

## マイクロアレイデータ解析 (4日目、5日目、6日目)

アレイデータのファイルや、実習の連絡事項を共有できる **wiki** を立ち上げました。  
<http://atlas.rnai.jp/microarray/>

〈4日目〉

### i) Excel によるデータ解析

#### 1. 全サンプルのデータを1つのワークシートにまとめる

行番号とプローブ番号の対応関係はどのサンプルも同じ。したがってサンプル X のデータの隣にサンプル Y のデータをコピー&ペーストすれば1枚のワークシートにまとまる。上記を繰り返して、全サンプルの **gProcessedSignal**, **ControlType**, **gIsWellAboveBG** の値を1枚のワークシートにまとめる。この状態で一度ファイルを保存しておくといよい。

最初のサンプルで残す列：

- **FeatureNum** - スポットの番号
- **ControlType** - コントロールのスポットかどうか？
- **ProbeName** - プローブ名
- **GeneName** - 遺伝子名
- **SystematicName** - 遺伝子名
- **gProcessedSignal** - green (Cy-3) のシグナル強度
- **gIsWellAboveBG** - シグナルがバックより十分高いか？

第2サンプル以降で残す列：

- **ControlType** (実は残さなくても全サンプル同じ)
- **gProcessedSignal**
- **gIsWellAboveBG**

2. 発現量が少なくアレイで検出できなかったものは、**gIsWellAboveBG** の値が 0 となっている。今回は、全てのサンプルで **gIsWellAboveBG** の値が 1 となっているもののみを解析の対象とする。また、**ControlType** が 0 以外のものはコントロールのプローブなので、解析の対象からははずす。各自、関数を利用したり「並べ替え」機能を用いて解析の対象となる行を抽出すること。

#### 3. X-Y プロット

サンプル X の **gProcessedSignal** の値 (以下、X) を横軸、サンプル Y の **gProcessedSignal** の値 (以下、Y) を縦軸にプロット。

#### 4. MA プロット

$\log_{10}(XY)$ を横軸、 $\log_2(Y/X)$ を縦軸にプロット。

- ・縦軸が 0 とはどういう意味か？ → 発現量に変化なし
- ・縦軸が 1 とはどういう意味か？ → 発現量が 2 倍に上昇
- ・縦軸が -1 とはどういう意味か？ → 発現量が半分に減少

#### 5. 解析

replicate 間で X-Y プロットおよび MA プロットを作成。

◎ サンプル 1 (mock その 1) 対 サンプル 2 (mock その 2)

- ・fold change が 1 以上のものは全体の何%か。
- ・fold change が -1 以下のものは全体の何%か。
- ・fold change が 0.1 以上のものは全体の何%か。
- ・fold change が -0.1 以下のものは全体の何%か。

◎ mock 対 let-7b/let-7b\*で X-Y プロットおよび MA プロットを作成。

- ・fold change が 1 以上のものは全体の何%か。
- ・fold change が -1 以下のものは全体の何%か。
- ・fold change が 0.1 以上のものは全体の何%か。
- ・fold change が -0.1 以下のものは全体の何%か。

◎ pTuD-control 対 pTuD-let-7b で X-Y プロットおよび MA プロットを作成。  
(同様)

#### 1'. 参考：アレイ間の normalization (75%tile 法)

アレイ間の全体的なシグナル強度の差を補正するために必要な操作で、方法もいくつかある。ここでは 75%tile 法でおこなう。

各サンプルごとに、コントロールを除く全プローブでの発現量の値を順番に並べ替え、順位 75%に位置するもの(発現量が高いほうから数えて 25%目の遺伝子)の値を求める。この 75%tile の値は通常サンプルごとに異なるが、それらの相乗平均値  $a$  を求める。各サンプルごとに、全プローブの値に ( $a /$  そのサンプルにおける 75%tile 値) を掛ける。全サンプルで 75%tile の値を  $a$  に揃える。

#### 1". 参考：アレイ間の normalization (quantile) → 余裕がある人は Excel で実装

シグナル強度の分布を、サンプル間で強制的に合わせてしまう normalization の手法。各サンプルごとに、コントロールを除く全プローブでの発現量の値を順番に並べ替える。1 位になっているプローブでシグナル値の相乗平均を求め、その値で置き換える ( $\log_2$  を求めて相加平均を取るのが簡単)。2 位以下も同様に、同順位のプローブでシグナル値の相乗平均を取って値を置き換える。結果、全サンプルで分布が同一になる。

例) 発現量が  $n$  位の  $\log_2(\text{シグナル値})$  が (-0.4, 0.1, 0.2, -0.3)なら、(-0.1, -0.1, -0.1, -0.1)に置き換えてしまう。

〈5日目〉

## ii) GeneSpring GXによる解析

### 0. GeneSpring GX のインストール

講師からライセンスコードを受け取り、GeneSpring GX をインストールする。詳細は wiki を参照。なお、帰る前に必ずライセンスを Surrender すること。忘れると 6 日目に使えない。

#### 1. データの読み込み

GeneSpring GX を起動

Project → New Project → 適当な名前をつける

Create new experiment

Experiment name → 適当な名前をつける

Experiment type → Agilent Single Color

Workflow type → Advanced Analysis

Experiment notes → メモ。空欄でも可

Load Data → Choose Files から数値データ (TXT) を全部選択。8 班分。

/home08/sirna/Microarray/2010-06-18.1/\* が 1 枚目のスライドのデータ

/home08/sirna/Microarray/2010-06-18.2/\* が 2 枚目のスライドのデータ

Use spot information in data files to flag the data のみにチェック。以下推奨設定。

Feature is not positive and significant → Absent

Feature is not Uniform → Marginal

Feature is not above background → Absent

Feature is Saturated → Marginal

Feature is population outlier → Absent

Normalization algorithm → Quantile

Baseline Options → Do not perform baseline transformation

初回のみ Technology Agilent 何とかが not found. などというエラーがでるが、「はい」と答えれば必要なファイルが自動的にダウンロードされる。

#### 2. サンプル名の入力・replicate の指定

画面右側の Experiment Setup タブ → Experiment Grouping → Add Parameter

Parameter name → (例) sample name などと入れておく。

Samples に表示されているデータファイルに対応するサンプル名を、Parameter Values に入力していく (mock, let-7b/let-7b\*, ...)。同じ Parameter Value を入力したものが自動的に replicate として扱われる。

続いて、画面右側の Experiment Setup タブ → Create Interpretation

先ほど入力したパラメータをチェックして Next → Average over replicates in conditions がチェックされていることを確認。他は変更せず終了。この操作で、replicate 間の平均の値が算出され、以降その値を利用して解析を進めることができる。

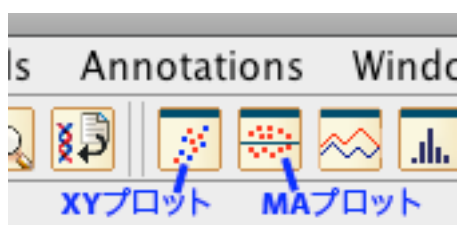
### 3. バックに近い値や、異常な値を除去

画面右側の Quality Control タブ → Filter Probesets by Flags → Next

at least [8] out of 8 samples have acceptable values

=1 サンプルでも Absent と判定された値があるものは除外。

### 4. X-Y プロット、MA プロットを、Excel と同様に作成する。



※GeneSpring GXにおけるMAプロットでは、たとえばX-Axisにlet-7b/let-7b\*、Y-Axisに mock を選択すると、let-7b/let-7b\*のサンプルで増加している遺伝子が上方 (>0) に、減少している遺伝子が下方 (<0) にプロットされる。

### 5. 注目している遺伝子の抽出

遺伝子 (アクセッション番号) リストを読み込み、その遺伝子に色をつける。

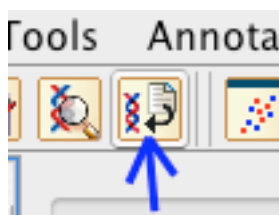
遺伝子リストの例：

Accession
NM_003380
NM_014616
NM_000368
NM_177402
.....

1 行目にタイトル、2 行目以降にアクセッション番号を 1 行につき 1 個記載。

上記をテキストファイルに保存する。

Import entity list from file ボタンを押す。



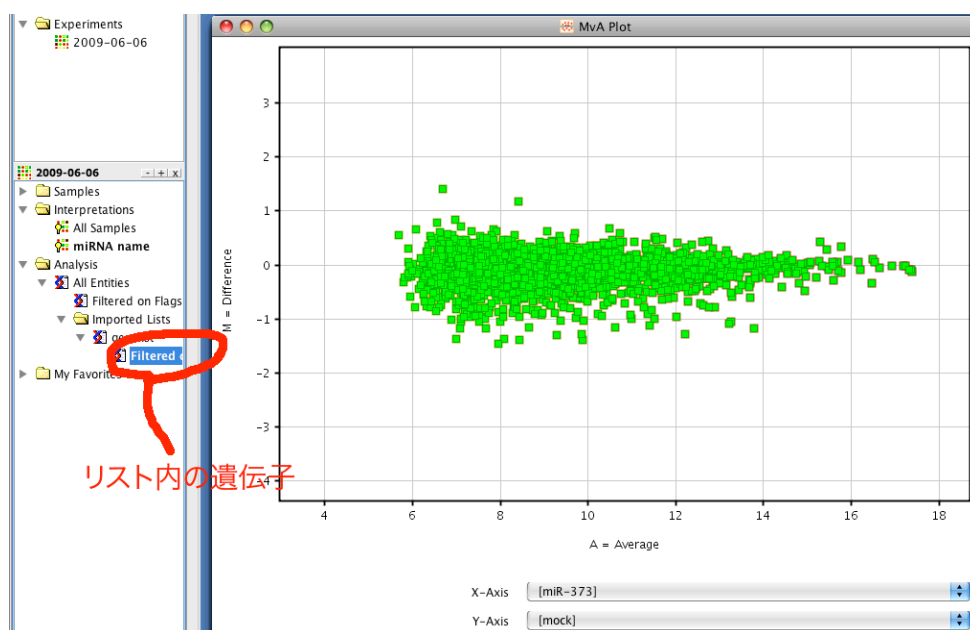
Choose file → 遺伝子リストのテキストファイルを選択

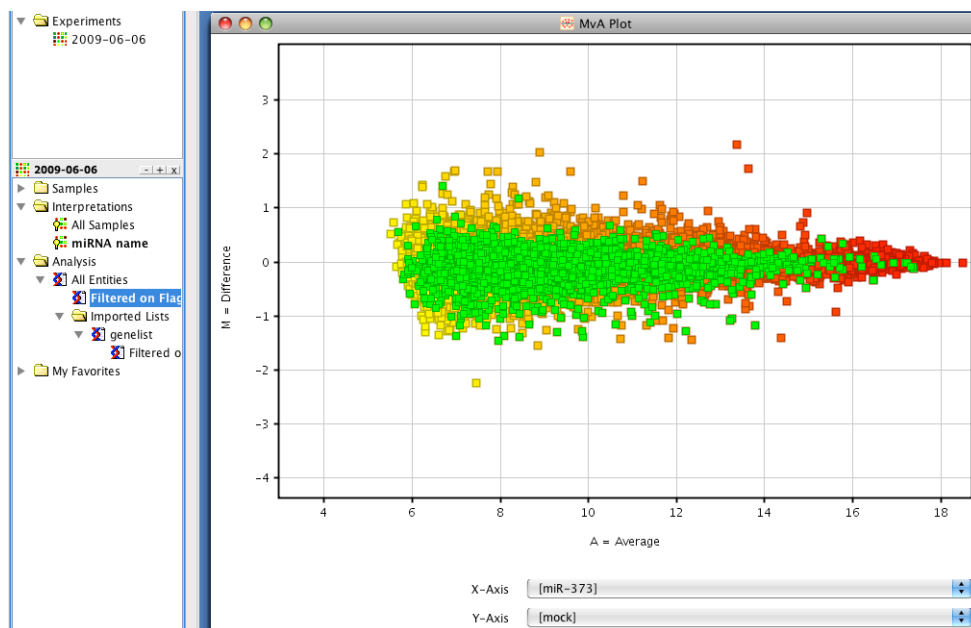
Choose file column to match → 読み込ませた遺伝子リストの1行目

Choose technology column to match → GenBank Accession

(アレイのプローブ ID や遺伝子名など、他の項目のリストを読むことも可能)

画面左側の Analysis フォルダ内に Imported Lists フォルダができ、その中に読み込んだリストが保存されている。それを選択すると、リスト内の遺伝子のみがプロットされる。この状態で、「3. バックに近い値や、異常な値を除去」と同じ操作をおこなう。すべての点を選択した状態で、All Entities 内の Filtered on Flags Present or Marginal を選択すると、全体のなかでリスト内の遺伝子がどこにプロットされているかわかる。





6. miRNA の seed 部分(\*)と相補的な配列が 3' UTR に存在する遺伝子は、miRNA の標的となりうるということが報告されている。今回の実験で、let-7b/let-7b\*の seed マッチする遺伝子がどのように変動しているか検証せよ。

### iii) 参考

1. miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk/>

miRNA のデータベース。

2. 入力した配列を 3'UTR にもつ遺伝子 (アクセッション番号) のリストを表示するページ : <http://atlas.rnai.jp/seedmatch/>

〈6日目〉

### iii) GeneSpring GX によるクラスター解析 (クラスタリング)

クラスター解析 (クラスタリング) は、発現の変動パターンが類似した遺伝子同士をグルーピングする手法。今回は、let-7b の標的遺伝子を特定することを目的として、「mock 対 let-7b で発現量が減少」し、かつ「pTuD-cont 対 pTuD-let-7b で発現量が増加」した遺伝子を抽出する。

## 1. データの読み込み

最後の部分だけ変更。Baseline Options → Baseline to “median” of control samples

1 行目 (1 班の mock) を選択して Assign Value → サンプル 1 を選択

2 行目 (3 班の let-7b/let-7b\*) を選択して Assign Value → サンプル 1 を選択

3 行目 (5 班の pTuD-cont) を選択して Assign Value → サンプル 3 を選択

4 行目 (7 班の pTuD-let-7b) を選択して Assign Value → サンプル 3 を選択

5~8 行目 (以下同様)

この操作は、それぞれのサンプルについて、指定したコントロールのサンプルのシグナル値 (log) を引いた値を求めるものである。

## 2. サンプル名の入力・replicate の指定

昨日と同様。ただし、Create Interpretation の画面で、[mock]と[pTuD-control]のチェックははずしておく (値が全部ゼロなので解析する意味がない)。

## 3. バックに近い値や、異常な値を除去

昨日と同様。

## 4. クラスタ解析

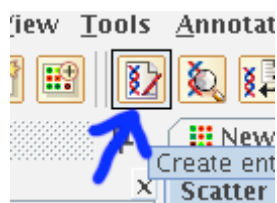
画面右側の Analysis タブ → Clustering

Clustering Algorithm → Hierarchical

他のパラメータは、まずはデフォルトのまま進む。系統樹付きのヒートマップが表示される。ヒートマップ上で遺伝子群をドラッグして選択した状態で、たとえば X-Y プロットを表示させると、選択した遺伝子群が X-Y プロット上でハイライトされる。

## 5. 遺伝子群の選択

遺伝子群を選択した状態で Create entity list from selection ボタンを押す。



適当な名前をつける。画面左側の Analysis フォルダ内に保存され、そこをクリックすればいつでも保存した遺伝子群をハイライトできる。

「mock 対 let-7b で発現量が減少」し、かつ「pTuD-cont 対 pTuD-let-7b で発現量が増加」した遺伝子群を entity list に保存する。また、let-7b/let-7b\*の seed が相補的な遺伝子群を entity list に保存する。両者に相関があるかを検討せよ。