA-seqのデータはMicroarrayのように発現差の解析を行うことが可能です。

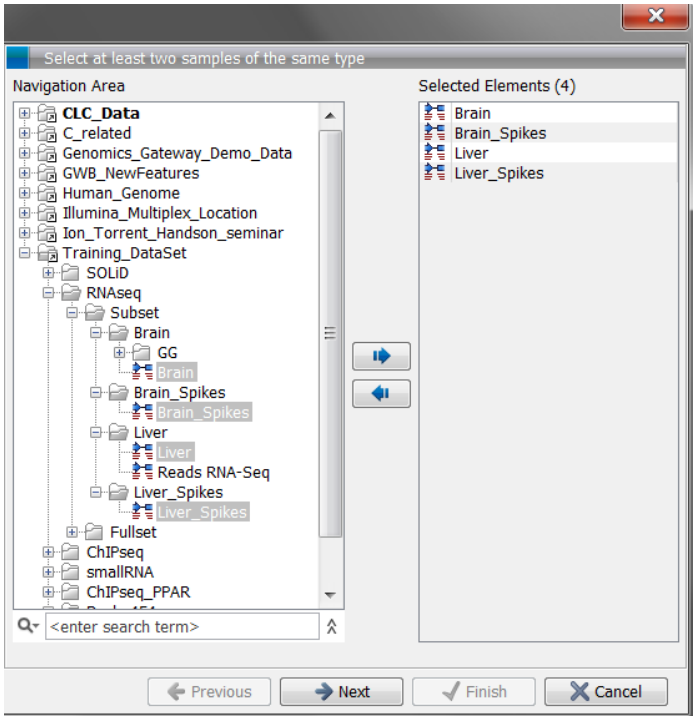
- そのためには、まずRNA-seqのデータをExperimentという形へ変更し、その後、発現解析ツールを使って解析を行います。



Expression Analysis

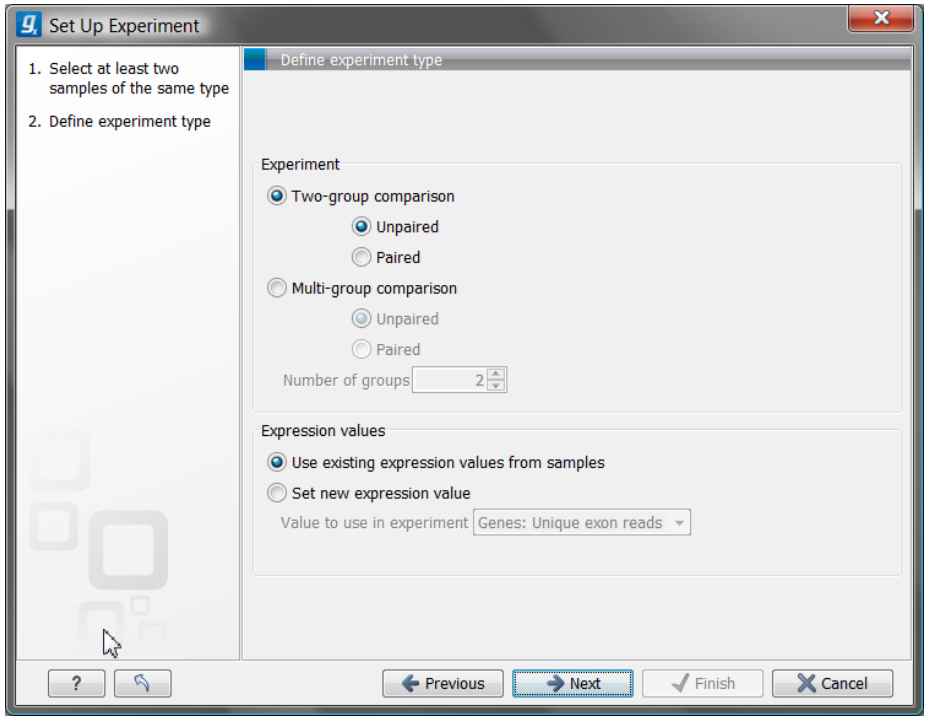






- Navigation Areaから使用するRNA-seqデータを選択。
- Toolboxから Set Up Experiment を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

Expression Analysis

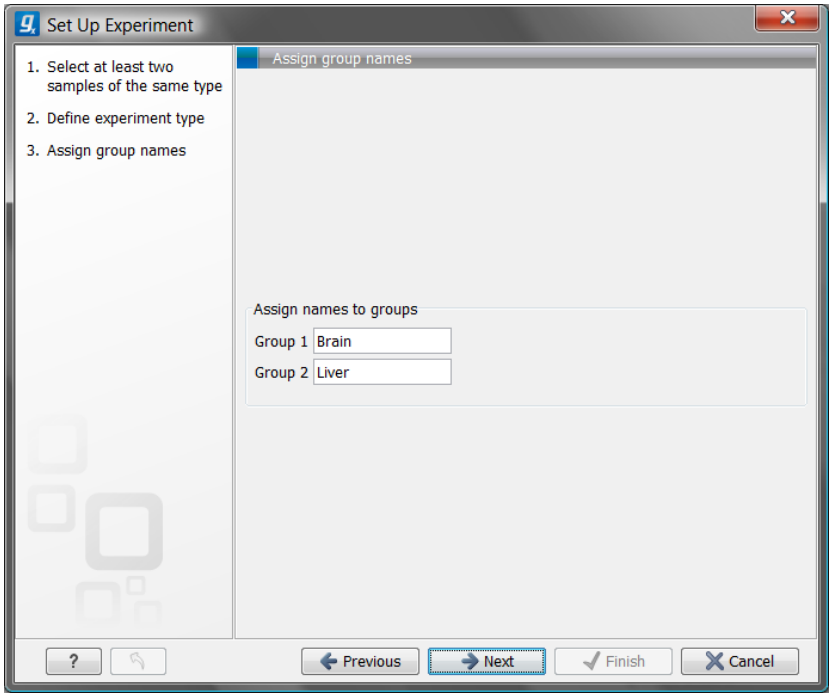


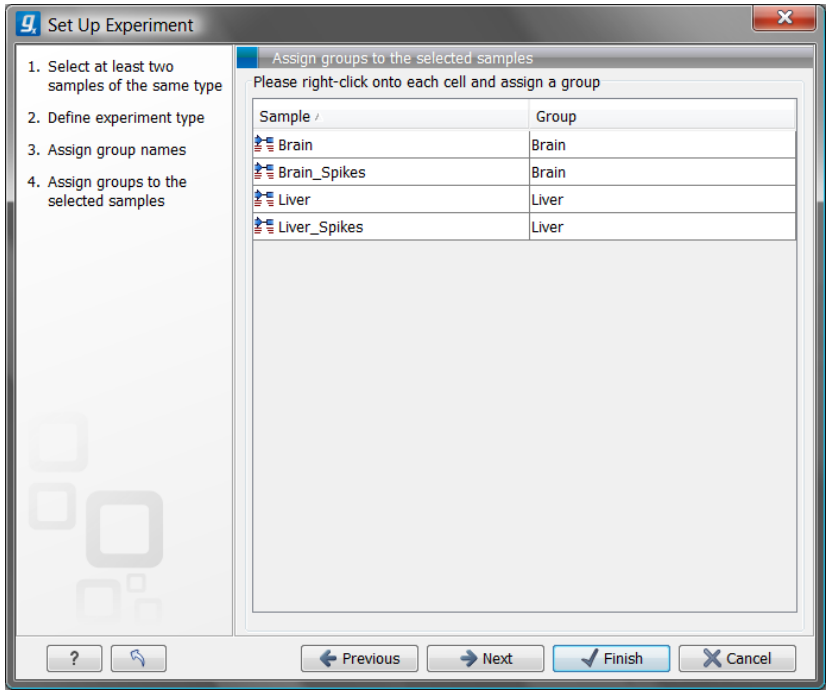
- Two-group comparison: 2群比較
  - Unpaired/Paired:2つの群のサンプルに対応があるかどうか。(同じ固体で違う条件など)
- Multi-group comparison:多群比較

- Use existing expression values from samples: RNA-seqで指定した発現量をそのままつかう場合。
- Set new expression value: 別の発現量を使う場合。

- Experimentを作成する際は、ひとまず何かの検定を行うことになります。

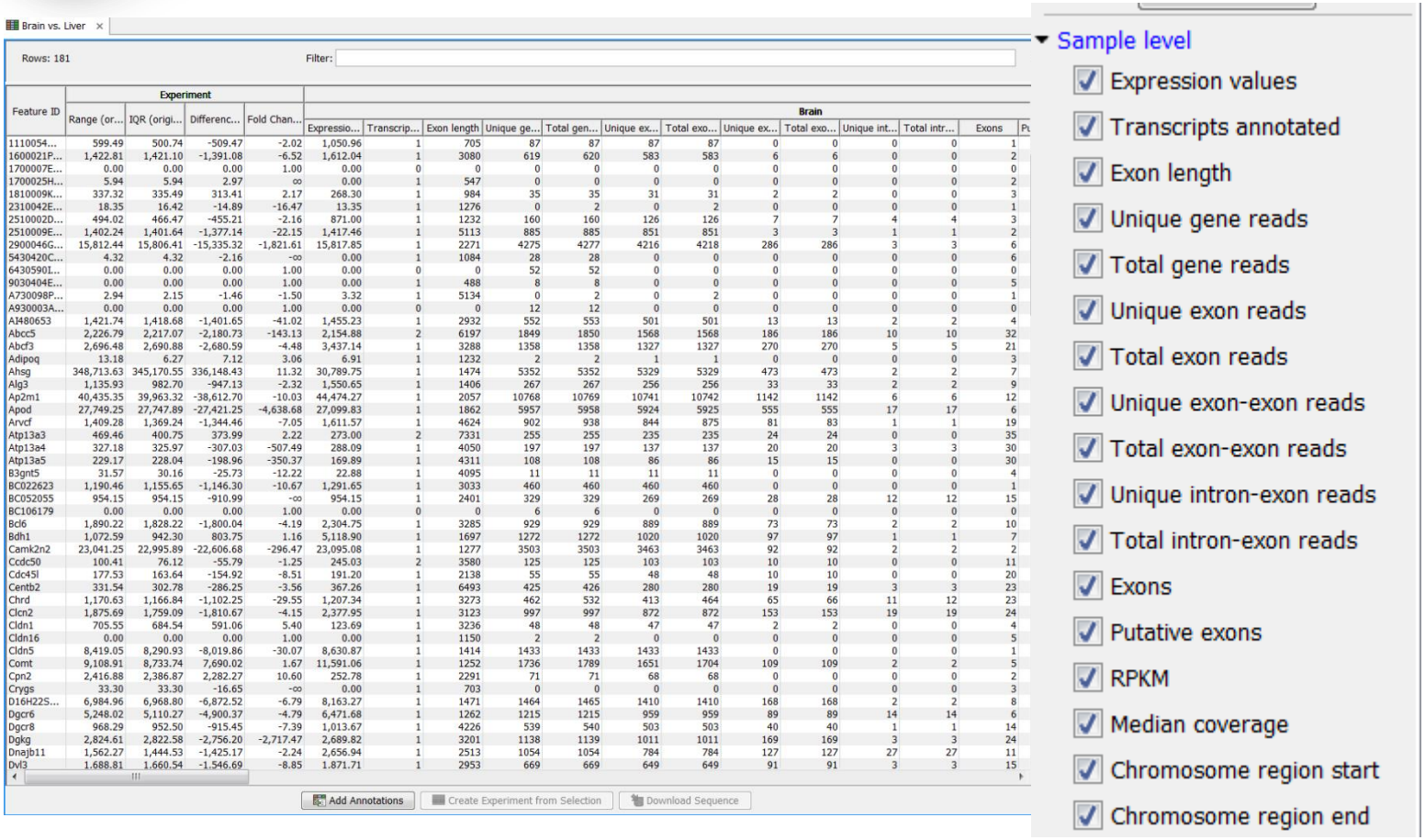
Expression Analysis



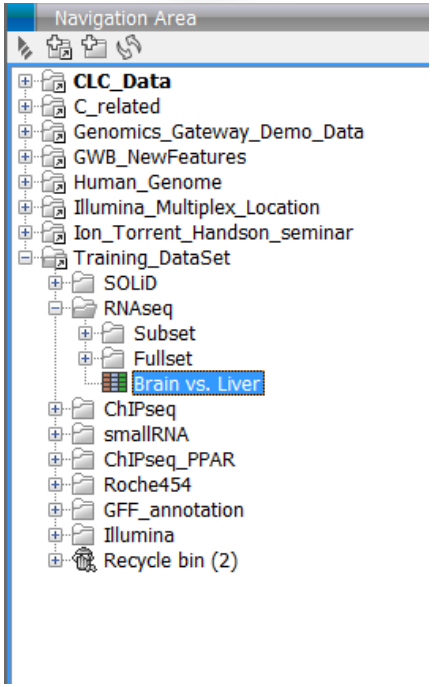


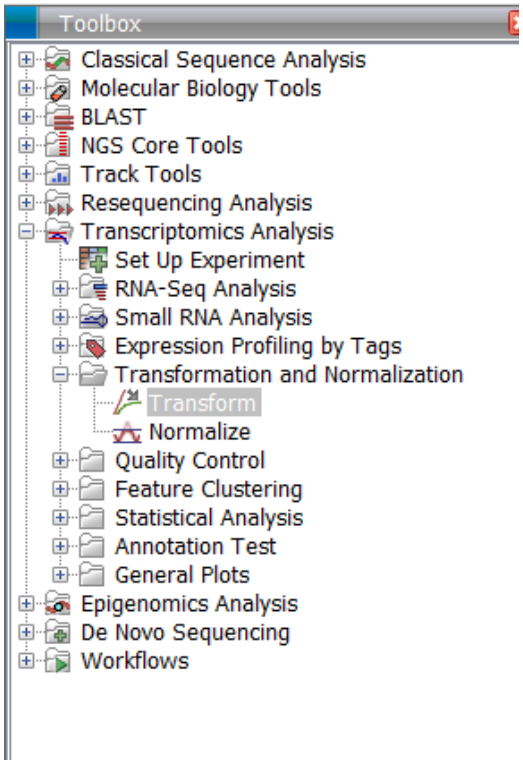
- グループにつける名前を入力
- RNA-seqのデータをグループに割り当てる

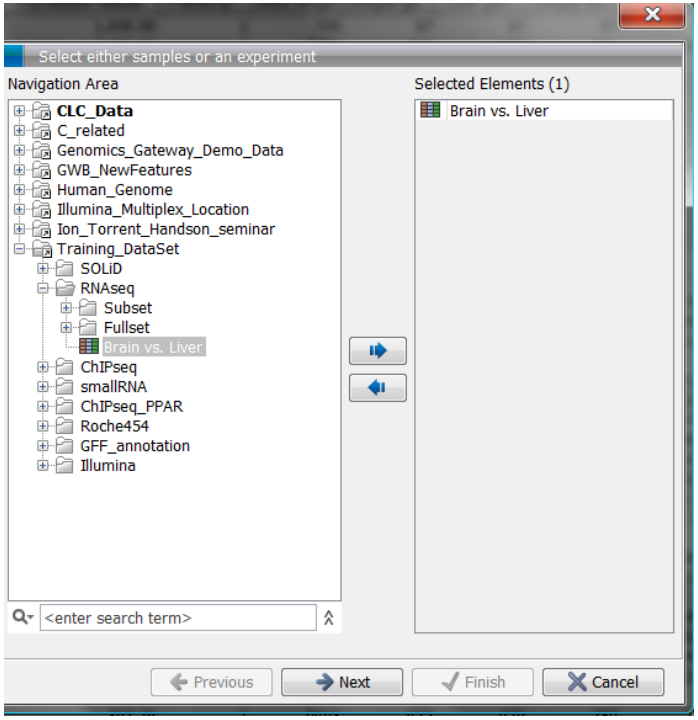
Expression Analysis



Expression Analysis: Log 変換

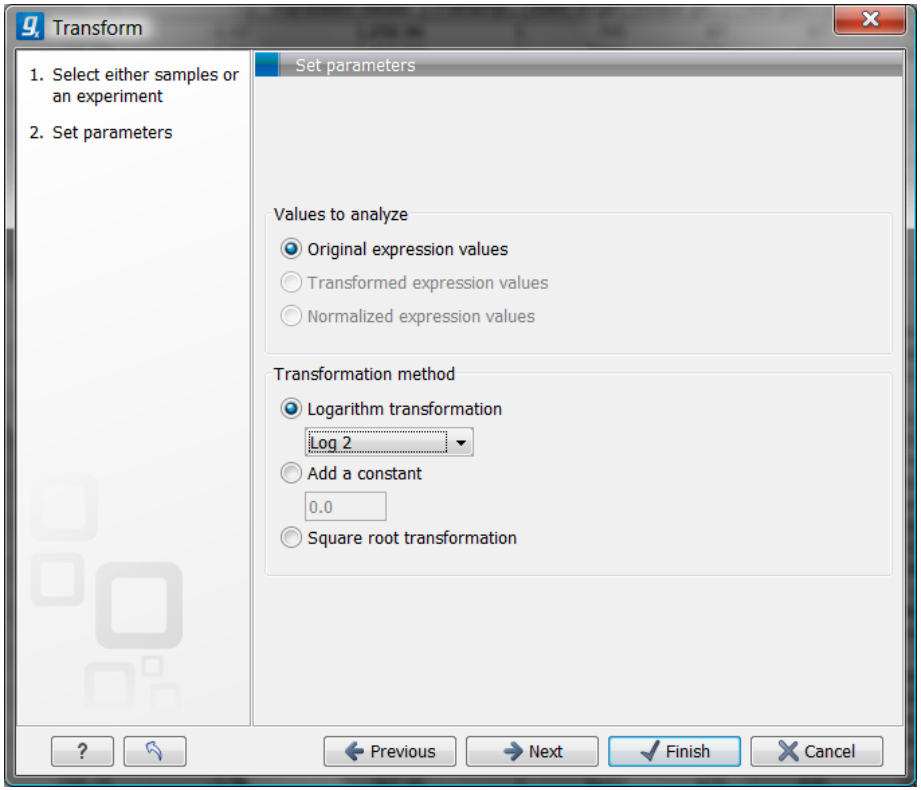






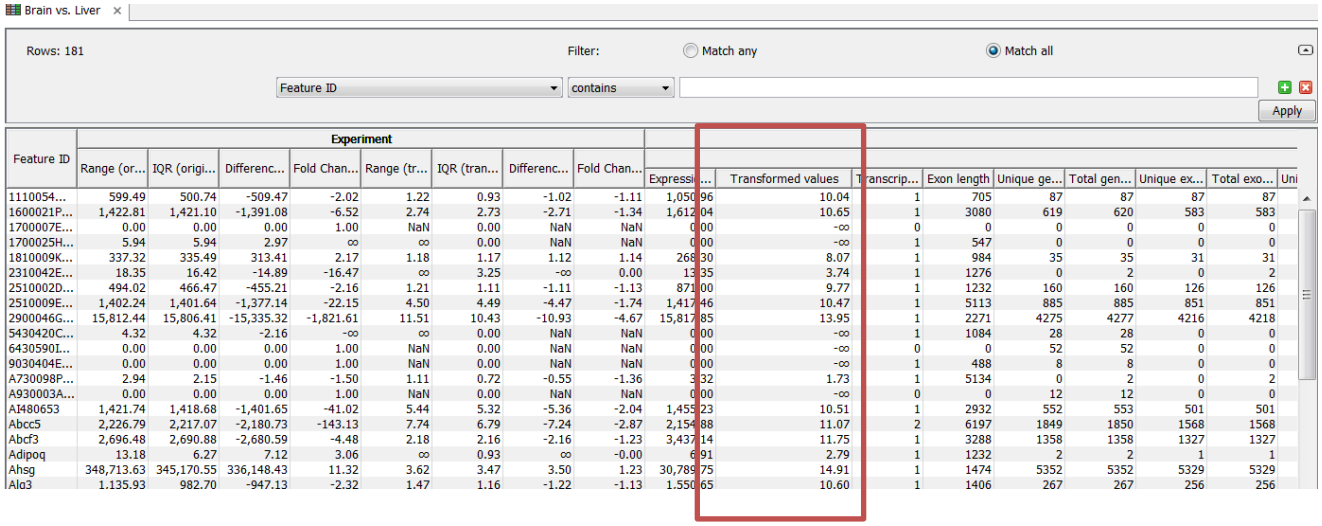
- Navigation Areaから使用するExperimentデータを選択。
- Toolboxから Transform を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

Expression Analysis: Log 変換



- Value to analyze: 解析に使用したい値
  - Original expression values
  - Transformed expression values
  - Normalized expression values
- Transformation method
  - Log2, Log10, Log e
  - 任意の数値を使った変換
  - 平方根

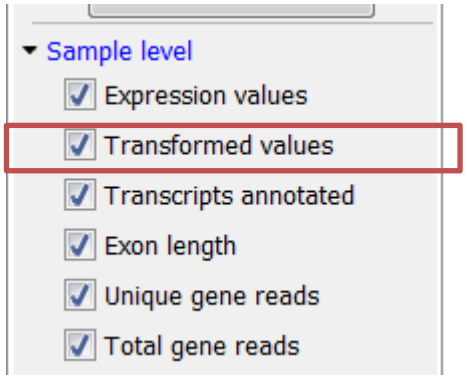
Expression Analysis: Log 変換


Brain vs. Liver

Rows: 181 Filter: Match any Match all

Feature ID contains Apply

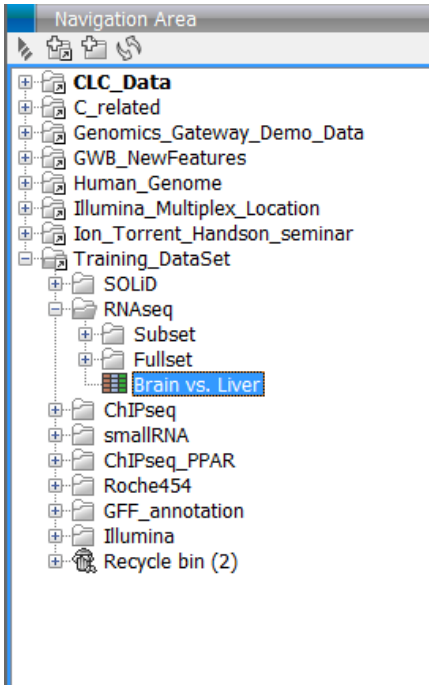
Feature ID	Experiment															
	Range (or...	IQR (origi...	Differenc...	Fold Chan...	Range (tr...	IQR (tran...	Differenc...	Fold Chan...	Expressi...	Transformed values	Transcrip...	Exon length	Unique ge...	Total gen...	Unique ex...	Total exo...	Uni
1110054...	599.49	500.74	-509.47	-2.02	1.22	0.93	-1.02	-1.11	1,050.96	10.04	1	705	87	87	87	87	
1600021P...	1,422.81	1,421.10	-1,391.08	-6.52	2.74	2.73	-2.71	-1.34	1,612.04	10.65	1	3080	619	620	583	583	
1700007E...	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	0.00	NaN	NaN	0.00	-∞	0	0	0	0	0	0	
1700025H...	5.94	5.94	2.97	∞	∞	0.00	NaN	NaN	0.00	-∞	1	547	0	0	0	0	
1810009K...	337.32	335.49	313.41	2.17	1.18	1.17	1.12	1.14	268.30	8.07	1	984	35	35	31	31	
2310042E...	18.35	16.42	-14.89	-16.47	∞	3.25	-∞	0.00	13.35	3.74	1	1276	0	2	0	2	
2510002D...	494.02	466.47	-455.21	-2.16	1.21	1.11	-1.11	-1.13	871.00	9.77	1	1232	160	160	126	126	
2510009E...	1,402.24	1,401.64	-1,377.14	-22.15	4.50	4.49	-4.47	-1.74	1,417.46	10.47	1	5113	885	885	851	851	
2900046G...	15,812.44	15,806.41	-15,335.32	-1,821.61	11.51	10.43	-10.93	-4.67	15,817.85	13.95	1	2271	4275	4277	4216	4218	
5430420C...	4.32	4.32	-2.16	-∞	∞	0.00	NaN	NaN	0.00	-∞	1	1084	28	28	0	0	
6430590I...	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	0.00	NaN	NaN	0.00	-∞	0	0	52	52	0	0	
9030404E...	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	0.00	NaN	NaN	0.00	-∞	1	488	8	8	0	0	
A730098P...	2.94	2.15	-1.46	-1.50	1.11	0.72	-0.55	-1.36	3.32	1.73	1	5134	0	2	0	2	
A930003A...	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	0.00	NaN	NaN	0.00	-∞	0	0	12	12	0	0	
AI480653	1,421.74	1,418.68	-1,401.65	-41.02	5.44	5.32	-5.36	-2.04	1,455.23	10.51	1	2932	552	553	501	501	
Abcc5	2,226.79	2,217.07	-2,180.73	-143.13	7.74	6.79	-7.24	-2.87	2,154.88	11.07	2	6197	1849	1850	1568	1568	
Abcf3	2,696.48	2,690.88	-2,680.59	-4.48	2.18	2.16	-2.16	-1.23	3,437.14	11.75	1	3288	1358	1358	1327	1327	
Adipoq	13.18	6.27	7.12	3.06	∞	0.93	∞	-0.00	6.91	2.79	1	1232	2	2	1	1	
Ahsg	348,713.63	345,170.55	336,148.43	11.32	3.62	3.47	3.50	1.23	30,789.75	14.91	1	1474	5352	5352	5329	5329	
Alg3	1.135.93	982.70	-947.13	-2.32	1.47	1.16	-1.22	-1.13	1.550.65	10.60	1	1406	267	267	256	256	

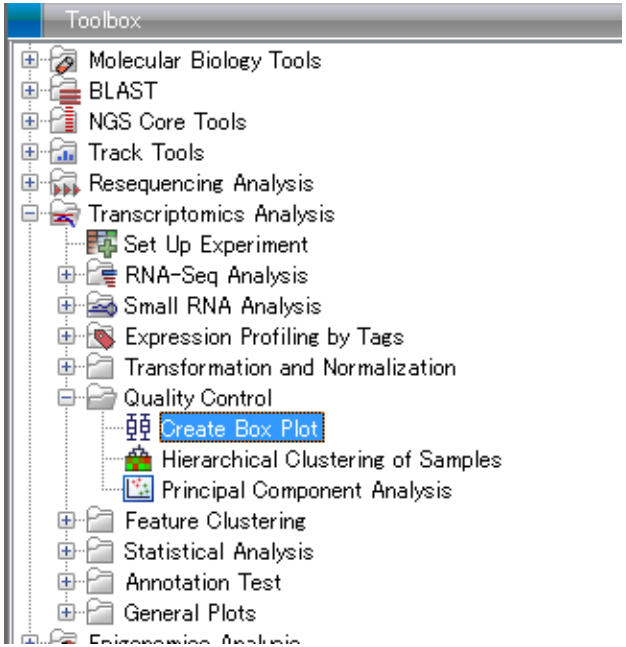


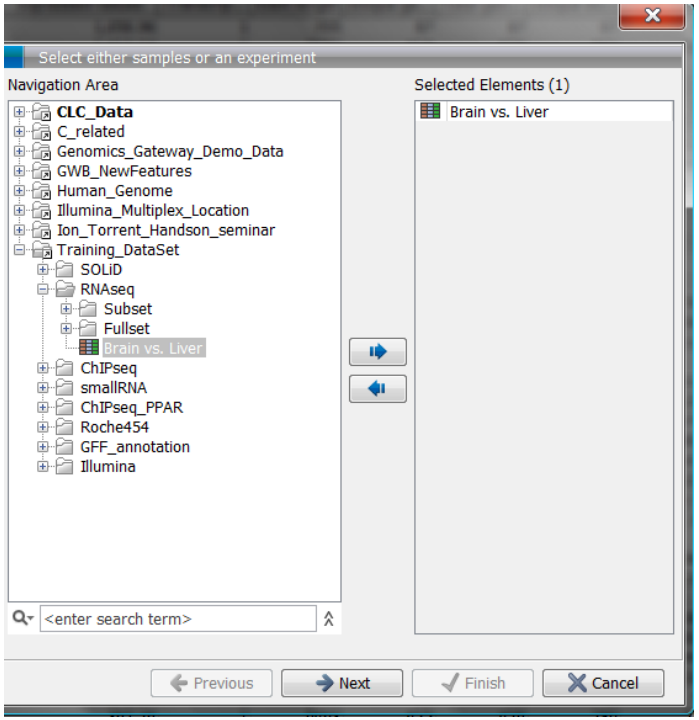
■ 変換された値が表に追加される

Expression Analysis: Box Plot

- Log変換後の結果をBox plotで確認



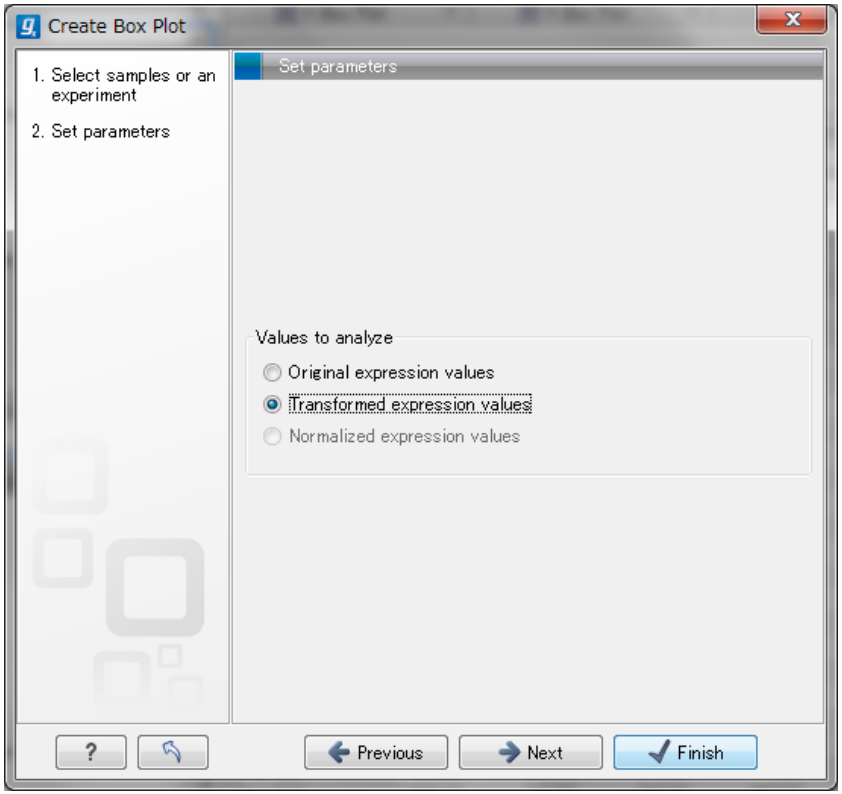




- Navigation Areaから使用するExperimentデータを選択。
- Toolboxから Transcriptomics Analysis > Quality Control > Create Box Plot を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

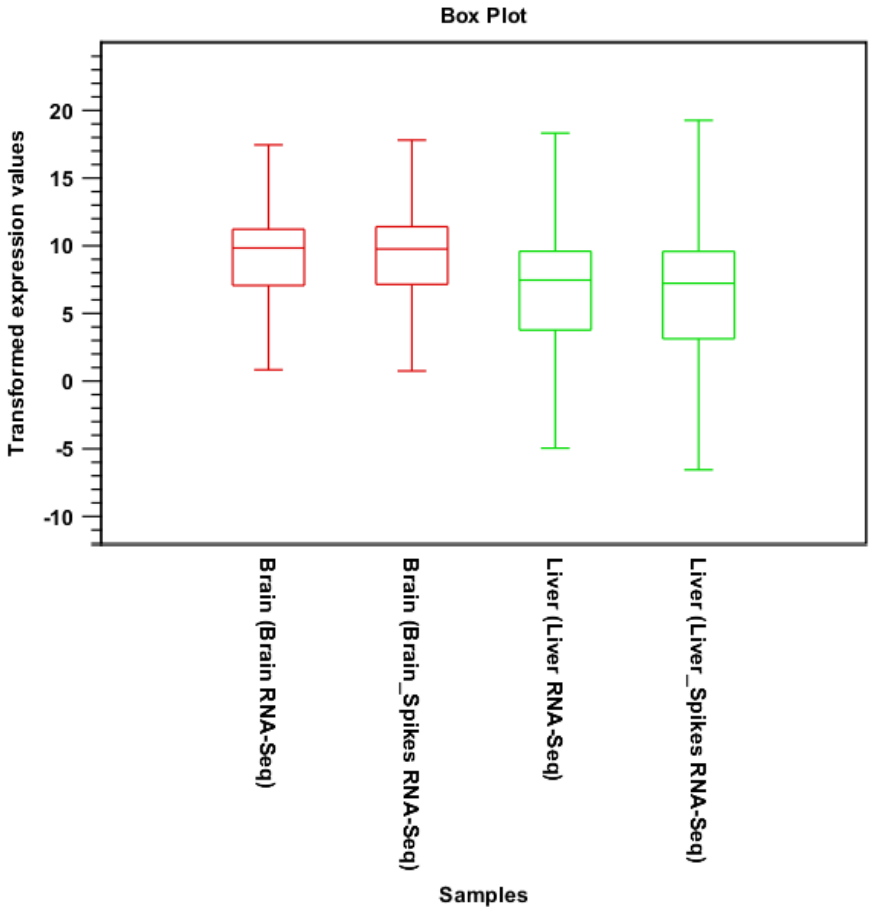
Expression Analysis: Box Plot

- Log変換後の結果をBox plotで確認

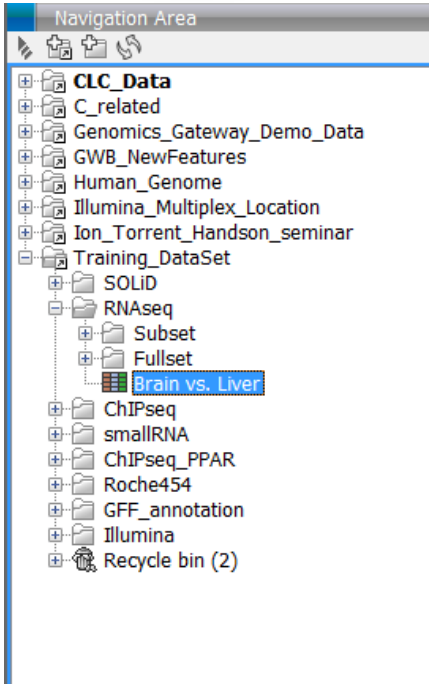


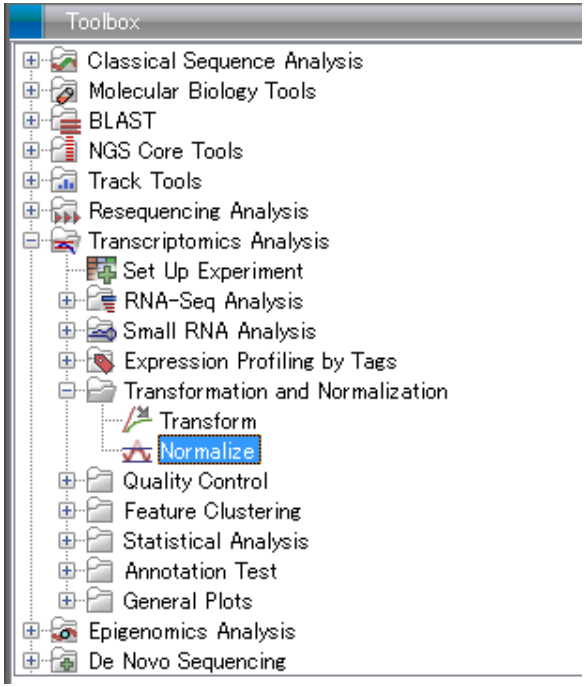
- Value to analyze: 解析に使用したい値を選択
  - もとの発現値
  - 変換後の発現値
  - ノーマライズ後の発現値

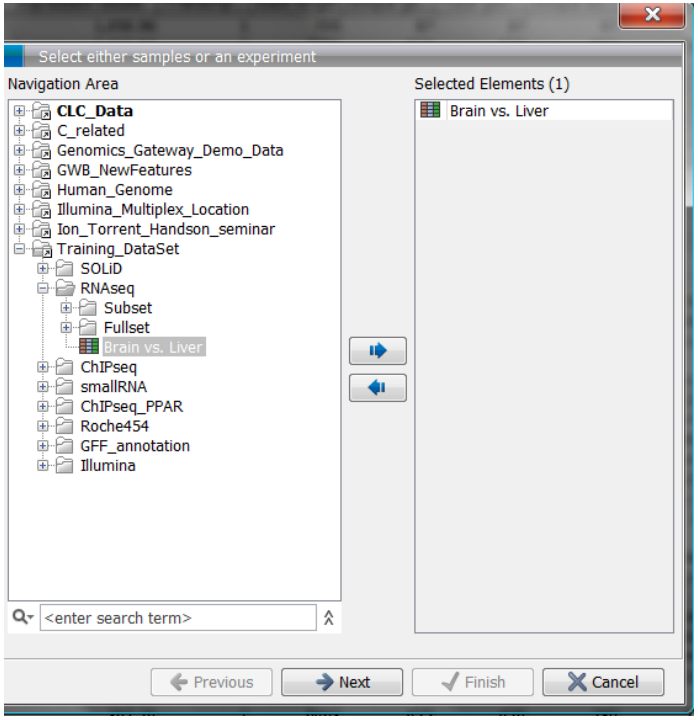
Expression Analysis: Box Plot



Expression Analysis: ノーマライゼーション

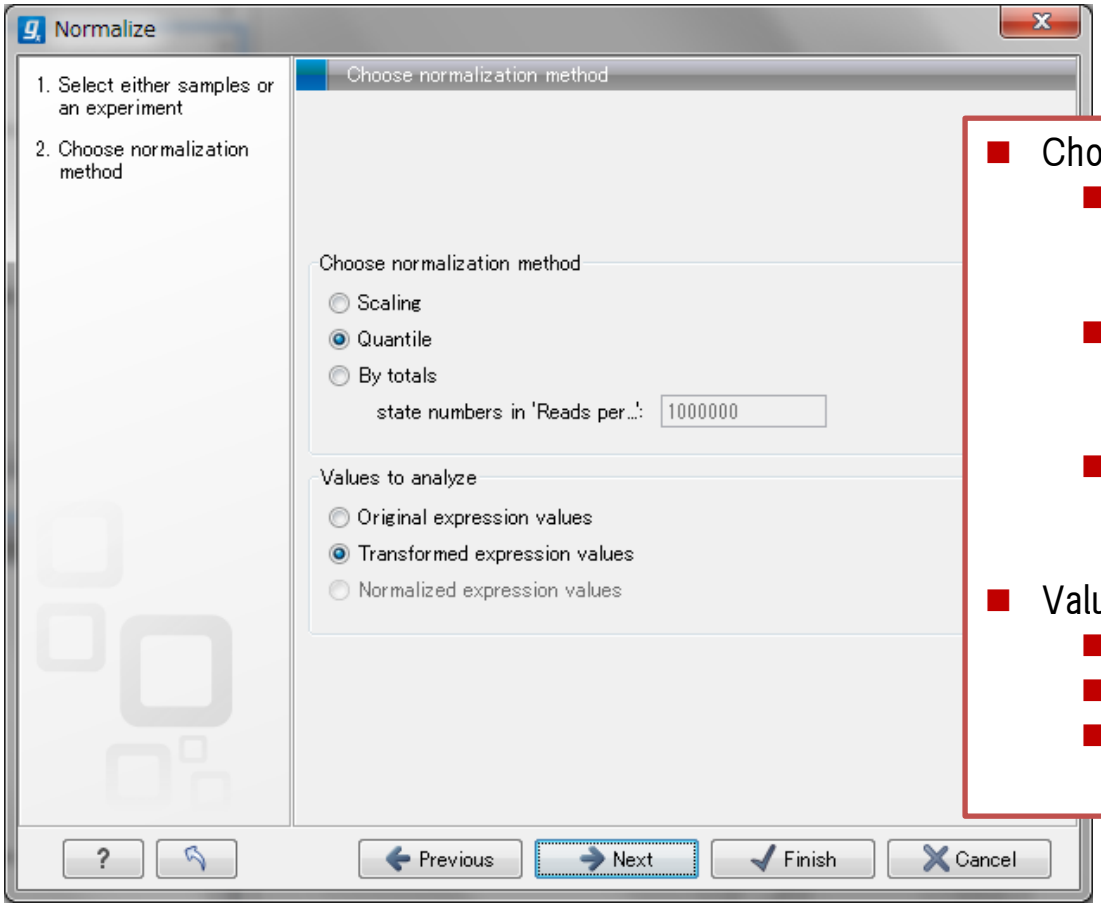






- Navigation Areaから使用するExperimentデータを選択。
- Toolboxから Transform を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

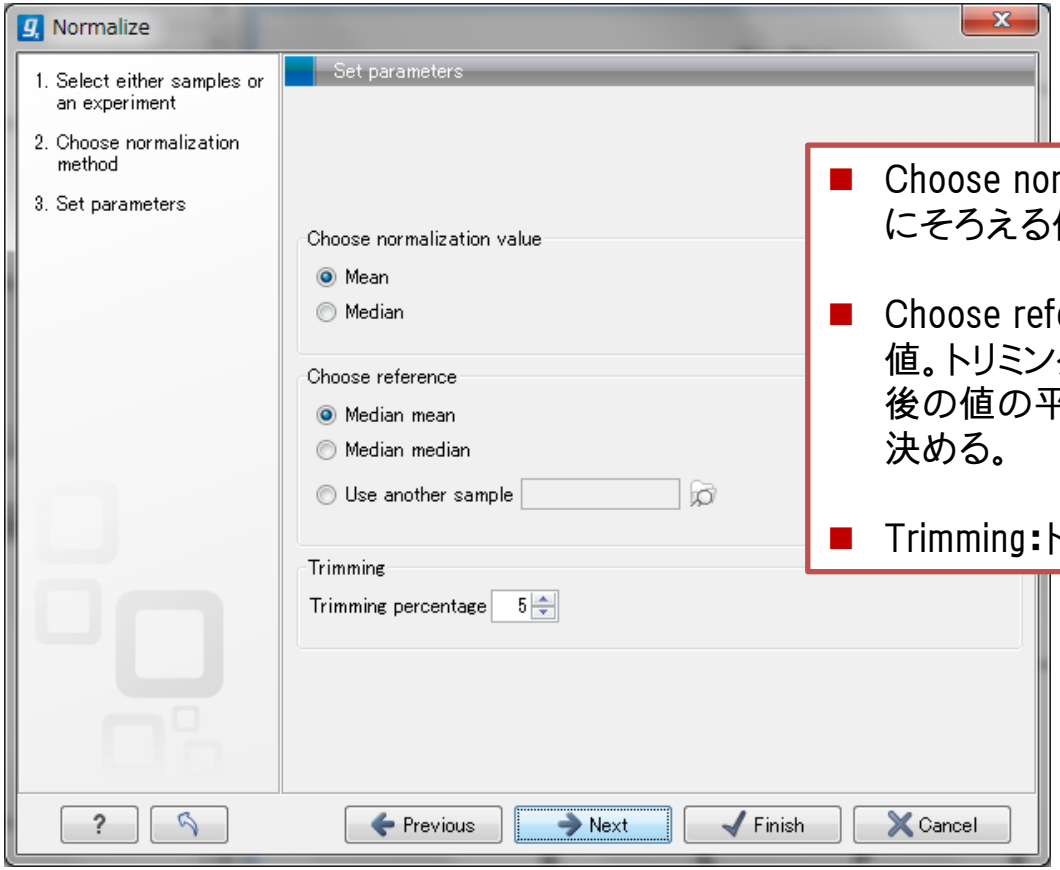
Expression Analysis: ノーマライゼーション



- Choose normalization method
  - Scaling：ある固定の値でノーマライズ。この選択肢を選ぶと、ノーマライズする値について次のウィンドウで選択する。
  - Quantile：グループ間で分布が同じ形から来ていると仮定し、ノーマライズする。
  - By total: 発現値をカウントの値としたときに使用する。
- Value to analyze: 解析に使用したい値を選択
  - もとの発現値
  - 変換後の発現値
  - ノーマライズ後の発現値

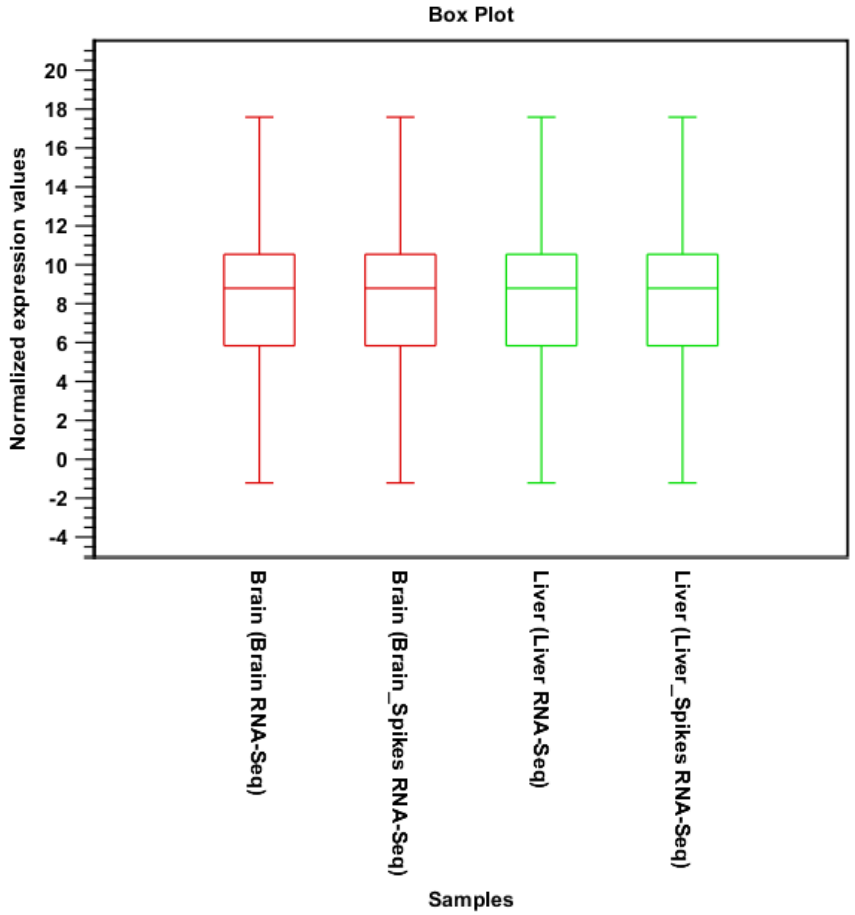
Expression Analysis: ノーマライゼーション

- Scaling を選んだ場合の次の画面

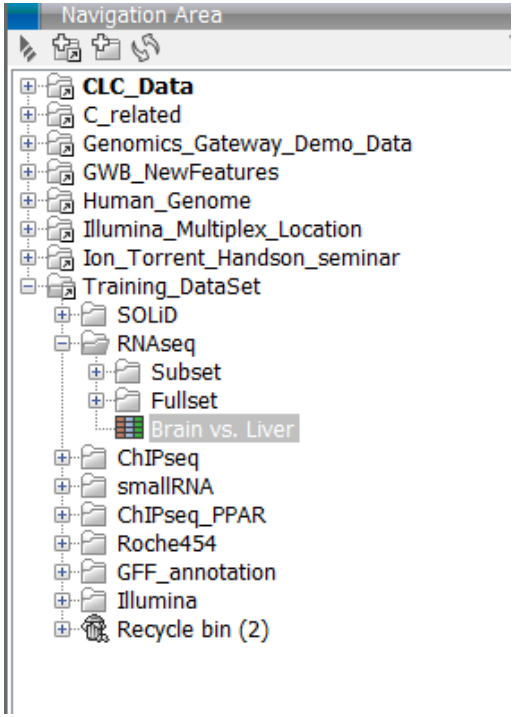


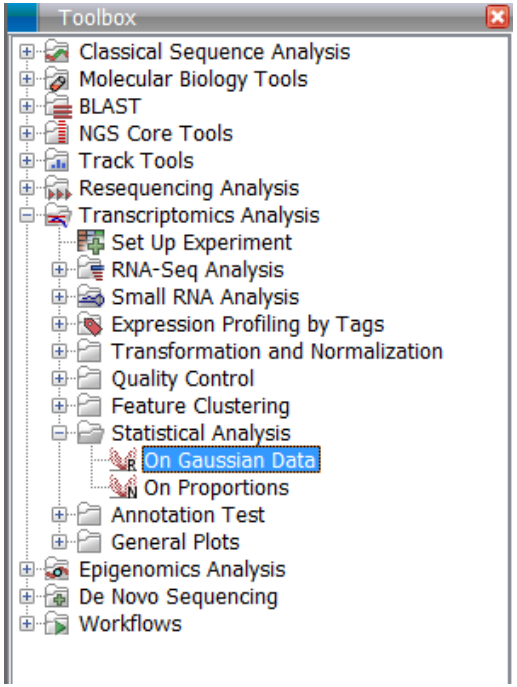
- Choose normalization value:ノーマライズ後にそろえる値を平均値か中央値を選択
- Choose reference:ノーマライズに使用する値。トリミング後の値を使用するが、トリミング後の値の平均値をつかうか中央値を使うか決める。
- Trimming:トリムする%を入力

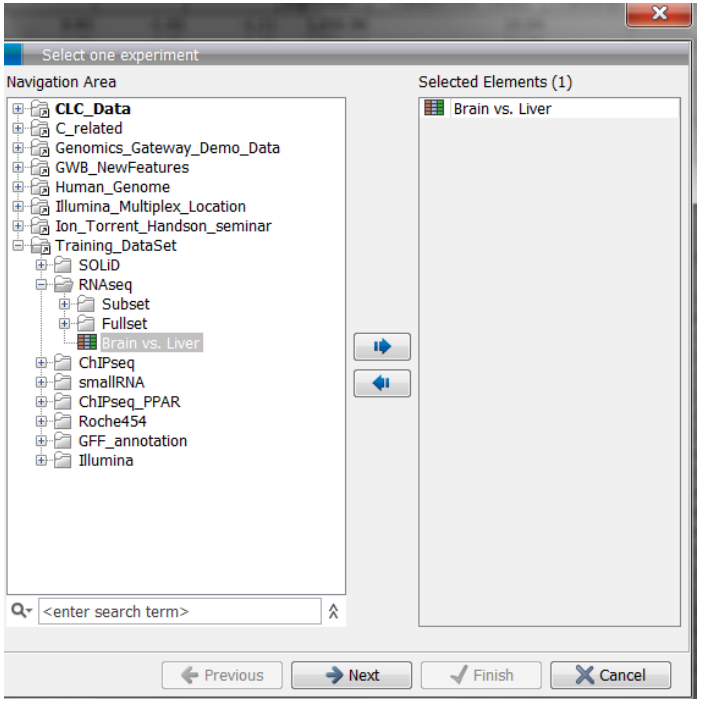
Expression Analysis: ノーマライゼーション



Expression Analysis: t-test

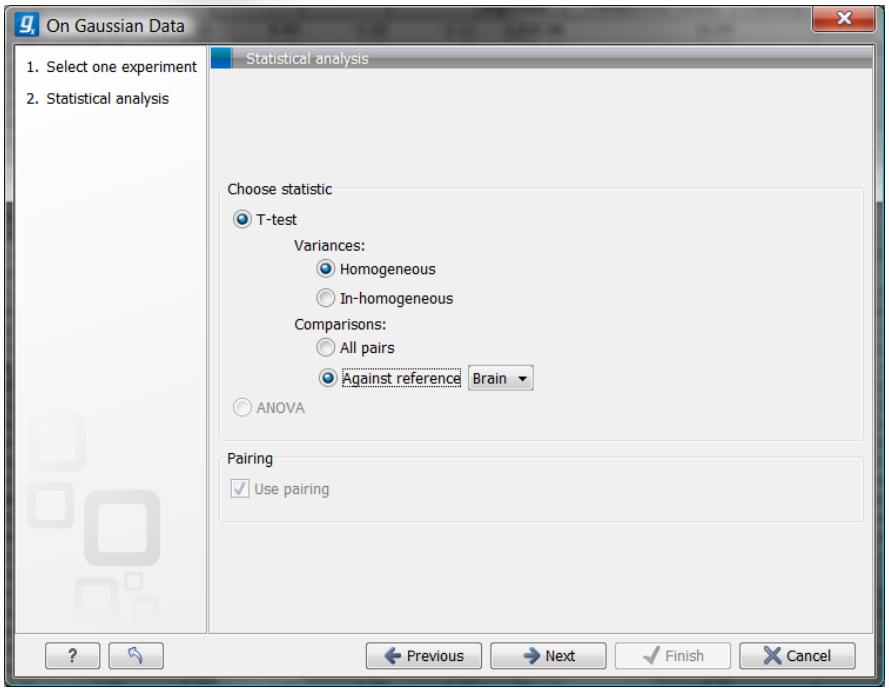


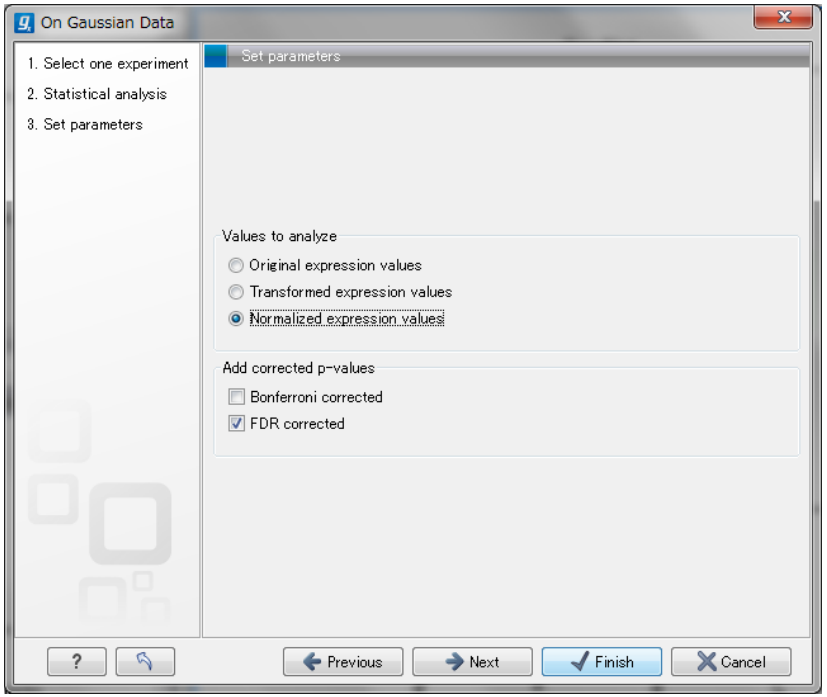




- Navigation Areaから使用するExperimentデータを選択。
- Toolboxから On Gaussian Data を選択、ダブルクリック。
- ウィザードが起動し、選択したデータが選ばれていることを確認。

Expression Analysis: t-test





- t検定
  - 分散
    - 均一な場合
    - 不均一
  - 全てのペアで比較するか、任意のグループに対して比較するか。

- Value to analyze
  - もとの発現値
  - 変換後の発現値
  - ノーマライズ後の発現値
- p値の補正
  - ボンフェローニ
  - FDR

Expression Analysis: t-test

Rows: 181 Filter:

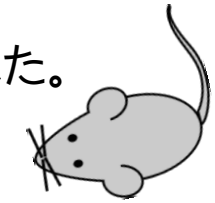
			t-test: Brain vs Liver normalized values					
IQR (normal...	Difference (...	Fold Chang...	Difference	Fold change	Test statistic	P-value	FDR p-valu...	Ex
0.00	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	
0.79	0.83	1.08	0.83	1.08	4.33	0.08	0.25	
0.00	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	
0.74	0.81	1.08	0.81	1.08	5.07	0.11	0.30	
0.10	-0.10	-1.01	-0.10	-1.01	-1.41	0.29	0.69	
0.67	-0.63	-1.06	-0.63	-1.06	-4.38	0.09	0.28	
1.90	1.88	1.18	1.88	1.18	10.32	0.01	0.17	
0.32	-0.32	-1.03	-0.32	-1.03	-∞	NaN	NaN	
0.37	-0.39	-1.04	-0.39	-1.04	-17.06	0.04	0.18	
2.27	2.48	1.45	2.48	1.45	11.91	0.05	0.20	
8.33	-∞	0.00	-∞	0.00	NaN	NaN	NaN	
1.62	-1.58	-1.78	-1.58	-1.78	-6.21	0.04	0.18	
0.00	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	
4.16	4.16	1.77	4.16	1.77	59.49	6.20E-4	0.11	
0.07	-0.16	-1.02	-0.16	-1.02	-1.82	0.32	0.74	
10.66	-10.69	-2.64	-10.69	-2.64	-318.49	2.00E-3	0.12	
0.94	0.90	1.09	0.90	1.09	8.51	0.05	0.20	

その他の機能について

- その他の機能については、弊社ホームページから日本語資料をダウンロードいただけます。

http://www.clcbio.co.jp/index.php?id=223

ご清聴ありがとうございました。



APPENDIX

P値の補正

- 検定を多く繰り返す(たくさんの遺伝子を一度に検定する)と多くのエラーを含んだリストを返す結果となります。
- たとえば、p < 0.05　以下の遺伝子のリストをえたい場合、3つの遺伝子をそれぞれケースとコントロールで検定した結果のリストは　1-(1-0.05)^3 = 0.14　となり、実際に得られるリストは、p値が0.05以下のリストではなく、0.14以下のリストとなります。
- ボンフェローにではこれを抑えるため、設定するp値を検定する数(発現解析では遺伝子の数、上記の例では3)で割り、小さなp値の閾値でリストを取得します。

P-value correction

FDR

- Say $p_1 < p_2 < p_3 < \cdots < p_i < \cdots < p_m$ and α is threshold.
- $i = m$
- $If\ \ p_i < \alpha \frac{i}{m}$ (1) を満たすならば、$k = i$
- (1)式が満たされない場合 $i = m - 1$ として (1)を再度計算
- $p_1, \cdots, p_k$に対応する仮説を棄却する。

カウントデータの検定

Kal’s test

- 2つのグループのカウントデータを比較し、その差が統計的に有意かどうかを検定する手法。

Aの分散

$$Z = \frac{p_A - p_B}{\sqrt{\frac{p_0(1-p_0)}{N_A} + \frac{p_0(1-p_0)}{N_B}}}, \quad \text{with}$$

Bの分散

$$p_A = \frac{X_A}{N_A}, \quad p_B = \frac{X_B}{N_B}, \quad p_0 = \frac{X_A + X_B}{N_A + N_B},$$

where the two library sizes are N_A and N_B and the two counts are X_A and X_B, respectively.

Kal, A. J. *et al.* Dynamics of Gene Expression Revealed by Comparison of Serial Analysis of Gene Expression Different Carbon Sources. **10,** 1859–1872 (1999).
Baggerly, K. a., Deng, L., Morris, J. S. & Aldaz, C. M. Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. Bioinformatics 19, 1477–1483 (2003).

カウントデータの検定

Baggerley's test

- Kal's test はレプリケートを必要としませんが、レプリケートがあった場合でも、レプリケート内のばらつきを考慮できません。これに対応するため、Baggerleyのテストでは、レプリケート内のばらつきを考慮するために提案された手法です。
- 統計量の算出方法は、Kal'sテストと似ていますが、分散の推定が複雑になっています。

$$t_w = \frac{\hat{p}_A - \hat{p}_B}{\sqrt{\hat{V}_A + \hat{V}_B}}$$