microRNAの発現解析
発現定量・アノテーション付与・エンリッチメント解析

フィルジェン株式会社　バイオインフォマティクス部

(biosupport@filgen.jp)

CLC Genomics Workbench について

Gx 次世代シークエンス解析用ソフトウェア

◆ **リシークエンシング解析**
・リファレンスゲノムへのマッピング
・変異検出

◆ **トランスクリプトミクス解析**
・RNA-seq解析
・small RNA解析

◆ **エピゲノミクス解析**
・ChIP-seq解析
・バイサルファイトシークエンス解析
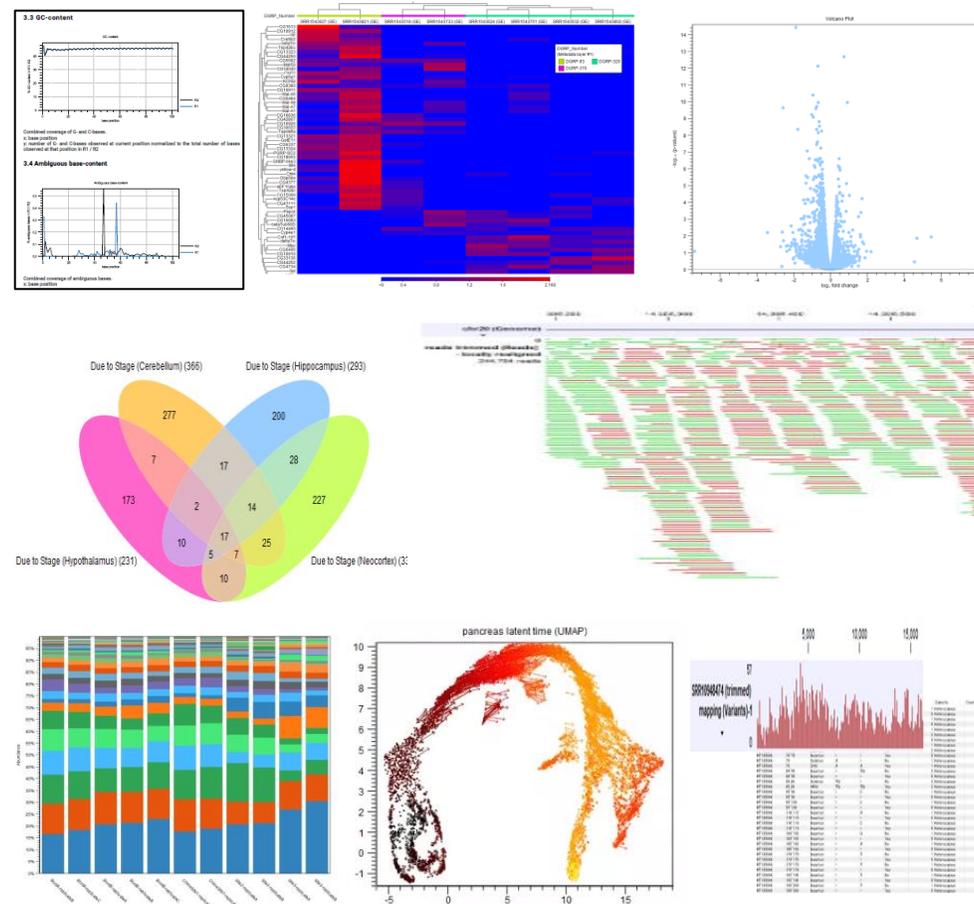
◆ **De Novo シークエンス解析**
・De Novo Assembly
・BLAST解析

◆ **菌叢解析**
◆ **ゲノムフィニッシング解析**
◆ **シングルセル解析**
◆ **超高速変異解析**

Premium版 限定機能

CLC Genomics Workbench について

次世代シークエンス解析用ソフトウェア

◆リシークエンシング解析
・リファレンスゲノムへのマッピング
・変異検出

◆トランスクリプトミクス解析
・RNA-seq解析
・small RNA解析

◆エピゲノミクス解析
・ChIP-seq解析
・バイサルファイトシークエンス解析

◆De Novo シークエンス解析
・De Novo Assembly
・BLAST解析

◆菌叢解析
◆ゲノムフィニッシング解析
◆シングルセル解析
◆超高速変異解析

Premium版 限定機能

本日の内容

1. microRNAの発現定量、エンリッチメント解析

2. isomiRベースの解析

3. 新規microRNAの検出

事前準備
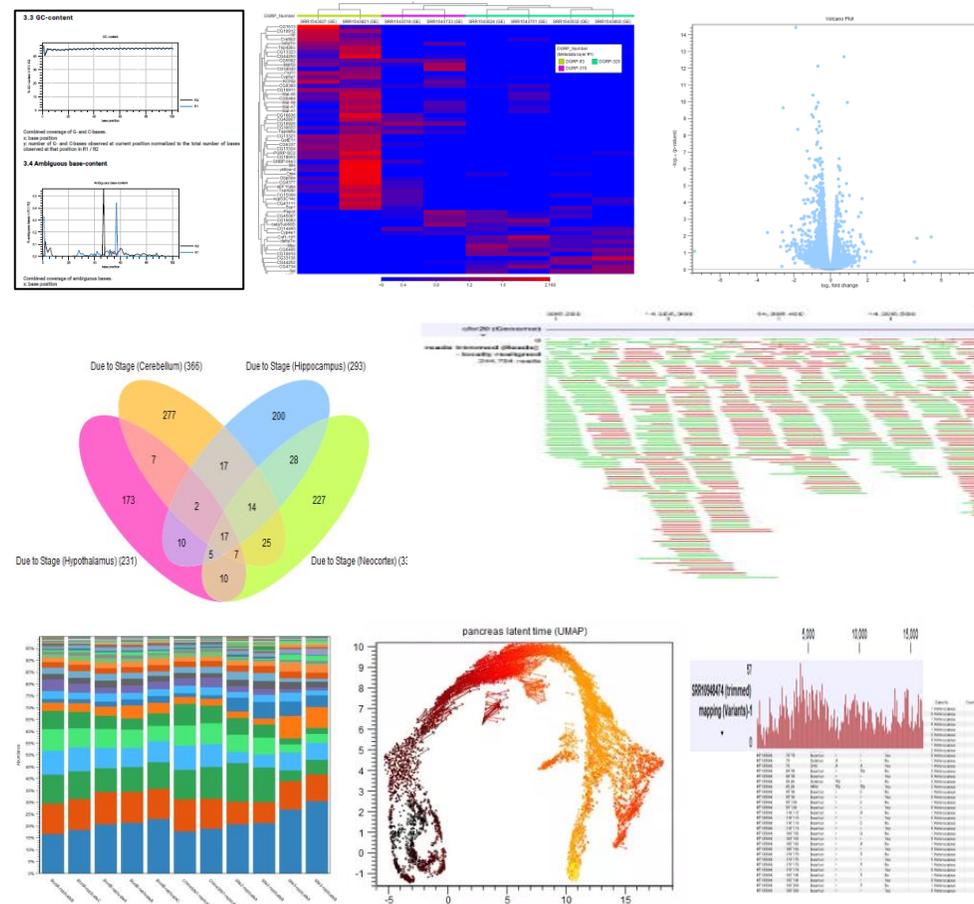
データベース、アノテーションファイルのダウンロード

Reference > QIAGEN Sets > QIAseq Small RNAからダウンロード可能です。

事前準備
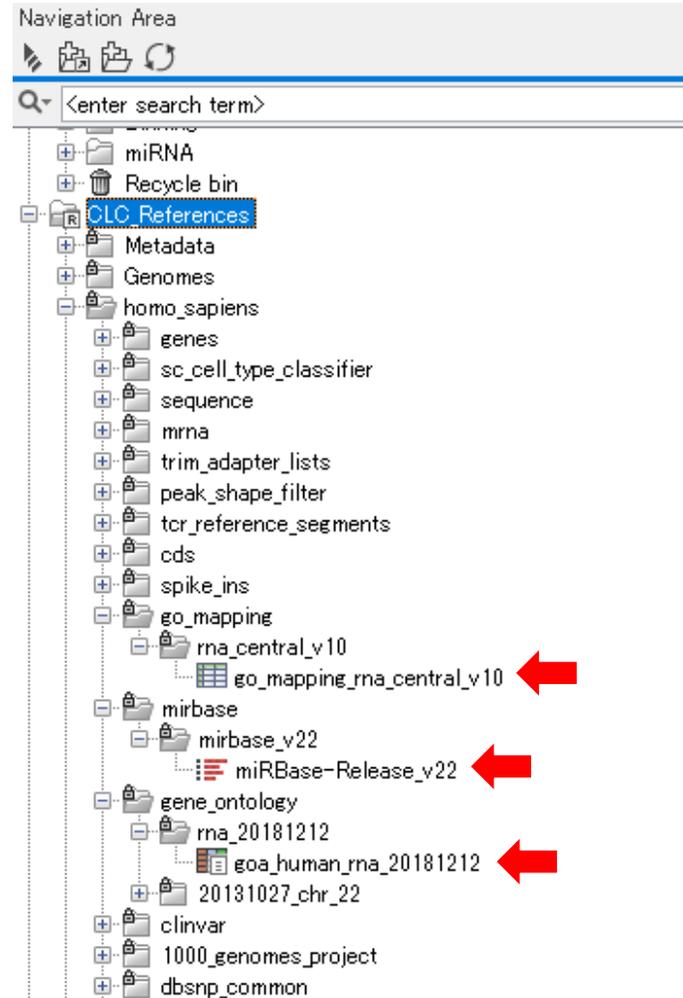
ダウンロードしたデータは、CLC Referencesというロケーションに保存されます。

本日の内容

1. microRNAの発現定量、エンリッチメント解析

2. isomiRベースの解析

3. 新規microRNAの検出

解析の流れ

NGSから出力されたデータのインポート

アダプターのトリミング、UMI情報付与 （オプション）

📊 Trim Reads
📊 Create UMI Reads for miRNA

miRNAの定量

📊 Quantify miRNA

・ヒートマップの作成
・PCAプロットの作成

RNACentral IDによるアノテーション付け

📊 Annotate with RNAcentral Accession Numbers

発現量の比較解析

📊 Differential Expression in Two Groups
📊 Differential Expression for RNA-Seq

・ベン図の作成
・発現量テーブルの作成

エンリッチメント解析

📊 Gene Set Test

発現量の比較解析

Differential Expression in Two Groups　**2群間の比較**

Differential Expression for RNA-Seq　**多群間の比較**（各サンプルとグループを対応づけるメタデータを用意する必要がある）
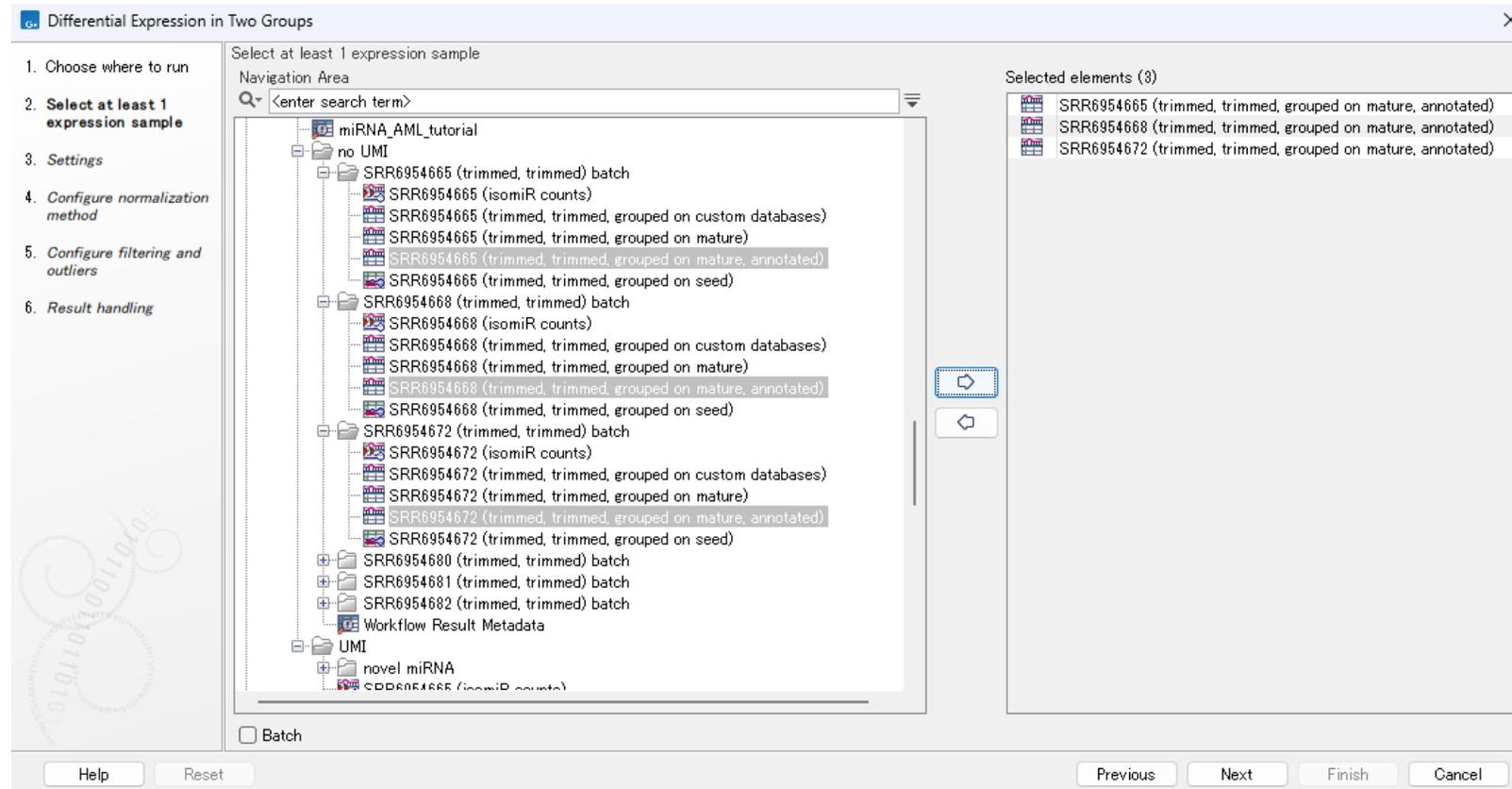
1群目に含まれるデータをすべて指定（今回はn=3）

発現量の比較解析
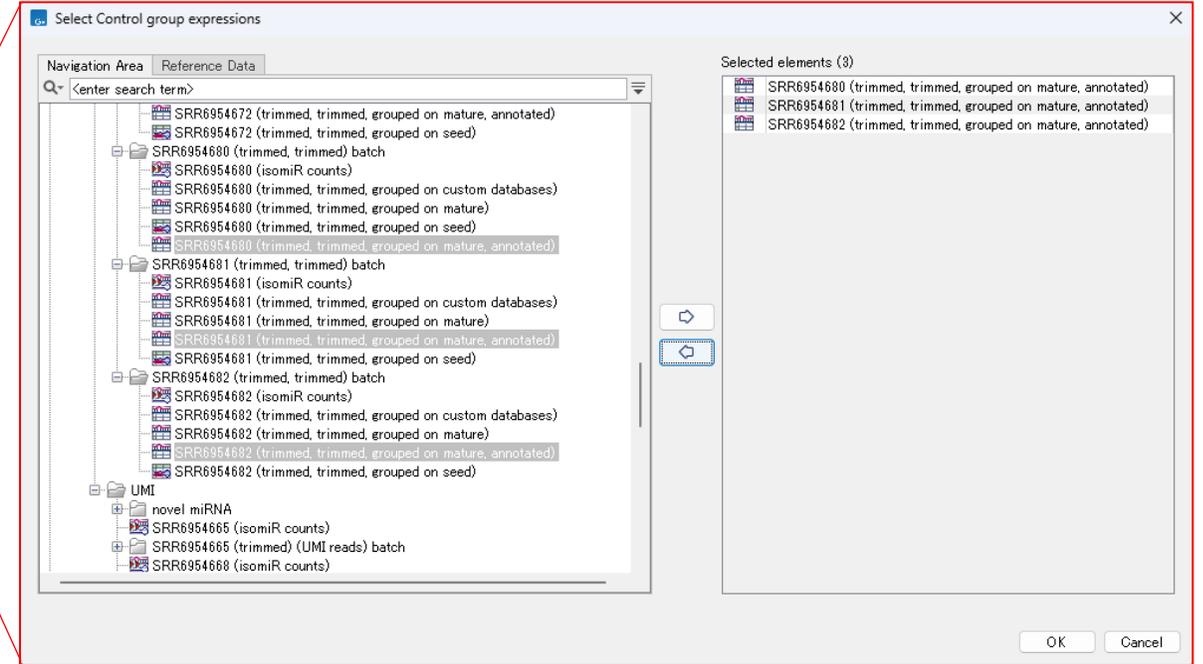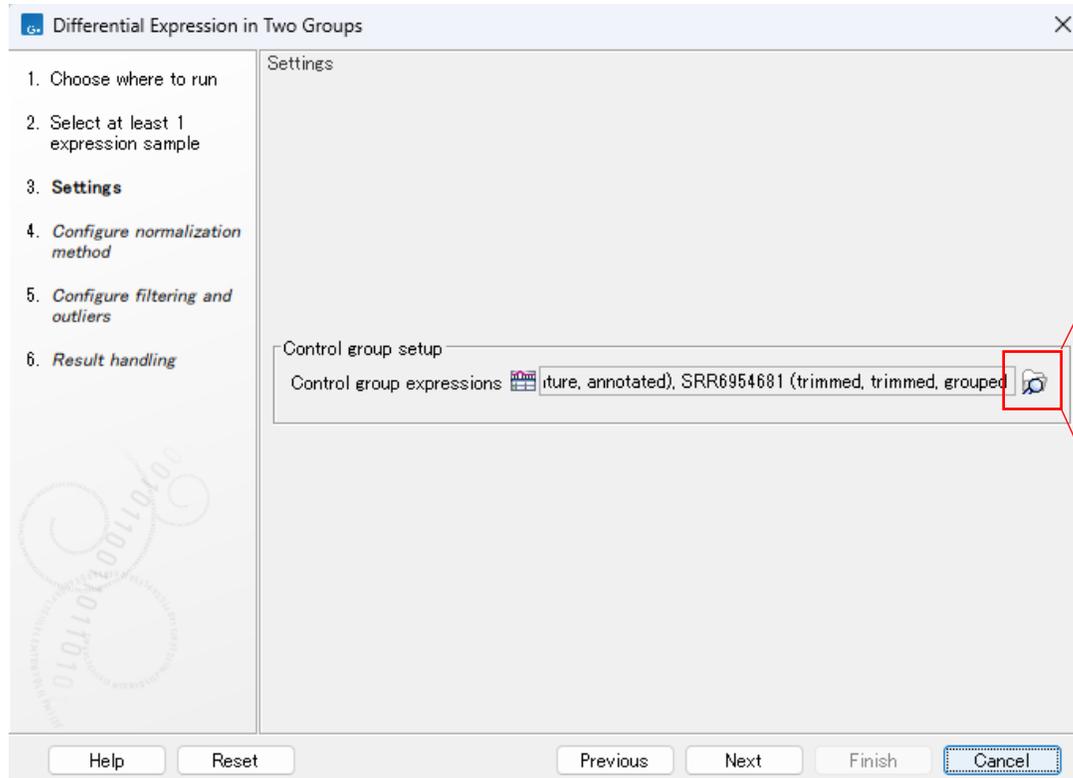
次の画面で、2群目に含まれるデータをすべて指定（今回はn=3）

本日の内容

1. microRNAの発現定量、エンリッチメント解析

2. isomiRベースの解析

3. 新規microRNAの検出

解析の流れ

NGSから出力されたデータのインポート

アダプターのトリミング、UMI情報付与（オプション）

 Trim Reads
 Create UMI Reads for miRNA

miRNAの定量

 Quantify miRNA

・ヒートマップの作成
・PCAプロットの作成

IsomiRの定量

 Extract IsomiR Counts

isomiRカウントの比較解析

 Differential Expression in Two Groups
 Differential Expression for RNA-Seq

・ベン図の作成
・発現量テーブルの作成

isomiRの定量

実験群に関わらず、全サンプルを指定する
（※Batchにはチェックをいれない）

isomiRの定量

isomiRの発現量比較

 Differential Expression in Two Groups　**2群間の比較**

 Differential Expression for RNA-Seq　**多群間の比較**（各サンプルとグループを対応づけるメタデータを用意する必要がある）

1群目のisomiRカウントデータをすべて指定
（今回はn=3）
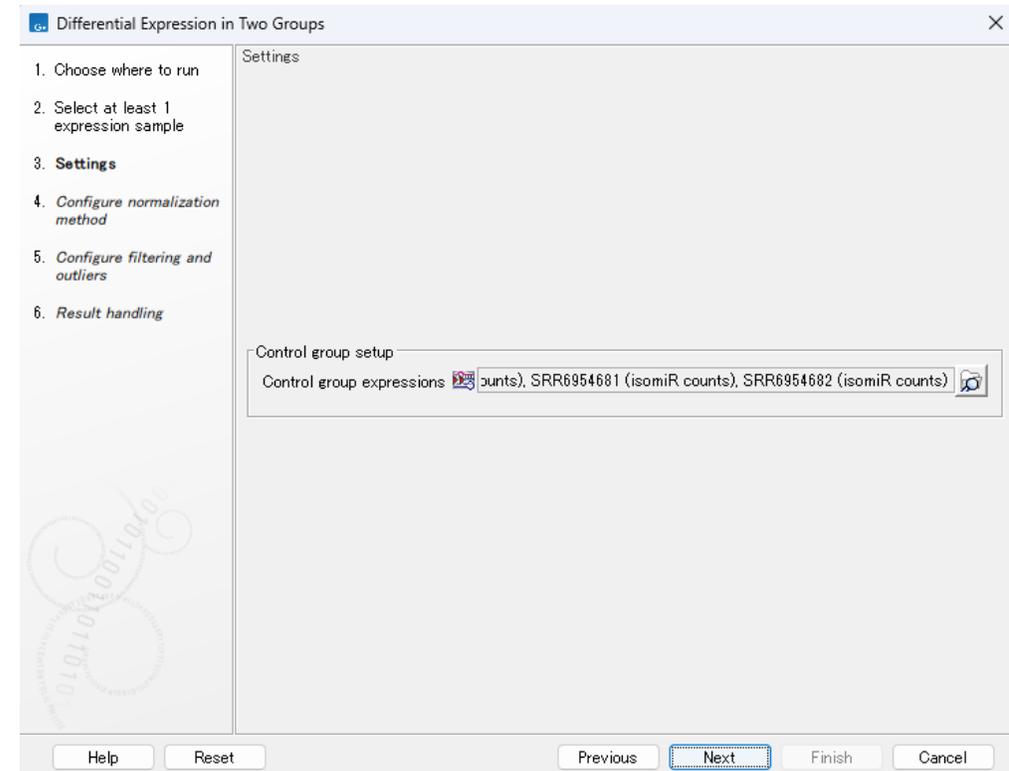
2群目のisomiRカウントデータをすべて指定
（今回はn=3）

以降のパラメータ設定は、mature miRNAの発現量比較と同様

プロットの作成

SRR6954668 (isomiR counts)

↓

PCA for RNA-Seq
Create Heat Map for RNA-Seq
Create Expression Browser
Create Venn Diagram for RNA-Seq

mature miRNAの発現量データの代わりに、isomiRのカウントデータを使用することで、
セクション1のようなプロットの作成が可能

本日の内容

1. microRNAの発現定量、エンリッチメント解析

2. isomiRベースの解析

3. 新規microRNAの検出
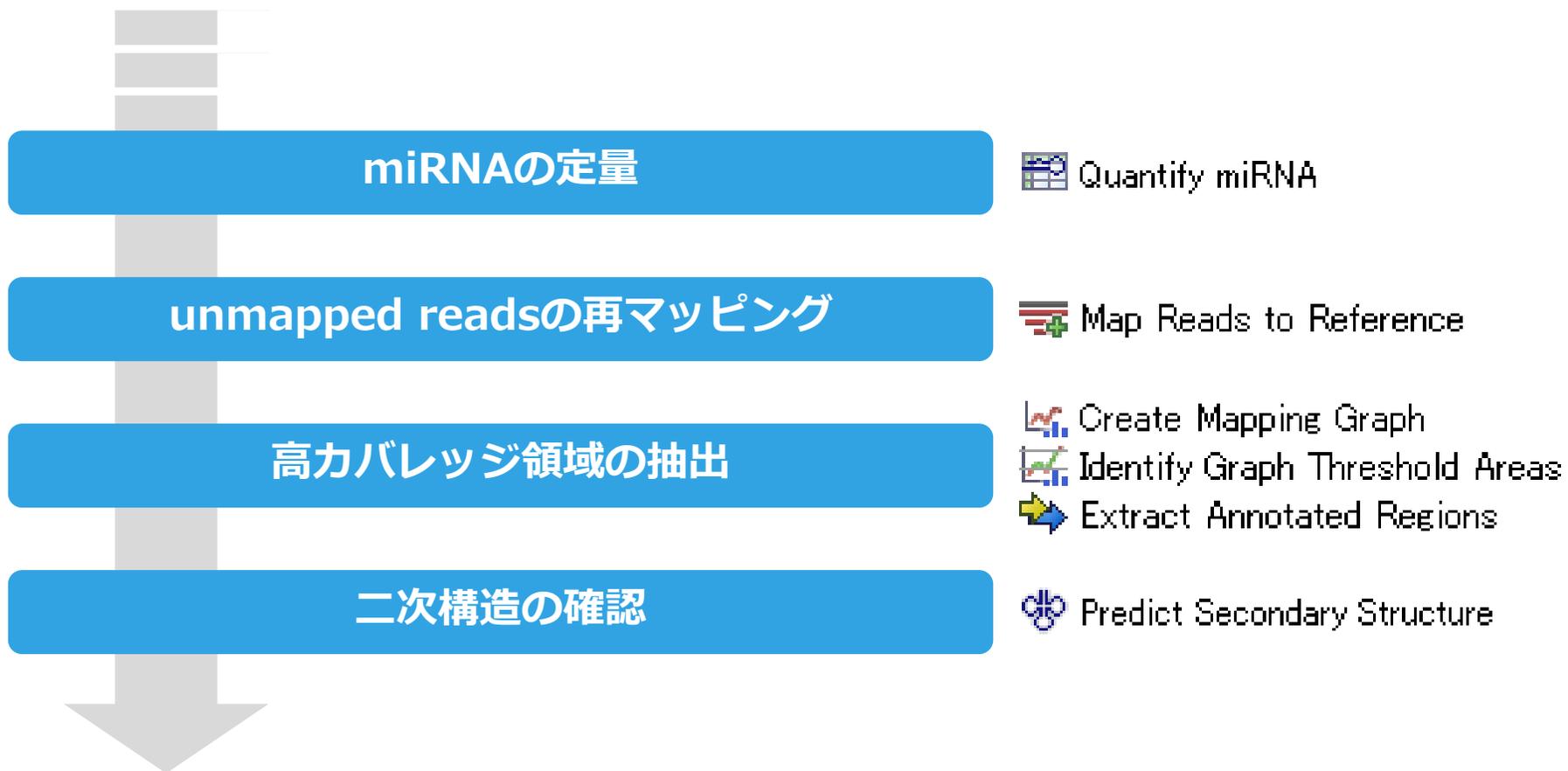
unmapped readの再マッピング

データベース上の配列にマッピングされなかったリードを、ゲノム配列上にマッピングする。

▤ Map Reads to Reference
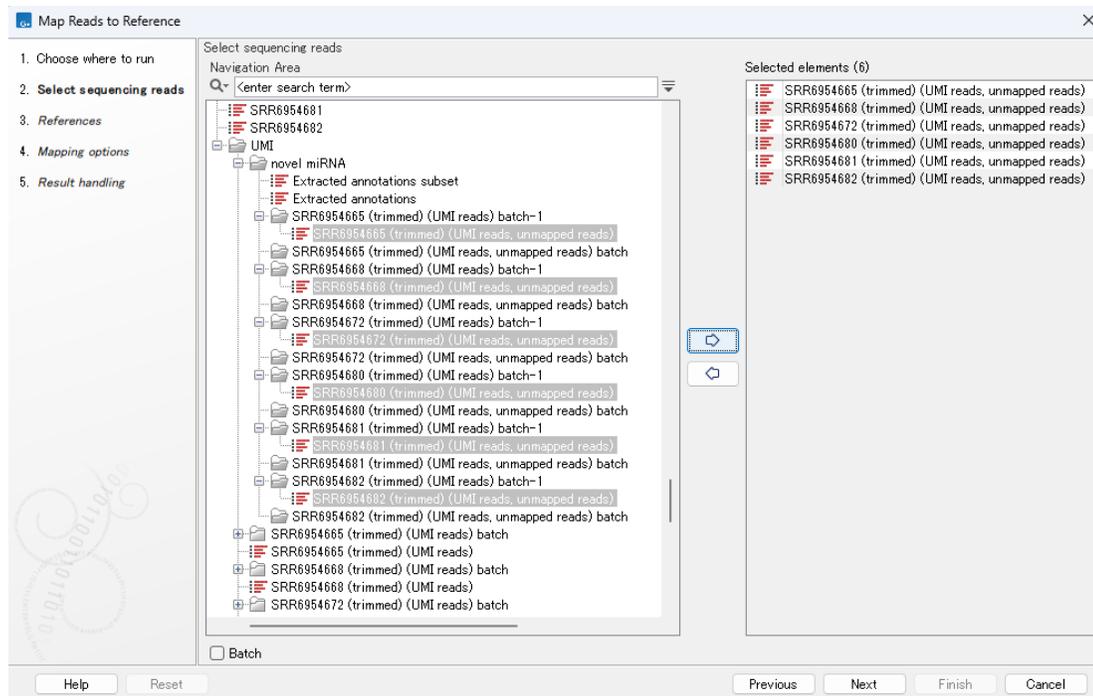
Quantify miRNAツールで出力されたunmapped readデータを指定

次に、ヒトゲノムデータを指定

unmapped readの再マッピング

ゲノム上へリードがマッピングされる
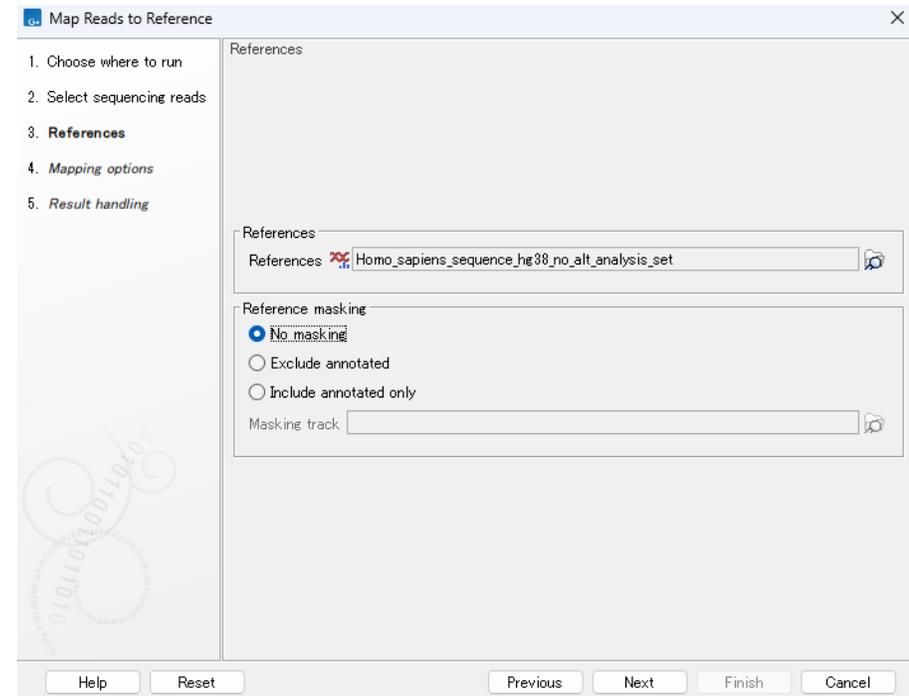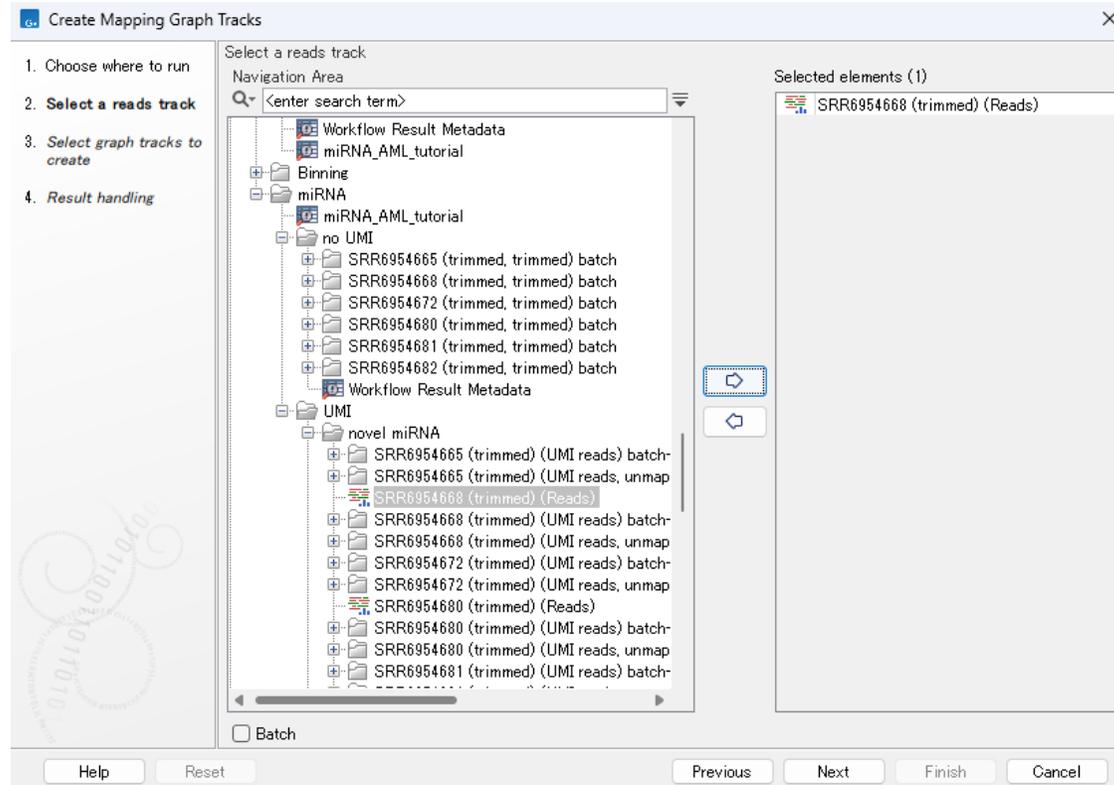
マッピングデータを指定　　　　　　　　　　　　"Read coverage"を選択

高カバレッジ領域の抽出

カバレッジグラフが作成される

高カバレッジ領域の抽出
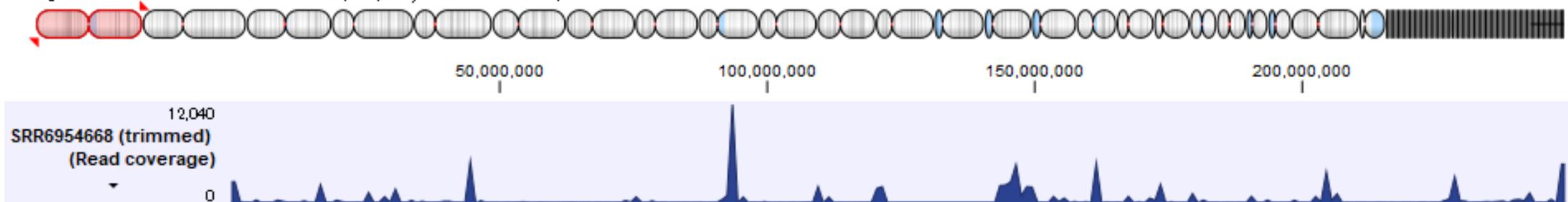
Identify Graph Threshold Areas

カバレッジグラフを指定

Use lower thresholdにチェックを入れ、値を指定
ここで指定した値以下のカバレッジの箇所は考慮されない

高カバレッジ領域の抽出

ゲノム中から該当領域が抽出され、アノテーションデータとして出力される

高カバレッジ領域の抽出

高カバレッジ領域のアノテーションデータを指定

ヒトゲノムデータを指定

高カバレッジ領域の抽出

ゲノム配列中から、高カバレッジ領域の配列が抽出され、リスト化される

二次構造の確認
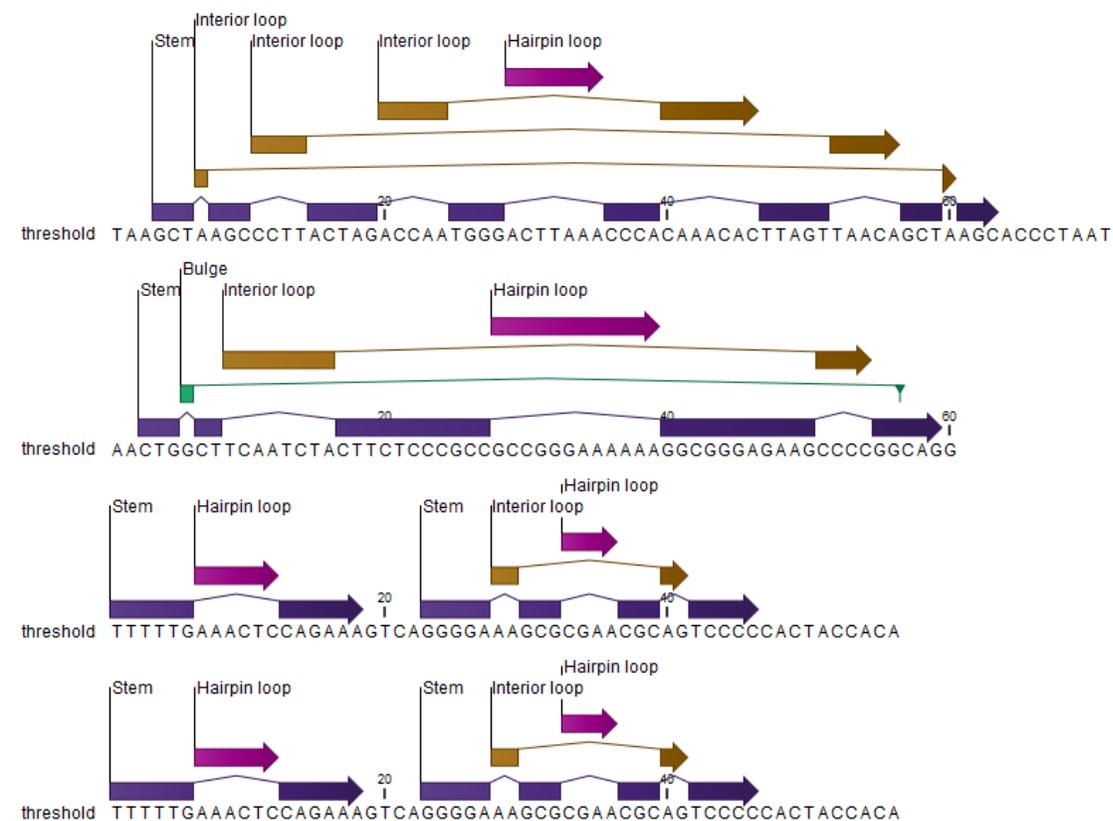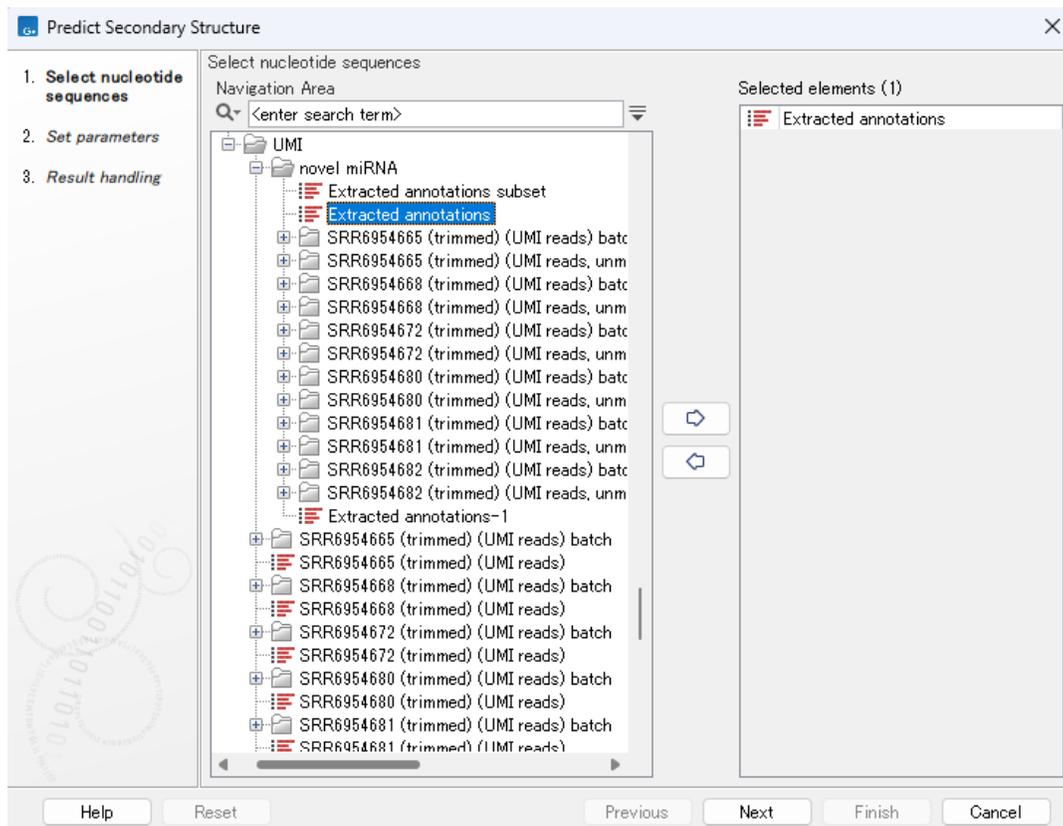
抽出された配列に対して、二次構造の予測を行うことで、ヘアピン構造等の有無を確認する

新規miRNAの定量・比較

Quantify miRNAツールのCustom databaseで、作成したリストを指定することで、
このリストに含まれるmiRNAに関する定量データが得られる。

さらに、1章同様、この定量データを用いて発現変動解析を行うことも可能

お問い合わせ先：フィルジェン株式会社

TEL: 052-624-4388 (9:00〜17：00）

FAX: 052-624-4389

E-mail: biosupport@filgen.jp