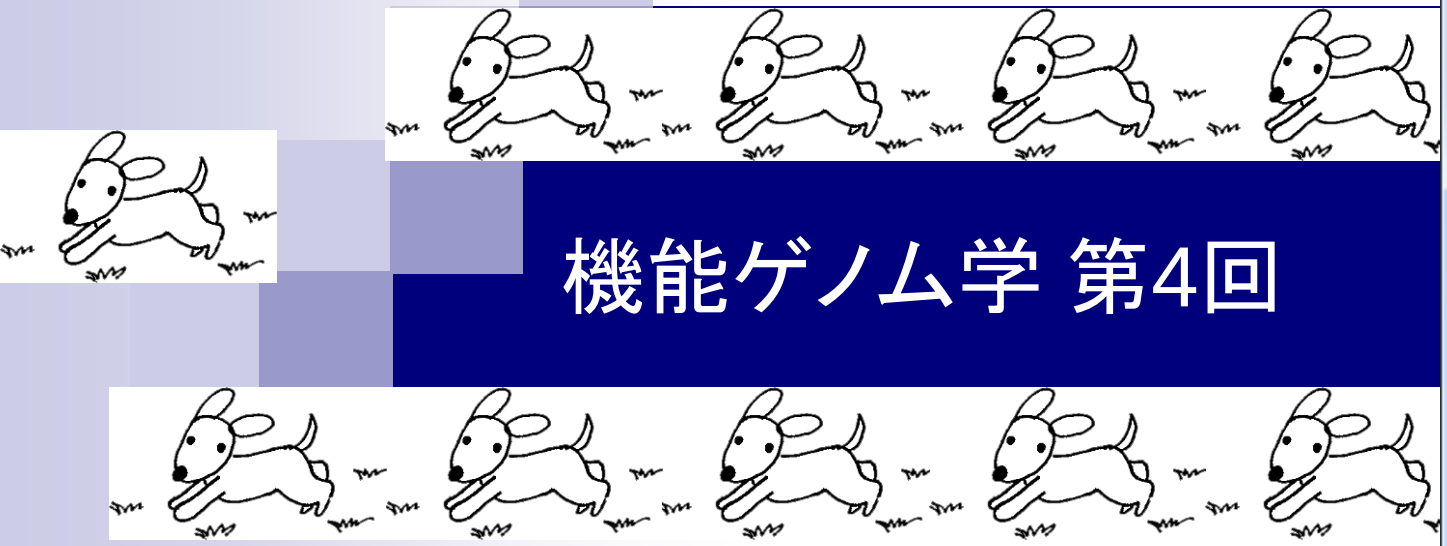
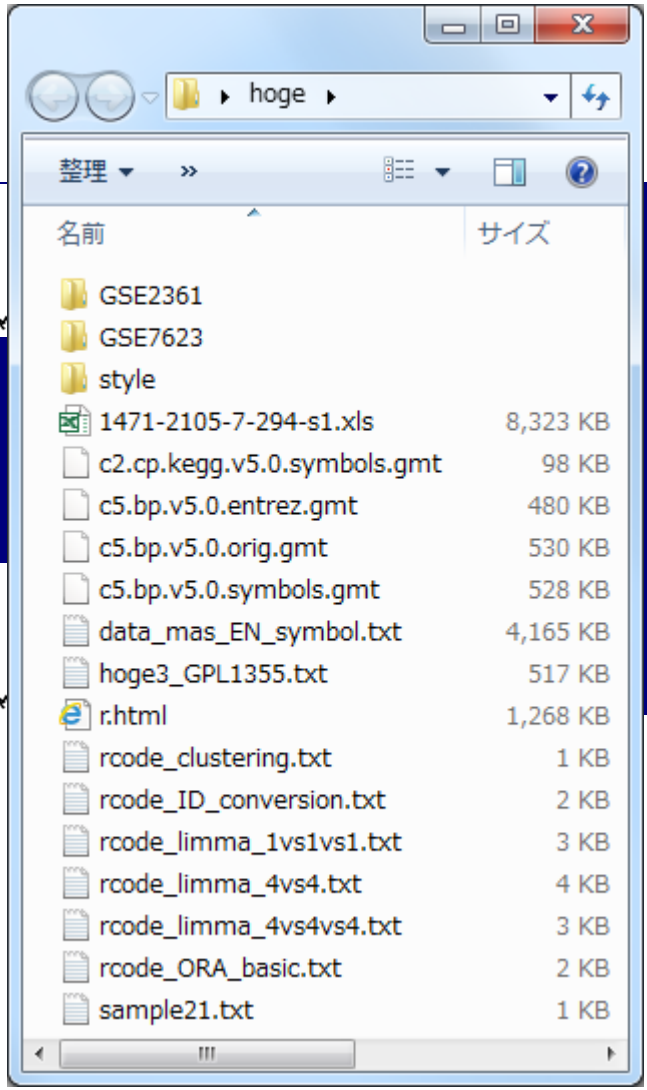
USBメモリ中のhogeフォルダをデスクトップにコピーしておいてください。



# 機能ゲノム学 第4回

大学院農学生命科学研究科
アグリバイオインフォマティクス教育研究プログラム
門田幸二（かどた　こうじ）
kadota@iu.a.u-tokyo.ac.jp
http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/



# 講義予定

細胞中で発現している全転写物（トランスクリプトーム）の解析技術は、マイクロアレイから次世代シーケンサ（RNA-seq）に移行しつつあります。しかしRNA-seq解析の多くは、マイクロアレイの知識を前提としています。本科目では、マイクロアレイデータを主な例として、各種トランスクリプトーム解析手法について解説します。また、Rのスキルアップを目指します

- 第1回（2016年05月09日）
  - 原理、各種データベース、生データ取得
  - 教科書の1.2節、2.2節周辺
- 第2回（2016年05月16日）
  - 数値行列作成、クラスタリング、実験デザイン
  - 教科書の3.2節周辺
- 第3回（2016年05月23日）
  - 発現変動解析（多重比較問題とFDR）、各種プロット（M-A plot）
  - 教科書の3.2節と4.2節周辺
- 第4回（2016年05月30日）
  - 発現変動解析（デザイン行列や3群間比較）
  - 機能解析（Gene Ontology解析やパスウェイ解析）

基本走り書きですので細かい表現には目をつぶってください

# 感想やコメントのところ

- DEG検出法（IBMTとlimma）×前処理法（MAS5とRMAとRobLoxBioC）の6通りの組み合わせで解析したけど、どれを論文にのせればいいですか？
  - 目的にもよりますが、講義内容通りのFDR閾値を満たすDEG数に関する議論などを行いつつ、本物をDEGを上位にランキングしたい場合には、「MAS5 -> IBMT」または、「RMA -> Rank products」の組み合わせがおススメです。根拠となる手法組合せガイドライン論文は「Kadota et al., Algorithms Mol. Biol., 4: 7, 2009」です。
  - Kadota 2009の論文では、「MAS5 -> WAD法」がおススメだと書いてあります。確かに本物をDEGを上位にランキングしたい場合にはこれがおススメです（再現性も抜群に高いですので…）。しかしこの方法は完全にヒューリスティックな方法であり、統計的手法ではありません。従って、FDR閾値やDEG数がこのデータセット中にいくつあるかという議論はできません。それでもよい場合は、「MAS5 -> WAD法」をご利用ください。
  - 尚、RobLoxBioCは2010年にpublishされた方法ですので、門田は体系的な検証を行っておりません。M-A plotの印象としてはRMAと同じような感じがしますので、おそらく「RobLoxBioC -> Rank products」でいいと思います。
  - というわけで、「MAS5 -> IBMT」、「RMA -> Rank products」、「RobLoxBioC -> Rank products」のどれでもいいとは思います。これらの平均順位や傾向を総合的に議論するのが最もよいとは思います。この3つの結果のバラツキは頭の片隅において、Discussion時にその点を意識しながら記載すれば100点だと思います。

# 感想やコメントのところ

論文中であまり明記されないノウハウ的なところがわかっていれば倍率変化でも問題ないと思います（もちろん私見です）

- 参考論文が倍率変化を使っていたがヤバイかもね？
  - 実は、Rank productsは倍率変化に基づく方法です。2016.05.23の最後のスライドを見てもわかりますが、RMA法は同一群のバラツキ分布が（MAS5に比べて）横軸である発現レベル非依存です。これはRMA前処理法を使って得られた発現データを入力とする場合は、発現レベルに応じてうまく傾向を捉える（モデル構築を行う）戦略の重要度が低いことを意味します。Kadota 2009論文で、確かこのあたりの議論を行っていたような気がしますが（もう忘れました）、いずれにせよ「RMA -> Rank products」の組み合わせのよさは、Kadota 2009で示されていますし、感覚的にもそれは妥当だと思います。なので、もしその参考論文がRMA前処理法を使っていたなら、おそらく倍率変化で上位x個をとり、RT-PCRなどでconfirmする戦略で問題ないと思います。
  - しかし、（私の他所での講習会や講演でもよく述べていることですが）なぜ先人の倍率変化の結果が受け入れられているかにも目を向けるべきです。実は、このあたりはノウハウ的なところなのであまり表には出ないことですが、シグナル強度が低い（つまり発現が低い）ところはノイズの割合が大きいところです。実用上、そのあたりは揺らぎが大きく信頼度が低いということを、年を重ねたヒトは経験的に知っています。それゆえ、倍率変化でランキングしつつも、先人は全体的な発現レベルが高い遺伝子をとれば安全である（RT-PCRでも発現変動をconfirmできる確率が高い）ということを知っているので（おそらく）そうしています（論文中に明記するヒトもいれば、そうでないヒトもいるでしょう）。
  - そして、そのあたり（倍率変化が大きく全体的な発現レベルも高い）は統計的手法でも倍率変化でも共通して「本物の可能性が高い遺伝子」であり、WADはその直感を数式で表現したもの

# 感想やコメントのところ

- 休憩は20分もいらない
  - 過去の受講生の要望に基づくものですが、現在の受講生の要望が当然優先されるべきでしょう。最後はそうします。
- 何故FDRのことをq-valueというのか疑問でした
  - 「p-valueという値があって、有意水準α(これはfalse positive rate (FPR)ともいう)という閾値で判断」と対応させると、「q-value (or adjusted p-value)という値があって、false discovery rate (FDR)という閾値で判断」という関係で捉えるといいでしょう。

# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

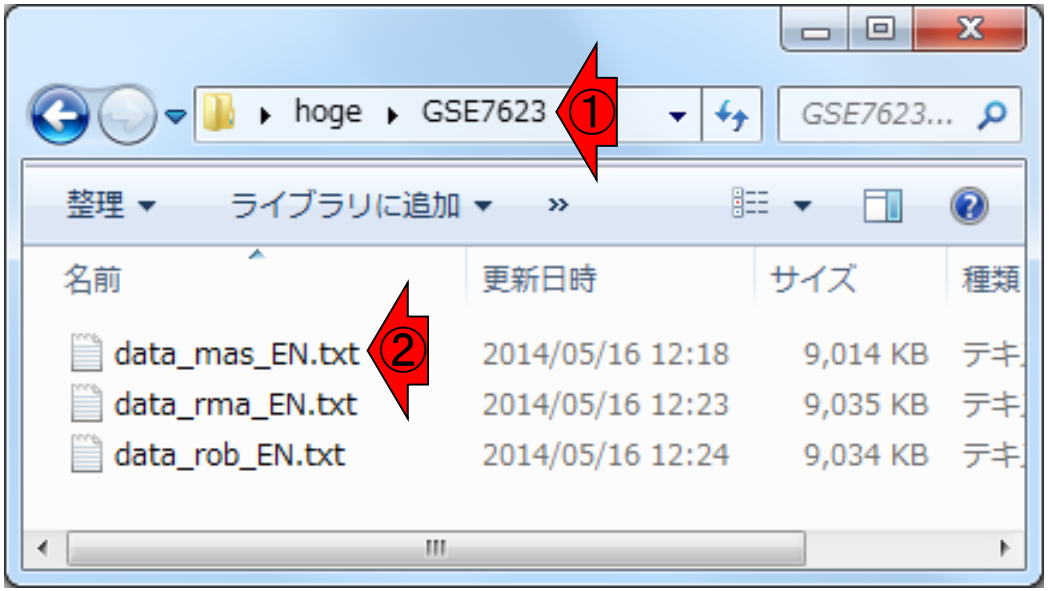
# アレイデータ

hogeフォルダ中に3つの前処理法の実行結果ファイルがあります。MAS5 (data_mas_EN.txt)、RMA (data_rma_EN.txt)、RMX (data_rob_EN.txt)

- Affymetrix GeneChip
  - Ge et al., *Genomics*, **86**: 127–141, 2005
    - **GSE2361**、GPL96 (Affymetrix Human Genome U133A Array)、22,283 probesets
    - **ヒト36サンプル**：Heart (心臓)、Thymus (胸腺)、Spleen (脾臓)、Ovary (卵巣)、Kidney (腎臓)、Skeletal Muscle (骨格筋)、Pancreas (膵臓)、Prostate (前立腺)、…
  - Nakai et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, **72**: 139–148, 2008
    - **GSE7623**、GPL1355 (Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array)、31,099 probesets
    - **ラット24サンプル**：Brown adipose tissue (褐色脂肪組織; BAT)8サンプル、White adipose tissue (白色脂肪組織; WAT)8サンプル、Liver (肝臓; LIV)8サンプル
      - BAT 8サンプル：通常(BAT_fed) 4サンプル vs. 24時間絶食(BAT_fas) 4サンプル
      - WAT 8サンプル：通常(WAT_fed) 4サンプル vs. 24時間絶食(WAT_fas) 4サンプル
      - LIV 8サンプル：通常(LIV_fed) 4サンプル vs. 24時間絶食(LIV_fas) 4サンプル
  - Kamei et al., *PLoS One*, **8**: e65732, 2013
    - **GSE30533**、GPL1355 (Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array)、31,099 probesets
    - **ラット10サンプル**：全てLiver (肝臓)サンプル
    - iron-deficient diet (Iron_def) 5サンプル vs. control diet (Control) 5サンプル

# アレイデータ

①「hoge – GSE7623」。GSE7623 (Nakai et al., 2008)の対数変換後のデータ



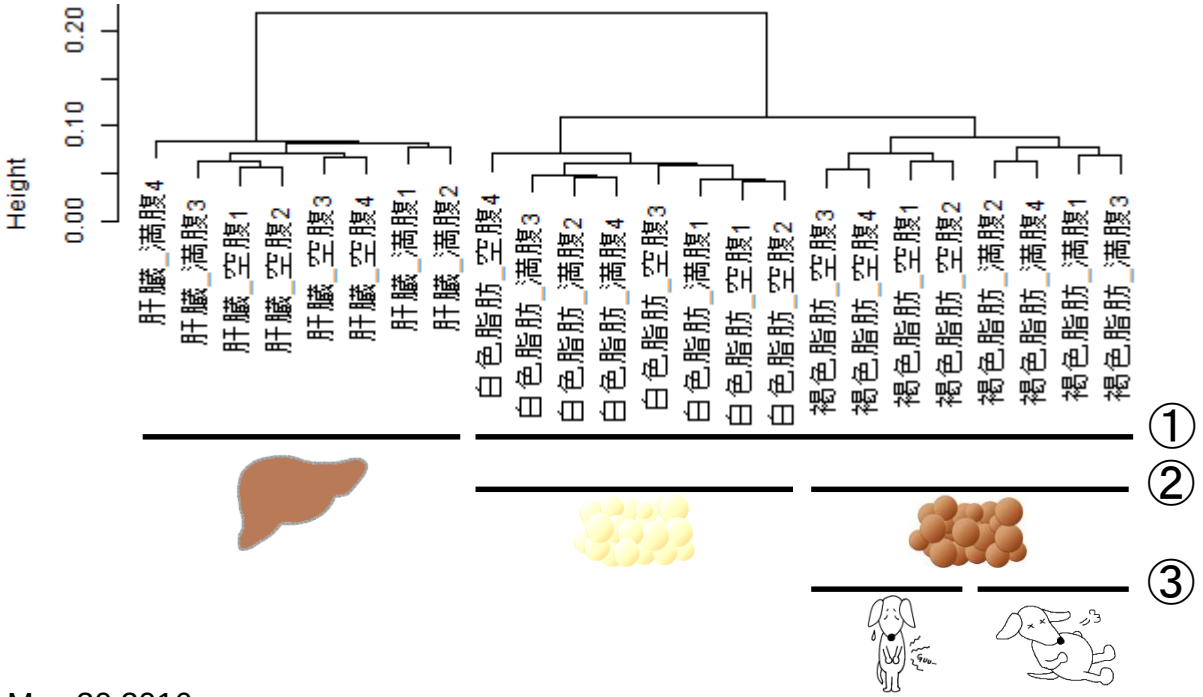

③ data_mas_EN.txt

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | BAT_fed1 | BAT_fed2 | BAT_fed3 | BAT_fed4 | BAT_fas1 | BAT_fas2 | BAT_fas3 | BAT_fa |
| 2 | 1367452_at | 12.784463 | 12.447082 | 12.805908 | 12.304718 | 12.589425 | 12.607532 | 11.815378 | 12.43 |
| 3 | 1367453_at | 11.801247 | 12.152935 | 11.942227 | 11.968477 | 11.845375 | 11.681727 | 12.078672 | 12.04 |
| 4 | 1367454_at | 11.389902 | 11.160757 | 11.145987 | 11.212088 | 11.540652 | 11.308877 | 11.49885 | 11.40 |
| 5 | 1367455_at | 12.364348 | 12.529744 | 12.432574 | 12.604011 | 12.441991 | 12.249935 | 12.281827 | 12.19 |
| 6 | 1367456_at | 13.448486 | 13.543046 | 13.552794 | 13.629799 | 13.36913 | 13.244278 | 13.424371 | 13.32 |
| 7 | 1367457_at | 10.404028 | 10.69632 | 10.475078 | 10.45579 | 10.141921 | 10.290666 | 10.146529 | 10.2 |
| 8 | 1367458_at | 9.9253387 | 10.244544 | 9.9720008 | 9.9576072 | 8.702884 | 9.3578792 | 9.2134367 | 9.499 |

おさらい

# 2群間比較(limma)

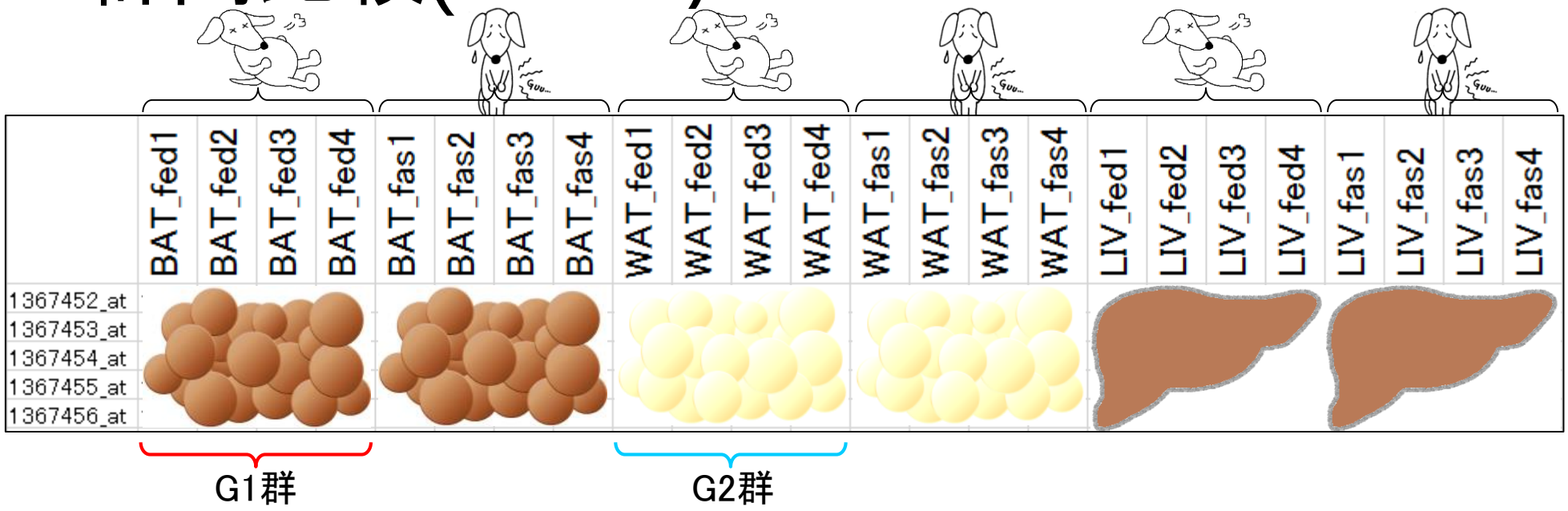
- Nakai et al., Biosci Biotechnol Biochem., 72: 139–148, 2008
  - GSE7623、GPL1355 (Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array)、31,099 probesets
  - Rat 24 samples：Brown adipose tissue (褐色脂肪組織; BAT)8サンプル、White adipose tissue (白色脂肪組織; WAT)8 samples、Liver (肝臓; LIV)8 samples
    - BAT 8 samples：通常(BAT_fed) 4 samples vs. 24時間絶食(BAT_fas) 4 samples
    - WAT 8 samples：通常(WAT_fed) 4 samples vs. 24時間絶食(WAT_fas) 4 samples
    - LIV 8 samples：通常(LIV_fed) 4 samples vs. 24時間絶食(LIV_fas) 4 samples

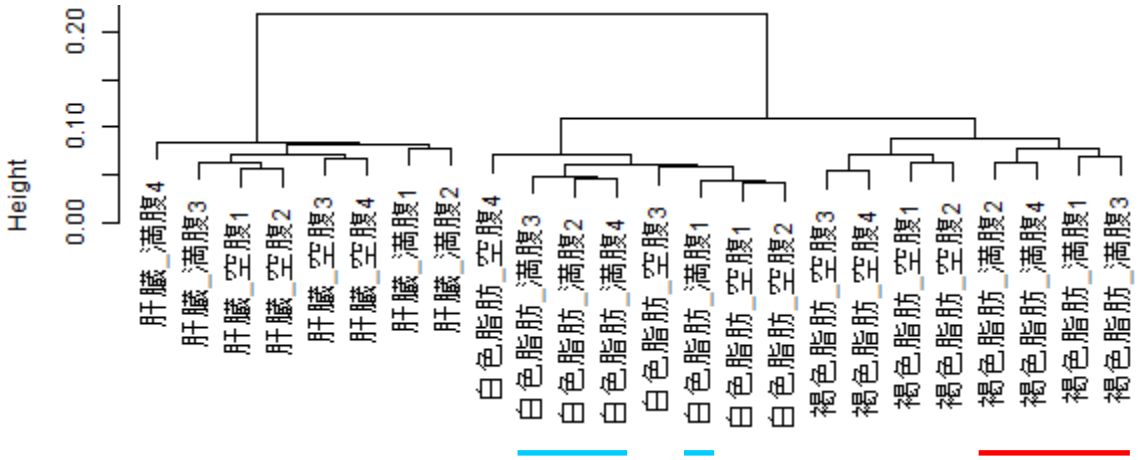



rcode_clustering_png.txtの実行結果。
①肝臓と脂肪間で大きく2つのクラスターに分かれている。
②脂肪の中でも白色脂肪と褐色脂肪に分かれている。
③褐色脂肪は空腹(24時間絶食)と満腹(通常)できれいに分かれている。

4 BAT_fed vs. 4 WAT_fed

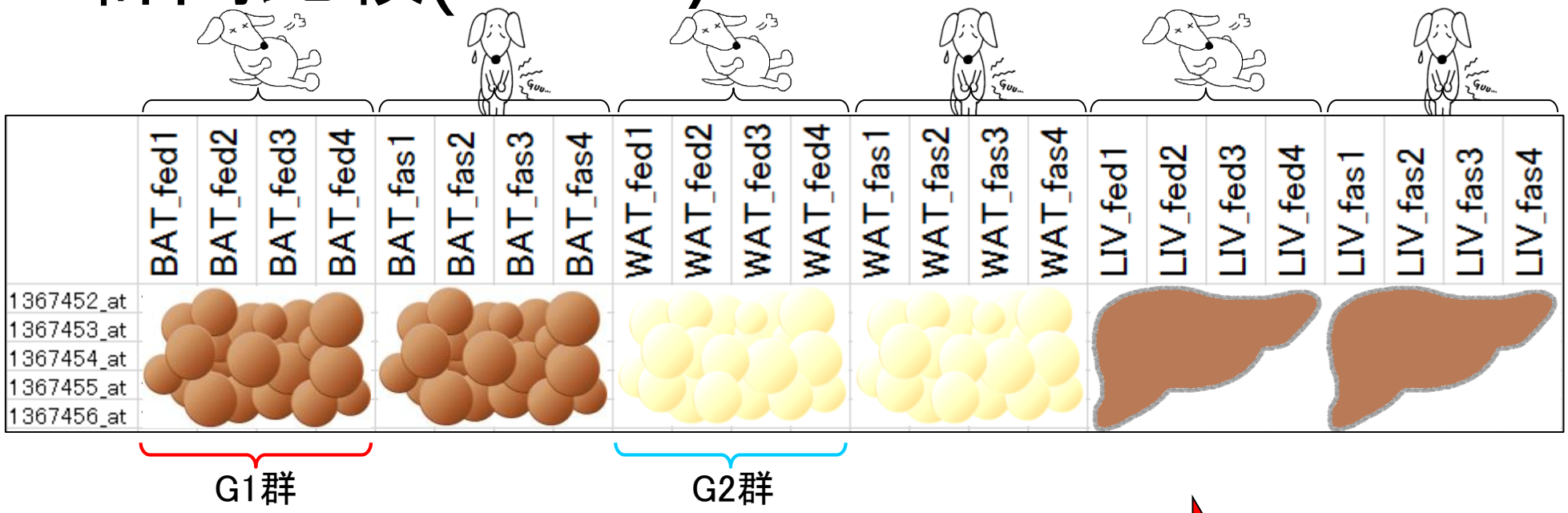
# 2群間比較(limma)



# 2群間比較(limma)

①hogeフォルダ中のrcode_limma_4vs4.txt。サブセット抽出のための情報は、②で与えている




①

rcode_limma_4vs4.txt

```
#####################################################↓
###  4 BAT_fed samples vs. 4 WAT_fed samples  ###↓
#####################################################↓
in_f <- "data_mas_EN.txt"                  #入力ファイル名を指定してin_fに格納↓
out_f1 <- "hoge1.txt"                      #出力ファイル名を指定してout_f1に格納↓
out_f2 <- "hoge1.png"                      #出力ファイル名を指定してout_f2に格納↓
param_G1 <- 4                              #G1群のサンプル数を指定↓
param_G2 <- 4                              #G2群のサンプル数を指定↓
param_posi <- c(1:4, 9:12)                 #元の発現行列上での列番号を指定↓
param_FDR <- 0.05                          #DEG検出時のfalse discovery rate (FDR)閾値を指定↓
param_fig <- c(400, 380)                   #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
↓
#必要なパッケージをロード↓
library(limma)                             #パッケージの読み込み↓
```

②

 教科書p167-

# 2群間比較(limma)

解析したいサブセットに正しくできていることがわかります

rcode_limma_4vs4.txt

```
##################################################
###  4 BAT_fed samples vs. 4 WAT_fed samples  ###
##################################################
in_f <- "data_mas_EN.txt"
out_f1 <- "hoge1.txt"
out_f2 <- "hoge1.png"
param_G1 <- 4
param_G2 <- 4
param_posi <- c(1:4, 9:12)
param_FDR <- 0.05
param_fig <- c(400, 380)

#必要なパッケージをロード
library(limma)

#入力ファイルの読み込みとラベル情報の作
data <- read.table(in_f, header=TRUE, r
data.cl <- c(rep(1, param_G1), rep(2, p
data <- data[,param_posi]
colnames(data)

#本番
#design <- model.matrix(~ as.factor(dat
design <- model.matrix(~data.cl)
fit <- lmFit(data, design)
```

R Console

```
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge/GSE7623"
> in_f <- "data_mas_EN.txt"                    #入力ファイ$
> out_f1 <- "hoge1.txt"                        #出力ファイ$
> out_f2 <- "hoge1.png"                        #出力ファイ$
> param_G1 <- 4                                #G1群のサン$
> param_G2 <- 4                                #G2群のサン$
> param_posi <- c(1:4, 9:12)                   #元の発現行$
> param_FDR <- 0.05                            #DEG検出時の$
> param_fig <- c(400, 380)                     #ファイル出$
>
> #必要なパッケージをロード
> library(limma)                               #パッケージ$
>
> #入力ファイルの読み込みとラベル情報の作成、そしてサ$
> data <- read.table(in_f, header=TRUE, row.names=1, $
> data.cl <- c(rep(1, param_G1), rep(2, param_G2))#G1$
> data <- data[,param_posi]                     #サブセット$
> colnames(data)                               #サブセット$
[1] "BAT_fed1" "BAT_fed2" "BAT_fed3" "BAT_fed4"
[5] "WAT_fed1" "WAT_fed2" "WAT_fed3" "WAT_fed4"
> param_posi
[1]  1  2  3  4  9 10 11 12
>
```

教科書p167

# 2群間比較(limma)

designオブジェクトが(実験)デザイン行列です。この行列の①2列目が、G1群とG2群がどれに相当するかを表すクラスラベル情報であることもわかります

rcode_limma_4vs4.txt

```
#本番
#design <- model.matrix(~ as.factor(data.cl))#デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
design <- model.matrix(~data.cl)          #デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
fit <- lmFit(data, design)                #モデル構築(ばらつきの程度を見積もっている)
out <- eBayes(fit)                        #検定(経験ベイズ)
p.value <- out$p.value[,ncol(design)]  #p
q.value <- p.adjust(p.value, method="BH")
ranking <- rank(p.value)                  #p
sum(q.value < param_FDR)                  #F
mean_G1 <- apply(as.matrix(data[,data.cl=
mean_G2 <- apply(as.matrix(data[,data.cl=
M <- mean_G2 - mean_G1                    #M
A <- (mean_G1 + mean_G2)/2                #M

#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(rownames(data), data, M, A,
write.table(tmp, out_f1, sep="¥t", append
```

R Console

```
> design <- model.matrix(~data.cl)
> design
  (Intercept) data.cl
1           1       1
2           1       1
3           1       1
4           1       1
5           1       2
6           1       2
7           1       2
8           1       2
attr(,"assign")
[1] 0 1
> data.cl
[1] 1 1 1 1 2 2 2 2
> as.factor(data.cl)
[1] 1 1 1 1 2 2 2 2
Levels: 1 2
>
```

①

# 2群間比較(limma)

①赤下線のout$p.valueで表されるlimma実行後のp-value情報は、ベクトル形式ではなく行列形式になっていることに注意。そしてその②列数は、デザイン行列designの列数と同じ。③out$p.valueの2列目の情報が解析結果に相当

rcode_limma_4vs4.t

```
#本番
#design <- model.matrix(~ as.factor(data.cl))#デザイン行
design <- model.matrix(~data.cl)          #デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
fit <- lmFit(data, design)                #モデル構築(ばらつきの程度を見積もっている)
out <- eBayes(fit)                        #検定(経験ベイズ)
p.value <- out$p.value[,ncol(design)]     #p値をp.valueに格納
q.value <- p.adjust(p.value, method="BH")#q値をq.valueに格納
ranking <- rank(p.value)                  #p.valueでランキングした結果をrankingに格納
sum(q.value < param_FDR)                  #FI
mean_G1 <- apply(as.matrix(data[,data.cl=
mean_G2 <- apply(as.matrix(data[,data.cl=
M <- mean_G2 - mean_G1                    #M
A <- (mean_G1 + mean_G2)/2

#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(rownames(data), data, M, A,
write.table(tmp, out_f1, sep="¥t", append
```

R Console

```
> fit <- lmFit(data, design)                #モデル構築($
> out <- eBayes(fit)                        #検定(経験ベ$
> p.value <- out$p.value[,ncol(design)]     #p値をp.valu$
> head(out$p.value, n=5)
             (Intercept)    data.cl
1367452_at 9.548174e-11 0.60594552
1367453_at 3.516879e-11 0.09645379
1367454_at 1.402195e-10 0.16185158
1367455_at 2.986084e-11 0.37498101
1367456_at 7.686525e-12 0.10585764
> dim(out$p.value)
[1] 31099     2
> head(out$p.value[, 2], n=4)
1367452_at 1367453_at 1367454_at 1367455_at
0.60594552 0.09645379 0.16185158 0.37498101
>
```

①

②

③

③

# 2群間比較(limma)

①ncol(design)と一般式で表すことで、常にデザイン行列の一番右側の列情報を抽出するようにしている。ここまでの話は、様々な記載方法への慣れと次の多群間比較のイントロ

rcode_limma_4vs4.txt

```
#本番
#design <- model.matrix(~ as.factor(data.cl))#デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
design <- model.matrix(~data.cl)          #デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
fit <- lmFit(data, design)                #モデル構築(ばらつきの程度を見積もっている)
out <- eBayes(fit)                        #
p.value <- out$p.value[,ncol(design)]     #p
q.value <- p.adjust(p.value, method="BH")
ranking <- rank(p.value)                  #p
sum(q.value < param_FDR)                  #F
mean_G1 <- apply(as.matrix(data[,data.cl=
mean_G2 <- apply(as.matrix(data[,data.cl=
M <- mean_G2 - mean_G1                    #M
A <- (mean_G1 + mean_G2)/2                #M

#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(rownames(data), data, M, A,
write.table(tmp, out_f1, sep="¥t", append
```

①

R Console

```
> head(out$p.value[, 2], n=4)
1367452_at 1367453_at 1367454_at 1367455_at
0.60594552 0.09645379 0.16185158 0.37498101
> design
  (Intercept) data.cl
1           1       1
2           1       1
3           1       1
4           1       1
5           1       2
6           1       2
7           1       2
8           1       2
attr(,"assign")
[1] 0 1
> dim(design)
[1] 8 2
> ncol(design)
[1] 2
>
```

# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

# 3群間比較(limma)

①が教科書に沿った内容。実験デザイン行列だとかコントラスト行列だとか様々な記述形式があります。②「応用1」の例題を一通り行うと感覚がつかめると思います。赤枠内では、分散分析(ANOVA)的な「比較するどこかの群間で発現変動している遺伝子」の同定について記述しています

## (Rで)マイクロアレイデータ解析

(last modified 2015/05/25, since 2005)

**What's new?**

- 門田幸二 著シリーズ Useful R 第7巻トランスクリプトーム解析刊行(共立出版)。マイクロアレイ解析に関する最近の知見や、ROKU法 (Kadota et al., 2006)、WAD法 (Kadota et al., 2008)などについての解説も含んでいます。書籍中のマイクロアレイ解析部分のRコードについては、このページの「書籍 | トランスクリプトーム解析 | ...」に掲載してあります。(2014/04/27)
- お知らせは主に(Rで)塩…や講演資料なども(Rで)…

- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応なし | パターンマッチング法(last modified 2014/05/23)
- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応あり | について(last modified 2009/11/11)
- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応あり | SAM (Tusher 2001) (last modified 2014/06/02)
- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応あり | SAM (Tusher 2001)+WADの 重みづけ (last modified 2013/06/02)
- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応あり | 時系列 | について(last modified 2013/6/8)
- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応あり | 時系列 | maSigPro (Conesa 2006) (last modified 2013/6/2)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | について(last modified 2015/01/16)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | Mulcom (Isella 2011)(last modified 2013/12/06)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | 基礎 | limma (Ritchie 2015) (last modified 2015/06/08) NEW
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | 応用1 | limma (Ritchie 2015)(last modified 2015/06/08) NEW
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | 応用2 | limma (Smyth 2004)(last modified 2015/06/08) NEW
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | 一元配置分散分析(One-way ANOVA) (last modified 2013/11/12)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | Kruskal-Wallis(クラスカル・ウォリス)検定 (last modified 2013/6/2)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | について(last modified 2013/6/2)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | SpeCond(Cavalli 2011) (last modified 2013/6/10)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | ROKU(Kadota 2006) (last modified 2014/05/30)

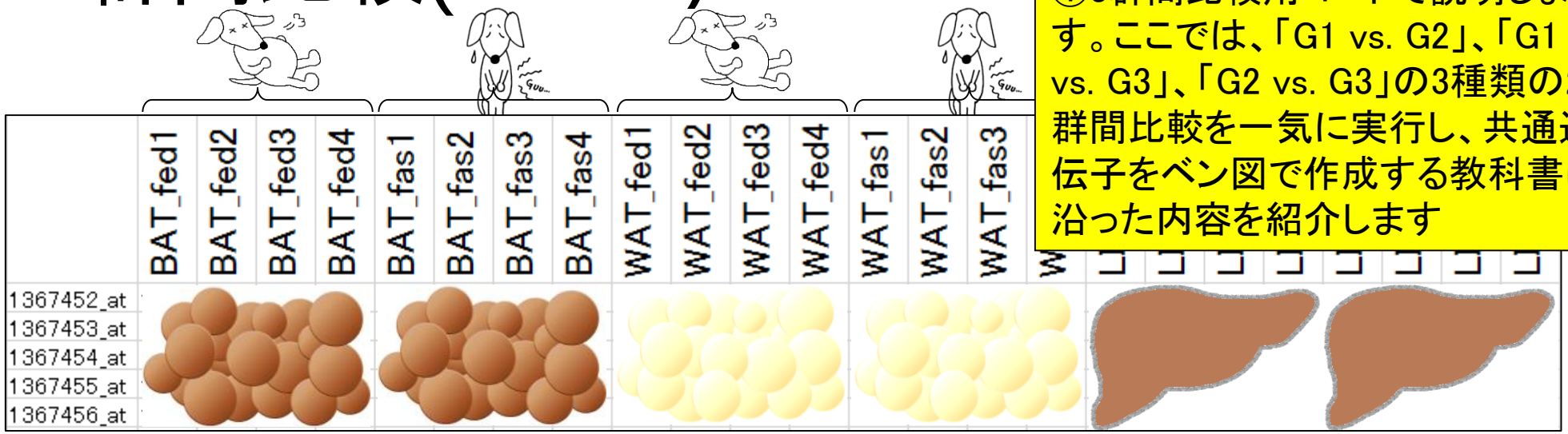
②

①

教科書p180-182

# 3群間比較(limma)

デザイン行列を理解しておかないと、多群間比較時に苦労します。
①3群間比較用コードで説明します。ここでは、「G1 vs. G2」、「G1 vs. G3」、「G2 vs. G3」の3種類の2群間比較を一気に実行し、共通遺伝子をベン図で作成する教科書に沿った内容を紹介します




rcode_limma_4vs4vs4.txt ①

```
##########################################################################↓
###  4 BAT_fed samples vs. 4 WAT_fed samples vs. 4 LIV_fed samples ###↓
##########################################################################↓
in_f <- "data_mas_EN.txt"                #入力ファイル名を指定してin_fに格納↓
out_f1 <- "hoge1.txt"                    #出力ファイル名を指定してout_f1に格納↓
out_f2 <- "hoge1.png"                    #出力ファイル名を指定してout_f2に格納↓
param_G1 <- 4                            #G1群のサンプル数を指定↓
param_G2 <- 4                            #G2群のサンプル数を指定↓
param_G3 <- 4                            #G2群のサンプル数を指定↓
param_posi <- c(1:4, 9:12, 17:20)        #元の発現行列上での列番号を指定↓
param_FDR <- 0.05                        #DEG検出時のfalse discovery rate (FDR)閾値を指定↓
↓
#必要なパッケージをロード↓
library(limma)                           #パッケージの読み込み↓
```

教科書p180-182

黒枠内をコピペ。解析したいサブセットに正しくできていることがわかる

# 3群間比較(limma)

rcode_limma_4vs4vs4.txt

```
##############################################################################
###  4 BAT_fed samples vs. 4 WAT_fed samples vs. 4 LIV_fed samples ###
##############################################################################
in_f <- "data_mas_EN.txt"                    #入力
out_f1 <- "hoge1.txt"                        #出力
out_f2 <- "hoge1.png"                        #出力
param_G1 <- 4                                #G1群
param_G2 <- 4                                #G2群
param_G3 <- 4                                #G2群
param_posi <- c(1:4, 9:12, 17:20)            #元の
param_FDR <- 0.05                            #DEG

#必要なパッケージをロード
library(limma)                               #パッ

#入力ファイルの読み込みとラベル情報の作成、
data <- read.table(in_f, header=TRUE, row.na
data.cl <- c(rep("G1", param_G1), rep("G2",
data <- data[,param_posi]                    #サブ
colnames(data)                               #サブ

#本番
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デザ
colnames(design) <- levels(as.factor(data.c
```

R Console

```
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge/GSE7623"
> list.files(pattern="mas_EN")
[1] "data_mas_EN.txt"
> in_f <- "data_mas_EN.txt"                    #入力ファイル$
> out_f1 <- "hoge1.txt"                        #出力ファイル$
> param_G1 <- 4                                #G1群のサン$
> param_G2 <- 4                                #G2群のサン$
> param_G3 <- 4                                #G2群のサン$
> param_posi <- c(1:4, 9:12, 17:20)            #元の発現行$
> param_FDR <- 0.05                            #DEG検出時の$
>
> #必要なパッケージをロード
> library(limma)                               #パッケージ$
>
> #入力ファイルの読み込みとラベル情報の作成、そしてサ$
> data <- read.table(in_f, header=TRUE, row.names=1, $
> data.cl <- c(rep("G1", param_G1), rep("G2", param_G$
> data <- data[,param_posi]                    #サブセット$
> colnames(data)                               #サブセット$
 [1] "BAT_fed1" "BAT_fed2" "BAT_fed3" "BAT_fed4"
 [5] "WAT_fed1" "WAT_fed2" "WAT_fed3" "WAT_fed4"
 [9] "LIV_fed1" "LIV_fed2" "LIV_fed3" "LIV_fed4"
>
```

# 3群間比較(limma)

実験デザイン行列には様々が記述の仕方があって難解ですが、慣れです。例えば①model.matrix実行直後のdesignは、②全部で12列の解析データのどこがどの群かを1で指し示している

```
#本番↓
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)      #デサ
colnames(design) <- levels(as.factor(data.c
fit <- lmFit(data, design)                 #モテ
contrast <- makeContrasts(                 #比較
    G1vsG2 = G1 - G2,                      #比較
    G1vsG3 = G1 - G3,                      #比較
    G2vsG3 = G2 - G3,                      #比較
    levels = design)                       #比較
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)       #モテ
out <- eBayes(fit2)                        #検定
p.value <- out$p.value                     #p値
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#p
```

R Console

```
> design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)
> design
   data.clG1 data.clG2 data.clG3
1          1         0         0
2          1         0         0
3          1         0         0
4          1         0         0
5          0         1         0
6          0         1         0
7          0         1         0
8          0         1         0
9          0         0         1
10         0         0         1
11         0         0         1
12         0         0         1
attr(,"assign")
[1] 1 1 1
attr(,"contrasts")
attr(,"contrasts")$data.cl
[1] "contr.treatment"

> data.cl
 [1] "G1" "G1" "G1" "G1" "G2" "G2" "G2" "G2" "G3" "G3"
[11] "G3" "G3"
> |
```

# 3群間比較(limma)

（通常の指定法とは異なり）①ここのdata.clは数値情報ではなく文字列情報

```
#本番
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デサ
colnames(design) <- levels(as.factor(data.c
fit <- lmFit(data, design)             #モテ
contrast <- makeContrasts(             #比較
    G1vsG2 = G1 - G2,                  #比較
    G1vsG3 = G1 - G3,                  #比較
    G2vsG3 = G2 - G3,                  #比較
    levels = design)                   #比較
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)   #モテ
out <- eBayes(fit2)                    #検定
p.value <- out$p.value                 #p値
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#p
```

R Console

```
> design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)
> design
   data.clG1 data.clG2 data.clG3
1          1         0         0
2          1         0         0
3          1         0         0
4          1         0         0
5          0         1         0
6          0         1         0
7          0         1         0
8          0         1         0
9          0         0         1
10         0         0         1
11         0         0         1
12         0         0         1
attr(,"assign")
[1] 1 1 1
attr(,"contrasts")
attr(,"contrasts")$data.cl
[1] "contr.treatment"

> data.cl
 [1] "G1" "G1" "G1" "G1" "G2" "G2" "G2" "G2" "G3" "G3"
[11] "G3" "G3"
>
```

①

# 3群間比較(limma)

①levels関数を用いてグループラベル情報を利用し、②デザイン行列designの列名情報を変更して取扱いやすくしています。③かなりすっきりしました

rcode_limma_4vs4vs4.t

```
#本番↓
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data.cl))#デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デザ
colnames(design) <- levels(as.factor(data.c
fit <- lmFit(data, design)                #モデ
contrast <- makeContrasts(                #比較
    G1vsG2 = G1 - G2,                     #比
    G1vsG3 = G1 - G3,                     #比
    G2vsG3 = G2 - G3,                     #比較
    levels = design)                      #比
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)      #モ
out <- eBayes(fit2)                       #検定
p.value <- out$p.value                    #p値
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#p
```

R Console

```
> as.factor(data.cl)
 [1] G1 G1 G1 G1 G2 G2 G2 G2 G3 G3 G3 G3
Levels: G1 G2 G3
> levels(as.factor(data.cl))
[1] "G1" "G2" "G3"
> colnames(design) <- levels(as.factor(data.cl))
> design
   G1 G2 G3
1   1  0  0
2   1  0  0
3   1  0  0
4   1  0  0
5   0  1  0
6   0  1  0
7   0  1  0
8   0  1  0
9   0  0  1
10  0  0  1
11  0  0  1
12  0  0  1
attr(,"assign")
[1] 1 1 1
attr(,"contrasts")
attr(,"contrasts")$data.cl
[1] "contr.treatment"
```

# 3群間比較(limma)

デザイン行列の列名を変更して取扱いやすくしておかないと、この部分の指定時にややこしいことになる。①ここでは3種類の2群間比較を行うようにしている。ここで作成しているのは、コントラスト行列というもの。「比較したいものを作成した行列」という位置づけ

rcode_limma_4vs4vs4.t

```
#本番↓
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data.cl))#デザイン行列を作成した
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デザイン行列を作成した結果をdes
colnames(design) <- levels(as.factor(data.cl))#デザイン行列の列名を付与
fit <- lmFit(data, design)                    #モデル構築(ばらつきの程度を見積
contrast <- makeContrasts(                    #比較したい2群の情報を作成↓
    G1vsG2 = G1 - G2,                         #比較したい2群の情報を作成↓
    G1vsG3 = G1 - G3,                         #比較したい2群の情報を作成↓
    G2vsG3 = G2 - G3,                         #比較したい2群の情報を作成↓
    levels = design)                          #比較したい2群の情報を作成↓
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)          #モデル構築↓
out <- eBayes(fit2)                           #検定(経験ベイズ)↓
p.value <- out$p.value                        #p値
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjus
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)
```

①

R Console

```
> fit <- lmFit(data, design)                    #モデル構築($
> contrast <- makeContrasts(                    #比較したい2$
+     G1vsG2 = G1 - G2,                         #比較したい2$
+     G1vsG3 = G1 - G3,                         #比較したい2$
+     G2vsG3 = G2 - G3,                         #比較したい2$
+     levels = design)                          #比較したい2$
> contrast
       Contrasts
Levels G1vsG2 G1vsG3 G2vsG3
    G1      1      1      0
    G2     -1      0      1
    G3      0     -1     -1
> |
```

# 3群間比較(limma)

3種類の2群間比較を行うようにしたコントラスト行列contrastを入力としているので、DEG検出結果として31,099行×3列からなるp-value行列である①out$p.valueが得られる

rcode_limma_4vs

```
#本番↓
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data.cl))#デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デザイン行列を作成した結果をdesignに格納↓
colnames(design) <- levels(as.factor(data.cl))#デザイン行列の列名を付与↓
fit <- lmFit(data, design)             #モデル構築(ばらつきの程度を見積もっている)↓
contrast <- makeContrasts(             #比較したい2群の情報を作成↓
    G1vsG2 = G1 - G2,                  #比較したい2群の情報を作成↓
    G1vsG3 = G1 - G3,                  #比較したい2群の情報を作成↓
    G2vsG3 = G2 - G3,                  #比較したい2群の情報を作成↓
    levels = design)                   #比較したい2群の情報を作成↓
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)   #モデル構築↓
out <- eBayes(fit2)                    #検定
p.value <- out$p.value                 #p値
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#
```

R Console

```
> fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)   #モデル構築
> out <- eBayes(fit2)                    #検定(経験ベ$
> head(out$p.value, n=5)
           Contrasts
                G1vsG2      G1vsG3     G2vsG3
  1367452_at 0.57066249 0.005780086 0.01612904
  1367453_at 0.07035758 0.010713438 0.30569612
  1367454_at 0.22337752 0.001491958 0.01373208
  1367455_at 0.34340818 0.004630791 0.02635020
  1367456_at 0.09121355 0.887708741 0.07149528
> dim(out$p.value)
[1] 31099     3
>
```

①

①

# 3群間比較(limma)

apply関数を用いて列ごと(MARGIN=2)にq-valueを計算している

rcode_limma_4vs4vs4.txt

```
#本番
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data.cl))#デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デザイン行列を作成した結果をdesignに格納
colnames(design) <- levels(as.factor(data.cl))#デザイン行列の列名を付与
fit <- lmFit(data, design)             #モデル構築(ばらつきの程度を見積もっている)
contrast <- makeContrasts(             #比較したい2群の情報を作成
    G1vsG2 = G1 - G2,                  #比較したい2群の情報を作成
    G1vsG3 = G1 - G3,                  #比較したい2群の情報を作成
    G2vsG3 = G2 - G3,                  #比較したい2群の情報を作成
    levels = design)                   #比較したい2群の情報を作成
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)   #モデル構築
out <- eBayes(fit2)                    #検定(経験ベイズ)
p.value <- out$p.value                 #p値をp.valueに格納
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust, method="BH")#q値をq.valueに格納
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#p.valueでランキングした結果をrankingに格納
```

R Console

```
> p.value <- out$p.value                    #p値をp.valu$
> q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust, metho$
> head(q.value, n=4)
            Contrasts
                G1vsG2      G1vsG3     G2vsG3
  1367452_at 0.7409725 0.019218956 0.04689295
  1367453_at 0.2034828 0.031828163 0.45396064
  1367454_at 0.4238707 0.006279388 0.04125726
  1367455_at 0.5520626 0.016024589 0.06949329
> |
```

# 3群間比較(limma)

FDR 1%という閾値を満たす遺伝子数は、G1 vs. G2が2,418個、G1 vs. G3が8,119個、そしてG2 vs. G3が7,471個という結果

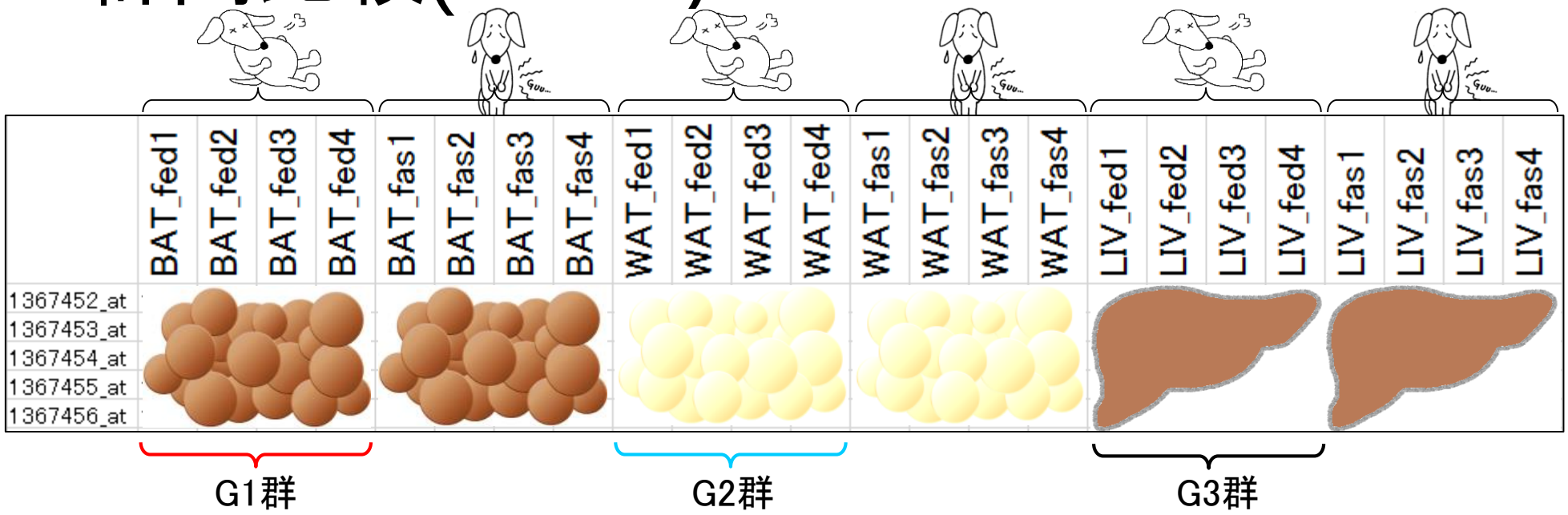
```
p.value <- out$p.value                    #p値をp.valueに格納
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust, method="BH")#q値をq.valueに格納
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#p.valueでランキングした結果をrankingに格納

#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(rownames(data), data, p.value, q.value, ranking)#入力データの右側にDEG検出結果を結合したものをtmpに格納
write.table(tmp, out_f1, sep="¥t", append=F, quote=F, row.names=F)#tmpの中身を指定したファイル名で保存

# ベン図
sum(q.value[,1] < 0.01)
sum(q.value[,2] < 0.01)
sum(q.value[,3] < 0.01)
vennDiagram(decideTests(out, adjust.method=
```

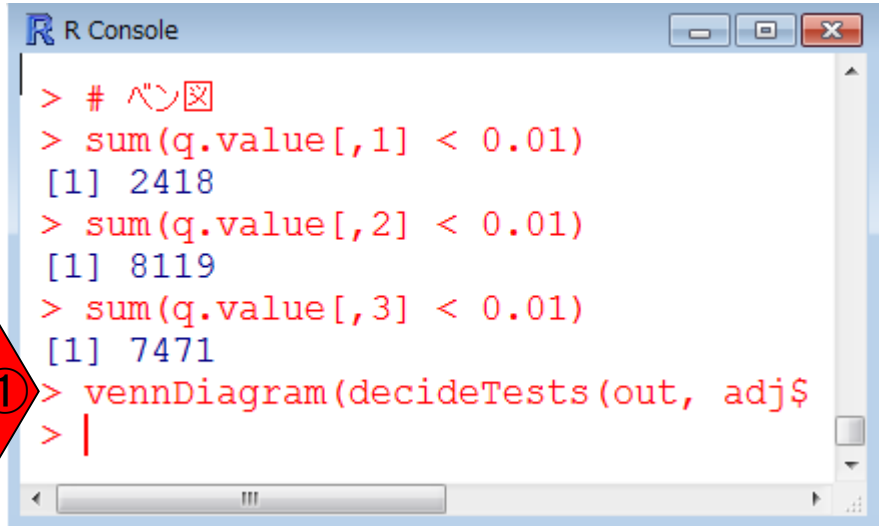
R Console

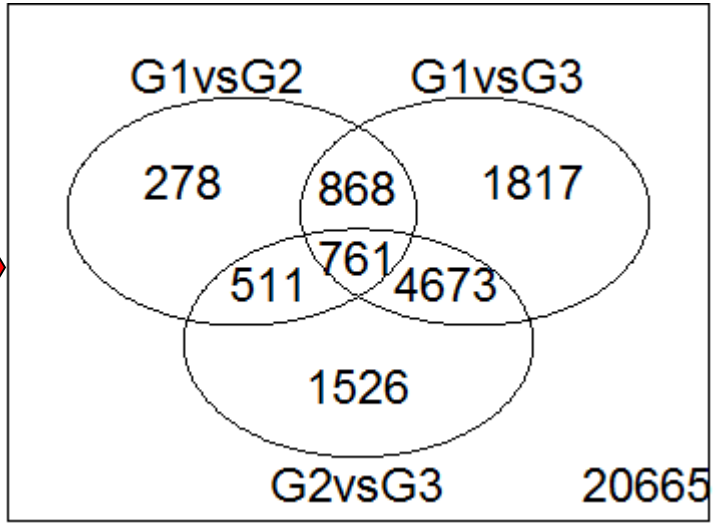
```
> #ファイルに保存(テキストファイル)
> tmp <- cbind(rownames(data), data, p.value, q.value$
> write.table(tmp, out_f1, sep="\t", append=F, quote=$
>
> # ベン図
> sum(q.value[,1] < 0.01)
[1] 2418
> sum(q.value[,2] < 0.01)
[1] 8119
> sum(q.value[,3] < 0.01)
[1] 7471
> vennDiagram(decideTests(out, adjust.method="BH", p.$
>
```

# 3群間比較(limma)

G1vsG2のDEG数が他に比べて少ないので妥当。①ベン図



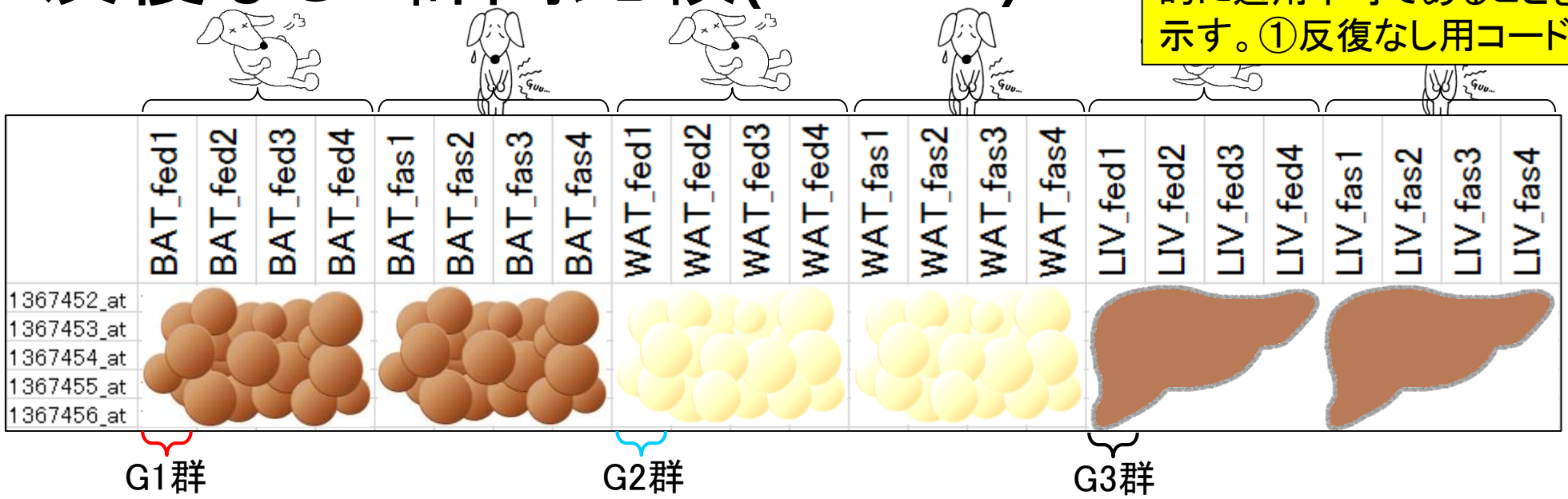
# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

教科書 § 4.2.2

# 反復なし3群間比較(limma)

(biological) replicatesがないデータの場合limmaは基本的に適用不可であることを示す。①反復なし用コード




rcode_limma_1vs1vs1.txt ①

```
##########################################################################↓
###  1 BAT_fed sample vs. 1 WAT_fed sample vs. 1 LIV_fed sample ###↓
##########################################################################↓
in_f <- "data_mas_EN.txt"                #入力ファイル名を指定してin_fに格納↓
out_f1 <- "hoge1.txt"                    #出力ファイル名を指定してout_f1に格納↓
param_G1 <- 1                            #G1群のサンプル数を指定↓
param_G2 <- 1                            #G2群のサンプル数を指定↓
param_G3 <- 1                            #G2群のサンプル数を指定↓
param_posi <- c(1, 9, 17)                #元の発現行列上での列番号を指定↓
param_FDR <- 0.05                        #DEG検出時のfalse discovery rate (FDR)閾値を指定↓
```

教科書 § 4.2.2

エラーが出ていることがわかる

# 反復なし3群間比較(limma)

```
##################################################################
###  1 BAT_fed sample vs. 1 WAT_fed sample vs. 1 LIV_fed sample ###
##################################################################
in_f <- "data_mas_EN.txt"                #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "hoge1.txt"                    #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
param_G1 <- 1                            #G1群のサンプル数を指定
param_G2 <- 1                            #G2群のサンプル数を指定
param_G3 <- 1                            #G3群のサンプル数を指定
param_posi <- c(1, 9, 17)                #元の発現行列上での列番号を指定
param_FDR <- 0.05                        #DEG検出時のfalse discovery rate (FDR)閾値を指

#必要なパッケージをロード
library(limma)                           #パッケージの読み込み

#入力ファイルの読み込みとラベル情報の作成、そ
data <- read.table(in_f, header=TRUE, row.name
data.cl <- c(rep("G1", param_G1), rep("G2", pa
data <- data[,param_posi]                #サブセ
colnames(data)                           #サブセ

#本番
#design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data.c
design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)  #デザイ
colnames(design) <- levels(as.factor(data.cl))
fit <- lmFit(data, design)               #モデル
contrast <- makeContrasts(               #比較し
    G1vsG2 = G1 - G2,                    #比較し
    G1vsG3 = G1 - G3,                    #比較し
    G2vsG3 = G2 - G3,                    #比較し
    levels = design)                     #比較し
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)     #モデル
out <- eBayes(fit2)                      #検定(
p.value <- out$p.value                   #p値を
q.value <- apply(p.value, MARGIN=2, p.adjust,
ranking <- apply(p.value, MARGIN=2, rank)#p.va
```

R Console

```
> #design <- model.matrix(~ 0 + as.factor(data.cl))#デザイ$
> design <- model.matrix(~ 0 + data.cl)   #デザイン行列を作$
> colnames(design) <- levels(as.factor(data.cl))#デザイン$
> fit <- lmFit(data, design)                    #モデル構築(ばら$
> contrast <- makeContrasts(                    #比較したい2群の$
+     G1vsG2 = G1 - G2,                         #比較したい2群の$
+     G1vsG3 = G1 - G3,                         #比較したい2群の$
+     G2vsG3 = G2 - G3,                         #比較したい2群の$
+     levels = design)                          #比較したい2群の$
> fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast)    #モデル構築
> out <- eBayes(fit2)                     #検定(経験ベイズ)
Error in ebayes(fit = fit, proportion = proportion, stdev.$
  No residual degrees of freedom in linear model fits
>
```

# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

# 反復なし多群間比較(TCC)

ROKU入出力のイメージ。出力は入力の対応する位置に「特異的組織でない部分には0、特異的高発現が1、特異的低発現が−1」と返す。①黒枠内の遺伝子（gene2, 7, 8）は組織特異的遺伝子ではない。②ROKU出力結果では、対応するどの組織も0になっていて妥当

入力

| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 9.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| ① gene2 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| gene3 | 0.02 | 0.41 | 0.41 | 0.38 | 9.60 | 0.49 | 0.44 | 0.16 | 0.21 | 0.52 |
| gene4 | 3.95 | 4.12 | 4.20 | 9.20 | 3.84 | 3.97 | 4.23 | 3.80 | 8.60 | 3.64 |
| gene5 | 8.06 | 7.93 | 3.00 | 7.82 | 7.75 | 8.42 | 8.06 | 7.75 | 7.88 | 8.26 |
| gene6 | 5.20 | 5.00 | 8.50 | 5.10 | 4.84 | 4.78 | 5.00 | 1.30 | 5.00 | 4.89 |
| ① gene7 | 8.20 | 9.30 | 8.00 | 6.90 | 8.60 | 7.30 | 8.00 | 6.70 | 8.20 | 7.50 |
| gene8 | 1.20 | 2.10 | 4.80 | 2.00 | 3.50 | 2.50 | 3.65 | 0.30 | 3.10 | 3.63 |

出力

| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 | modH | ranking |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.000 | 1 |
| ② gene2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.322 | 8 |
| gene3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.768 | 2 |
| gene4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1.718 | 5 |
| gene5 | 0 | 0 | −1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.492 | 3 |
| gene6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | −1 | 0 | 0 | 1.645 | 4 |
| ② gene7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.952 | 6 |
| gene8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.032 | 7 |

教科書 § 4.2.3

# 反復なし多群間比較(TCC)

①出力の右側は全体的な組織特異度の高さでランキングした結果を返す。modH列の値が0に近いほど、組織特異度が高いことを表す

入力

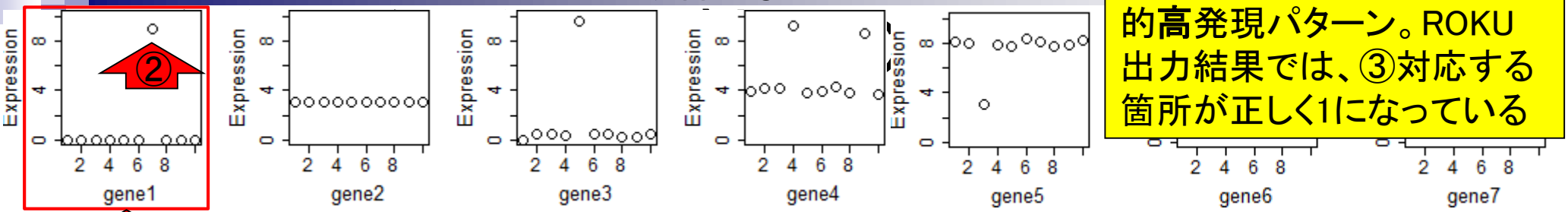
| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 9.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| gene2 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| gene3 | 0.02 | 0.41 | 0.41 | 0.38 | 9.60 | 0.49 | 0.44 | 0.16 | 0.21 | 0.52 |
| gene4 | 3.95 | 4.12 | 4.20 | 9.20 | 3.84 | 3.97 | 4.23 | 3.80 | 8.60 | 3.64 |
| gene5 | 8.06 | 7.93 | 3.00 | 7.82 | 7.75 | 8.42 | 8.06 | 7.75 | 7.88 | 8.26 |
| gene6 | 5.20 | 5.00 | 8.50 | 5.10 | 4.84 | 4.78 | 5.00 | 1.30 | 5.00 | 4.89 |
| gene7 | 8.20 | 9.30 | 8.00 | 6.90 | 8.60 | 7.30 | 8.00 | 6.70 | 8.20 | 7.50 |
| gene8 | 1.20 | 2.10 | 4.80 | 2.00 | 3.50 | 2.50 | 3.65 | 0.30 | 3.10 | 3.63 |

①

出力

| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 | modH | ranking |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.000 | 1 |
| gene2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.322 | 8 |
| gene3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.768 | 2 |
| gene4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1.718 | 5 |
| gene5 | 0 | 0 | −1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.492 | 3 |
| gene6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | −1 | 0 | 0 | 1.645 | 4 |
| gene7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.952 | 6 |
| gene8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.032 | 7 |

# 教科書 § 4.2.3




①gene1は、②tissue7特異的高発現パターン。ROKU出力結果では、③対応する箇所が正しく1になっている

入力

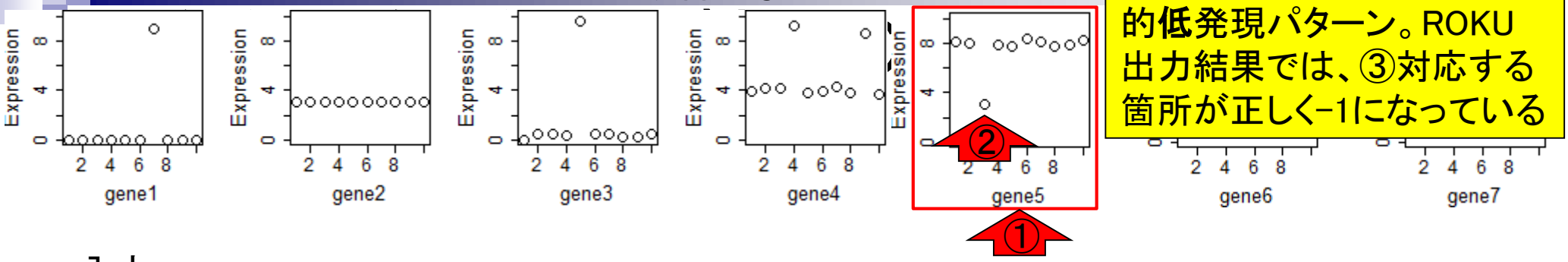
| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 9.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| gene2 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| gene3 | 0.02 | 0.41 | 0.41 | 0.38 | 9.60 | 0.49 | 0.44 | 0.16 | 0.21 | 0.52 |
| gene4 | 3.95 | 4.12 | 4.20 | 9.20 | 3.84 | 3.97 | 4.23 | 3.80 | 8.60 | 3.64 |
| gene5 | 8.06 | 7.93 | 3.00 | 7.82 | 7.75 | 8.42 | 8.06 | 7.75 | 7.88 | 8.26 |
| gene6 | 5.20 | 5.00 | 8.50 | 5.10 | 4.84 | 4.78 | 5.00 | 1.30 | 5.00 | 4.89 |
| gene7 | 8.20 | 9.30 | 8.00 | 6.90 | 8.60 | 7.30 | 8.00 | 6.70 | 8.20 | 7.50 |
| gene8 | 1.20 | 2.10 | 4.80 | 2.00 | 3.50 | 2.50 | 3.65 | 0.30 | 3.10 | 3.63 |

出力

| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 | modH | ranking |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.000 | 1 |
| gene2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.322 | 8 |
| gene3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.768 | 2 |
| gene4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1.718 | 5 |
| gene5 | 0 | 0 | −1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.492 | 3 |
| gene6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | −1 | 0 | 0 | 1.645 | 4 |
| gene7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.952 | 6 |
| gene8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.032 | 7 |

# 教科書 § 4.2.3

①gene5は、②tissue3特異的低発現パターン。ROKU出力結果では、③対応する箇所が正しく-1になっている




## 入力

| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 9.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| gene2 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| gene3 | 0.02 | 0.41 | 0.41 | 0.38 | 9.60 | 0.49 | 0.44 | 0.16 | 0.21 | 0.52 |
| gene4 | 3.95 | 4.12 | 4.20 | 9.20 | 3.84 | 3.97 | 4.23 | 3.80 | 8.60 | 3.64 |
| gene5 | 8.06 | 7.93 | 3.00 | 7.82 | 7.75 | 8.42 | 8.06 | 7.75 | 7.88 | 8.26 |
| gene6 | 5.20 | 5.00 | 5.10 | 4.84 | 4.78 | 5.00 | 1.30 | 5.00 | 4.89 | |
| gene7 | 8.20 | 9.30 | 8.00 | 6.90 | 8.60 | 7.30 | 8.00 | 6.70 | 8.20 | 7.50 |
| gene8 | 1.20 | 2.10 | 4.80 | 2.00 | 3.50 | 2.50 | 3.65 | 0.30 | 3.10 | 3.63 |

①

②

## 出力

| | tissue1 | tissue2 | tissue3 | tissue4 | tissue5 | tissue6 | tissue7 | tissue8 | tissue9 | tissue10 | modH | ranking |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| gene1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.000 | 1 |
| gene2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.322 | 8 |
| gene3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.768 | 2 |
| gene4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1.718 | 5 |
| gene5 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.492 | 3 |
| gene6 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 1.645 | 4 |
| gene7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.952 | 6 |
| gene8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.032 | 7 |

③

教科書 § 4.2.3

# 反復なし多群間比較(TCC)

入出力のイメージは、②例題1実行結果。modH列の値は、「データ変換後のエントロピー値」に相当

## (Rで)マイクロアレイデータ解析

**(last modified 2015/05/25, since 2005)**

**What's**

- 門田
- お知

- 解析 | 発現変動 | 2群間 | 対応あり | 時系列 | maSigPro (Conesa_2006) (last modified 2013/6/2)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | について(last modified 2015/01/16)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | Mulcom (Isella_2011)(last modified 2013/12/06)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | limma (Smyth_2004)(last modified 2014/02/03)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | 一元配置分散分析(One-way ANOVA) (last modified 2013/11/12)
- 解析 | 発現変動 | 3群間 | 対応なし | Kruskal-Wallis(クラスカル-ウォリス) 検定 (last modified 2013/6/2)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | について(last modified 2013/6/2)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | SpeCond(Cavalli_2011) (last modified 2013/6/10)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | ROKU(Kadota_2006) (last modified 2014/05/30)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | Sprent's non-parametric method(Ge_2005) (last modified 2009/07/31)
- 解析 | 発現変動 | 多群間 | Schug's H(

①

### 解析 | 発現変動 | 多群間 | ROKU (Kadota_2006)

TCCパッケージで提供しているROKU法(Kadota et al., 2006)を用いて、遺伝子発現行列中の遺伝子を全体的な組織特異性の度合いでランキングします。出力ファイル中の"modH"列の数値は、「ROKU論文中のAdditional file 1 (Suppl.xls)の"H(x')"列の数値」と対応しています。つまり、データ変換後のエントロピー値です。"ranking"列は、modHの値でランキングした結果です。"ranking"列で昇順にソートすることで、全体的な組織特異性の度合いでランキングしていることになります。つまり、上位が「(どの組織で特異的かはこのスコアだけでは分からないが)組織特異性が高い遺伝子」ということになります。残りの結果は「1:特異的高発現、-1:特異的低発現、0:その他」からなる「外れ値行列」です。例えば、組織AとBで1, それ以外の組織で0を示す遺伝子(群)は「AとB特異的高発現遺伝子」と判断します。

「ファイル」-「ディレクトリの変更」で解析したいファイルを置いてあるディレクトリに移動し、以下をコピペ

②

**1. サンプルデータ21のsample21.txtの場合:**

log2変換後のデータであるという前提です。

```
in_f <- "sample21.txt"                  #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f <- "hoge1.txt"                    #出力ファイル名を指定してout_fに格納

#必要なパッケージをロード
library(TCC)                            #パッケージの読み込み

#入力ファイルの読み込み
data <- read.table(in_f, header=TRUE, row.names=1, sep="\t", quote="")#in_fで指定したファ
```

参考

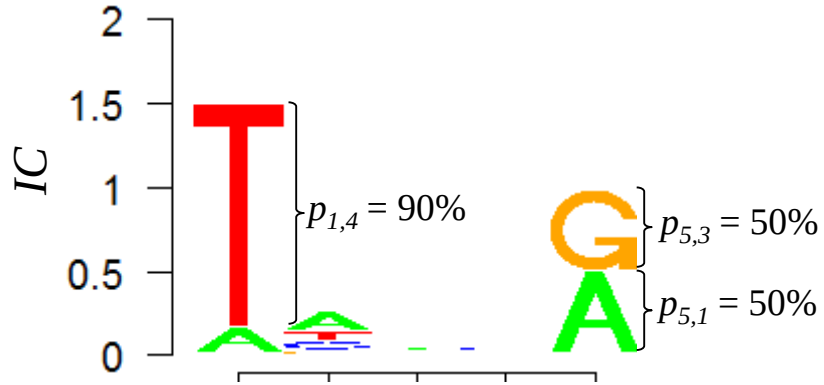
# Sequence logos

①Sequence logosは、あるポジションに特定の塩基が濃縮されている状態をうまく表すために、エントロピーを内部的に計算しているだけです。②赤枠内がエントロピー

- position $i$の情報量 $IC_i = \log_2(N) - H(x_i)$
  $= 2$

position $i$

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | … |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 配列 1 | T | A | C | G | G | … |
| 配列 2 | T | A | A | C | G | … |
| 配列 3 | T | G | T | A | G | … |
| 配列 4 | A | C | T | T | A | … |
| 配列 5 | T | T | G | G | A | … |
| 配列 6 | T | C | A | A | G | … |
| 配列 7 | T | A | C | T | A | … |
| 配列 8 | T | T | G | C | A | … |
| 配列 9 | T | A | A | C | A | … |
| 配列10 | T | A | C | T | G | … |




| $IC$ | 1.53 | 0.24 | 0.03 | 0.03 | 1.00 | … |
|---|---|---|---|---|---|---|

| $x_{ij}$ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | … |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aの数 ($j$=1) | 1 | 5 | 3 | 2 | 5 | … |
| Cの数 ($j$=2) | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | … |
| Gの数 ($j$=3) | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | … |
| Tの数 ($j$=4) | 9 | 2 | 2 | 3 | 0 | … |
| $\Sigma_j\ x_{ij}$ | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |

$j$

| $p_{ij}$ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | … |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.1 | 0.5 | 0.3 | 0.2 | 0.5 | … |
| 2 | 0.0 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | … |
| 3 | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.5 | … |
| 4 | 0.9 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.0 | … |
| $\Sigma_j$ | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |

| $-p_{ij}\log_2(p_{ij})$ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | … |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.33 | 0.50 | 0.52 | 0.46 | 0.50 | … |
| 2 | 0.00 | 0.46 | 0.52 | 0.52 | 0.00 | … |
| 3 | 0.00 | 0.33 | 0.46 | 0.46 | 0.50 | … |
| 4 | 0.14 | 0.46 | 0.46 | 0.52 | 0.00 | … |
| $H = \Sigma_j$ | 0.47 | 1.76 | 1.97 | 1.97 | 1.00 | |

①

②

Schneider and Stephens, *Nucleic Acids Res.*, **18**(20): 6097-6100, 1990

# エントロピー

組織特異的発現遺伝子検出にエントロピーを最初に応用したのは①Schug et al. 2005。ROKU法はその改良版という位置づけ

- 遺伝子$i$のエントロピー $H(x_i) = -\sum_{j=1}^{N} p_{ij} \log_2(p_{ij})$, where $p_{ij} = x_{ij} / \sum_{j=1}^{N} x_{ij}$

$x_{ij}$

| $j$ | 遺伝子1 | 遺伝子2 | 遺伝子3 | 遺伝子4 | 遺伝子5 | ... |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 組織1 | 1 | 5 | 6 | 4 | 10 | ... |
| 組織2 | 0 | 2 | 6 | 4 | 10 | ... |
| 組織3 | 0 | 1 | 6 | 4 | 10 | ... |
| 組織4 | 9 | 2 | 6 | 4 | 10 | ... |
| 組織5 | 0 | 4 | 6 | 10 | 4 | |
| 組織6 | 0 | 6 | 6 | 4 | 10 | |
| 組織7 | 0 | 3 | 6 | 4 | 10 | |
| 組織8 | 0 | 5 | 6 | 4 | 10 | |
| $\Sigma_j x_{ij}$ | 10 | 28 | 48 | 38 | 74 | |

$p_{ij}$

| $i$ | 遺伝子1 | 遺伝子2 | 遺伝子3 | 遺伝子4 | 遺伝子5 | ... |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.10 | 0.18 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | ... |
| 2 | 0.00 | 0.07 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | ... |
| 3 | 0.00 | 0.04 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | ... |
| 4 | 0.90 | 0.07 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | ... |
| 5 | 0.00 | 0.14 | 0.13 | 0.26 | 0.05 | |
| 6 | 0.00 | 0.21 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | |
| 7 | 0.00 | 0.11 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | |
| 8 | 0.00 | 0.18 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | |
| $\Sigma_j$ | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | |

$-p_{ij} \log_2(p_{ij})$

| $i$ | 遺伝子1 | 遺伝子2 | 遺伝子3 | 遺伝子4 | 遺伝子5 | ... |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.33 | 0.44 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | ... |
| 2 | 0.00 | 0.27 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | ... |
| 3 | 0.00 | 0.17 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | ... |
| 4 | 0.14 | 0.27 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | ... |
| 5 | 0.00 | 0.40 | 0.38 | 0.51 | 0.23 | |
| 6 | 0.00 | 0.48 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | |
| 7 | 0.00 | 0.35 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | |
| 8 | 0.00 | 0.44 | 0.38 | 0.34 | 0.39 | |
| $\Sigma_j$ | 0.47 | 2.83 | 3.00 | 2.90 | 2.96 | |

組織特異的遺伝子は低いエントロピー

そうでないものは高い値

$N$：組織数（$j$の数）= 8

$H$の取りうる範囲：$0 \leqq H \leqq \log_2 N \rightarrow 0 \leqq H \leqq 3$

①

Schug et al., *Genome Biol.*, **6**: R33, 2005

教科書 § 4.2.3

hoge – GSE2361フォルダ中のデータを用いてROKUを実行してみよう

# ROKUを実行

- Affymetrix GeneChip
  - Ge et al., *Genomics*, **86**: 127–141, 2005
    - **GSE2361**、GPL96 (Affymetrix Human Genome U133A Array)、22,283 probesets
    - **ヒト36サンプル**：Heart (心臓)、Thymus (胸腺)、Spleen (脾臓)、Ovary (卵巣)、Kidney (腎臓)、Skeletal Muscle (骨格筋)、Pancreas (膵臓)、Prostate (前立腺)、…

BMC Bioinformatics. 2006 Jun 12;7:294.

**ROKU: a novel method for identification of tissue-specific genes.**

Kadota K[1], Ye J, Nakai Y, Terada T, Shimizu K.

**Author information**

**Abstract**

**BACKGROUND:** One of the important goals of mi
expression is considerably higher or lower in some
identifying such tissue-specific genes.

**RESULTS:** We describe a method, ROKU, which
many tissues and thousands of genes. ROKU ran
Shannon entropy and detects tissues specific to e
evaluated the capacity for the detection of various
We observed that ROKU was superior to a conver
according to overall tissue specificity and to detect
objective tissues.

**CONCLUSION:** ROKU is useful for the detection
is also directly applicable to the selection of diagn

**Analysis of real data**

To further investigate the validity of our method (ROKU), we applied the method to a public gene expression matrix consisting of 36 normal human tissues and 22,283 probesets [5]. Briefly, ROKU (1) processes each probeset expression vector and makes a processed vector $\boldsymbol{x}'$, (2) calculates the entropy $H(\boldsymbol{x}')$, and (3) assigns specific tissues to each probeset whose observations are detected to be 'outliers' (see Methods). We compared the performance of ROKU to that of Schug's method, which directly uses the original/non-processed vector $\boldsymbol{x}$ for measuring the entropy $H(\boldsymbol{x})$ [4]. The two entropy scores ($H(\boldsymbol{x}')$ and $H(\boldsymbol{x})$) for all probesets are available in the additional file [see 1].

**Additional file 1. Full information analyzed by ROKU for dataset of Ge et al. (2005).** For the original gene expression matrix, an outlier matrix (consisting of 1 for over-expressed outliers, -1 for under-expressed outliers, and 0 for non-outliers) is provided. It also contains two entropy scores measured by ROKU and Schug's method and their ranks.

Format: XLS Size: 8.1MB Download file

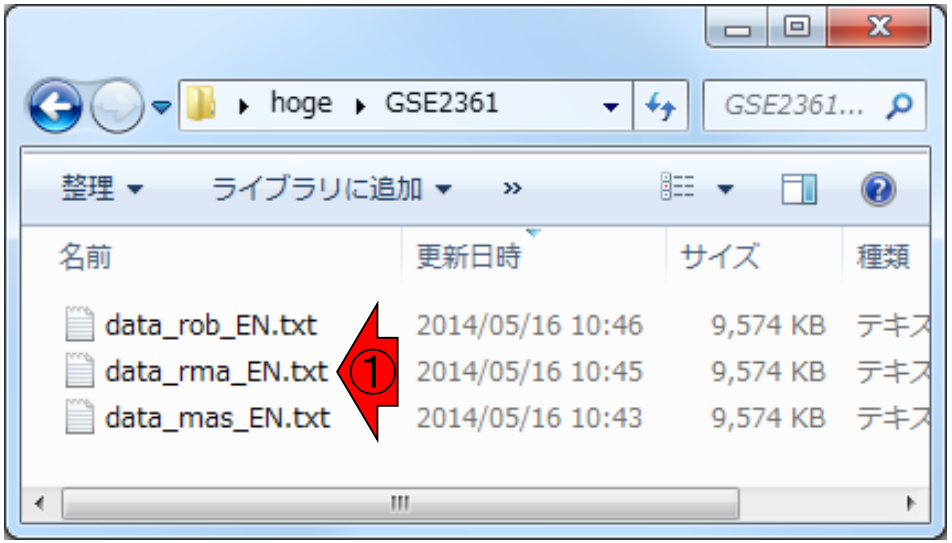
This file can be viewed with: Microsoft Excel Viewer

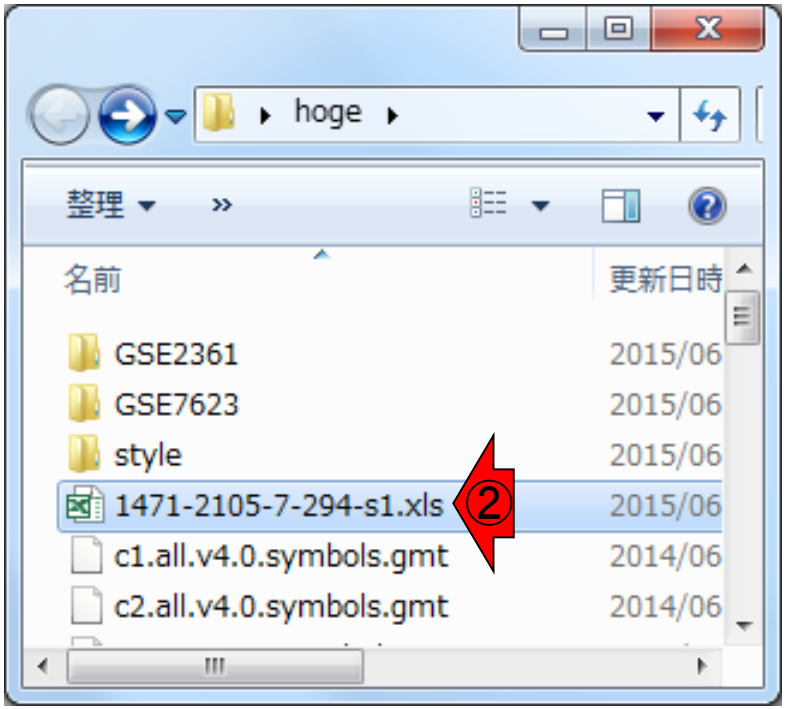
OPEN DATA

①RMA前処理後のデータを入力としてROKUを実行した結果（の一部）が、②ROKU論文のAdditional file 1と基本的に同じもの

# ROKUを実行

- Affymetrix GeneChip
  - Ge et al., *Genomics*, **86**: 127–141, 2005
    - **GSE2361**、GPL96 (Affymetrix Human Genome U133A Array)、22,283 probesets
    - **ヒト36サンプル**：Heart (心臓)、Thymus (胸腺)、Spleen (脾臓)、Ovary (卵巣)、Kidney (腎臓)、Skeletal Muscle (骨格筋)、Pancreas (膵臓)、Prostate (前立腺)、…



教科書 § 4.2.3

# ROKUを実行

①テンプレートスクリプトをテキストエディタにコピペして、②ファイル名部分を変更し、コピペ実行。約2分

## 解析 | 発現変動 | 多群間 | ROKU (Kadota_2006)

TCCパッケージで提供しているROKU法(Kadota et al., 2006)を用いて、遺伝子発現行列中の遺伝子を全体的な組織特異性の度合いでランキングします。出力ファイル中の"modH"列の数値は、「ROKU論文中のAdditional file 1(Suppl.xls)の"H(x')"列の数値」と対応しています。つまり、データ変換後のエントロピー値です。"ranking"列は、modHの値でランキングした結果です。"ranking"列で昇順にソートすることで、全体的な組織特異性の度合いでランキングしていることになります。つまり、上位が「(どの組織で特異的かはこのスコアだけでは分からないが)組織特異性が高い遺伝子」ということになります。残りの結果は「1:特異的高発現、-1:特異的低発現、0:その他」からなる「外れ値行列」です。例えば、組織AとBで1, それ以外の組織で0を示す遺伝子(群)は「AとB特異的高発現遺伝子」と判断します。

①

「ファイル」-「ディレクトリの変更」で解析したいファイルを置いてあるディレクトリに移動し、以下をコピペ

1. サンプルデータ21のsample21.txtの場合:

log2変換後のデータであるという前提です。

```
in_f <- "sample21.txt"
out_f <- "hoge1.txt"

#必要なパッケージをロード
library(TCC)

#入力ファイルの読み込み
data <- read.table(in_f, header=

#本番
hoge <- ROKU(data)
outlier <- hoge$outlier
modH <- hoge$modH
ranking <- hoge$rank

#ファイルに保存
tmp <- cbind(rownames(data), out
write.table(tmp, out_f, sep="\t
```

②

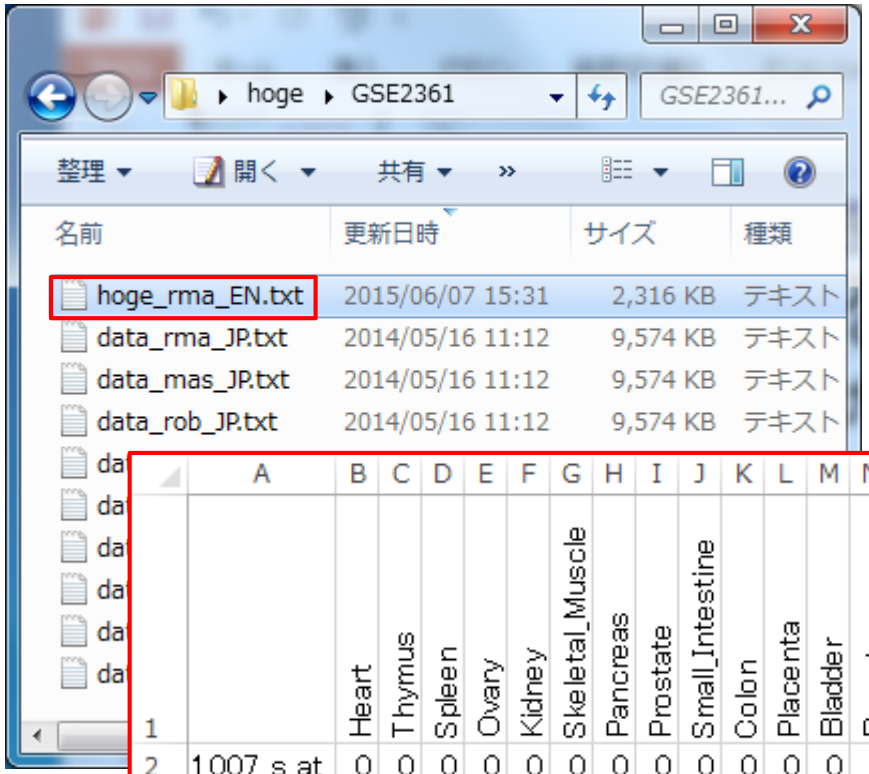
```
in_f <- "data_rma_EN.txt"          #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f <- "hoge_rma_EN.txt"         #出力ファイル名を指定してout_fに格納

#必要なパッケージをロード
library(TCC)                       #パッケージの読み込み

#入力ファイルの読み込み
data <- read.table(in_f, header=TRUE, row.names=1, sep="¥t", quote="")#in_f
#本番
hoge <- ROKU(data)                 #ROKUを実行した結果をhogeに格納
outlier <- hoge$outlier            #外れ値行列をoutlierに格納
modH <
rankin
#ファイ
tmp <-
write.
```

R Console

```
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge/GSE2361"
> list.files(pattern="rma")
[1] "data_rma.txt"    "data_rma_EN.txt" "data_rma_JP.txt"
>
```

# ROKUを実行

ROKU論文のAdditional file 1と若干結果が違いますが、Rやパッケージのバージョンの違い、ROKU内部で用いている階乗計算部分が原著論文では近似式（Staring）でしたが、TCCに移植する際に別の関数に置換したことなどが原因と考えられます




| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | W | X | Y | Z | AA | AB | AC | AD | AE | AF | AG | AH | AI | AJ | AK | AL | AM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | Heart | Thymus | Spleen | Ovary | Kidney | Skeletal_Muscle | Pancreas | Prostate | Small_Intestine | Colon | Placenta | Bladder | Breast | Uterus | Thyroid | Skin | Salivary_Gland | Trachea | Cerebellum | Brain | Fetal_Brain | Adrenal_Gland | Bone_Marrow | Amygdala | Caudate_Nucleus | Corpus | Hippocampus | Thalamus | Pituitary_Gland | Spinal_Cord | Testis | Liver | Stomach | Lung | Fetal_Lung | Fetal_Liver | modH | ranking |
| 2 | 1007_s_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.81 | 20121 |
| 3 | 1053_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4.54 | 7074 |
| 4 | 117_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.71 | 15317 |
| 5 | 121_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.97 | 1419 |
| 6 | 1255_g_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.13 | 2045 |
| 7 | 1294_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.85 | 21291 |
| 8 | 1316_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.66 | 12535 |
| 9 | 1320_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.57 | 8350 |
| 10 | 1405_i_at | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.19 | 2329 |
| 11 | 1431_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.66 | 76 |
| 12 | 1438_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4.57 | 8065 |
| 13 | 1487_at | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.74 | 16878 |

# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

# 機能解析

機能解析の実体は、遺伝子セットの発現変動解析。発現に差のある遺伝子セットを探したい、ということ

- Gene Ontology (GO)解析(発現に差のあるGO termを探索)
  - 基本3カテゴリ(Cellular Component (CC), Molecular Function (MF), Biological Process (BP))のどれでも可能
    - 例:肝臓の空腹状態 vs. 満腹状態のGO(BP)解析の結果、「脂肪酸β酸化」関連GO term (GO:0006635)が動いていることが分かった
- パスウェイ解析(発現に差のあるパスウェイを探索)
  - KEGG Pathway, BioCarta, Reactome pathway databaseのどれでも可能
    - 例:酸化的リン酸化パスウェイ関連遺伝子セットが糖尿病患者で動いていた
- モチーフ解析(発現に差のあるモチーフを探索)
  - 同じ3'-UTR microRNA結合モチーフをもつ遺伝子セット
  - 同じ転写因子結合領域(TATA-boxなど)をもつ遺伝子セット
    - 例:TATA-boxをもつ遺伝子セットがG1群 vs. G2群比較で動いていた
- ...

# 様々な方法があります

最近はRNA-seqとマイクロアレイどちらにも対応した解析プログラムがあります。一応①GO解析用と②Pathway解析用に分けていますが、大部分重複しています。講義では②GSAを利用してGO解析を行いますが、これは③Pathway解析にも使えます

## (Rで)マイクロアレイデータ解析

(last modified 2015/05/25, since 2005)

**What's new?**

- 門田幸二 著シリーズ Usef
  する最近の知見や、ROK
  んでいます。書籍中のマ
  トーム解析 | ...」に掲載し
- お知らせは主に(Rで)塩基
  や講演資料なども(Rで)塩

- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | betr (Aryee 2009) (last modified 2012/05/29)
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | maSigPro (Conesa 2006) (last modified 2015/08/16)
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | SAM (Tusher 2001) (last modified 2015/08/16)
- ① 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について(last modified 2016/05/25) NEW
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | gage (Luo 2009)(last modified 2015/05/25)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GSA (Efron 2007)(② modified 2015/10/26)推奨
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | Category (Jiang 200 (last modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | pcot2 (Kong 2006)(last modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | SAFE (Barry 2005)(last modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | globaltest (Goeman 2004)(last modified 2014/06/01)
- ② 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | について(last modified 2015/06/08)
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | Pathview (Luo 2013)(last modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | gage (Luo 2009)(last modified 20164/05/25) NEW
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | SPIA (Tarca 2009)( t modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | GSA (Efron 2007)(③ modified 2015/06/08)推奨
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | sigPathway (Tian 20 5)(last modified 2014/06/01)

# GO解析用

最も有名なのは②GSEA。③このあたりが最新プログラム。リスト漏れは沢山あるはず

- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | betr (Aryee 2009) (last modified 2012/05/29)
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | maSigPro (Conesa 2006) (last modified 2015/08/16)
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | SAM (Tushe 2001) (last modified 2015/08/16)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について (① modified 2016/05/25) NEW
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | gage (Luo 009)(last modified 2015/05/25)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GSA (Efron 2007)(last modified 2015/10/26)推奨
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | Categ
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | pcot2
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | SAFE
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | global
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | について(
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | Pathview (
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | gage (Luo
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | SPIA (Tar
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | GSA (Efro
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | sigPathwa

## 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について NEW

機能解析の実体は遺伝子セット解析です。遺伝子セット解析としてGO termを利用するのがGO解析です。

**R用:**

- globaltest: Goeman et al., Bioinformatics, 2004
- SAFE: Barry et al., Bioinformatics, 2005
- topGO: Alexa et al., Bioinformatics, 2006
- pcot2: Kong et al., Bioinformatics, 2006
- Category: Jiang et al., Bioinformatics, 2007
- GSA (作者のGSAウェブページ): Efron and Tibshirani, Ann. Appl. Stat., 2007
- dCoxS: Cho et al., BMC Bioinformatics, 2009
- GAGE: Luo et al., BMC Bioinformatics, 2009
- GOSemSim: Yu et al., Bioinformatics, 2010
- Camera (limmaの一部, 分かりづらい): We et al., Nucleic Acids Res., 2012
- RamiGO: Schröder et al., Bioinformatics, 2013
- LCT: Dinu et al., BMC Bioinformatics, 2013
- CompGO: Waardenberg et al., BMC Bioinformatics, 2015
- EnrichmentBrowser: Geistlinger et al., BMC Bioinformatics, 2016
- GOexpress: Rue-Albrecht et al., BMC Bioinformatics, 2016

③

**R以外:**

②

- GSEA: Subramanian et al., PNAS, 2005
- GSEAのユーザーガイド
- 名前とプログラムなし: Jiang and Gentleman, Bioinformatics, 2007
- GeneTrail: Backes et al., NAR, 2007

# Pathway解析用

②Pathviewなどはプログラム名からも想像できるように Pathway解析専用。以降は、なぜ③GSEAが流行ったかなどを、遺伝子セット解析の概念を④の総説をベースに解説

- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | について

- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | betr (Aryee 2009) (last modified 2012/05/29)
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | maSigPro (Conesa 200
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | SAM (Tusher 2001) (l
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について(last modifi
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | gage (Luo 2009)(las
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GSA (Efron 2007)(l
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | Category (Jiang 200
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | pcot2 (Kong 2006)(
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | SAFE (Barry 2005)(
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | global (Goeman
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | について(① modified 2
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | Pathview (Luo 2013)(las
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | gage (Luo 2009)(last mo
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | SPIA (Tarca 2009)(last m
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | GSA (Efron 2007)(last m
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | sigPathway (Tian 2005)(

## 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | について NEW

機能解析の実体は遺伝子セット解析です。遺伝子セット解析としてKEGGなどのパスウェイ情報を利用するのがパスウェイ解析です。

**R用:**

- GSA (作者のGSAウェブページ): Efron and Tibshirani, Ann. Appl. Stat., 2007
- SPIA: Tarca et al., Bioinformatics, 2009
- dCoxS: Cho et al., BMC Bioinformatics, 2009
- GAGE: Luo et al., BMC Bioinformatics, 2009
- PADOG: Tarca et al., BMC Bioinformatics, 2012
- Pathview: Luo et al., Bioinformatics, 2013
- EnrichmentBrowser: Geistlinger et al., BMC Bioinformatics, 2016

**R以外:**

- PLAGE(リンク切れ): Tomfohr et al., BMC Bioinformatics, 2005
- GSEA: Subramanian et al., PNAS, 2005
- GSEAのユーザーガイド
- ToppGene Suite(loginも要求なし; webtool): Chen et al., Nucleic Acids Res., 2009
- PINTA(loginも要求なし; webtool): Nitsch et al., Nucleic Acids Res., 2011
- FIDEA(loginも要求なし; webtool): D'Andrea et al., Nucleic Acids Res., 2013

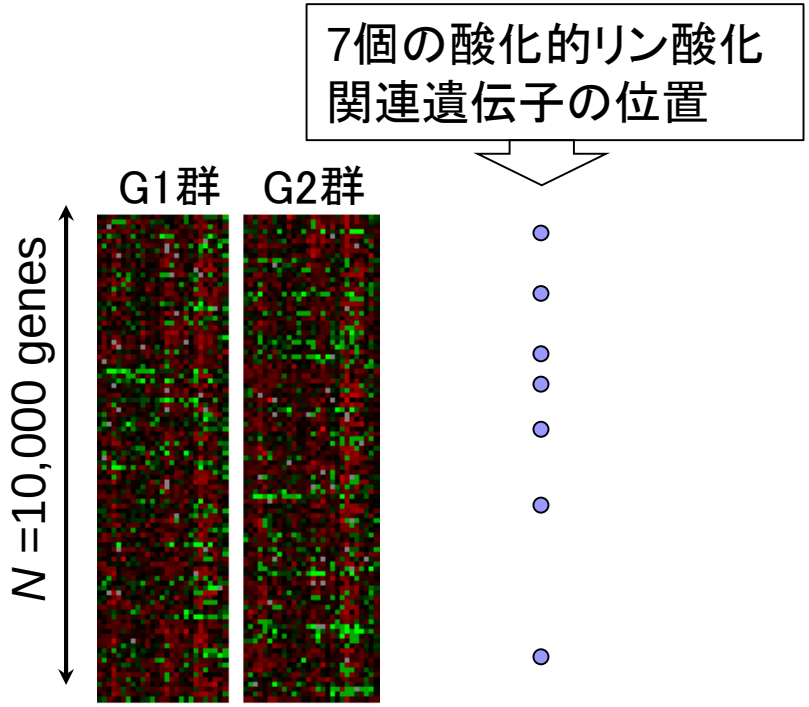
**Review、ガイドライン、パイプライン系:**

- 手法比較: Abatangelo et al., BMC Bioinforma[illegible], 2009
- Review: Khatri H, PLoS Comput Biol., 2012
- Review: Maciejewski H, Brief Bioinform., 201[illegible]
- 手法比較: Alavi-Majd et al., Gene, 2014
- 手法比較: Tarca et al., PLoS One, 2013
- 手法比較: Bayerlová et al., BMC Bioinformatics, 2016

# 機能解析（遺伝子セット解析）

酸化的リン酸化関連遺伝子セットが変動しているかどうかを調べたい、という問題を考える

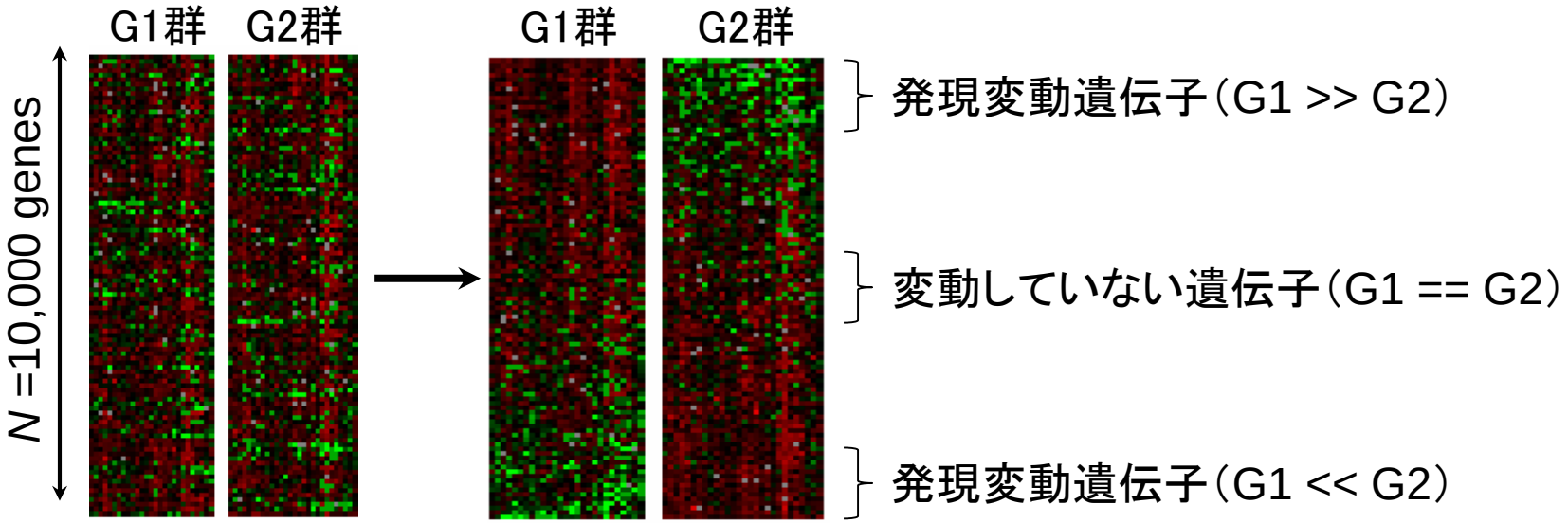
- 発現変動遺伝子セット解析手法（2群間比較用がほとんど）
  - *N* =10,000個の遺伝子からなる2群間比較用データ
  - この中に、XXX関連遺伝子が*n*個含まれている
    - 例：酸化的リン酸化（=XXX）関連遺伝子が7（=*n*）個含まれている



# 機能解析（遺伝子セット解析）

基本はデフォルトでやるようですが、様々な選択肢があります

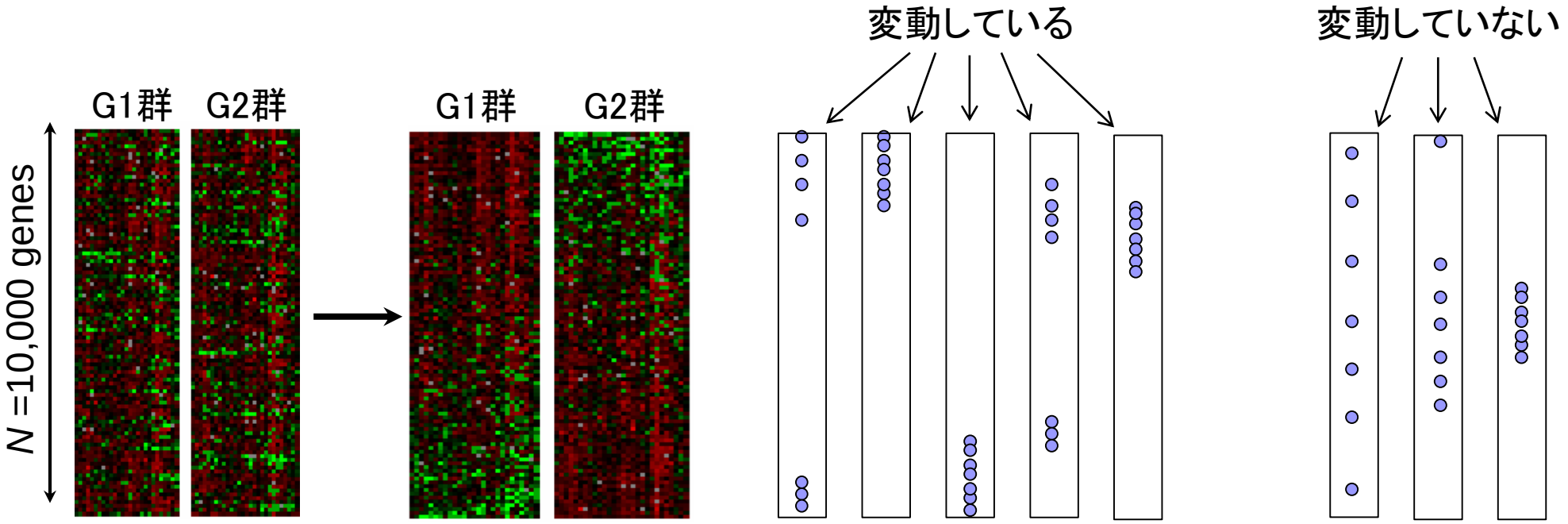
- 遺伝子ごとの発現変動の度合いを数値化
  - 例：t-統計量、log2（G2/G1）、相関係数、…



どうやって偏りを評価するのか?

# 機能解析(遺伝子セット解析)

- 発現変動順にソート後の酸化的リン酸化関連遺伝子セットのステレオタイプな分布

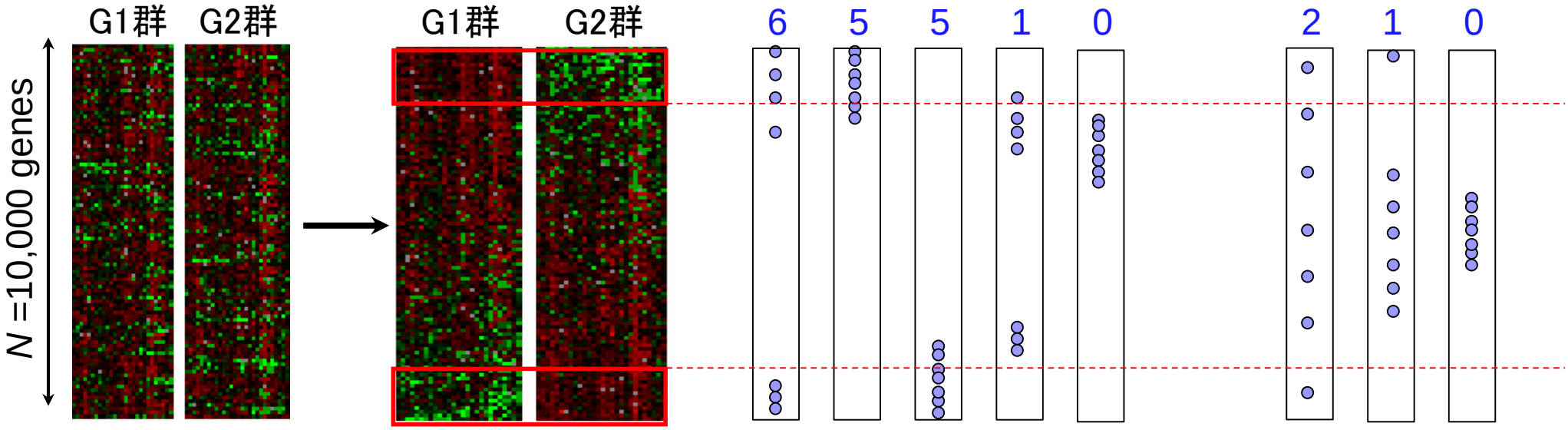


# 機能解析（遺伝子セット解析）

基本的な考え方は、「全遺伝子」と「上位のサブセット」のみで、調べたい遺伝子セットの割合が不変という帰無仮説のもとで検定

- Over-Representation Analysis (ORA)
  - 何らかの手段で決めた上位$X$(=1500)個のうち、$x$個が酸化的リン酸化関連遺伝子であった

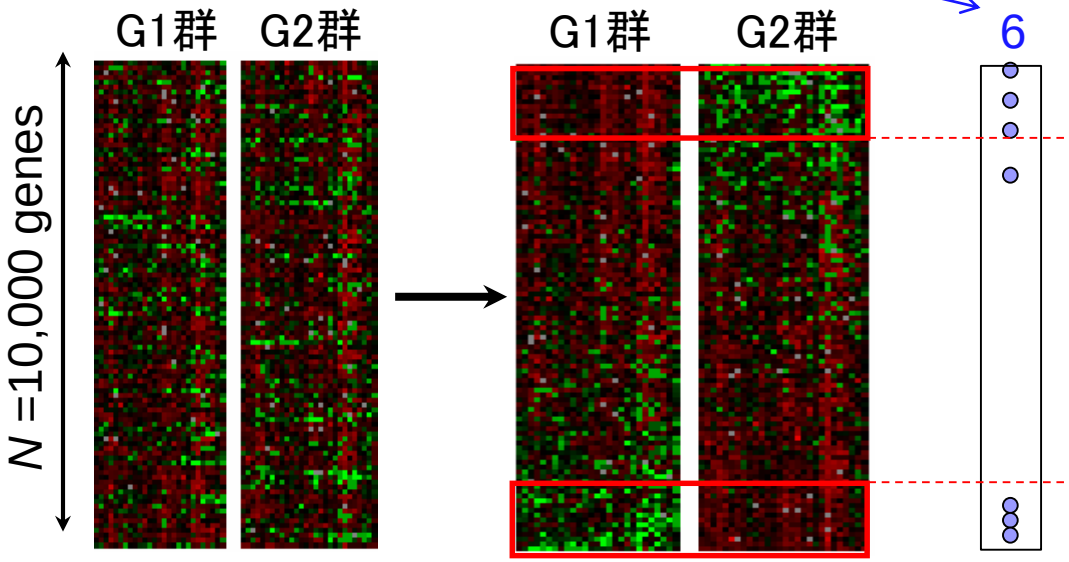
酸化的リン酸化関連遺伝子セット($n$=7)が変動していない場合：$x/n \fallingdotseq X/N$ (= 1500/10000)
酸化的リン酸化関連遺伝子セット($n$=7)が変動している場合：$x/n >> X/N$ (= 15%)



# 機能解析（遺伝子セット解析）

2×2分割表（contingency table）に基づく方法。超幾何検定やカイ二乗検定が利用されます。

- Over-Representation Analysis (ORA)
  - 何らかの手段で決めた上位*X*(=1500)個のうち、*x*個が酸化的リン酸化関連遺伝子であった




XXX=酸化的リン酸化関連遺伝子セット

| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | 1 | 8500-1 | $N$-$X$ |
| DEG数 | 6 | 1500-6 | $X$ |
| 計 | $n$ | $N$-$n$ | |

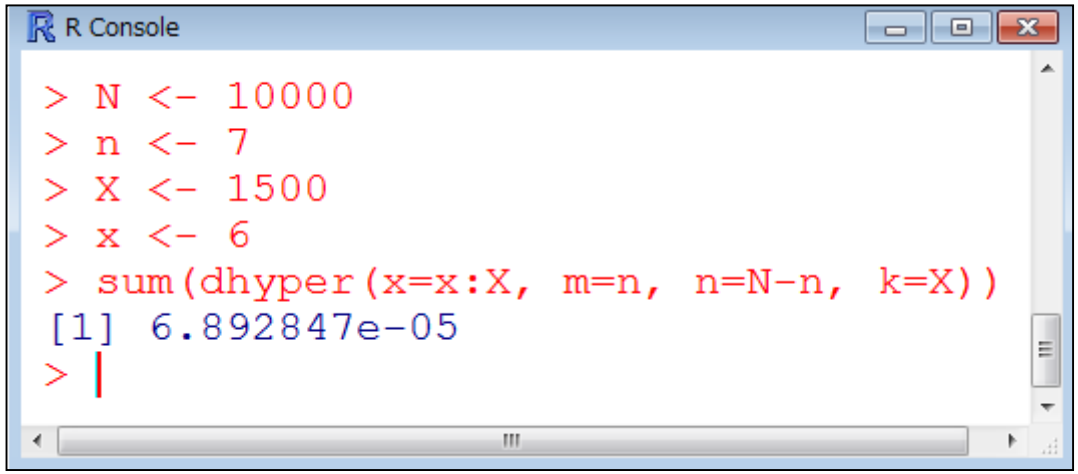
# 機能解析(超幾何検定)

DEGとして1500個抽出したとき、酸化的リン酸化関連遺伝子が6個以上含まれる確率として算出

- *N*=10000個の遺伝子発現データ中にXXX=酸化的リン酸化関連遺伝子は*n*=7個含まれていた。上位*X*=1500個の発現変動遺伝子(DEG)の中に*x*=6個の酸化的リン酸化関連遺伝子が含まれていた
  - 帰無仮説:酸化的リン酸化関連遺伝子の割合はDEGとnon-DEG間で差がない

| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | 1 | 8500-1 | 8500 |
| DEG数 | 6 | 1500-6 | 1500 |
| 計 | 7 | 9993 | 10000 |

| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | $n$-$x$ | $(N$-$n)$-$(X$-$x)$ | $N$-$X$ |
| DEG数 | $x$ | $X$-$x$ | $X$ |
| 計 | $n$ | $N$-$n$ | $N$ |



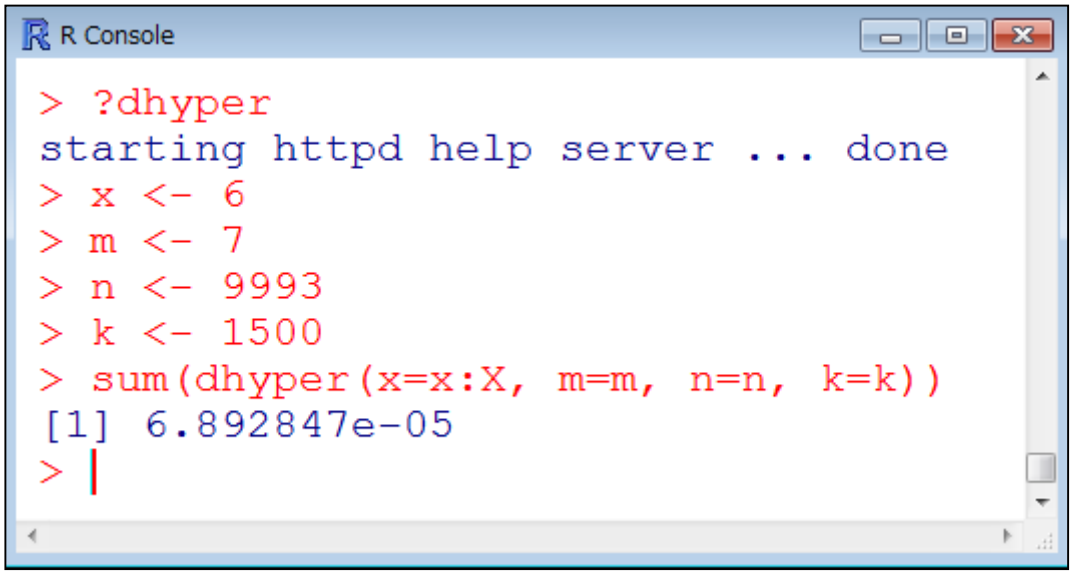
?dhyperマニュアル中の一般的な説明に置き換えるとこんな感じ

# 機能解析（超幾何検定）

- *m*=7個の白いボールと*n*=9993個の黒いボールが入った箱があります（トータルで*N*=*m*+*n*=10,000個）。この中から*k*=1500個ランダムに取り出したときに*x*=6個以上白いボールが含まれる確率を計算しなさい。

| | 白 | 黒 | 計 |
|---|---|---|---|
| 箱の中 | 1 | 9993−(1500−6) | 8500 |
| 箱の外 | 6 | 1500−6 | 1500 |
| 計 | 7 | 9993 | 10000 |

| | 白 | 黒 | 計 |
|---|---|---|---|
| 箱の中 | $m$-$x$ | $n$-($k$-$x$) | $m$+$n$-$k$ |
| 箱の外 | $x$ | $k$-$x$ | $k$ |
| 計 | $m$ | $n$ | $N$ |



# 機能解析(カイ二乗検定)

DEGとして1500個抽出したとき、酸化的リン酸化関連遺伝子が6個以上含まれる確率として算出

R Console

```
> N <- 10000
> n <- 7
> X <- 1500
> x <- 6
> data <- matrix(c((n-x), (N-n)-(X-x), x, (X-x)), ncol=2, byrow=T)
> data
     [,1] [,2]
[1,]    1 8499
[2,]    6 1494
> chisq.test(data)

        Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity
        correction

data:  data
X-squared = 22.2032, df = 1, p-value = 2.453e-06

 警告メッセージ:
In chisq.test(data) :  カイ自乗近似は不正確かもしれません
>
```

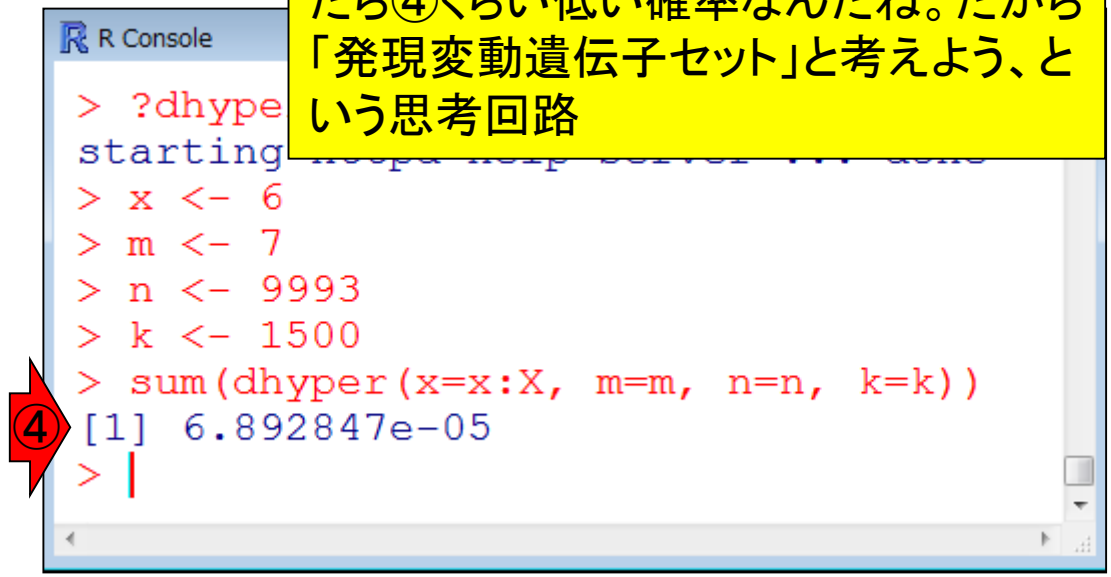
| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | 1 | 8500-1 | 8500 |
| DEG数 | 6 | 1500-6 | 1500 |
| 計 | 7 | 9993 | 10000 |

| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | $n$-$x$ | $(N$-$n)$-$(X$-$x)$ | $N$-$X$ |
| DEG数 | $x$ | $X$-$x$ | $X$ |
| 計 | $n$ | $N$-$n$ | $N$ |

# 直感は重要

① N=10000個の遺伝子発現データ中にXXX=酸化的リン酸化関連遺伝子は*n*=7個存在する
② 上位*X*=1500個の発現変動遺伝子（DEG）の中に*x*=6個の酸化的リン酸化関連遺伝子が含まれていた
③ 帰無仮説：酸化的リン酸化関連遺伝子の割合はDEGとnon-DEG間で差がない

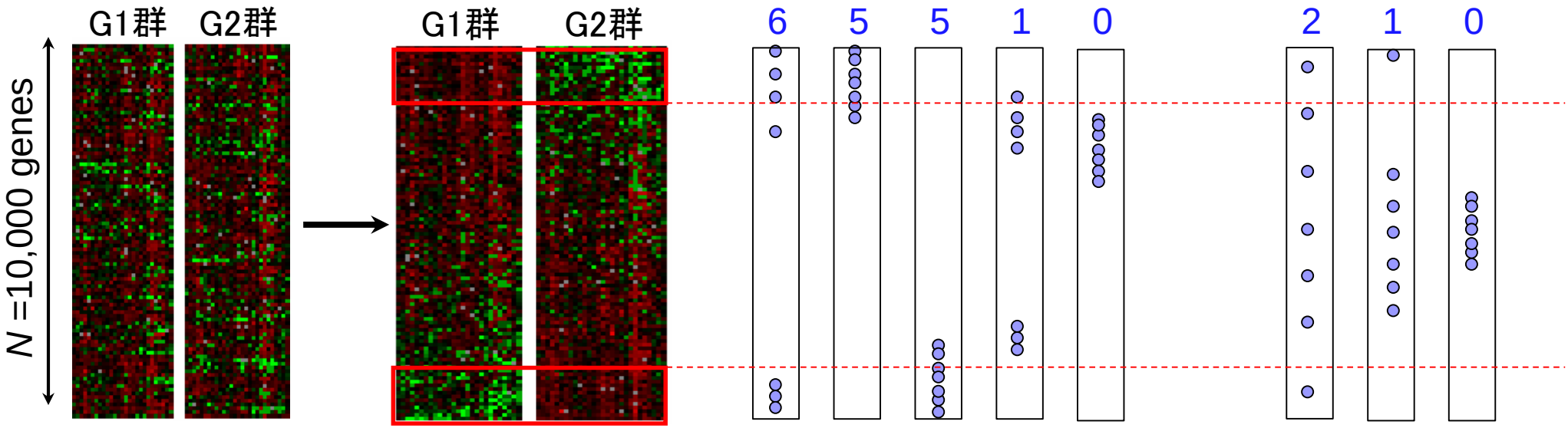
①の段階で、調べたい遺伝子セットは、7/10,000 = 0.07%の割合だと考える。②で6/1,500 = 0.4%の割合に濃縮されていると考える。③今やっているのは、ある2群間比較。もし比較している群間で、この遺伝子セットが全体として発現変動していなかったとしたら…ランダムで1,500個とった時に、この遺伝子セット中の遺伝子が含まれる割合は0.07%なので、個数だと1500×0.07% = 1.05個程度しか含まれないはず。実際に得られたのは6個なので、偶然こんな結果が得られたとは考えにくい。起こるとしたら④くらい低い確率なんだね。だから「発現変動遺伝子セット」と考えよう、という思考回路



# 機能解析（遺伝子セット解

上位1500個のうち、酸化的リン酸化関連遺伝子が7個中4つ以上含まれていれば $p < 0.05$ で検出可能ということを意味する

- Over-Representation Analysis (ORA)




| $p$-value | $x$=6 | $x$=5 | $x$=4 | $x$=3 | $x$=2 | $x$=1 | $x$=0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 超幾何検定 | 6.89E-05 | 0.0012 | 0.0121 | 0.0737 | 0.2834 | 0.6795 | 1.0000 |
| カイ二乗検定 | 2.45E-06 | 0.0003 | 0.0095 | 0.1247 | 0.6337 | 0.6337 | 0.5603 |
| Fisher test | 6.89E-05 | 0.0012 | 0.0121 | 0.0737 | 0.2834 | 1.0000 | 0.6039 |

$p < 0.05$を灰色で示した

①GenMAPPは比較的有名

# 機能解析(遺伝子セット解析)

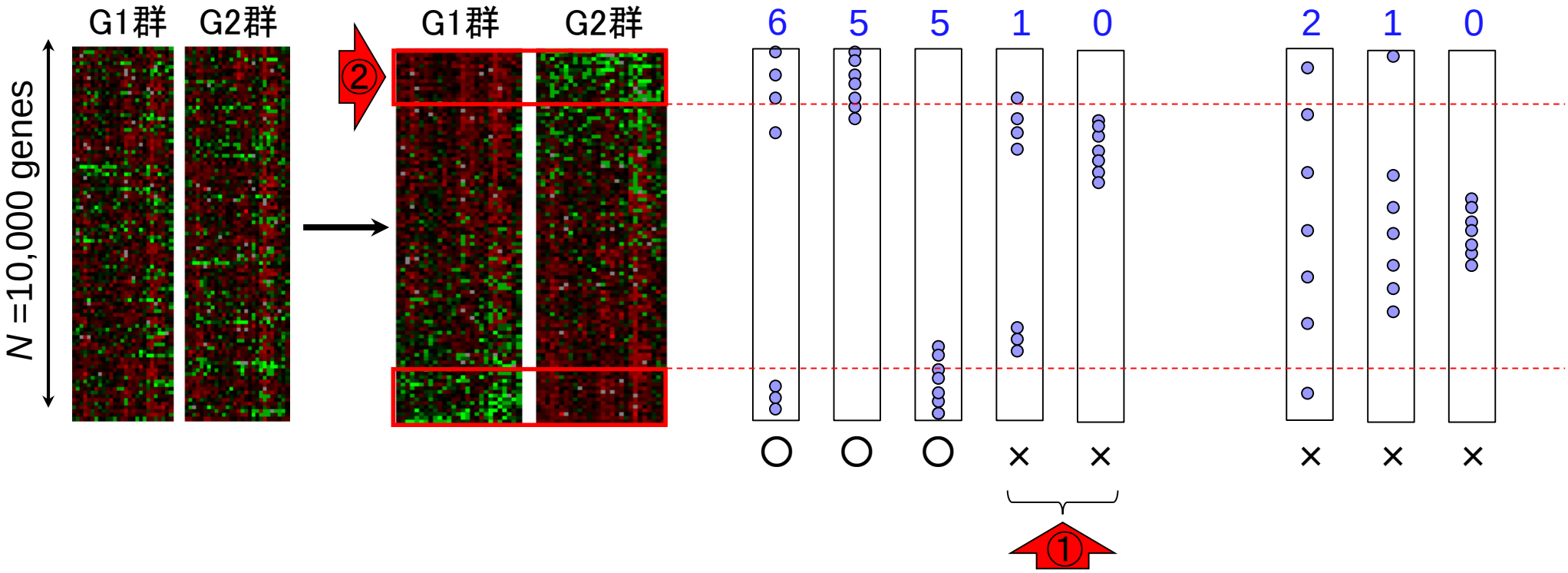
- Over-Representation Analysis (ORA)
  - GenMAPP (Dahlquist et al., *Nature Genet.,* **31**: 19-20, 2002) ①
  - FatiGO (Al-Shahrour et al., *Bioinformatics*, **20**: 578-580, 2004)
  - GOstat (Beissbarth et al., *Bioinformatics*, **20**: 1464-1465, 2004)
  - GOFFA (Sun et al., *BMC Bioinformatics*, **7 Suppl 2**: S23, 2006)
  - agriGO (Du et al., *Nucleic Acids Res.*, **38**: W64-W70, 2010)
  - …

# 第1世代（ORA）の短所

① 全体的には動いているものの、個々の発現変動の度合いが弱い場合に検出困難
② 上位$X$個の$X$次第で結果が変わる
③ 情報量低下（発現変動の度合い → カウント情報）

③

| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | $n$-$x$ | $(N$-$n)$-$(X$-$x)$ | $N$-$X$ |
| DEG数 | $x$ | $X$-$x$ | $X$ |
| 計 | $n$ | $N$-$n$ | $N$ |



もちろん分割表ベースの方法(ORA)ではない第2世代以降の方法があります

# 第2世代(FCS)

- Functional Class Scoring (FCS)
  1. 遺伝子ごとの統計量を算出(発現変動の度合いを数値化)
     例:*t*-統計量、log(G2/G1)、相関係数、…
  2. 目的の遺伝子セットXXX(=酸化的リン酸化関連遺伝子)の偏りを何らかの方法で評価
     - *t*検定(XXX中の遺伝子群の統計量 vs. それ以外の遺伝子群の統計量)
     - Wilcoxon rank sum test (XXX中の遺伝子群の発現変動の順位 vs. それ以外)
     - XXX中の*n*個の遺伝子群の何らかの要約統計量$S_{XXX}$を計算しておき、*N*個の全遺伝子の中からランダムに*n*個を抽出して同じ統計量を計算する(例えば10万回)。10万回のうち$S_{XXX}$「以上」(大きければ大きいほど発現変動していることを意味する場合;その逆のときは「以下」)だった回数(例えばj回)に基づいてp値(= j / 100,000)を算出(いわゆるgene set permutationというアプローチ)
     - 本来のG1群 vs. G2群のラベル情報を用いて得られたXXX中の*n*個の遺伝子群の何らかの要約統計量$S_{XXX}$を計算しておく。ランダムにラベル情報を入れ替えて、同じ統計量を計算することを何回も繰り返して*p*値を算出(いわゆるPhenotype permutationというアプローチ)

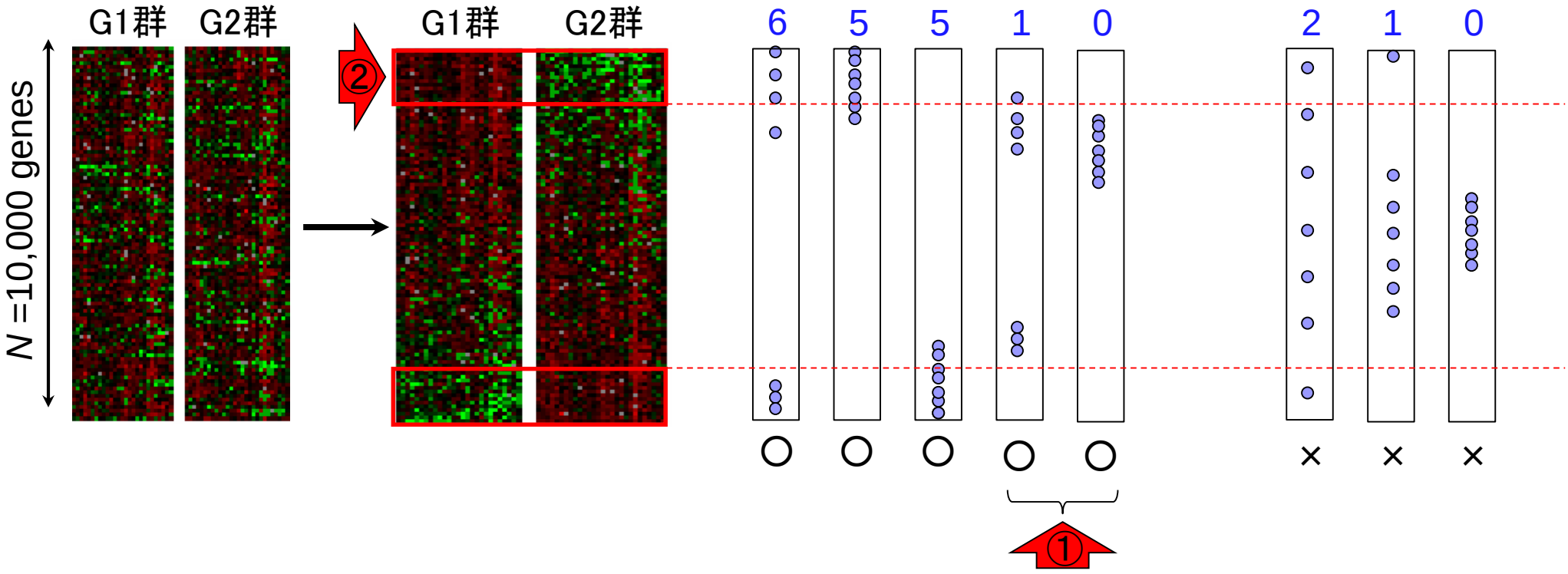
# 第2世代（FCS）

遺伝子ごとのlog比で考えると、遺伝子を等価に取り扱うのではなく、log比そのものを足し込むことで、発現変動の大きなものに対し、小さなものに比べてより大きな重みをかけるイメージ

- 第一世代(ORA)の欠点が改善
  - ① 全体的には動いているものの、個々の発現変動の度合いが弱い場合に検出困難
  - ② 上位$X$個の$X$次第で結果が変わる
  - ③ 情報量低下（発現変動の度合い → カウント情報）

③

| | XXX | XXX以外 | 計 |
|---|---|---|---|
| non-DEG数 | $n$-$x$ | $(N$-$n)$-$(X$-$x)$ | $N$-$X$ |
| DEG数 | $x$ | $X$-$x$ | $X$ |
| 計 | $n$ | $N$-$n$ | $N$ |



# 第2世代(FCS)

最も有名なのは①GSEA。実習で行う②GSAもこのカテゴリ

- Functional Class Scoring (FCS)
  - **GSEA** (Subramanian et al., *PNAS*, **102**: 15545–15550, 2005) ①
  - PAGE (Kim and Volsky, *BMC Bioinformatics*, **6**: 144, 2005)
  - sigPathway (Tian et al., *PNAS*, **102**: 13544–13549, 2005)
  - GSA (Efron and Tibshirani, *Ann. Appl. Stat.*, **1**: 107–129, 2007) ②
  - GeneTrail (Backes et al., *Nucleic Acids Res.*, **35**: W186–W192, 2007)
  - SAM-GS (Dinu et al., *BMC Bioinformatics*, **8**: 242, 2007)
  - …

# 遺伝子セット解析の課題

突っ込みどころは満載だが、ネガティブなことばかりいってもしょうがないし、この種の機能解析が目的の場合も多い

- （知識ベースの解析法なので）解析対象がアノテーションの情報の豊富な生物種に限定
  - それ以外の生物種は、まずは地道にアノテーション情報を増やしていくことが先決（ではないだろうか）
  - アノテーションの解像度を上げる努力も大事
- アノテーション情報の信頼度が高いとはいえない
  - なんらかのGO termがついていたとしても、その大部分のevidence codeが自動でつけられたもの（IEA, inferrred from electronic annotations）である…
- 遺伝子セット間の独立性の問題
  - 「数百個程度の遺伝子セットの中から、比較するサンプル間で動いている遺伝子セットはどれか？」という解析を遺伝子セット間の独立性を仮定して調べるが、そもそも独立ではない（GO term間の親子関係などから明らか）
    → いくつくらいの遺伝子セットが動いているのか？という問いに答えるすべがない
- 評価に用いられる「よく研究されているデータセット」は答えが完全に分かっているものではない（the actual biology is never fully known!）
  - “感度が高い”と謳っているだけの方法は…（全部の遺伝子セットが動いている → 感度100%）

# 遺伝子セット解析おさらい

どの遺伝子セットにどの遺伝子が属しているかというgmt形式ファイルの取得が第一歩

- Gene Ontology (GO)解析(発現に差のあるGO termを探索)
  - 基本3カテゴリ(Cellular component (CC), Molecular Function (MF), Biological Process (BP))のどれでも可能
    - 例:肝臓の空腹状態 vs. 満腹状態のGO(BP)解析の結果、「脂肪酸β酸化」関連GO term (GO:0006635)が動いていることが分かった
- パスウェイ解析(発現に差のあるパスウェイを探索)
  - KEGG, BioCarta, Reactome pathway databaseのどれでも可能
    - 例:酸化的リン酸化パスウェイ関連遺伝子セットが糖尿病患者で動いていた
- モチーフ解析(発現に差のあるモチーフを探索)
  - 同じ3'-UTR microRNA結合モチーフをもつ遺伝子セット
  - 同じ転写因子結合領域(TATA-boxなど)をもつ遺伝子セット
    - 例:TATA-boxをもつ遺伝子セットがG1群 対 G2群比較で動いていた
- …

# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

# MSigDB ver. 5.1

①MSigDBは、Molecular Signature Databaseの略。様々な遺伝子セット解析を行うために必要な情報を含むgmt形式ファイルをダウンロード可能です

- H: hallmark gene sets (50 gene sets)
- c1: positional gene sets (326 gene sets)
  - ヒト染色体の位置ごとの遺伝子セットリストファイル (326 gene sets)
- c2: curated gene sets (4,726 gene sets)
  - **CGP**: chemical and genetic perturbations (3,396 gene sets)
  - **CP**: canonical pathways (1,330 gene sets)
  - **CP:BIOCARTA**: BioCarta gene sets (217 gene sets)
  - **CP:KEGG**: KEGG gene sets (186 gene sets)
  - **CP:REACTOME**: Reactome gene sets (674 gene sets)
- c3: motif gene sets (836 gene sets)
  - **MIR**: microRNA targets (221 gene sets)
  - **TFT**: transcription factor targets (615 gene sets)
- c4: computational gene sets (858 gene sets)
  - **CGM**: cancer gene neighborhoods (427 gene sets)
  - **CM**: cancer modules (431 gene sets)
- c5: gene ontology (GO) gene sets (1,454 gene sets)
  - **BP**: biological process (825 gene sets)
  - **CC**: cellular component (233 gene sets)
  - **MF**: molecular function (396 gene sets)
- c6: oncogenic signatures gene sets (189 gene sets)
- c7: immunologic signatures gene sets (4,872 gene sets)

発現変動と関連するKEGGパスウェイを調べたいとき

発現変動と関連するBP中のGO termsを調べたいとき

①

Subramanian et al., *PNAS*, **102**: 15545–15550, 2005

2015年3月にMSigDB ver. 5.0リリース

# MSigDB ver. 5.0

- H: hallmark gene sets (50 gene sets)
- c1: positional gene sets (326 gene sets)
  - ヒト染色体の位置ごとの遺伝子セットリストファイル (326 gene sets)
- c2: curated gene sets (4,725 gene sets)
  - **CGP**: chemical and genetic perturbations (3,395 gene sets)
  - **CP**: canonical pathways (1,330 gene sets)
  - **CP:BIOCARTA**: BioCarta gene sets (217 gene sets)
  - **CP:KEGG**: KEGG gene sets (186 gene sets)
  - **CP:REACTOME**: Reactome gene sets (674 gene sets)
- c3: motif gene sets (836 gene sets)
  - **MIR**: microRNA targets (221 gene sets)
  - **TFT**: transcription factor targets (615 gene sets)
- c4: computational gene sets (858 gene sets)
  - **CGM**: cancer gene neighborhoods (427 gene sets)
  - **CM**: cancer modules (431 gene sets)
- c5: gene ontology (GO) gene sets (1,454 gene sets)
  - **BP**: biological process (825 gene sets)
  - **CC**: cellular component (233 gene sets)
  - **MF**: molecular function (396 gene sets)
- c6: oncogenic signatures gene sets (189 gene sets)
- c7: immunologic signatures gene sets (1,910 gene sets)

発現変動と関連するKEGGパスウェイを調べたいとき ←

発現変動と関連するBP中のGO termsを調べたいとき ←

2013年5月にMSigDB ver. 4.0リリース

# MSigDB ver. 4.0

- c1: positional gene sets (326 gene sets)
  - ヒト染色体の位置ごとの遺伝子セットリストファイル (326 gene sets)
- c2: curated gene sets (4,722 gene sets)
  - **CGP**: chemical and genetic perturbations (3,402 gene sets)
  - **CP**: canonical pathways (1,320 gene sets)
  - **CP:BIOCARTA**: BioCarta gene sets (217 gene sets)
  - **CP:KEGG**: KEGG gene sets (186 gene sets)
  - **CP:REACTOME**: Reactome gene sets (674 gene sets)
- c3: motif gene sets (836 gene sets)
  - **MIR**: microRNA targets (221 gene sets)
  - **TFT**: transcription factor targets (615 gene sets)
- c4: computational gene sets (858 gene sets)
  - **CGM**: cancer gene neighborhoods (427 gene sets)
  - **CM**: cancer modules (431 gene sets)
- c5: gene ontology (GO) gene sets (1,454 gene sets)
  - **BP**: biological process (825 gene sets)
  - **CC**: cellular component (233 gene sets)
  - **MF**: molecular function (396 gene sets)
- c6: oncogenic signatures gene sets (189 gene sets)
- c7: immunologic signatures gene sets (1,910 gene sets)

発現変動と関連するKEGG パスウェイを調べたいとき

発現変動と関連するBP中のGO termsを調べたいとき

# MSigDB ver. 5.0 →5.1

MSigDB ver. 5.1では、①c7の情報が豊富になっていることがわかる。②原著論文

- H: hallmark gene sets (50 gene sets)
- c1: positional gene sets (326 gene sets)
  - ヒト染色体の位置ごとの遺伝子セットリストファイル (326 gene sets)
- c2: curated gene sets (4,726 gene sets)
  - **CGP**: chemical and genetic perturbations (3,396 gene sets)
  - **CP**: canonical pathways (1,330 gene sets)
  - **CP:BIOCARTA**: BioCarta gene sets (217 gene sets)
  - **CP:KEGG**: KEGG gene sets (186 gene sets)
  - **CP:REACTOME**: Reactome gene sets (674 gene sets)
- c3: motif gene sets (836 gene sets)
  - **MIR**: microRNA targets (221 gene sets)
  - **TFT**: transcription factor targets (615 gene sets)
- c4: computational gene sets (858 gene sets)
  - **CGM**: cancer gene neighborhoods (427 gene sets)
  - **CM**: cancer modules (431 gene sets)
- c5: gene ontology (GO) gene sets (1,454 gene sets)
  - **BP**: biological process (825 gene sets)
  - **CC**: cellular component (233 gene sets)
  - **MF**: molecular function (396 gene sets)
- c6: oncogenic signatures gene sets (189 gene sets)
- c7: immunologic signatures gene sets (4,872 gene sets) ①

発現変動と関連するKEGGパスウェイを調べたいとき

発現変動と関連するBP中のGO termsを調べたいとき

②

Godec et al., *Immunity*, **44**: 194–206, 2016

# MSigDB

遺伝子セット解析を行うためのgmt形式ファイルのダウンロード方法は②こちら

## (Rで)マイクロアレイデータ解析

**(last modified 2015/05/25, since 2005)**

- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | maSigPro (Conesa 2006) (last modified 2009/8/3)
- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | SAM (Tushe 2001) (last modified 2009/8/3)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について (① modified 2015/06/07) NEW
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GAGE (Lu 2009)(last modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GSA (Efron 2007)(last modified 2014/06/03)推奨

### 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について NEW

機能解析の実体は遺伝子セット解析です。遺伝子セット解析としてGO termを利用するのがGO解析です。

**R用:**

- globalt
- SAFE:
- topGO
- pcot2:
- Catego
- GSA (
- dCoxS
- GAGE
- GOSen
- Camer
- RamiG
- LCT:

**遺伝子セットDB系:**

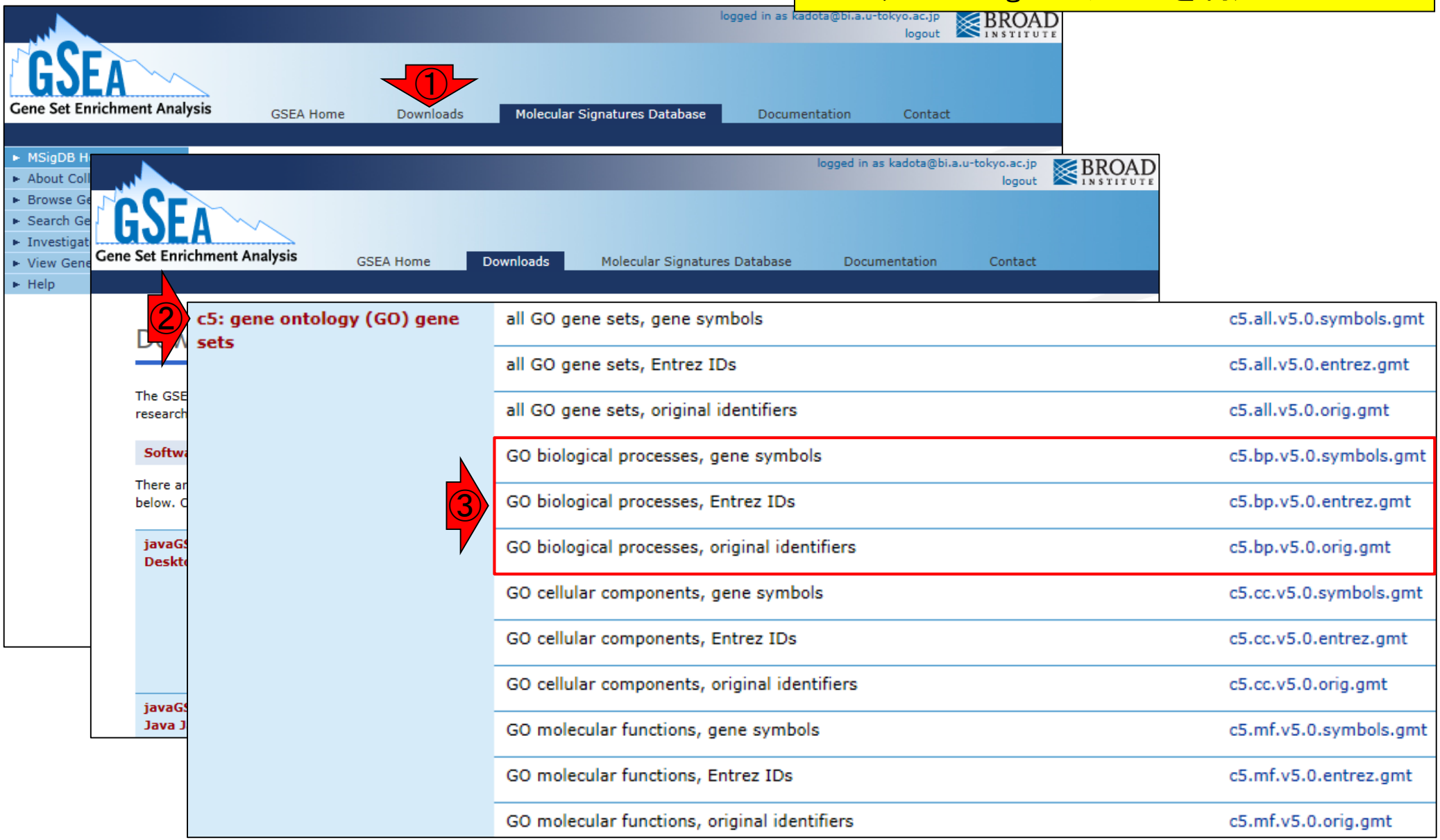
- MSigDB: Subramanian et al., PNAS, 2005

GSEAに代表される発現変動遺伝子セット解析は、基本的にGSEAの開発者らが作成した様々な遺伝子セット情報を収めた Molecular Signatures Database (MSigDB)からダウンロードした.gmt形式ファイルを読み込んで解析を行います。それゆえ、自分がどの遺伝子セットについて機能解析を行いたいのかを予め決めておく必要がありますが、GO解析の場合はbiological process (BP)が一般的なようです。2015/06/07現在のバージョンは5.0です。gmt形式ファイルの基本的なダウンロード方法は以下の通りです:

1. Molecular Signatures Database (MSigDB) (②
   「register」のページで登録し、遺伝子セットをダウンロード可能な状態にする。
2. Molecular Signatures Database (MSigDB)の
   「Download gene sets」の"Download"のところをクリックし、Loginページで登録したe-mail addressを入力。
3. これでMSigDBのダウンロードページに行けるので、目的に応じたgmtファイルをダウンロードしておく。
   「c5: gene ontology gene sets」の「bp: biological process」を解析する場合:c5.bp.v5.0.symbols.gmt
   「c5: gene ontology gene sets」の「cc: cellular components」を解析する場合:c5.cc.v5.0.symbols.gmt
   「c5: gene ontology gene sets」の「mf: molecular functions」を解析する場合:c5.mf.v5.0.symbols.gmt

# MSigDB

②発現変動と関連するbiological processes (BP)中のGO termsを調べたいときは、③中のいずれかのgmtファイルを利用



# gmtファイル

基本的にどれを使っても自由だが、利用するRパッケージがどの入力形式を受け付けるかにも依存する。経験上gene symbolsを使っておけば間違いないので、門田は*.symbols.gmtをいつも利用しています

| | A | B | C | D | E | F | G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TRNA_PROCESSING | http://www | ADAT1 | TRNT1 | FARS2 | METTL1 | SARS |
| 2 | REGULATION_OF_BIOLOGICAL_QUALI | http://www | DLC1 | ALS2 | SLC9A7 | PTGS2 | PTGS1 |
| 3 | DNA_METABOLIC_PROCESS | http://www | XRCC5 | XRCC4 | RAD51C | XRCC3 | XRCC2 |
| 4 | AMINO_SUGAR_METABOLIC_PROCESS | http://www | UAP1 | CHIA | GNPDA1 | GNE | CSGALNAC |
| 5 | BIOPOLYMER_CATABOLIC_PROCESS | http://www | BTRC | HNRNPD | USE1 | RNASEH1 | RNF217 |

| | A | B | C | D | E | F | G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TRNA_PROCESSING | http://www | 23536 | 51095 | 10667 | 4234 | 6301 |
| 2 | REGULATION_OF_BIOLOGICAL_QUALI | http://www | 10395 | 57679 | 84679 | 5743 | 5742 |
| 3 | DNA_METABOLIC_PROCESS | http://www | 7520 | 7518 | 5889 | 7517 | 7516 |
| 4 | AMINO_SUGAR_METABOLIC_PROCESS | http://www | 6675 | 27159 | 10007 | 10020 | 55790 |
| 5 | BIOPOLYMER_CATABOLIC_PROCESS | http://www | 8945 | 3184 | 55850 | 246243 | 154214 |

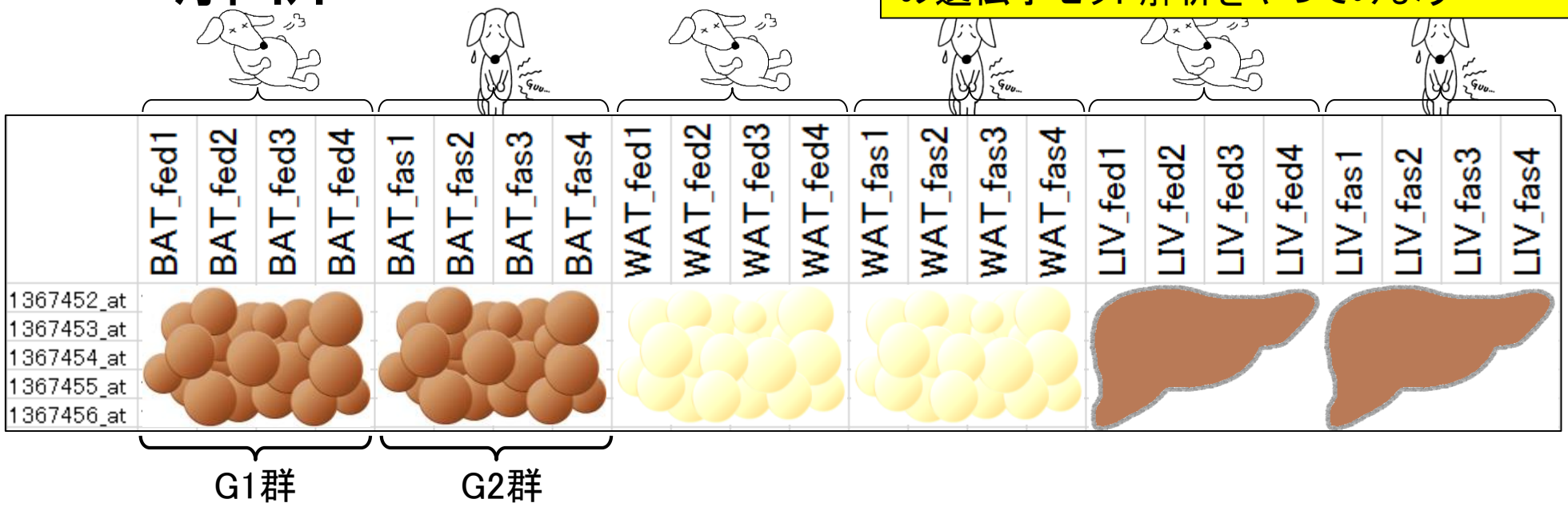
c5.bp.v5.0.symbols.gmt
c5.bp.v5.0.entrez.gmt
c5.bp.v5.0.orig.gmt

| | A | B | C | D | E | F | G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TRNA_PROCESSING | http://www | ADAT1 | TRNT1 | FARS2 | METTL1 | SARS |
| 2 | REGULATION_OF_BIOLOGICAL_QUALI | http://www | DLC1 | ALS2 | SLC9A7 | PTGS2 | PTGS1 |
| 3 | DNA_METABOLIC_PROCESS | http://www | XRCC5 | XRCC4 | RAD51C | XRCC3 | XRCC2 |
| 4 | AMINO_SUGAR_METABOLIC_PROCESS | http://www | UAP1 | CHIA | GNPDA1 | GL | |
| 5 | BIOPOLYMER_CATABOLIC_PROCESS | http://www | BTRC | HNRPD | USE1 | RI | |

1列目：遺伝子セット名
2列目：URL
3列目以降：gene ID or symbol

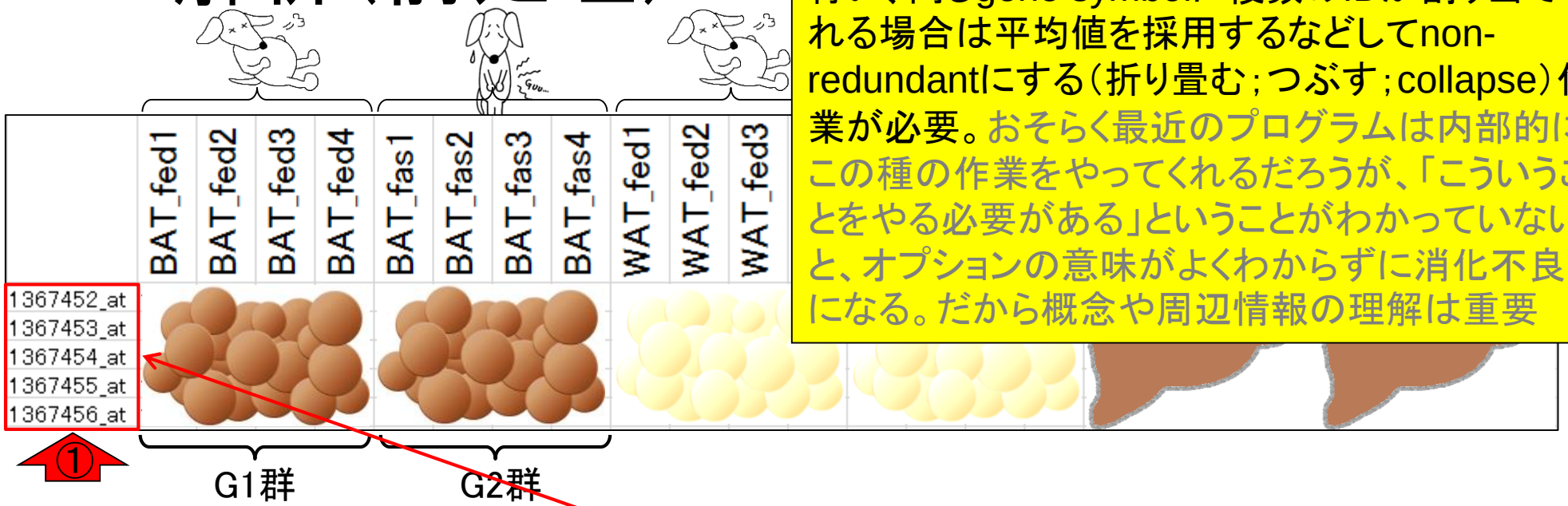
# GO解析

GSE7623 (Nakai et al., 2008)の**対数変換後**のデータを入力として、BAT_fed vs. BAT_fasの遺伝子セット解析をやってみよう



# GO解析（前処理）

①probeset ID（Affymetrix GeneChipの遺伝子につけられたID）と②gene symbolの対応付けを行い、同じgene symbolに複数のIDが割り当てられる場合は平均値を採用するなどしてnon-redundantにする（折り畳む；つぶす；collapse）作業が必要。おそらく最近のプログラムは内部的にこの種の作業をやってくれるだろうが、「こういうことをやる必要がある」ということがわかっていないと、オプションの意味がよくわからずに消化不良になる。だから概念や周辺情報の理解は重要




| | A | B | C | D | E | F | G | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TRNA_PROCESSING | http://www | ADAT1 | TRNT1 | FARS2 | METTL1 | SARS | AARS |
| 2 | REGULATION_OF_BIOLOGICAL_QUALI | http://www | DLC1 | ALS2 | SLC9A7 | PTGS2 | PTGS1 | MPV |
| 3 | DNA_METABOLIC_PROCESS | http://www | XRCC5 | XRCC4 | RAD51C | XRCC3 | XRCC2 | XRC |
| 4 | AMINO_SUGAR_METABOLIC_PROCESS | http://www | UAP1 | CHIA | GNPDA1 | GNE | CSGALNAC | CHS |
| 5 | BIOPOLYMER_CATABOLIC_PROCESS | http://www | BTRC | HNRNPD | USE1 | RNASEH1 | RNF217 | ISG2 |
| 6 | DNA_METABOLIC_PROCESS | http://www | HNRNPF | HNRNPD | SYNCRIP | MED24 | RORB | MED |

②

# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

# ID変換

遺伝子発現データは、公共DBのGEOからGSE7623というIDで取得したものだった。ここから、probeset IDとgene symbolの対応付けを行うためのアノテーションファイルを取得可能。コピペはしなくてよい

- イントロ | 発現データ取得 | GEOquery(Davis_2007) (last modified 2013/08/20)
- イントロ | アノテーション情報取得 | 公共DB(GEO)から (last modified 2013/08/18)
- イントロ | アノテーション情報取得 | GEOquery(Davis_2007) (last modified 2014/06/03)推
- イントロ | アノテーション情報取得 | Rのパッケージ*.dbから (last modified 2014/06/02)
- イントロ | プローブ配列情報取得 | Rのパッケージから (last modified 2013/08/16)
- イントロ | トランスクリプト
- イントロ | トランスクリプト
- イントロ | Affymetrix CEL
- 正規化(cDNA or two-colo
- 正規化 | Stanford型 (or cD
- 正規化 | Stanford型 (or cD
- 正規化 | Agilent microarra
- 正規化 | Agilent microarra
- 正規化 | Illumina BeadAr
- 正規化 | Illumina BeadAr

① ②

## イントロ | アノテーション情報取得 | GEOquery (Davis_2007)

公共DBGene Expression Omnibus (GEO)に登録されているアレイ(Platform)のアノテーション情報をGEOqueryというRパッケージを用いてゲットするやり方を示します。
「ファイル」-「ディレクトリの変更」でファイルを保存したいディレクトリに移動し以下をコピペ。

**1. Affymetrix Rat Genom**

```
out_f <- "hoge1.txt"
param <- "GPL1355"

#必要なパッケージをロー
library(GEOquery)

#前処理
data <- getGEO(param)

#本番
out <- data@dataTable@
write.table(out, out_f
```

**3. "GSE"から始まるIDをたよりにアレイのID情報を内部的に入手してアノテーション情報を取得したい場合:**

GSE7623 (Nakai et al., BBB, 2008)は1種類のアレイ(GPL1355)しか使っていないので、1つのファイルのみ生成されます。出力ファイルの情報に相当するoutオブジェクト中の、自分がほしいprobe ID列とgene symbol列が1列目と11列目に存在することがあらかじめ分かっているという前提です。colnames(out)でわかります。アノテーション情報のバージョンが異なりうるため若干違うかもしれませんがhoge3_GPL1355.txtと酷似したものができていると思います。

```
param1 <- "GSE7623"                    #入手したいGEO IDを指定
param2 <- "hoge3_"                     #出力ファイル名の最初の部分を指定
param_posi <- c(1, 11)                 #outオブジェクト中のID列とgene symb

#必要なパッケージをロード
library(GEOquery)                      #パッケージの読み込み

#前処理
data <- getGEO(param1)                 #指定したGEO IDのデータを取得
sapply(data, annotation)               #用いられたアレイ情報(GPL ID)を表示

#本番
hoge <- sapply(data, annotation)       #用いられたアレイ情報(GPL ID)をhoge
```

# ID変換

probeset IDとgene symbolからなるアノテーションファイルを取得できています。確認時は2分程度で終わりましたが、hogeフォルダにhoge3_GPL1355.txtを一応置いてあります

**3. "GSE"から始まるIDをたよりにアレイのID情報を内部的に入手してアノテーション情報を得したい場合:**

GSE7623 (Nakai et al., BBB, 2008)は1種類のアレイ(GPL1355)しか使っていないので、1つのファイルのみ生成されます。出力ファイルの情報に相当するoutオブジェクト中の、自分がほしいprobe ID列とgene symbol列が1列目と11列目に存在することがあらかじめ分かっているという前提です。colnames(out)でわかります。アノテーション情報のバージョンが異なりうるため若干違うかもしれませんがhoge3_GPL1355.txtと酷似したものができていると思います。

```
param1 <- "GSE7623"                          #入手したいGE
param2 <- "hoge3_"                           #出力ファイル
param_posi <- c(1, 11)                       #outオブジェ

#必要なパッケージをロード
library(GEOquery)                            #パッケージの

#前処理
data <- getGEO(param1)                       #指定したGEO
sapply(data, annotation)                     #用いられたア

#本番
hoge <- sapply(data, annotation)             #用いられたア
for(i in 1:length(hoge)){                    #hogeの要素数
    out_f <- paste(param2, hoge[i], ".txt", sep="")
    out <- data[[i]]@featureData@data        #アノテーショ
    colnames(out)                            #確認してるた
```

R Console

```
> for(i in 1:length(hoge)){                          #hogeの要$
+     out_f <- paste(param2, hoge[i], ".txt", sep=$
+     out <- data[[i]]@featureData@data   #アノテ$
+     colnames(out)                                  #確認して$
+     out <- out[,param_posi]                        #サブセッ$
+     write.table(out, out_f, sep="\t", append=F, $
+ }
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge"
> list.files(pattern="hoge3")
[1] "hoge3_GPL1355.txt"
> head(out, n=3)
                ID Gene Symbol
1367452_at 1367452_at       Sumo2
1367453_at 1367453_at       Cdc37
1367454_at 1367454_at       Copb2
> dim(out)
[1] 31099     2
>
```

# ID変換

エクセルで開くときには注意が必要！1行1列目のところが”ID”から始まる文字列の場合にこのような現象が起こるようですが、基本無視で構いません

参考

# ID変換

**編集して保存したい場合**には、ドラッグ&ドロップで開いてはだめです。「ファイル」-「開く」でファイルを指定して開くべし!そのまま開くと例えば**March2**というgene symbolが日付と認識されてしまうため、これを防ぐ必要があります！

BMC Bioinformatics. 2004 Jun 23;5:80.

**Mistaken identifiers: gene name errors can be introduced inadvertently when using Excel in bioinformatics.**

Zeeberg BR[1], Riss J, Kane DW, Bussey KJ, Uchio E, Linehan WM, Barrett JC, Weinstein JN.

Author information

**Abstract**

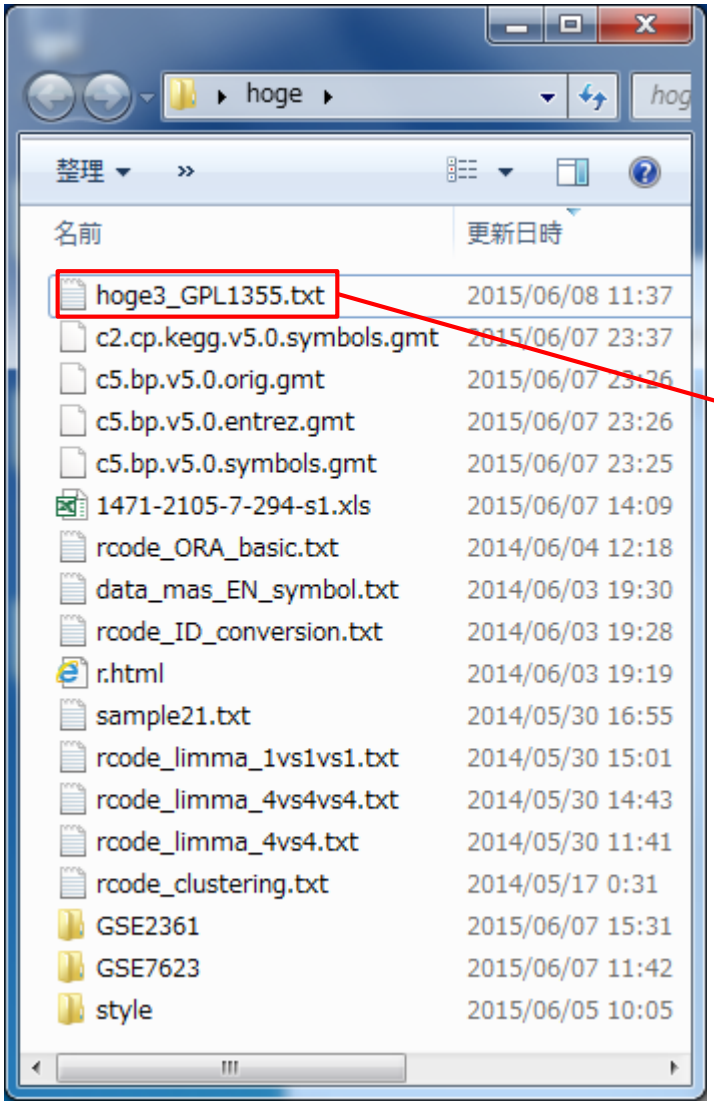
**BACKGROUND:** When processing microarray data sets, we recently noticed that some gene names were being changed inadvertently to non-gene names.

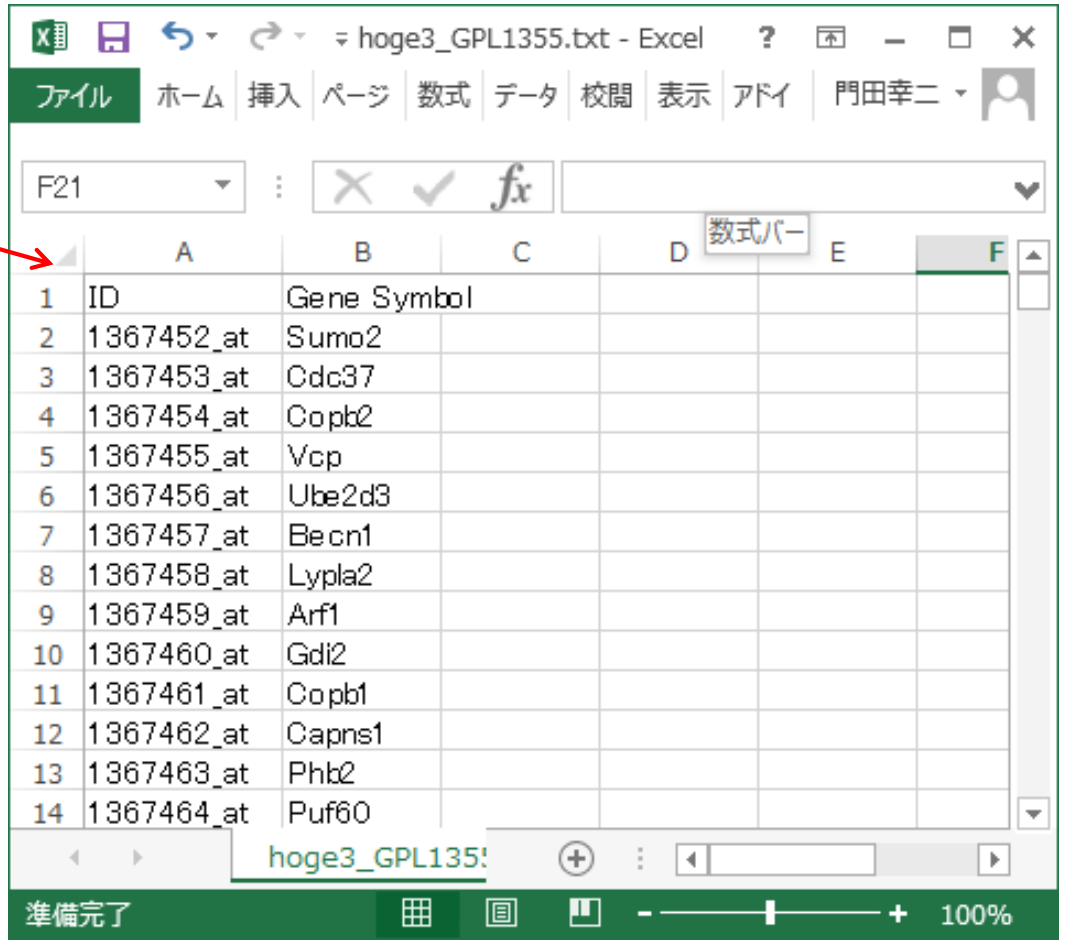
**RESULTS:** A little detective work traced the problem to default date format conversions and floating-point format conversions in the very useful Excel program package. The date conversions affect at least 30 gene names; the floating-point conversions affect at least 2,000 if Riken identifiers are included. These conversions are irreversible; the original gene names cannot be recovered.

**CONCLUSIONS:** Users of Excel for analyses involving gene names should be aware of this problem, which can cause genes, including medically important ones, to be lost from view and which has contaminated even carefully curated public databases. We provide work-arounds and scripts for circumventing the problem.

# ID変換

ここでは、ファイルの中身を眺めるだけなので、再度ドラッグ&ドロップ。1回目は失敗しても2回目は普通に開けます



# ID変換

同じエクセルシート上に配置して、①
Gene Symbol列でソートしてみると…

①

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ID | Gene Symbol | | BAT_fed1 | BAT_fed2 | BAT_fed3 | BAT_fed4 | BAT_fas1 | BAT_fas2 |
| 2 | 1367452_at | Sumo2 | 1367452_at | 12.78446 | 12.44708 | 12.80591 | 12.30472 | 12.58943 | 12.6075 |
| 3 | 1367453_at | Cdc37 | 1367453_at | 11.80125 | 12.15293 | 11.94223 | 11.96848 | 11.84538 | 11.6817 |
| 4 | 1367454_at | Copb2 | 1367454_at | 11.3899 | 11.16076 | 11.14599 | 11.21209 | 11.54065 | 11.3088 |
| 5 | 1367455_at | Vcp | 1367455_at | 12.36435 | 12.52974 | 12.43257 | 12.60401 | 12.44199 | 12.2499 |
| 6 | 1367456_at | Ube2d3 | 1367456_at | 13.44849 | 13.54305 | 13.55279 | 13.6298 | 13.36913 | 13.2442 |
| 7 | 1367457_at | Becn1 | 1367457_at | 10.40403 | 10.69632 | 10.47508 | 10.45579 | 10.14192 | 10.2906 |
| 8 | 1367458_at | Lypla2 | 1367458_at | 9.925339 | 10.24454 | 9.972001 | 9.957607 | 8.702884 | 9.35787 |
| 9 | 1367459_at | Arf1 | 1367459_at | 13.83374 | 13.71342 | 13.95477 | 13.70214 | 13.76626 | 13.6696 |
| 10 | 1367460_at | Gdi2 | 1367460_at | 13.36349 | 13.55406 | 13.48064 | 13.43393 | 13.5366 | 13.5084 |

hoge3_GPL1355.txt

data_mas_EN.txt

# ID変換

①ソート後の状態。同じgene symbolを持つprobeset IDが複数存在することがわかる。例えば②A2bp1は、6 probeset IDs

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ID | Gene Symbol | | BAT_fed1 | BAT_fed2 | BAT_fed3 | BAT_fed4 | BAT_fas1 | BAT_fas2 |
| 2 | 1367452_at | Sumo2 | 1367452_at | 12.78446 | 12.44708 | 12.80591 | 12.30472 | 12.58943 | 12.6075 |
| 3 | 1367453_at | Cdc37 | 1367453_at | 11.80125 | 12.15293 | 11.94223 | 11.96848 | 11.84538 | 11.6817 |
| 4 | 1367454_at | Copb2 | 1367454_at | 11.3899 | 11.16076 | 11.14599 | 11.21209 | 11.54065 | 11.3088 |
| 5 | 1367455_at | Vcp | 1367455_at | 12.36435 | 12.52974 | 12.43257 | 12.60401 | 12.44199 | 12.2499 |
| 6 | 1367456_at | Ube2d3 | 1367456_at | 13.44849 | 13.54305 | 13.55279 | 13.6298 | 13.36913 | 13.2442 |
| 7 | 1367457_at | Becn1 | 1367457_at | 10.40403 | 10.69632 | 10.47508 | 10.45579 | 10.14192 | 10.2906 |
| 8 | 1367458_at | Lypla2 | 1367458_at | 9.925339 | 10.24454 | 9.972001 | 9.957607 | 8.702884 | 9.35787 |
| 9 | 1367459_at | Arf1 | 1367459_at | 13.83374 | 13.71342 | 13.95477 | 13.70214 | 13.76626 | 13.6696 |
| 10 | 1367460_at | Gdi2 | 1367460_at | 13.36349 | 13.55406 | 13.48064 | 13.43393 | 13.5366 | 13.5084 |

①

| ID | Gene Symbol | | BAT_fed1 | BAT_fed2 | BAT_fed3 | BAT_fed4 | BAT_fas1 | BAT_fas2 | BAT_fas3 | BAT_fas4 | WAT_fe |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1369509_a_at | A1bg | 1369509_a_at | 2.283274 | 2.663464 | 3.393108 | 5.581337 | 4.444774 | 2.070498 | 2.366629 | 1.242299 | 3.202 |
| 1368784_at | A1cf | 1368784_at | 5.844694 | 5.913832 | 5.755455 | 5.509977 | 4.184778 | 6.572447 | 5.657811 | 5.381227 | 5.246 |
| 1370027_a_at | A1i3 /// Mug1 | 1370027_a_at | 7.186455 | 6.369903 | 3.668318 | 3.498324 | 7.211794 | 6.427345 | 2.480638 | 3.215938 | 5.959 |
| 1378371_at | A2bp1 | 1378371_at | 3.395028 | 5.712191 | 5.063096 | 6.231098 | 6.612678 | 6.064106 | 6.833413 | 6.143807 | 4.328 |
| 1380516_at | A2bp1 | 1380516_at | 4.359652 | 4.69428 | 3.010153 | 4.315149 | 4.516653 | 2.632701 | 3.892409 | 5.18021 | 1.917 |
| 1383130_at | A2bp1 | 1383130_at | .081817 | 4.593572 | 4.535909 | 8.811696 | 9.702333 | 9.75088 | 9.105133 | 8.825036 | 5.409 |
| 1383257_at | A2bp1 | 1383257_at | .501018 | 2.966239 | 2.232853 | 7.283267 | 8.426518 | 8.651317 | 7.625359 | 7.31545 | 1.329 |
| 1385235_at | A2bp1 | 1385235_at | 3.847942 | 4.026388 | 3.911792 | 8.330072 | 9.3733 | 9.137933 | 8.885068 | 8.734736 | 4.634 |
| 1390594_at | A2bp1 | 1390594_at | 4.641244 | 6.627334 | 5.234572 | 5.89079 | 2.245885 | 1.417343 | 6.138234 | 6.252581 | 5.294 |
| 1382945_at | A2ld1 | 1382945_at | 9.974381 | 10.2494 | 9.811327 | 9.831842 | 9.093722 | 8.947993 | 8.82087 | 9.13077 | 9.386 |
| 1392725_at | A2ld1 | 1392725_at | 6.696741 | 5.425293 | 6.610669 | 6.104502 | 6.084417 | 6.684742 | 5.49265 | 2.381073 | 6.770 |

②

# ID変換

マイクロアレイごとに搭載されている遺伝子の種類や重複度が異なるため、この作業は重要。①処理前、②処理（平均化）後

入力1：hoge3_GPL1355.txt

| ID | Gene Symbol |
|---|---|
| 1369509_a_at | A1bg |
| 1368784_at | A1cf |
| 1370027_a_at | A1i3 /// Mug1 |
| 1378371_at | A2bp1 |
| 1380516_at | A2bp1 |
| 1383130_at | A2bp1 |
| 1383257_at | A2bp1 |
| 1385235_at | A2bp1 |
| 1390594_at | A2bp1 |
| 1382945_at | A2ld1 |
| 1392725_at | A2ld1 |

入力2：data_mas_EN.txt

| | BAT_fed1 | BAT_fed2 | BAT_fed3 | BAT_fed4 | BAT_fas1 | BAT_fas2 | BAT_fas3 | BAT_fas4 | WAT_fe |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1369509_a_at | 2.283274 | 2.663464 | 3.393108 | 5.581337 | 4.444774 | 2.070498 | 2.366629 | 1.242299 | 3.202 |
| 1368784_at | 5.844694 | 5.913832 | 5.755455 | 5.509977 | 4.184778 | 6.572447 | 5.657811 | 5.381227 | 5.246 |
| 1370027_a_at | 7.186455 | 6.369903 | 3.668318 | 3.498324 | 7.211794 | 6.427345 | 2.480638 | 3.215938 | 5.959 |
| 1378371_at | 3.395028 | 5.712191 | 5.063096 | 6.231098 | 6.612678 | 6.064106 | 6.833413 | 6.143807 | 4.328 |
| 1380516_at | 4.359652 | 4.69428 | 3.010153 | 4.315149 | 4.516653 | 2.632701 | 3.892409 | 5.18021 | 1.917 |
| 1383130_at | 6.081817 | 93572 | 4.535909 | 8.811696 | 9.702333 | 9.75088 | 9.105133 | 8.825036 | 5.409 |
| 1383257_at | 1.501018 | 66239 | 2.232853 | 7.283267 | 8.426518 | 8.651317 | 7.625359 | 7.31545 | 1.329 |
| 1385235_at | 3.847942 | 4026388 | 3.911792 | 8.330072 | 9.3733 | 9.137933 | 8.885068 | 8.734736 | 4.634 |
| 1390594_at | 4.641244 | 6.627334 | 5.234572 | 5.89079 | 2.245885 | 1.417343 | 6.138234 | 6.252581 | 5.294 |
| 1382945_at | 9.974381 | 10.2494 | 9.811327 | 9.831842 | 9.093722 | 8.947993 | 8.82087 | 9.13077 | 9.386 |
| 1392725_at | 6.696741 | 5.425293 | 6.610669 | 6.104502 | 6.084417 | 6.684742 | 5.49265 | 2.381073 | 6.770 |

①

出力：data_mas_EN_symbol.txt

| | BAT_fed1 | BAT_fed2 | BAT_fed3 | BAT_fed4 | BAT_fas1 | BAT_fas2 | BAT_fas3 | BAT_fas4 | WAT_fe |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1bg | 2.283274 | 2.663464 | 3.393108 | 5.581337 | 4.444774 | 2.070498 | 2.366629 | 1.242299 | 3.202 |
| A1cf | 5.844694 | 5.913832 | 5.755455 | 5.509977 | 4.184778 | 6.572447 | 5.657811 | 5.381227 | 5.246 |
| A1i3 /// Mug1 | 7.186455 | 6.369903 | 3.668318 | 3.498324 | 7.211794 | 6.427345 | 2.480638 | 3.215938 | 5.959 |
| A2bp1 | 3.971117 | 70001 | 3.998062 | 6.810345 | 6.812894 | 6.275713 | 7.079936 | 7.075304 | 3.81 |
| A2ld1 | 8.335561 | 837348 | 8.210998 | 7.968172 | 7.58907 | 7.816367 | 7.15676 | 5.755922 | 8.07 |
| A2m | 4.201252 | 5.612429 | 4.637289 | 3.967974 | 3.373227 | 3.301394 | 4.6048 | 3.135392 | 8.089 |
| A3galt2 | 5.848709 | 7.467876 | 6.437417 | 6.415588 | 5.585956 | 6.751774 | 7.105526 | 7.278448 | 7.548 |
| A4galt | 4.71439 | 1.895368 | 3.072015 | 2.174757 | 5.799177 | 4.673696 | 5.339913 | 5.443959 | 4.847 |
| AA926063 /// | | | | | | | | | |
| Aaas | | | | | | | | | |
| Aacs | | | | | | | | | |

②

R Console

```
> (3.395028+4.359652+6.081817+1.501018+3.847942+4.641244)/6
[1] 3.971117
>
```

入力ファイルは2つ（発現データと変換表）。出力ファイルは1つ

# ID変換

## (Rで)マイクロアレイデータ解析

**(last modified 2015/05/25, since 2005)**

What's ne

- 門田幸
  する最
  んでい
  トーム解
- お知ら
  や講演

- 前処理 | フィルタリング | 分散が小さいものを除去 (last modified 2013/11/15)
- 前処理 | ID変換 | について(last modified 2014/06/03)
- 前処理 | ID変換 | probe ID --> gene symbol(last modified 2014/06/03)
- 前処理 | ID変換 | probe ID --> Entrez ID(last modified 2014/06/03)
- 前処理 | ID変換 | probe ID --> その
- 前処理 | ID変換 | 同じ遺伝子名を
- 解析 | 基礎 | 共通遺伝子の抽出(l
- 解析 | 基礎 | ベクトル間の距離(las
- 解析 | 基礎 | 遺伝子ごとの各種要
- 解析 | 基礎 | 最大発現量を示す組
- 解析 | 基礎 | 似た発現パターンを
- 解析 | 基礎 | 平均-分散プロット (la
- 解析 | クラスタリング | 階層的 | に
- 解析 | クラスタリング | 階層的 | pvc
- 解析 | クラスタリング | 階層的 | hcl

## 前処理 | ID変換 | probe ID --> gene symbol NEW

probe IDの遺伝子発現行列を入力として、gene symbolの遺伝子発現行列を出力するやり方を示します。probe IDとgene symbolの対応関係情報が必要ですので、様々なやり方を示しています。同じgene symbolをもつ複数のprobe IDsが存在する場合にはparamで指定した方法で要約統計量を計算します。代表値(要約統計量)は、平均値(mean)、中央値(median)、最大値(max)など好きなものを指定できます。
「ファイル」-「ディレクトリの変更」で解析したいファイルを置いてあるディレクトリに移動し、以下をコピペ

**1. サンプルデータ20の31,099 probesets×24 samplesのRMA-preprocessedデータ(data_rma_2.txt)の場合:**

Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いて得られたNakai et al., BBB, 2008のデータです。イントロ | アノテーション情報取得 | GEOquery(Davis 2007)の3を行って得られたhoge3_GPL1355.txtの情報も利用しています。
data_rma_2.txtの1列目のID情報とhoge3_GPL1355.txtの1列目のID情報の対応がとれる(同じ行の位置でなくてもよい)ことが前提です。1分程度で終わります。

```
in_f1 <- "data_rma_2.txt"                #入力ファイル名を指定してin_f1に格納(発現データ)
in_f2 <- "hoge3_GPL1355.txt"             #入力ファイル名を指定してin_f2に格納(Gene symbolと
out_f <- "hoge1.txt"                     #出力ファイル名を指定してout_fに格納
param <- mean                            #代表値を指定

#前処理(IDとGene symbolとの対応関係を含む情報を入手)
sym <- read.table(in_f2, header=TRUE, row.names=1, sep="\t", quote="")#in_f2で指定した
IDs <- as.vector(sym[,1])                #Gene symbol情報をベクトルに変換し、IDsに格納
names(IDs) <- rownames(sym)              #IDsを行名で対応づけられるようにしている
uniqID <- unique(IDs)                    #non-redundant ID情報を抽出し、uniqIDに格納
uniqID <- uniqID[uniqID != ""]           #uniqIDの中から指定したIDがないものを除く
uniqID <- uniqID[!is.na(uniqID)]         #uniqIDの中から指定したIDが"NA"のものを除く
uniqID <- uniqID[!is.nan(uniqID)]        #uniqIDの中から指定したIDが"NaN"のものを除く

#本番
```

# ID変換

hogeフォルダ中のdata_mas_EN_symbol.txtは、①のコピペで作成しています。②作業ディレクトリに入力ファイルがあることを確認してから実行しましょう。③のファイルがないことに気づくはず（思考停止禁止!）

## 前処理 | ID変換 | probe ID --> gene symbol NEW

probe IDの遺伝子発現行列を入力として、gene symbolの遺伝子発現行列を出力するやり方を示
gene symbolの対応関係情報が必要ですので、様々なやり方を示しています。同じgene symbolをもつ複数のprobe IDs
が存在する場合にはparamで指定した方法で要約統計量を計算します。代表値(要約統計量)は、平均値(mean)、中央
値(median)、最大値(max)など好きなものを指定できます。
「ファイル」-「ディレクトリの変更」で解析したいファイル

1. サンプルデータ20の31,099 probesets×24 samplesの

Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いて得られ
ン情報取得 | GEOquery(Davis_2007)の3を行って得
data_rma_2.txtの1列目のID情報とhoge3_GPL1355.t
い)ことが前提です。1分程度で終わります。

```
in_f1 <- "data_rma_2.txt"
in_f2 <- "hoge3_GPL1355.txt"
out_f <- "hoge1.txt"
param <- mean

#前処理(IDとGene symbolとの対応関係を含む
sym <- read.table(in_f2, header=TRUE, r
IDs <- as.vector(sym[,1])
names(IDs) <- rownames(sym)
uniqID <- unique(IDs)
uniqID <- uniqID[uniqID != ""]
uniqID <- uniqID[!is.na(uniqID)]
uniqID <- uniqID[!is.nan(uniqID)]

#本番
```

rcode_ID_conversion.txt ①

```
in_f1 <- "data_mas_EN.txt"                  #入力ファイル名を指定してin_f1に格納(発現
in_f2 <- "hoge3_GPL1355.txt"                #入力ファイル名を指定してin_f2に格納(Gene
out_f <- "data_mas_EN_symbol.txt"           #出力ファイル名を指定してout_fに格納
param <- mean                               #代表値を指定

#前処理(IDとGene symbolとの対応関係を含む情報を入手)
sym <- read.table(in_f2, header=TRUE, row.names=1, sep="¥t", quote="")#in_f2で指
IDs <- as.vector(sym[,1])                   #Gene symbol情報をベクトルに変換し、IDsに
names(IDs) <- rownames(sym)                 #IDsを行名で対応づけられるようにしている
uniqID <- unique(IDs)                       #non-redundant ID情報を抽出し、uniqIDに格
uniqID <- uniqID[uniqID != ""]              #uniqIDの中から指定したIDがないものを除く
uniqID <- uniqID[!is.na(uniqID)]            #uniqIDの中から指定したIDが"NA"のものを除
uniqID <-

#本番
data <- read.tab
hoge <- t(apply(a
                a
        }, data,
rownames(hoge) <-

#ファイルに保存
tmp <- cbind(rown
write.table(tmp, out_f, sep="¥t", append=F, quote=F, row.names=F)#tmpの中身を指
```

③

R Console ②

```
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge/GSE7623"
> list.files(pattern="hoge")
[1] "hoge1.txt"          "hoge3_GPL1355.txt"
> list.files(pattern="mas_EN")
[1] "data_mas_EN.txt"
>
```

# ID変換

コピペ実行後に確認。①data_mas_EN_symbol.txtは、②14,132個のユニークなgene symbolsからなることがわかる

rcode_ID_conversion.txt

```
in_f1 <- "data_mas_EN.txt"                  #入力ファイル名を指定してin_f1に格納(発現
in_f2 <- "hoge3_GPL1355.txt"                #入力ファイル名を指定してin_f2に格納(Gene
out_f <- "data_mas_EN_symbol.txt"           #出力ファイル名を指定してout_fに格納↓
param <- mean                               #代表値を指定↓
↓
#前処理(IDとGene symbolとの対応関係を含む情報を入手)↓
sym <- read.table(in_f2, header=TRUE, row.names=1, sep="¥t", quote="")#in_f2で指
IDs <- as.vector(sym[,1])                   #Gene symbol情報をベクトルに変換し、IDsに
names(IDs) <- rownames(sym)                 #IDsを行名で対応づけられるようにしている、
uniqID <- unique(IDs)                       #non-redundant ID情報を抽出し、uniqIDに格
uniqID <- uniqID[uniqID != ""]              #uniqIDの中から指定したIDがないものを除く
uniqID <- uniqID[!is.na(uniqID)]            #uniqIDの中から指定したIDが"NA"のものを除
uniqID <- uniqID[!is.nan(uniqID)]           #uniqIDの中から指定したIDが"NaN"のものを除
↓
#本番↓
data <- read.table(in_f1, header=TRUE, row.names=1, sep="¥t",
hoge <- t(apply(as.matrix(uniqID), 1, function(i, d = data, s
                apply(d[which(s == i), ], 2, p, na.rm = TRUE)#
        }, data, IDs, param))               #apply関数でdata,IDs,pa
rownames(hoge) <- uniqID                    #non-redundant IDをhoge
↓
#ファイルに保存↓
tmp <- cbind(rownames(hoge), hoge)          #指定したIDの列を行列
write.table(tmp, out_f, sep="¥t", append=F, quote=F, row.names
```

①

②

R Console

```
+          }, data, IDs, param))              #$
> rownames(hoge) <- uniqID                    #$
>
> #ファイルに保存
> tmp <- cbind(rownames(hoge), hoge)          #$
> write.table(tmp, out_f, sep="\t", append$
> dim(tmp)
[1] 14132    25
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge/GSE7623"
>
```

- 前処理 | ID変換 | probe ID --> gene symbol
- 解析 | 機能解析 | パスウェイ(Pathway)解析 | GAGE (Luo 2009)

# Tips：as.matrix

①

プログラムの組み方で速度が結構違います（①データフレーム形式より行列形式のほうが早いらしい）。②孫建強氏作は1分、③門田作は2分w

②

**1. サンプルデータ20の31,099 probesets×24 samplesのRMA-preprocessedデータ(data_rma_2.txt)の場合:**

Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いて得られたNakai et al., BBB, 2008のデータです。イントロ | アノテーション情報取得 | GEOquery(Davis_2007)の3を行って得られたhoge3_GPL1355.txtの情報も利用しています。data_rma_2.txtの1列目のID情報とhoge3_GPL1355.txtの1列目のID情報の対応がとれる(同じ行の位置でなくてもよい)ことが前提です。1分程度で終わります。

```
in_f1 <- "data_rma_2.txt"
in_f2 <- "hoge3_GPL1355.txt"
out_f <- "hoge1.txt"
param <- mean

#前処理(IDとGene symbolとの対応関係を含
sym <- read.table(in_f2, header=TRUE,
IDs <- as.vector(sym[,1])
names(IDs) <- rownames(sym)
uniqID <- unique(IDs)
uniqID <- uniqID[uniqID != ""]
uniqID <- uniqID[!is.na(uniqID)]
uniqID <- uniqID[!is.nan(uniqID)]

#本番
data <- read.table(in_f1, header=TRUE
hoge <- t(apply(as.matrix(uniqID), 1,
                apply(d[which(s == i)
        }, data, IDs, param))
rownames(hoge) <- uniqID

#ファイルに保存
```

③

**2. サンプルデータ20の31,099 probesets×24 samplesのRMA-preprocessedデータ(data_rma_2.txt)の場合:**

Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いて得られたNakai et al., BBB, 2008のデータです。イントロ | アノテーション情報取得 | GEOquery(Davis_2007)の3を行って得られたhoge3_GPL1355.txtの情報も利用しています。data_rma_2.txtの1列目のID情報とhoge3_GPL1355.txtの1列目のID情報の対応がとれる(同じ行の位置でなくてもよい)ことが前提です。2分程度で終わります。

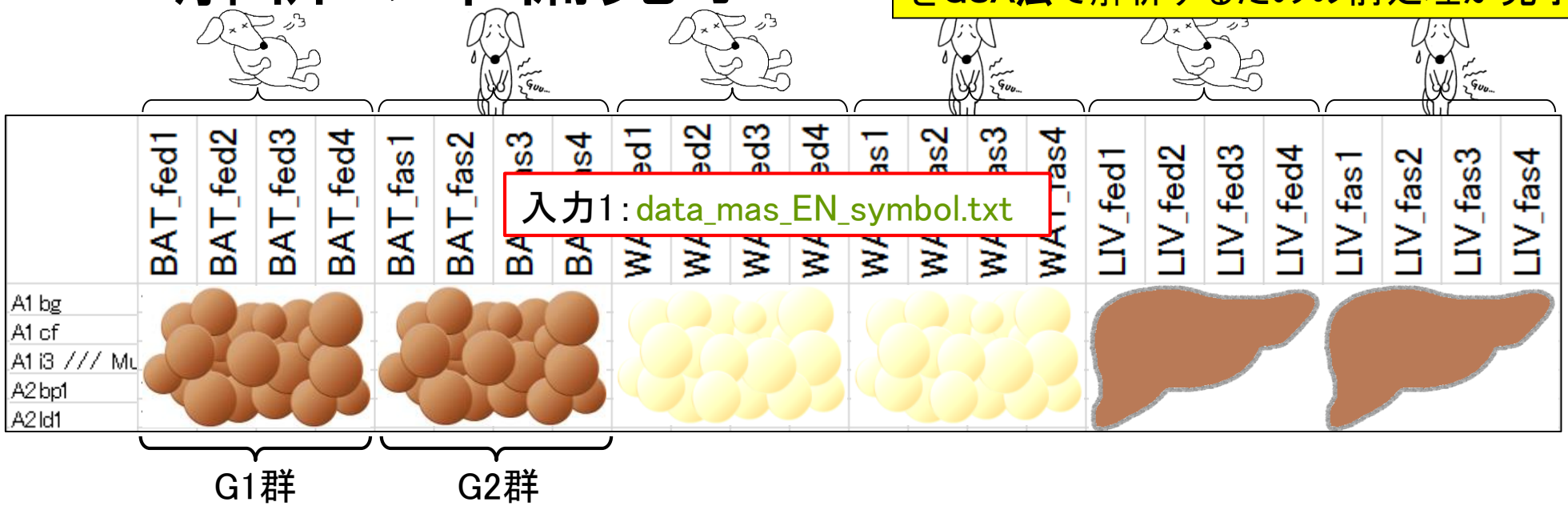
```
in_f1 <- "data_rma_2.txt"                #入力ファイル名を指定してin_f1に格納(発現データ)
in_f2 <- "hoge3_GPL1355.txt"             #入力ファイル名を指定してin_f2に格納(Gene symbol
out_f <- "hoge2.txt"                     #出力ファイル名を指定してout_fに格納
param <- mean                            #代表値を指定

#前処理(IDとGene symbolとの対応関係を含む情報を入手)
sym <- read.table(in_f2, header=TRUE, row.names=1, sep="\t", quote="")#in_f2で指定した
IDs <- as.vector(sym[,1])                #Gene symbol情報をベクトルに変換し、IDsに格納
names(IDs) <- rownames(sym)              #IDsを行名で対応づけられるようにしている
uniqID <- unique(IDs)                    #non-redundant ID情報を抽出し、uniqIDに格納
uniqID <- uniqID[uniqID != ""]           #uniqIDの中から指定したIDがないものを除く
uniqID <- uniqID[!is.na(uniqID)]         #uniqIDの中から指定したIDが"NA"のものを除く
uniqID <- uniqID[!is.nan(uniqID)]        #uniqIDの中から指定したIDが"NaN"のものを除く

#本番
data <- read.table(in_f1, header=TRUE, row.names=1, sep="\t", quote="")#in_f1で指定し
hoge <- NULL                             #最終的に欲しい情報を格納するためのプレースホルダ
for(i in 1:length(uniqID)){              #non-redundant ID数分だけループを回す
    hoge <- rbind(hoge, apply(data[which(IDs == uniqID[i]),], 2, param, na.rm=TRUE))#
}                                        #non-redundant ID数分だけループを回す
rownames(hoge) <- uniqID                 #non-redundant IDをhogeの行の名前として利用
```

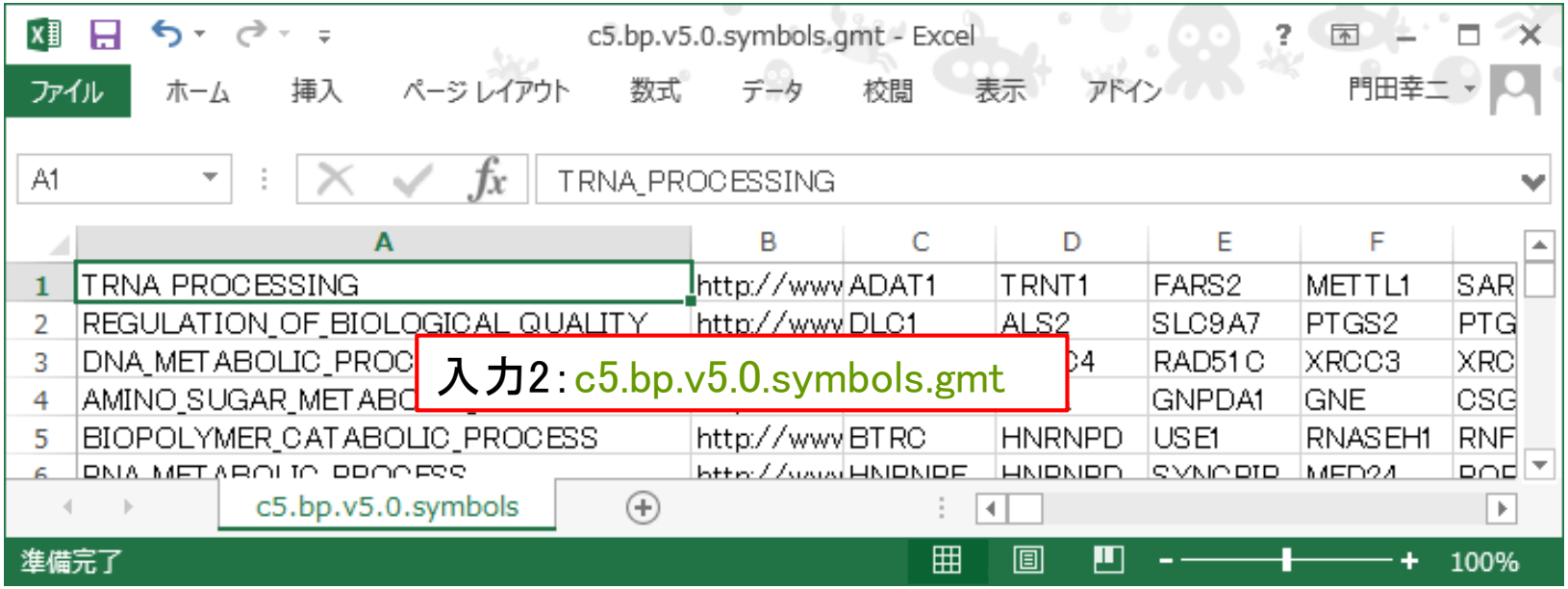
# Contents

- デザイン行列の意味を理解（教科書p173–182）
  - limmaパッケージを用いた2群間比較のおさらい
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復あり）
- 反復なし多群間比較（教科書p182–188）
  - limmaパッケージを用いた3群間比較（反復なし）
  - TCCパッケージ中のROKU法を用いた特異的発現遺伝子検出
- 機能解析（遺伝子セット解析）
  - 基本的な考え方
  - 前処理
    - MSigDBからの遺伝子セット情報（gmt形式ファイル）取得
    - ID変換（probeset ID → gene symbol）
  - GSAパッケージを用いた遺伝子セット解析

# GO解析の準備完了

褐色脂肪「満腹 vs. 空腹」の発現変動に関連したGO Biological Process遺伝子セットをGSA法で解析するための前処理が完了



# GSAでGO解析

②例題3をテンプレートとして、③入力ファイル名部分のみをdata_mas_EN_symbol.txtに変更してBAT_fed vs. BAT_fasのGO解析をやってみよう。④作業ディレクトリはココ

## (Rで)マイクロアレイデータ解析

(last modified

What's new?

- 門田幸二
- お知らせは

- 解析 | 発現変動 | 時系列 | non-periodic genes | SAM (Tusher_2001) (last modified 2009/8/3)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | について(last modified 2015/06/07) NEW
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GAGE (Luo_2009)( modified 2014/06/01)
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GSA (Efron_2007)( modified 2014/06/03)推奨
- 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | Category (Jiang_200 (last modified 2014/06/01)

①

### 解析 | 機能解析 | 遺伝子オントロジー(GO)解析 | GSA (Efron_2007) NEW

GSAパッケー

「ファイル」-「

②

1.サンプルデータ

肝臓のみからな

ルのprobeset ID

```
in_f1 <- "da
in_f2 <- "c5
out_f1 <- "h
out_f2 <- "h
param_G1 <-
param_G2 <-
param_FDR <-

#必要なパッケ
library(GSA)

#入力ファイル
gmt <- GSA.r
```

3.サンプルデータ20のdata_rma_2_nr.txtの場合:

14,132 genes×24 samplesのデータです。オリジナルのprobeset IDからgene symbolにID変換がなされています。
BAT_fed vs. BAT_fastedの2群間比較を行うべく、それらの 位置情報を指定しています。

③

```
in_f1 <- "data_rma_2_nr.txt"          #入力ファイル名を指定してin_f1に格納(発現データ
in_f2 <- "c5.bp.v5.0.symbols.gmt"     #入力ファイル名を指定してin_f2に格納(gmtファイ
out_f1 <- "hoge3_G1.txt"              #出力ファイル名を指定してout_f1に格納(G1群で高
out_f2 <- "hoge3_G2.txt"              #出力ファイル名を指定してout_f2に格納(G2群で高
param_G1 <- 4                         #G1群のサンプル数を指定
param_G2 <- 4                         #G2群のサンプル数を指定
param_FDR <- 0.1                      #DEG検出時のfalse discovery rate (FDR)閾値を
param_posi <- c(1:4, 5:8)             #G1群およびG2群の位置情報を指定

#必要なパッケージをロード
library(GSA)

#入力ファイルの読み込みとラベル情報の
gmt <- GSA.read.gmt(in_f2)
data <- read.table(in_f1, header=T
rownames(data) <- toupper(rownames
data.cl <- c(rep(1, param_G1), rep
data <- data[,param_posi]
colnames(data)

#GSA本番
out <- GSA(data, data.cl,             #GSAを実行し、結果をoutに格納
```

④

R Console

```
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge"
> list.files(pattern="symbol")
[1] "c2.cp.kegg.v5.0.symbols.gmt"
[2] "c5.bp.v5.0.symbols.gmt"
[3] "data_mas_EN_symbol.txt"
>
```

# GSAでGO解析

①FDR 10%の閾値を満たす有意な遺伝子セット数は、②G1群で高発現のものが24個、G2群で高発現のものが4個だったことがわかる。ヒトによって若干結果が異なります

**3.サンプルデータ20のdata_rma_2_nr.txtの場合:**

14,132 genes×24 samplesのデータです。オリジナルのprobeset IDからgene symbolにID変換がなされています。
BAT_fed vs. BAT_fastedの2群間比較を行うべく、それらの位置情報を指定しています。

```
in_f1 <- "data_rma_2_nr.txt"            #入力ファイル名を指定してin_f1に格納(発現データ
in_f2 <- "c5.bp.v5.0.symbols.gmt"       #入力ファイル名を指定してin_f2に格納(gmtファイ
out_f1 <- "hoge3_G1.txt"                #出力ファイル名を指定してout_f1に格納(G1群で高
out_f2 <- "hoge3_G2.txt"                #出力ファイル名を指定して
param_G1 <- 4                           #G1群のサンプル数を指定
param_G2 <- 4                           #G2群のサンプル数を指定
param_FDR <- 0.1                        #DEG検出時のfalse disco
param_posi <- c(1:4, 5:8)               #G1群およびG2群の位置情

#必要なパッケージをロード
library(GSA)                            #パッケージの読み込み

#入力ファイルの読み込みとラベル情報の作成、そしてサブセットの作成
gmt <- GSA.read.gmt(in_f2)              #in_f2で指定したファイル
data <- read.table(in_f1, header=TRUE, row.names=1, sep="\t",
rownames(data) <- toupper(rownames(data))#IDを大文字に変換して
data.cl <- c(rep(1, param_G1), rep(2, param_G2))#G1群を1、G2群
data <- data[,param_posi]               #サブセットを抽出
colnames(data)                          #確認してるだけです

#GSA本番
out <- GSA(data, data.cl,               #GSAを実行し、結果をout
```

①

②

③

R Console

```
+          FDRcut=param_FDR)                    #$
>
> #ファイルに保存
> write.table(tmp$negative, out_f1, sep="\$
> write.table(tmp$positive, out_f2, sep="\$
> getwd()
[1] "C:/Users/kadota/Desktop/hoge"
> list.files(pattern="symbol")
[1] "c2.cp.kegg.v5.0.symbols.gmt"
[2] "c5.bp.v5.0.symbols.gmt"
[3] "data_mas_EN_symbol.txt"
> list.files(pattern="hoge3")
[1] "hoge3_G1.txt"       "hoge3_G2.txt"
[3] "hoge3_GPL1355.txt"
> nrow(tmp$negative)
[1] 24
> nrow(tmp$positive)
[1] 4
>
```

私は、結果の評価はできません

# GSAでGO解析

| Gene_set | Gene_set_name | Score | p-value | FDR |
|---|---|---|---|---|
| 22 | PHOSPHOLIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS | -0.5692 | 0 | 0 |
| 56 | REGULATION_OF_DNA_BINDING | -0.3102 | 0 | 0 |
| 92 | COFACTOR_METABOLIC_PROCESS | -0.4346 | 0 | 0 |
| 134 | BIOSYNTHETIC_PROCESS | -0.2019 | 0 | 0 |
| 147 | INTRACELLULAR_PROTEIN_TRANSPORT | -0.1555 | 0 | 0 |
| 205 | PROTEIN_IMPORT | -0.2265 | 0 | 0 |
| 264 | MEMBRANE_LIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS | -0.4554 | 0 | 0 |
| 287 | LIPID_METABOLIC_PROCESS | -0.2399 | 0 | 0 |
| 317 | LIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS | -0.7518 | 0 | 0 |
| 331 | REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVIT | -0.295 | 0 | 0 |
| 370 | MITOCHONDRION_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS | -0.3251 | 0 | 0 |
| 383 | NEGATIVE_REGULATION_OF_DNA_BINDING | -0.6935 | 0 | 0 |
| 415 | NEGATIVE_REGULATION_OF_CELLULAR_COMPONENT | -0.2769 | 0 | 0 |
| 466 | CELLULAR_RESPONSE_TO_STIMULUS | -0.4359 | 0 | 0 |
| 471 | INTERACTION_WITH_HOST | -0.389 | 0 | 0 |
| 490 | RIBONUCLEOTIDE_METABOLIC_PROCESS | -0.6475 | 0 | 0 |
| 541 | CELLULAR_LIPID_METABOLIC_PROCESS | -0.2414 | 0 | 0 |
| 607 | NEGATIVE_REGULATION_OF_BINDING | -0.6935 | 0 | 0 |
| 609 | PHOSPHOLIPID_METABOLIC_PROCESS | -0.2709 | 0 | 0 |
| 619 | REGULATION_OF_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_A | -0.2051 | 0 | 0 |
| 667 | NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FACTC | -0.804 | 0 | 0 |
| 669 | RIBOSOME_BIOGENESIS_AND_ASSEMBLY | -0.3904 | 0 | 0 |
| 721 | PROTEIN_TRANSPORT | -0.1425 | 0 | 0 |
| 762 | STEROID_BIOSYNTHETIC_PROCESS | -1.2465 | 0 | 0 |

| Gene_set | Gene_set_name | Score | p-value | FDR |
|---|---|---|---|---|
| 39 | POSITIVE_REGULATION_OF_SIGNAL_TRANSDUCTION | 0.1897 | 0 | 0 |
| 121 | PATTERN_SPECIFICATION_PROCESS | 0.4294 | 0 | 0 |
| 461 | PROTEIN_KINASE_CASCADE | 0.1781 | 0 | 0 |
| 783 | ACTIVATION_OF_PROTEIN_KINASE_ACTIVITY | 0.6607 | 0 | 0 |