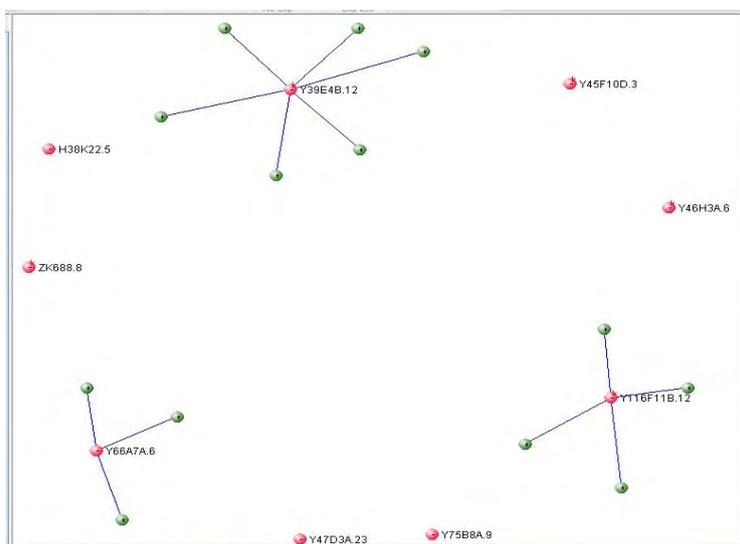


以下は私達の研究室で卒業研究を行って卒業した学生さんの大作の卒論の後半部分から、遺伝子ネットワーク解析サイト VISANT の使い方の解説部分を抽出し、野村が最近のサイトの些細な改変について加筆したものです。卒論にあった糖鎖遺伝子群の VISANT による解析結果や実験部分は後日、論文にまとめる予定です。

VISANT 超入門

VISANT (Integrative Visual Analysis Tool for Biological Networks) というサイトは遺伝子の遺伝的相互作用、タンパク質 - タンパク質相互作用を、免疫沈降、yeast two hybrid 等によって相互関係や可能性を画面で表示して解析するプログラムのサイトである (<http://visant.bu.edu/>)。ヒトやマウス、ショウジョウバエや線虫、酵母やバクテリアなど、様々な生物の持っている遺伝子間の相互作用を、遺伝学的相互作用やタンパク質間相互作用などのビッグデータに基づいてネットワーク表示して解析できる。自分の研究している遺伝子のリストを検索ボックスに入れて、それらの相互作用、その他の遺伝子との相互作用を調べるのに便利で、各自の遺伝子について試してみると思いがけない相互作用が見つかるかもしれない。この VISANT は、遺伝子-遺伝子相互作用の解析に有用であるにもかかわらず、日本語の使用の手引がなく、使いづらいものであった。そこで、日本語で VISANT の使い方説明書を作成した。左下に線虫での糖鎖を合成する酵素の一つのグループである N-アセチルガラクトサミン転移酵素 GalNAcT (N-acetylgalactosamine を付加していく酵素で多数の遺伝子がある) の遺伝子についての VISANT による解析結果の画像(全体図) を挙げてみた。



この解説で VISANT の使い方がだいたいわかったら、次に英語のチュートリアル (http://visant.bu.edu/tutorials/tutorials_list.html) やヘルプを読んで、このプログラムを活用していただきたい。

VISANT を使いはじめるための準備

VISANT はブラウザからサイトに接続して使う、あるいは自分のコンピュータに JAVA で書かれたプログラムをダウンロードして使うという二種類の方法で利用することができます。まず VISANT のサイト (<http://visant.bu.edu>) にブラウザでアクセスしてみてください。この際にはブラウザは Firefox でなく Internet Explorer を使って下さい。両者による表示は異なっており、Java スクリプトも Firefox の表示で表示させてクリックしても動かないので、はじめての方は Internet Explorer を使って以下のページにアクセスしてみてください。

まず <http://visant.bu.edu> をクリックして

UI customization -> **Start VisANT**
Visual Analysis Tool for Biological Networks and Pathways

Home News **Run VisANT** Database Features Tutorials Samples Documents VisANT Community Interaction Statistics

Gene/Protein name/ID: in species
Homo sapiens

Search for Interactions Browse KEGG Pathways

Help | Tutorials | Samples | Interaction Statistics | Run as Local Application | Download | Documents | Report Bugs

News

- 02/06/2013 **New** Release 4.07, add link out information for drugs and fixed several bugs, [more...](#)
- 12/31/2012 **New** Release VisANT 4.06, with new functions for Disease Enrichment Analysis and integrative query, [more...](#)
- 08/15/2012 **New** Release 4.03, fix the bug of VisML loading with saved legend node.
- 07/15/2012 **New** Release 4.0, add disease/drug hierarchies, and major enhancement of user interface, [more...](#)
- 09/06/2011 VisANT is recruiting, [more...](#)
- 08/26/2011 new NIH grant for VisANT, [more...](#)
- 07/04/2010 Release VisANT 3.86, with a new

Features

- New** Network Module Enrichment analysis (NMEA) to detect phenotypic difference of expression data between the sample and control (e.g.. disease v.s. normal), try out [NMEA for cell cycle pathway in P53 mutant data](#), [more...](#)
- New** Predict the function of a network module using either hypergeometry analysis, or GOTEA, [macro](#) to try, [more...](#)
- Primarily support of [macros](#) to define your own work flow, try [macro sample 1](#), [macro sample 2](#), [more...](#)
- [Batch mode](#) automates batch processes

上のページにたどりついたら、Run VisANT をクリックする。

すると下の画面になるので Start Java Application をクリックして Java のプログラムをダ

ダウンロードする

(はじめは Run Java Applet でも OK)。



Running VisANT: Detailed Information
VisANT has been carefully designed to fit different requirements under different scenarios. It provides four run modes as detailed below:

[Online Java Applet](#) [Java Web Application](#) [Local Application](#) [Batch mode](#)

Online Java Applet	Run Java Applet
Advantage: <ul style="list-style-type: none">Most common way to run VisANT. With a java-compatible browser, VisANT can be started any time at any place with internet access.Always run the latest version of VisANT	Disadvantage: <ul style="list-style-type: none">Can not access the local resources (such as save/load networks from local disk, printing...) due to the security restriction

Java Web Application	Start Java Application
<p>When running as Web Application you will see the security warning on the right. Click "Yes" to allow the application to run and read/write network files on your computer.</p> Advantage: <ul style="list-style-type: none">Access full set of functions to read and write local files (text and images).Create shortcut just as standard local applicationAutomatically access the latest version of VisANT, bug fixes, etc. Disadvantage: <ul style="list-style-type: none">Requires Java Web Start, which is automatically installed when you install JRE/JDK with version 1.4.2 above	A screenshot of a Java security warning dialog box titled "Warning - Security". The text inside asks: "Do you want to trust the signed applet distributed by 'DeLisi Lab'? Publisher authenticity verified by: 'Boston University'". It shows two warning icons: a yellow triangle with an exclamation mark and a purple circle with an 'i'. The text says: "The security certificate was issued by a company that is not trusted." and "The security certificate has not expired and is still valid." Below this is a caution: "Caution: 'DeLisi Lab' asserts that this content is safe. You should only accept this content if you trust 'DeLisi Lab' to make that assertion." There are buttons for "Yes", "No", "Always", and "More Details".

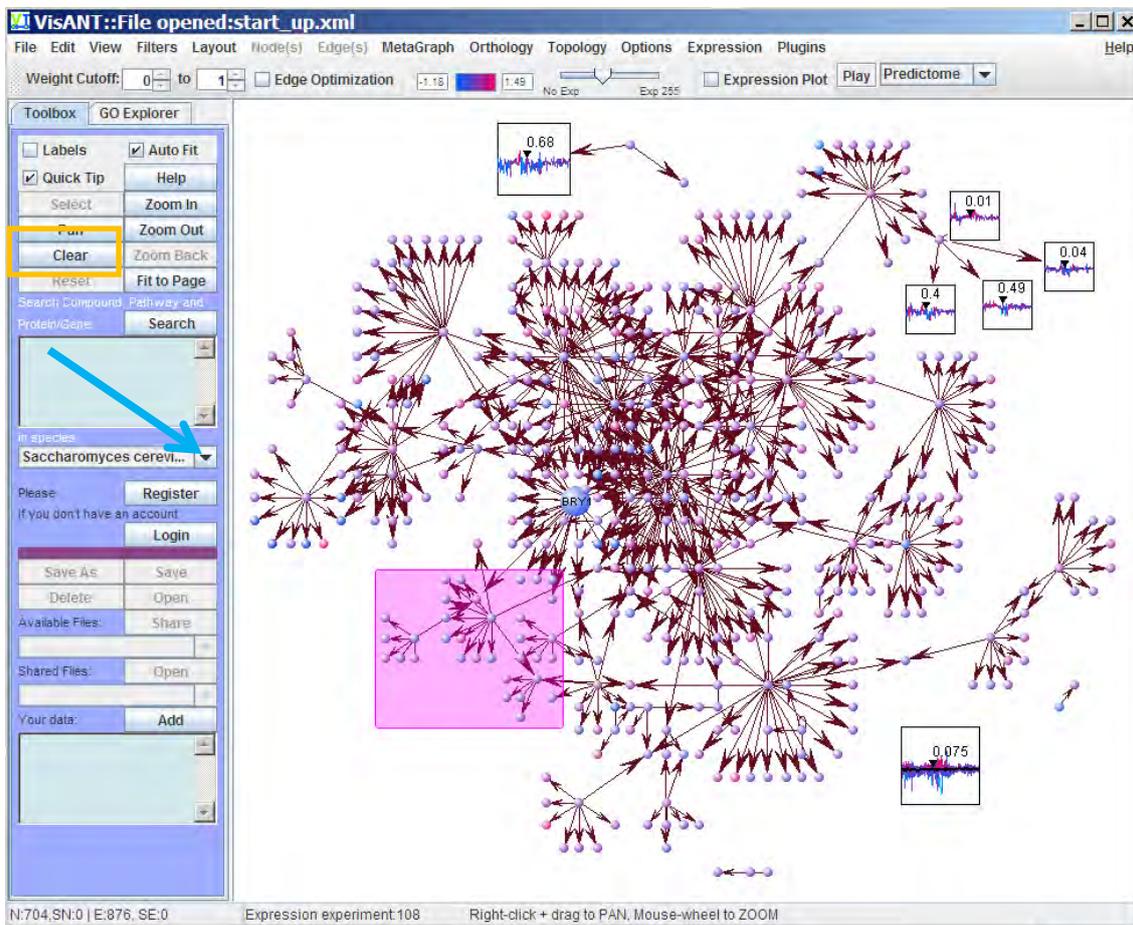
Java Local Application	Latest Version of VisANT
Advantage:	Disadvantage:

Start Java Application をクリックすると、Java のプログラムをダウンロードしに行く。ダウンロードを許可してやると Java が起動して (Java がパソコンにインストールされている場合は) 以下のような画面がでてくるはずである。でなかったら Java がインストールされていないので、最新のバージョンの JAVA (次々と脆弱性が発見されているので最新のバージョンの JAVA をインストールすることが必須である) を以下にアクセスしてインストールする。

<http://java.com/ja/download/>

以下のような酵母の遺伝子ネットワークを表示する画面 (デフォルト画面) が表示された

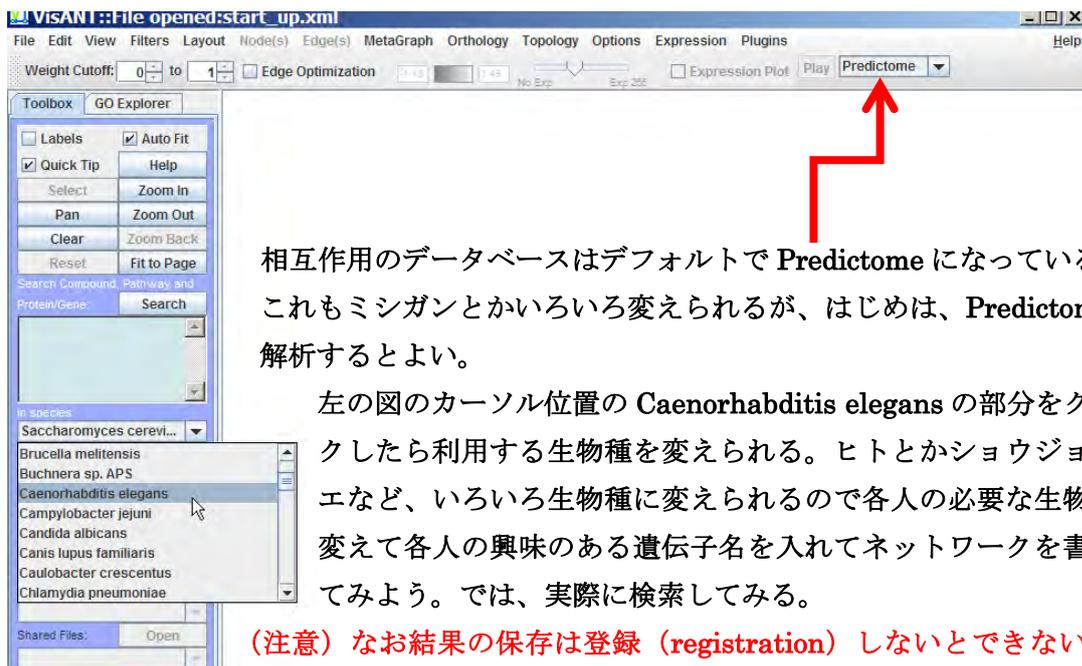
ら成功である。さっそくネットワークを書かせてみよう。



解析する生物種と利用するデータベースの設定。

ではモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の遺伝子ネットワークの解析をはじめることにする。まず上の酵母のネットワーク（デフォルトで開くように設定されている）を左上の **Clear button** で消してから、**矢印**の部分プルダウンして *Caenorhabditis elegans* を選ぶ。

相互作用のデータベースの選択



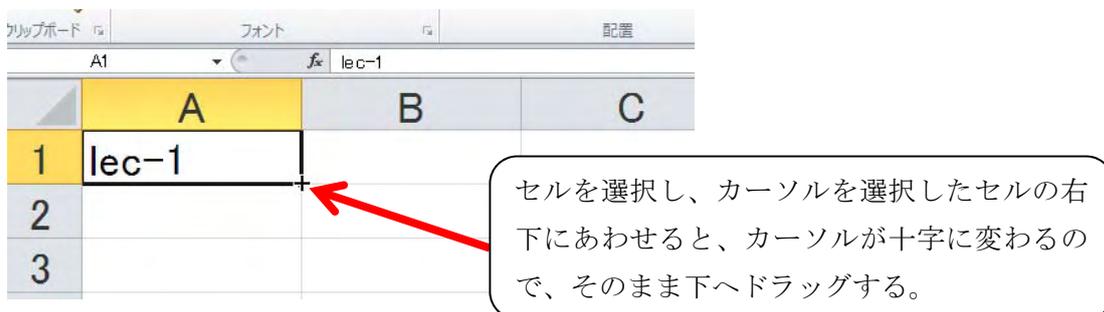
相互作用のデータベースはデフォルトで **Predictome** になっている。これもミシガンとかいろいろ変えられるが、はじめは、**Predictome** で解析するとよい。

左の図のカーソル位置の **Caenorhabditis elegans** の部分をクリックしたら利用する生物種を変えられる。ヒトとかショウジョウバエなど、いろいろ生物種に変えられるので各人の必要な生物種に変えて各人の興味のある遺伝子名を入れてネットワークを書かせてみよう。では、実際に検索してみる。

(注意) なお結果の保存は登録 (**registration**) しないとできない (10セッションまで) ので、使い方の練習がおわったら、さっそく登録して試してみるのを薦める。(登録の仕方は後述する。)

今回の例題では多数の遺伝子を一度に解析する例をやってみることにする。数個の遺伝子を検索窓に入れて試してみるのもお勧めであるが、実用的には数百の遺伝子を入れての解析例のほうが役立つと思われる。

C. elegans の遺伝子名である **lec-1** から **lec-10**, **clec-1** から **clec-266** を具体例にとって実際に試してみる。(具体的には、遺伝子名である **lec-1**, **lec-2**, **lec-3**, ..., **lec-10**, **clec-1**, **clec-2**, ..., **clec-266** までを使う。Excel のセルに **lec-1** を入れてセルを選択した上でカーソルを十字にかえてそのままプルダウンして



lec-1 から **lec-10** 遺伝子までのリストを作り (下図参照)、

	A
1	lec-1
2	lec-2
3	lec-3
4	lec-4
5	lec-5
6	lec-6
7	lec-7
8	lec-8
9	lec-9
10	lec-10
11	
12	

その下に clec-1 の遺伝子をいれてやはり同様にカーソルを clec-1 のセルの右下で十字にかえて、そのまま下へドラッグしていくと、自動的に clec-1, clec-2, clec-3 と遺伝子名が番号順に入力される。こうして lec-1 から lec-10,そして clec-1 から clec-266 までの遺伝子リストが出来るので、その列を全部選択してコピーして、VISANT の検索窓にペーストすると解析準備が完了である。(例題の遺伝子は線虫のガレクチンと C 型レクチンの遺伝子)

	A
1	lec-1
2	lec-2
3	lec-3
4	lec-4
5	lec-5
6	lec-6
7	lec-7
8	lec-8
9	lec-9
10	lec-10
11	clec-1



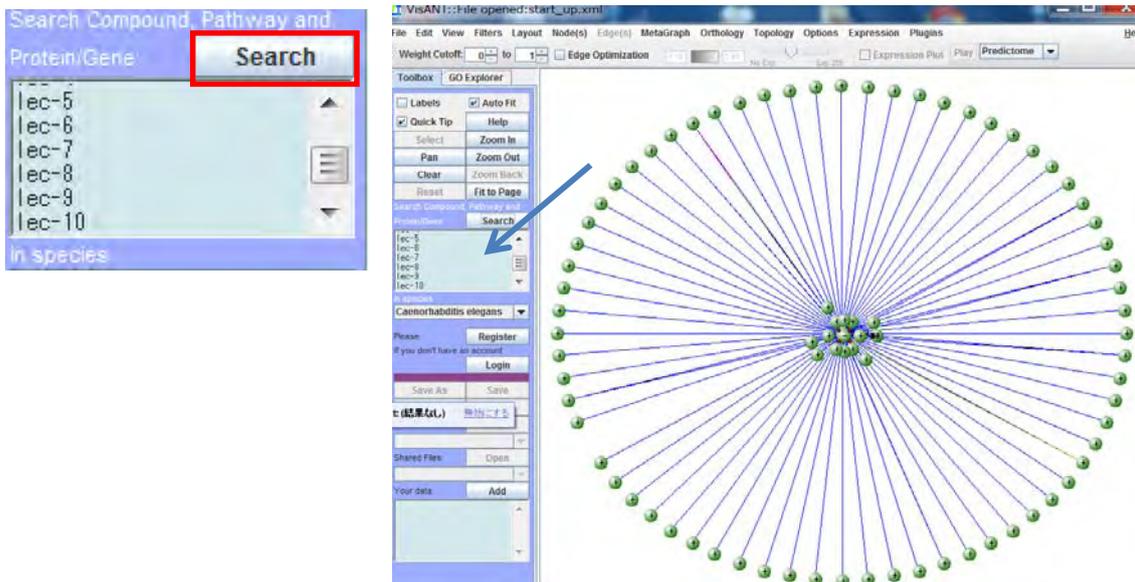
lec-10 遺伝子 (A10 セル) の下のセル (A11 セル) に clec-1 遺伝子を入力した。みやすいように赤字にしてある。カーソルをプラス表示にかえてそのまま下へドラッグすると番号が 1 ずつ増加して遺伝子名が連番で挿入される。

	A
1	lec-1
2	lec-2
3	lec-3
4	lec-4
5	lec-5
6	lec-6
7	lec-7
8	lec-8
9	lec-9
10	lec-10
11	clec-1
12	clec-2
13	clec-3
14	clec-4
15	clec-5
16	clec-6
17	clec-7
18	clec-8

もちろん sqv-3, sqv-4, sqv-5, sqv-7, rib-1, rib-2 など好きな遺伝子を好きな個数だけ入れても以下を参照しながら同様に解析できる。

・検索の仕方

遺伝子名のリストをコンマで区切ったり、改行で区切ったりして検索窓（矢印）に入れて **Search** ボタンを押す。しばらくすると（遺伝子数が少ないと瞬時に。今回のように数百だと5分から10分以上かかるかもしれない。）結果がかえてくる。今回の例題の場合、**clec-89** と **clec-200** には該当データベースにデータがないという警告（**No results found for clec-89** などという警告）がでるので **OK** をおしてすすむとよい。（あるいは当初の遺伝子リストから **clec-89** と **clec-200** の遺伝子名を除いておいてもよい。）

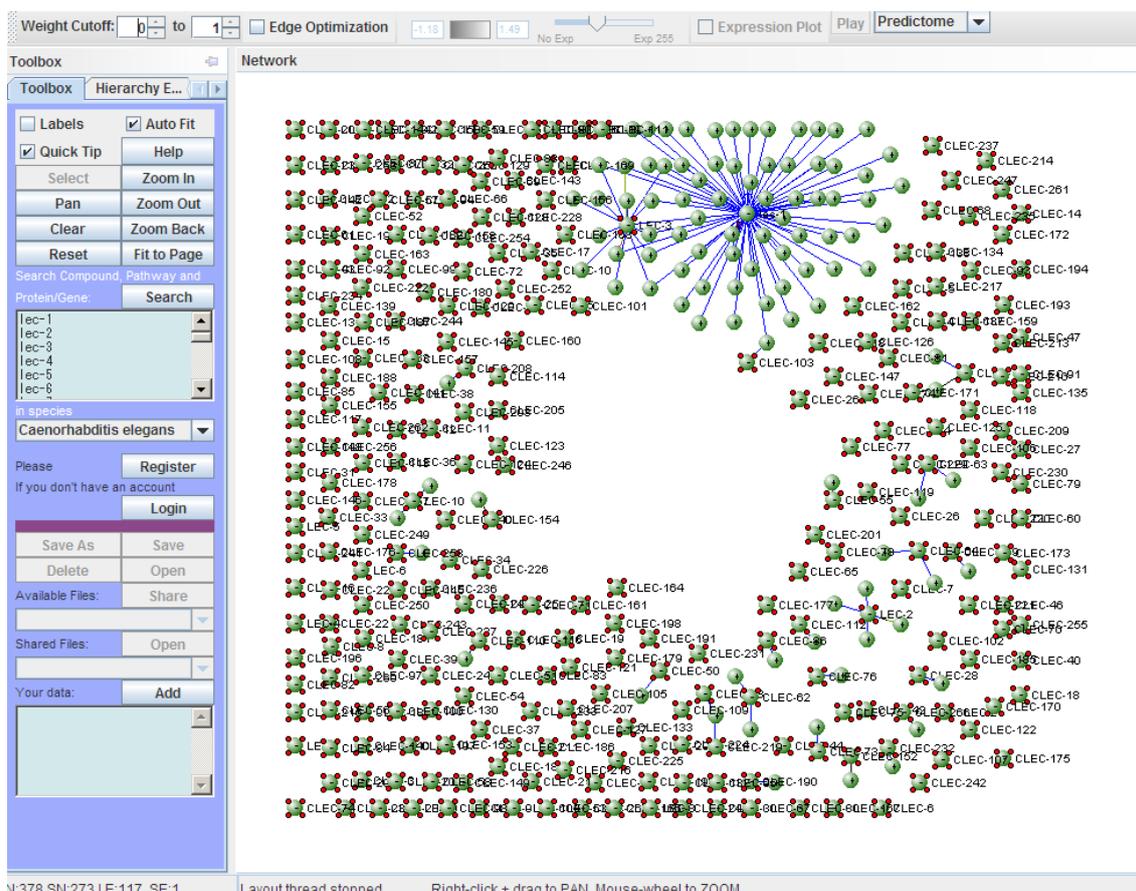


こうしてネットワークが図のように表示されたら成功である。

・見やすくするために

次の解析をすすめるために、ネットワーク表示のレイアウトを変えてみよう。メニューバーの部分にある **Layout** のプルダウンメニューから **Spring Embedded Relaxing** などのボタンをおすと重ならないノードが表示されたネットワークが書かれる。

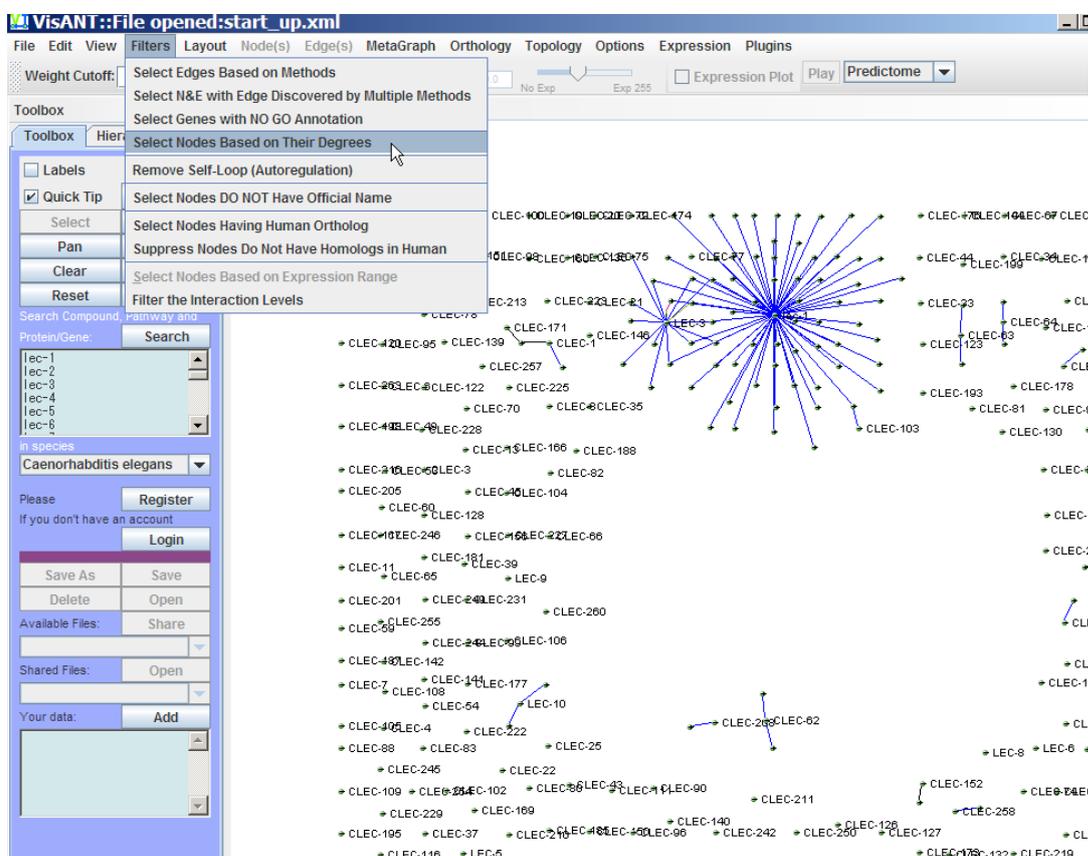
ネットワークの表示結果が揺れている場合は左に表示される **Stop Animation** ボタンを押すと止まるので、止めて解析する。



こんな感じで表示される。これでは相互作用のない遺伝子が山ほどあって見にくい。そうした孤立した遺伝子（相互作用の相手のデータがない、線で結ばれていない遺伝子）のノード(node)を除く操作を行ってみよう。こうしたネットワーク解析では、遺伝子はグラフのノード（グラフ理論でいう vertex）、遺伝子間相互作用の存在を示す線はグラフのエッジと呼ばれる。

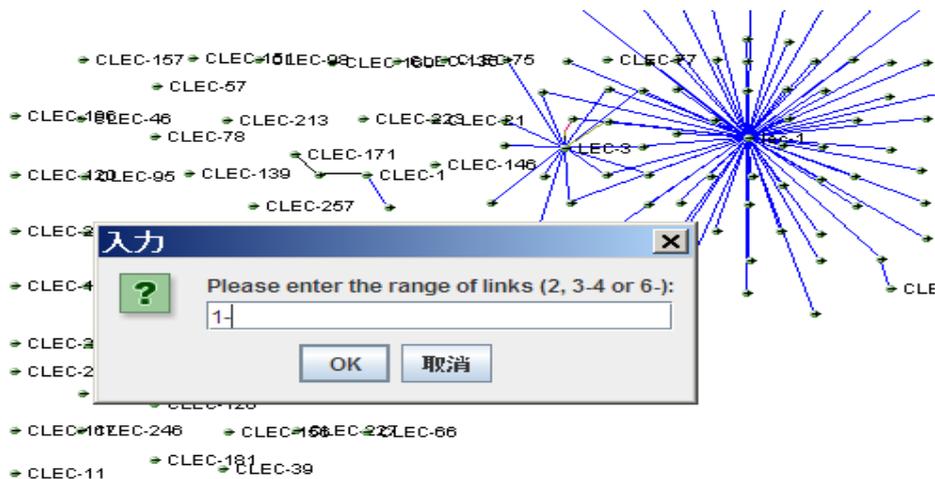
なおホイール付きマウスをつかっている場合は、ネットワークの図の拡大、縮小はホイールマウスで、図の移動は右クリックしてドラッグすると可能である。

では孤立していて相互作用の相手の遺伝子がない遺伝子ノードを、全部のぞいてみよう。
 遺伝子がなにも選ばれていない状態で以下のようにするとよい。

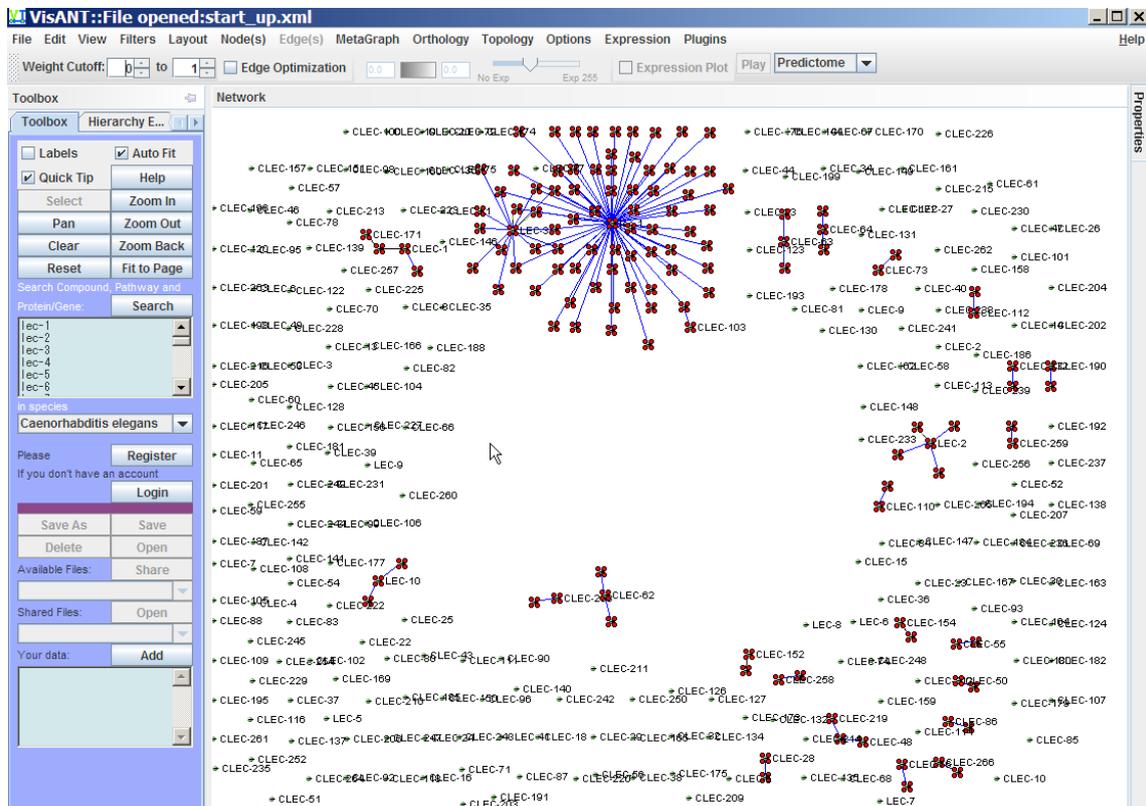


Filter のプルダウンメニューから **Select Nodes Based on Their Degrees** を選ぶ。

これはグラフの遺伝子と遺伝子とをむすぶ線の数 (**degrees**: ノードからでている相手と結合しているエッジの数) によって遺伝子のノードを選ぶフィルターである。 **degree 1** というのは隣の 1 個の相手と相互作用している遺伝子ノード、 **2** が隣の 2 個の遺伝子と相互作用しているも遺伝子ノード、 **2+** とすると 2 個以上の隣の遺伝子と相互作用しているノードを示す。出てくるメニューに **1-** といれると、一つ以上の隣の遺伝子と線で結ばれている遺伝子ノードだけが選択される。 **degree** が **2** と **3** のものだけをフィルターしたいなら、 **2-3** と入れればよい。 **6** 以上なら **6+** と入れる。



結果は以下のようなになる。

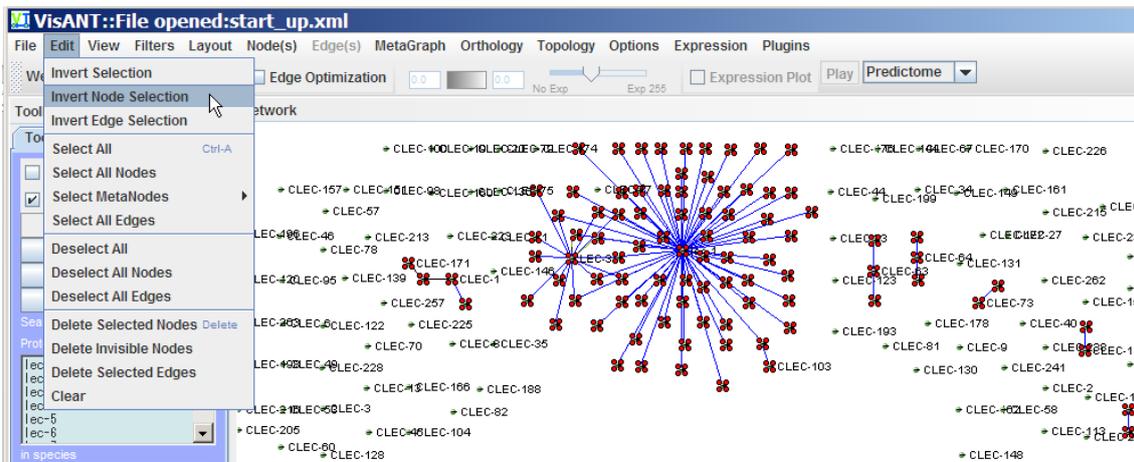


赤い点で選択されているのが、辺を一本以上含むグラフをつくる遺伝子ノードである。

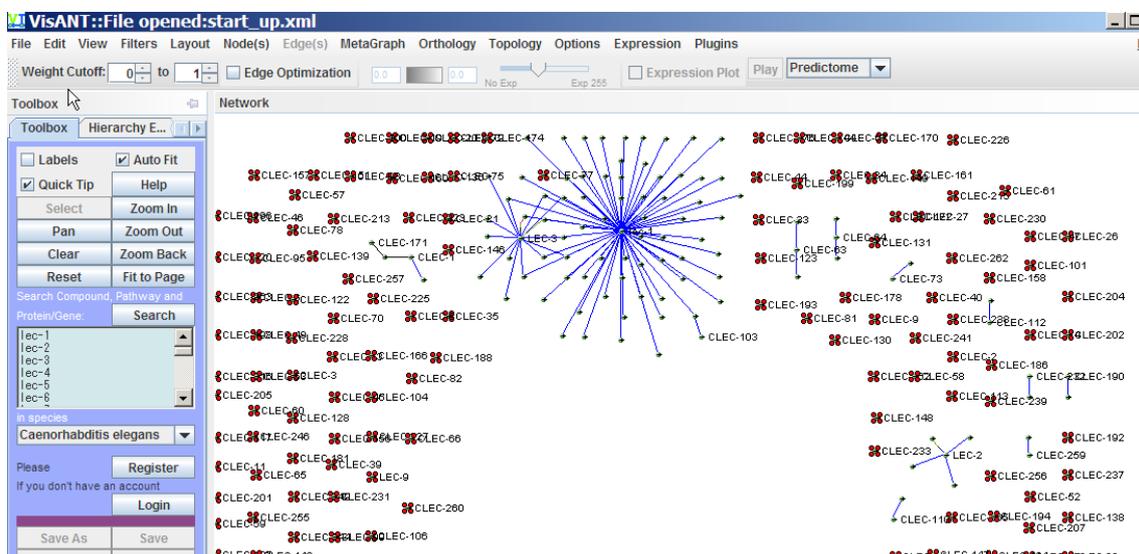
(この段階では、ノードの遺伝子と相互作用するとデータベースに記載されている遺伝子が一個だけ結びつけられているだけである。相互作用の相手の遺伝子を選択して、さらにダブルクリックするとその遺伝子と相互作用する遺伝子が新たに表示される。これについてはもう一度後で説明する。)

では次に degree がゼロの遺伝子を消してみよう。

Edit menu のプルダウンから、Invert Nodes Selection を選ぶ。

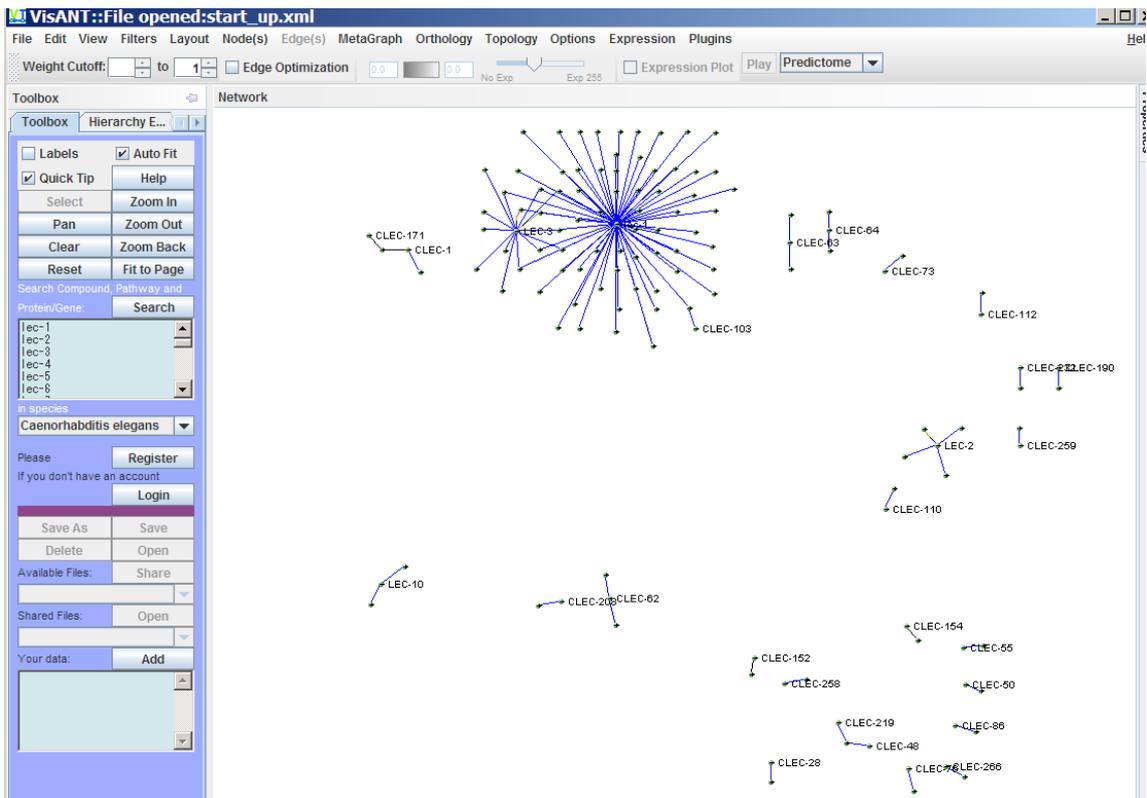


すると選択したノードと、選択されていないノードが反転する。

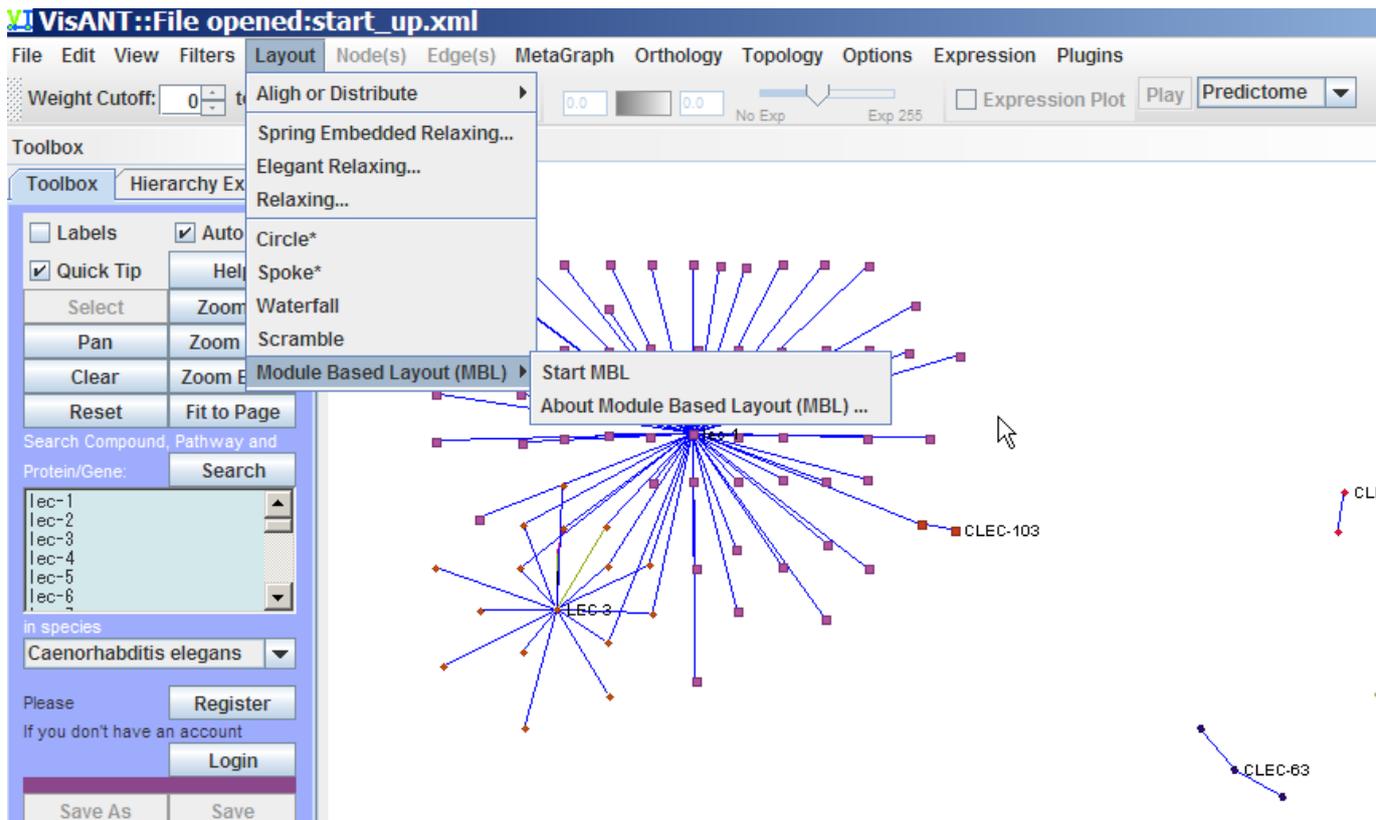


こうして選ばれたノードは、今回は不要なノードなので、これを delete キーを押して（あるいは Edit menu の Delete Selected Nodes を選んで）消す。

すると、こんな感じになる。



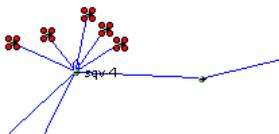
これで望んだ結果が得られたのであれば、**Layout** メニューをいろいろ選んでみて、自分のみやすいレイアウトにして解析を続けるとよい。いろんなレイアウトを選んで遊んでみるのがよい。**Module layout** など試すとよい。



VisANT 解析の tips

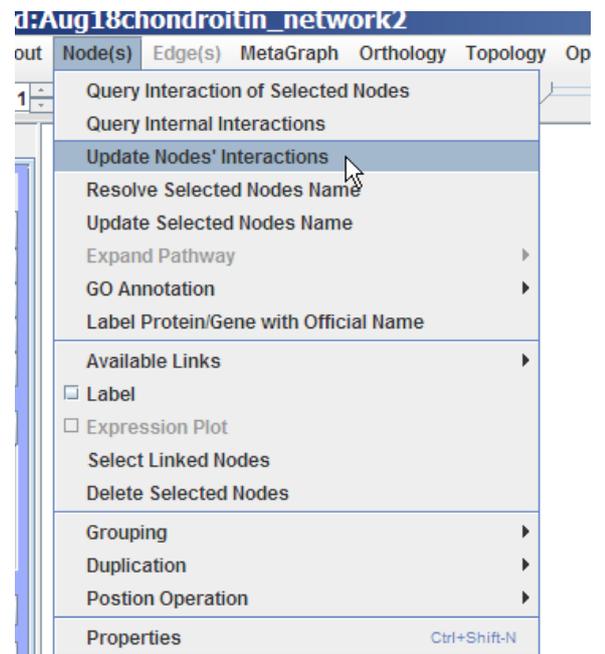
いくつかの **node** を選択した上で、そのノードからの新しいリンクノードを探して表示させるには以下のようにすればよい。 **node** (遺伝子) の選択は **shift** キーを押しながらクリックすると複数の **nodes** が選べる。

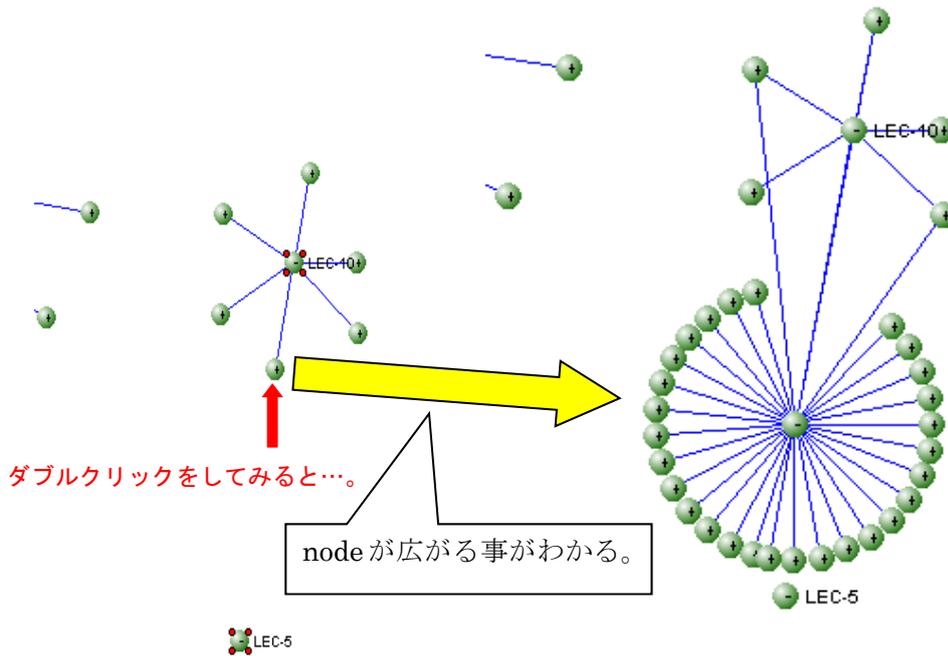
下のようにノードを選択した上で、メニューの **Nodes** から **Update nodes' interactions** をクリックしたら良い。



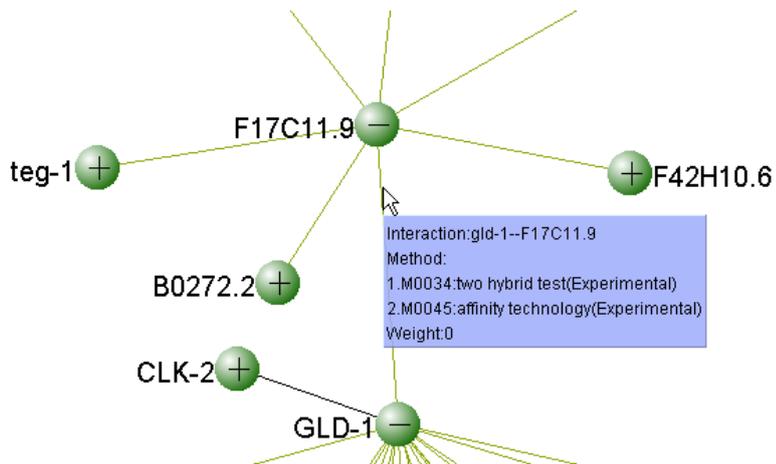
• node の展開の仕方

node をダブルクリックすると、その **node** と関係がある遺伝子 (今回なら Predictome のデータベースにある相互作用している遺伝子の **node**) が展開される。

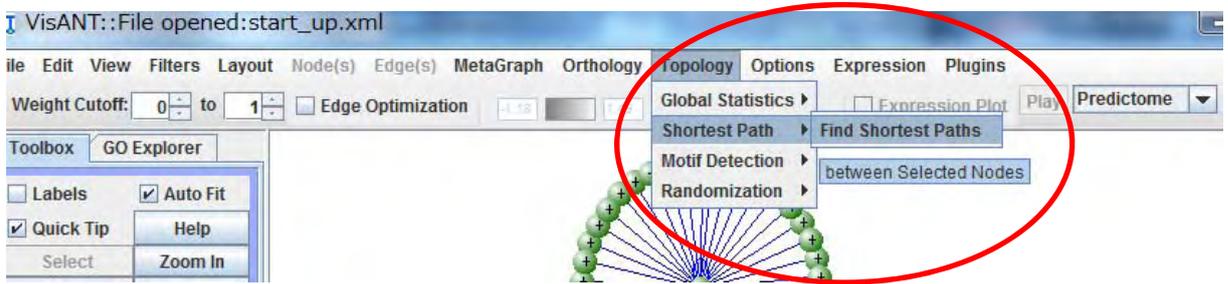




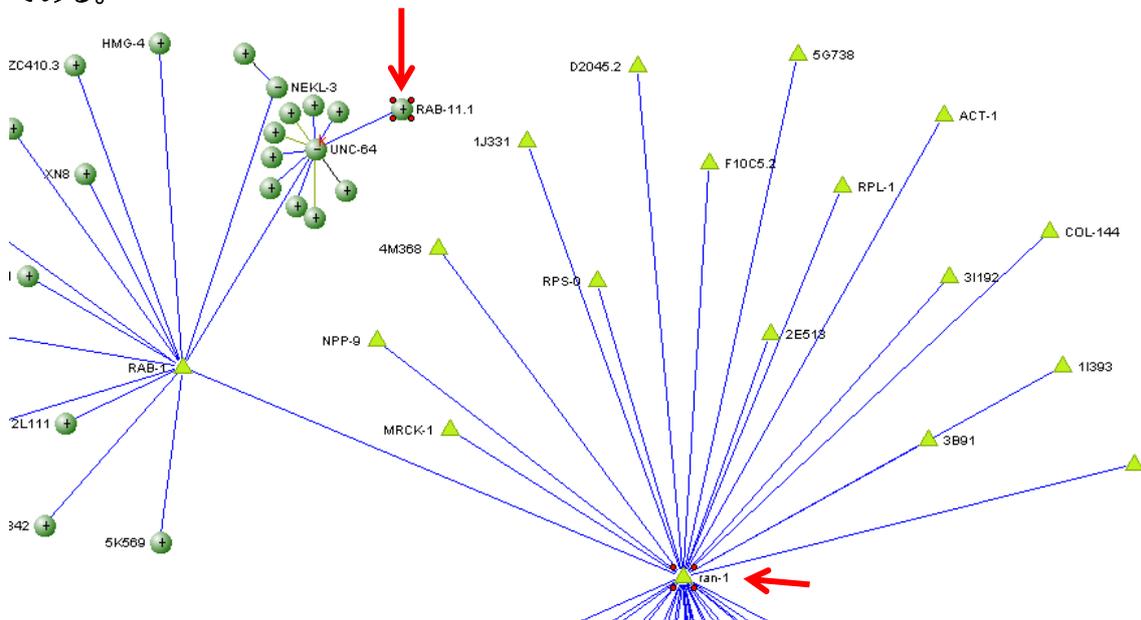
新しく現れた点はそれぞれ遺伝子に相当し、Predictomeで相互作用のある遺伝子が結ばれている。結んでいる線の色（Edgeの色という）はどのような形で相互作用するかを示している。カーソルを線の上に重ねると相互作用の根拠がポップアップするようになっている。yeast two hybrid 実験か、免疫沈降実験か、遺伝子相互作用実験によるのかなど相互作用の根拠がわかる。下図では *gld-1* と F17C11.9 という二つの遺伝子間の相互作用に two hybrid と affinity 実験による根拠があるというのわかる。



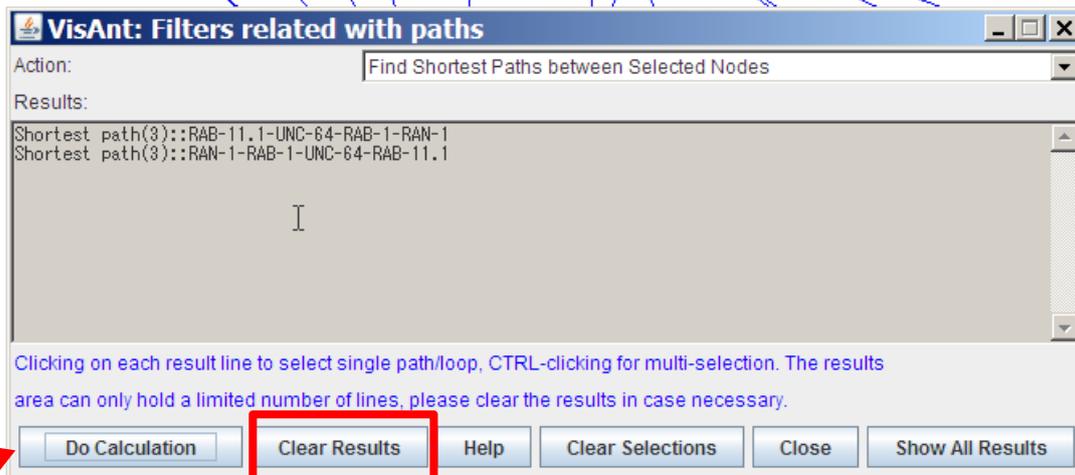
・最短経路の調べ方



二つの遺伝子 node を図からシフトキーを押しながらクリックして選び、
Topology→Shortest Path→Find Shortest Paths で 2 つの node 間での最短経路がわかる。
二つの遺伝子を結びつける遺伝子名と遺伝子間相互作用の証拠が一瞬にしてわかる。
例えば、以下の例では **rab-11.1** という遺伝子と **ran-1** という遺伝子をクリックして選択してある。

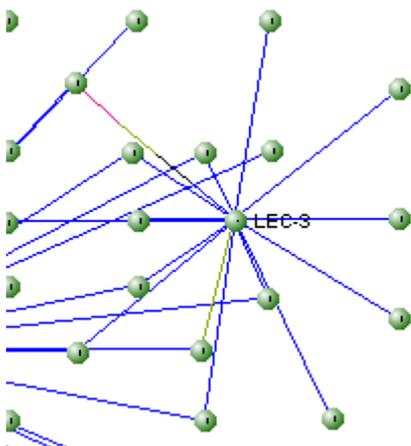


この二つの遺伝子 (**ran-1** と **rab-11.1**) 間の最短経路を上の方法で求めると
以下のような出力が得られる。**ran-1** と **rab-1** が相互作用し、**rab-1** と **unc-64** が相互作用、
さらに **unc-64** と **rab-11.1** が相互作用することがわかる。



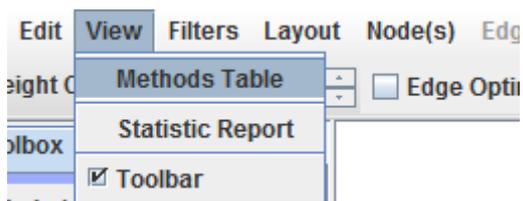
注意: 以前に **shortest path** を調べていたらその結果が残っている場合がある。その場合は、まず **Clear Results** ボタンを押して、**Results** 欄の結果をクリアして、あらためて二つの遺伝子を選択しなおして **Do Calculation** ボタンを押すと見やすい結果が得られる。いろいろ試してほしい。

・ **Method** 別で線の色が分けられている。

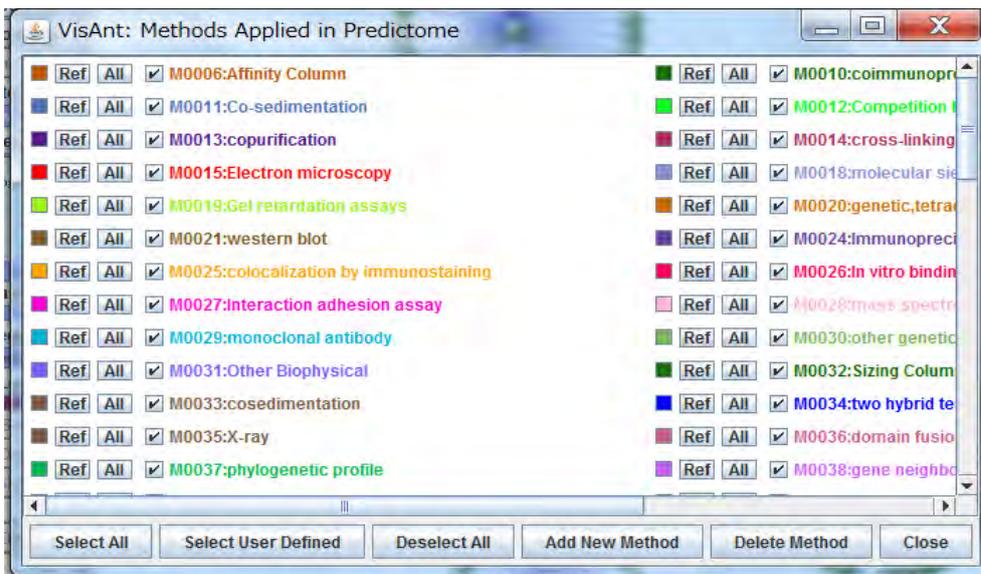


図のようにグラフの辺の色がちがっている場合がある。これは遺伝子間相互作用の根拠別に線の色を変えているのである。

View→Methods Table としてみると、

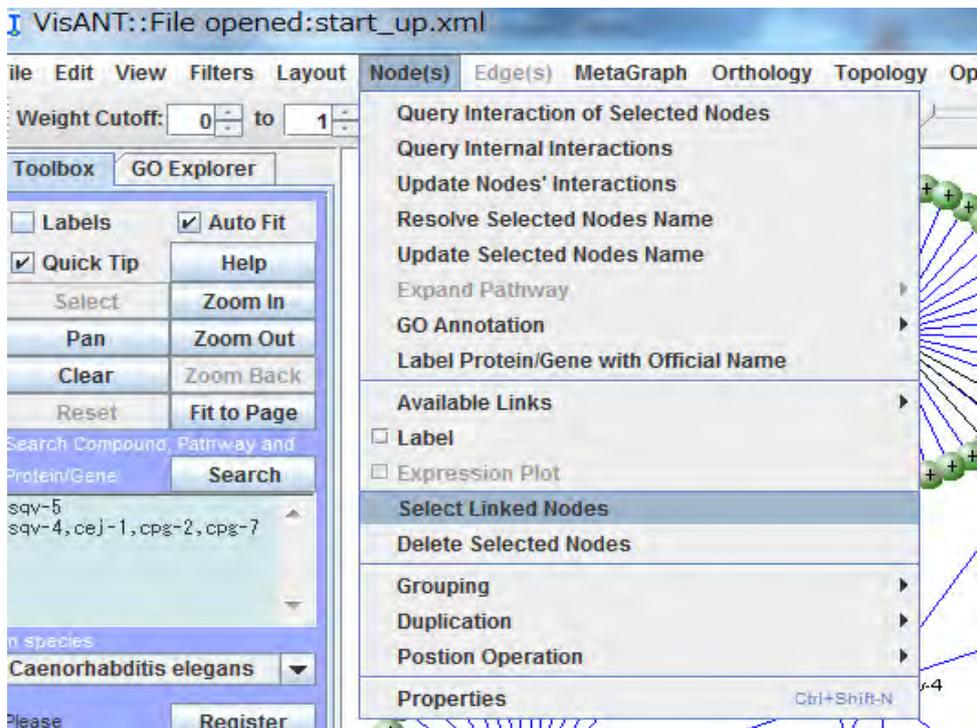


繋がっている線の色が根拠別に異なる事がわかる。



二つのノードを結ぶ線 (edge) の色で、相互作用があると表示されている根拠がわかる。Affinity column での結合実験の結果から、相互作用があるとされているのか、yeast two hybrid の結果が根拠にあるのか、遺伝的相互作用の実験結果が根拠なのか、などなど、遺伝子間相互作用の根拠がわかるし、上の図のチェックを外すことで、必要な根拠だけチェックして解析結果をより信頼性の高いものに限定することも容易である。自分の遺伝子でいろいろチェックをいれたりはずしたりしてみるとよい。

・繋がっている遺伝子 node を次々と表示することが出来る。



・任意の遺伝子(nodes を複数個選んでもよい)を選び、メニューから **Node→Select Linked Nodes** を選ぶと、任意の遺伝子 (または複数の遺伝子群) と **edge** 一本でつながっている遺伝子ノードを全て選ぶことができる。最初の遺伝子 (または遺伝子群) につながっている遺伝子がみな選択されているので、その状態でもう一回同じ操作をすると、さらにつながっている遺伝子が選ばれる。こうして次々と相互作用している新しい遺伝子をグラフに追加していくことができる。

・10個まで検索結果が保存できる。

結果の保存はサイトに登録しなくてはできないので注意。

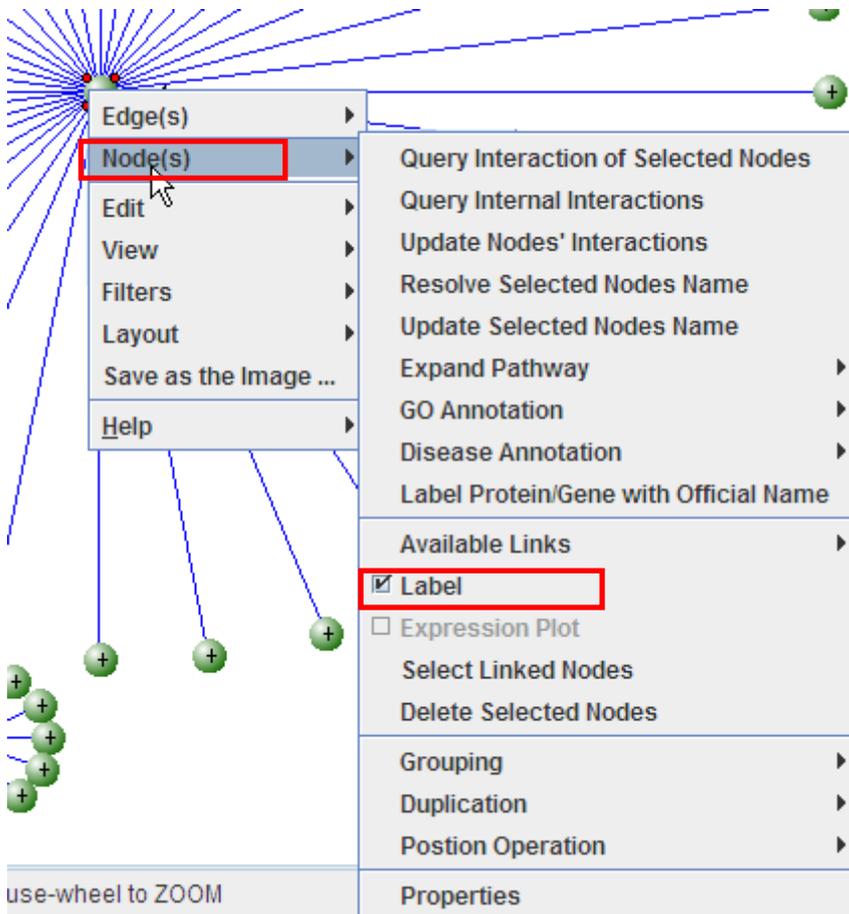
まず検索ボックス画面の下のほうにある **Register** ボタンを押し、登録をする。メールでパスワード(後に変更可)が送られてくるので、そのパスワードを使って **Login** をする。

↑ **Register** を押すと上記のような画面が出てくる。ここに、e-mail アドレス、名前、所属を打ち込むと登録が完了する。

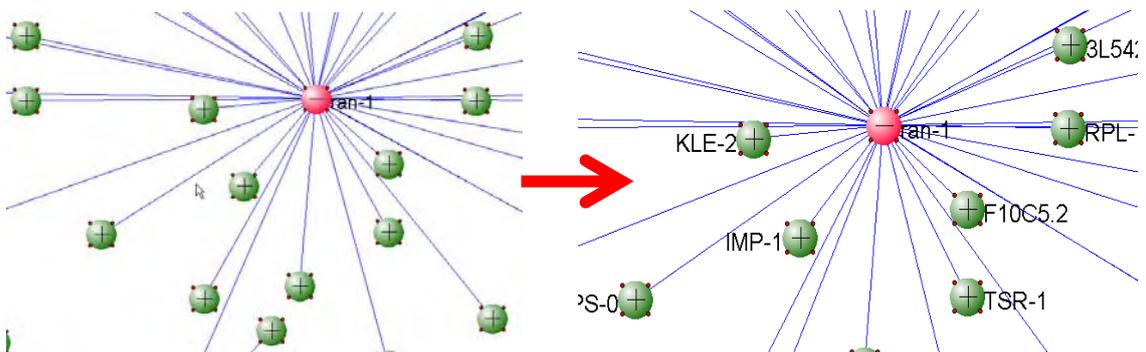
Login すると、**Save As** がクリック出来るようになるので、クリックしてファイル名を打ち込むと保存が完了する。

・遺伝子名を表示出来る

名前の知りたい遺伝子を右クリックし、node→label をクリックすると、

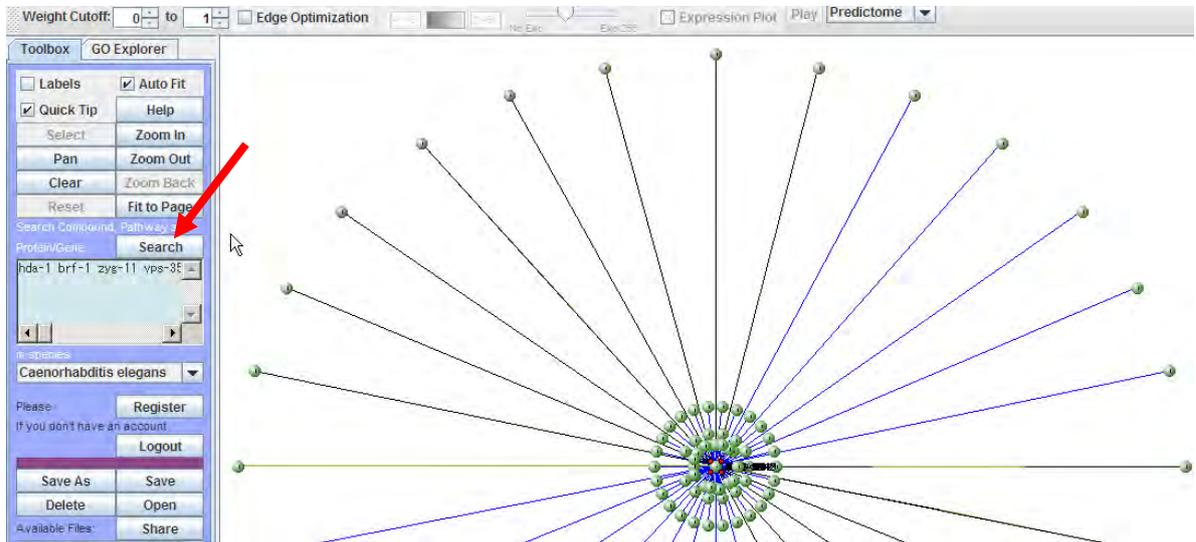


遺伝子名が表示される。



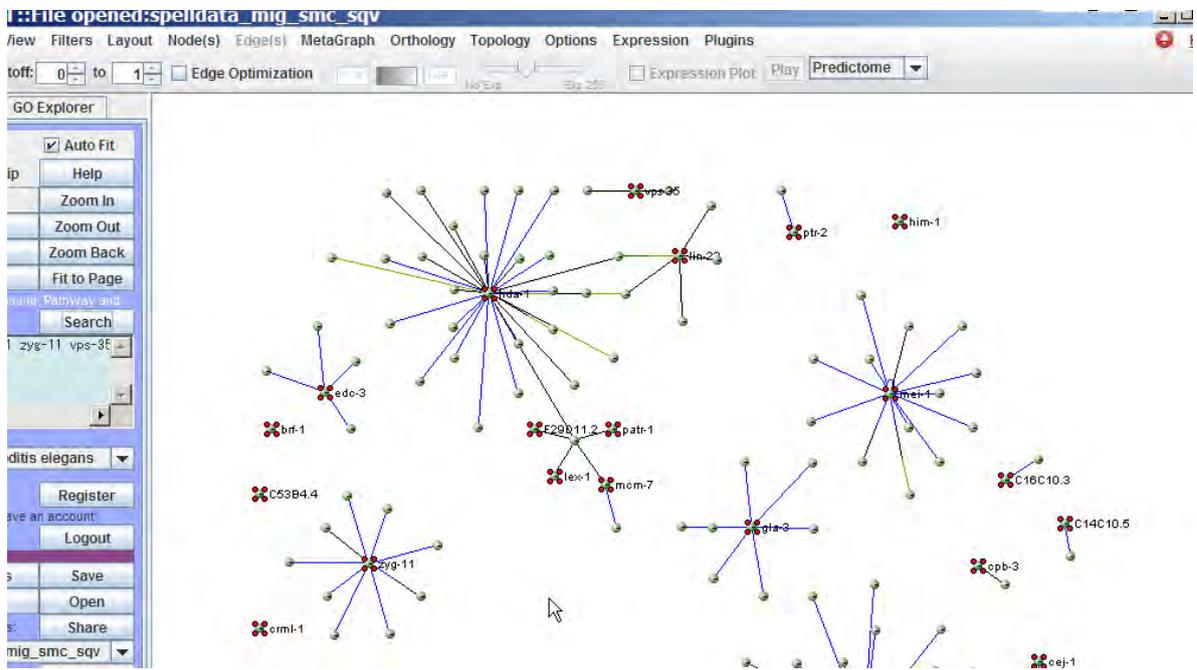
・ネットワークを書かせたら、入力した遺伝子だけに色を新しく付けて表示するとあとあと見やすい。

それは以下のようにする。



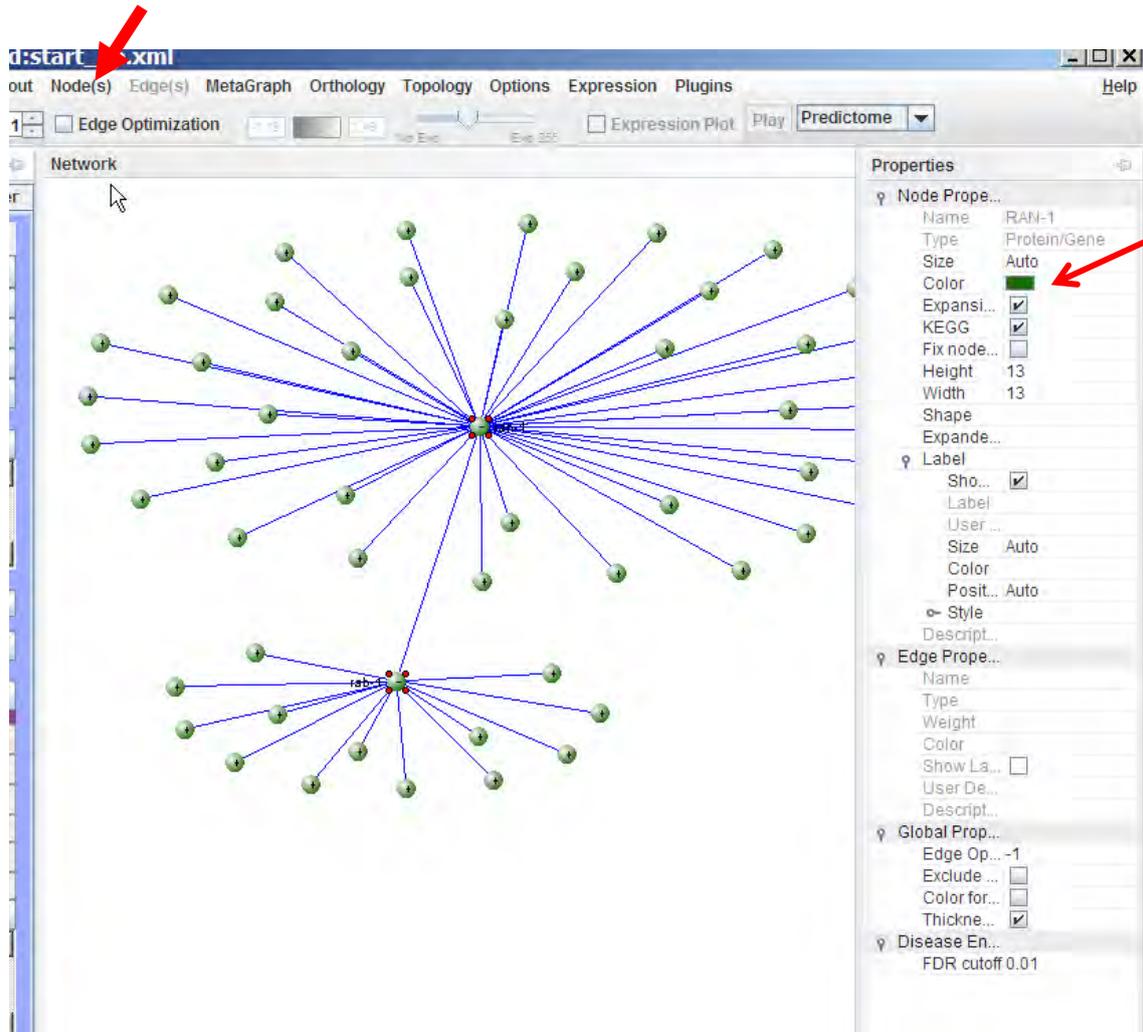
遺伝子名を入力して **Search** ボタンを押すとしばらくしたら上のような表示でネットワークが描かれる。

layout で **spring embedded** などにして

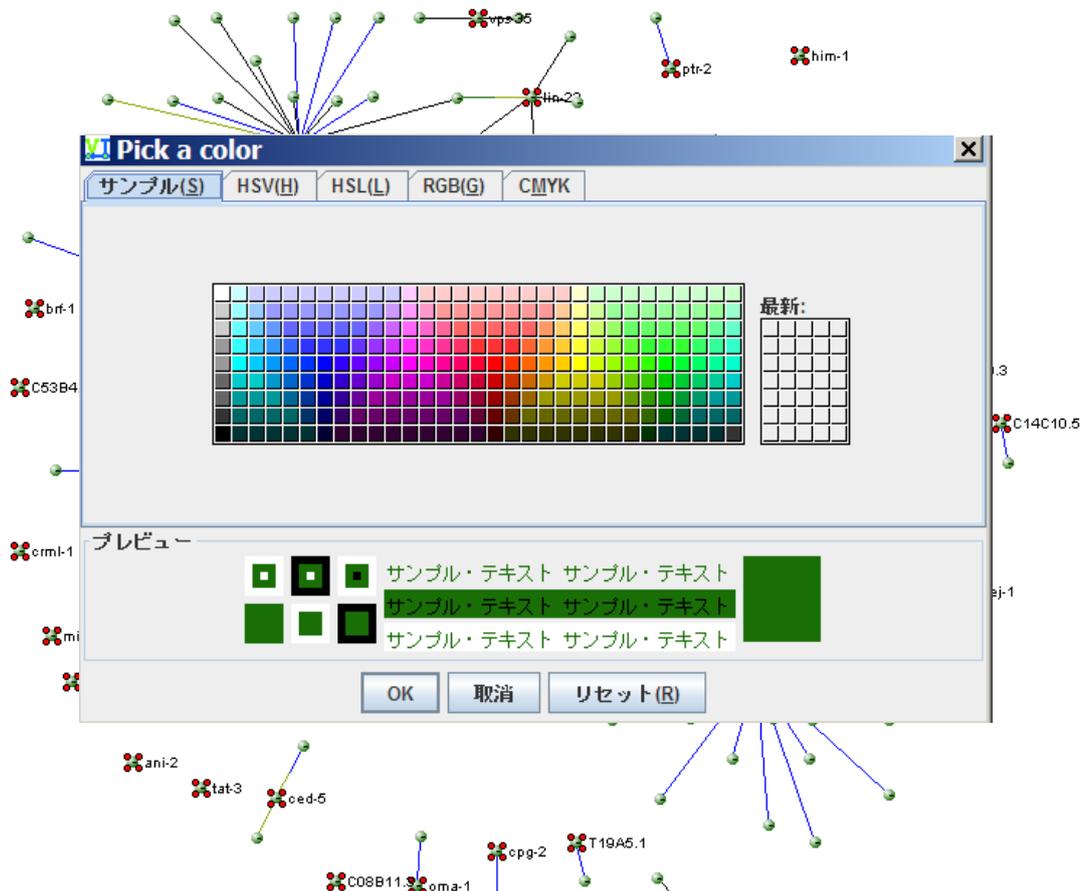
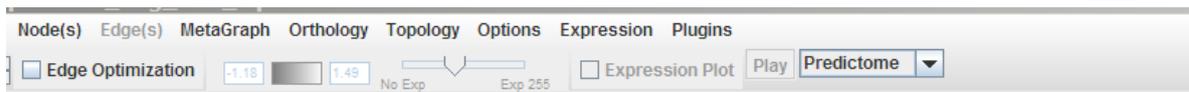


こんな感じで表示されたら、**Search** ボタンを一回押して、入力した遺伝子をすべて選択表示にする。

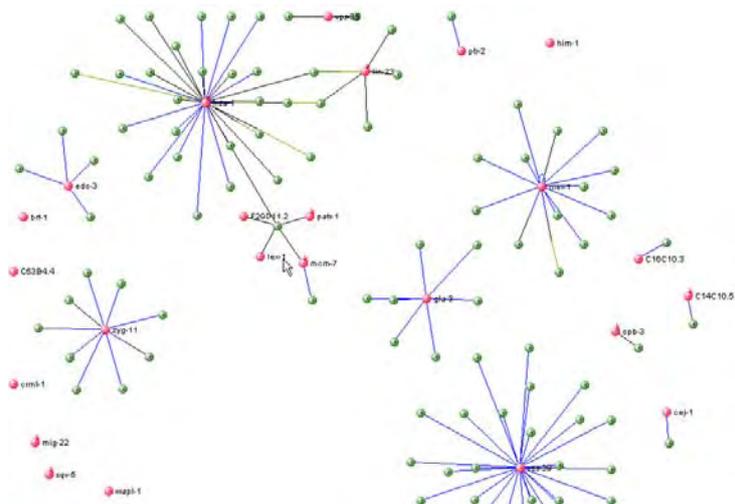
この状態で **Node** メニューから **Properties** を選ぶ。



すると右に上のような **Properties** と書いてある箱がでてきてノードやエッジの属性を変更することができる。矢印で示した **Color** を選ぶと、**Pick a color** の選択ボックスが開き、ここで好きな色で選択した後は、選択した **node** が好みの色で表示されるようになる。

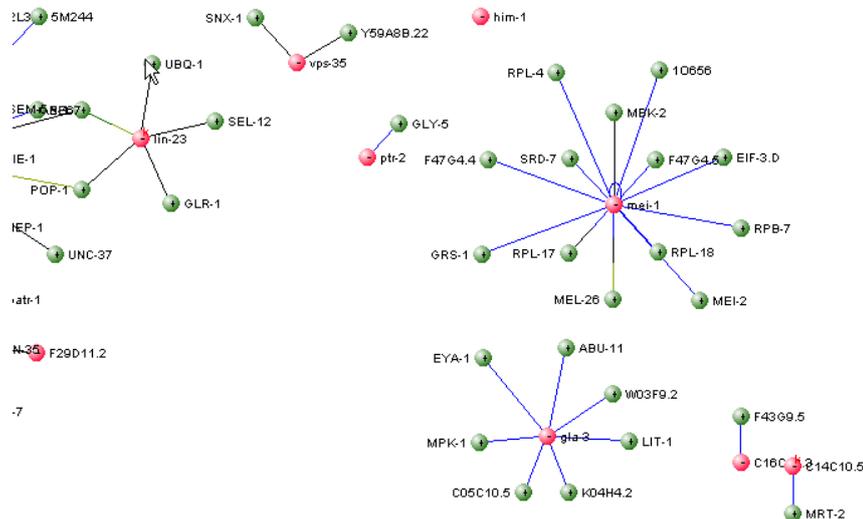


上で、例えば赤色を選ぶと、了解ボタンを押すと次のようになる。

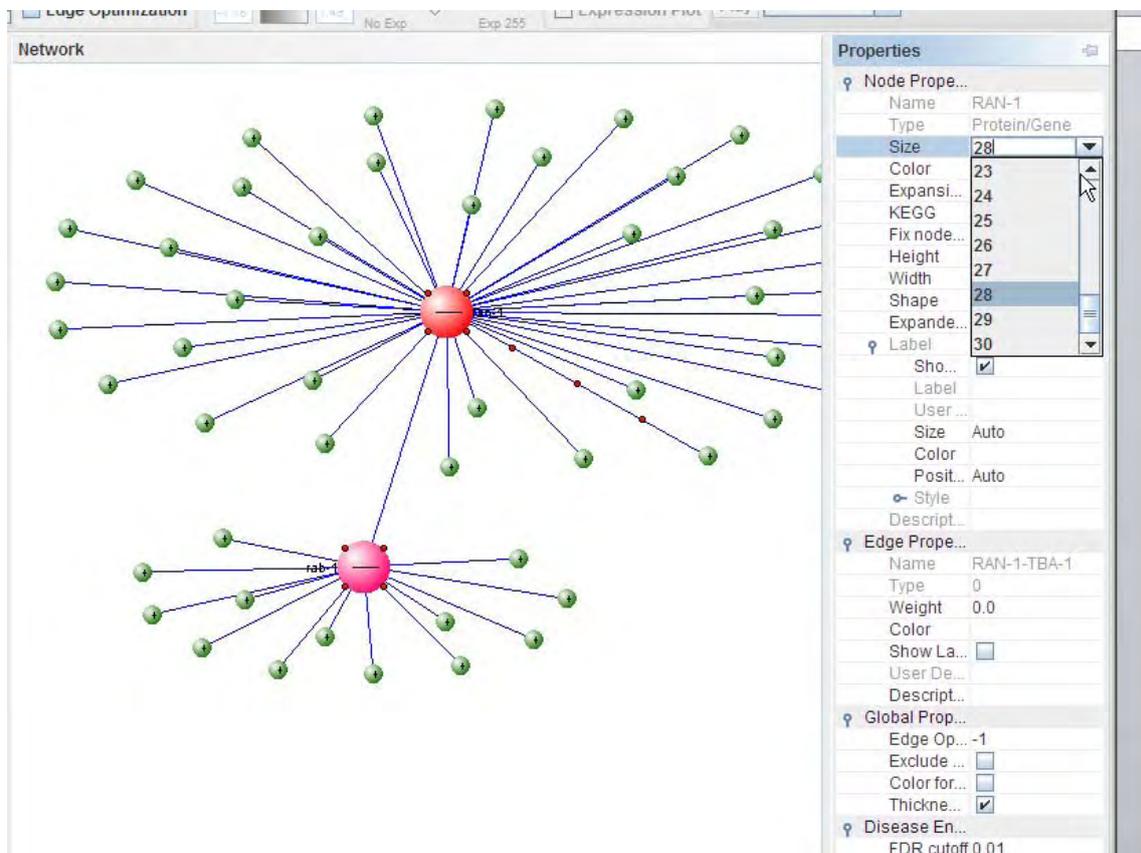


入力した遺伝子名が色つきで表示されているので以降、見やすく扱いやすい。

また、全部の node に遺伝子名を表示させるには、node を全部選択しておいて、Nodes メニューから label にチェックをいれるとよい。



また Nodes の Properties の項目で、色、ノードの大きさその他をいろいろ変えて図を見やすくすることもできる。



また Nodes メニューからは GO term での annotation (ものすごく細かく表示を調節できる。たとえば次の図は、Nodes, GO Annotations のプルダウンメニューから Configurations を選んだところ。ネットワーク図の左に GO terms についてのパネル(GO explorer)が開いている。さらに Disease Annotatin で病気についての annotation を付けたりすることもできる。ので試してみるとよい。

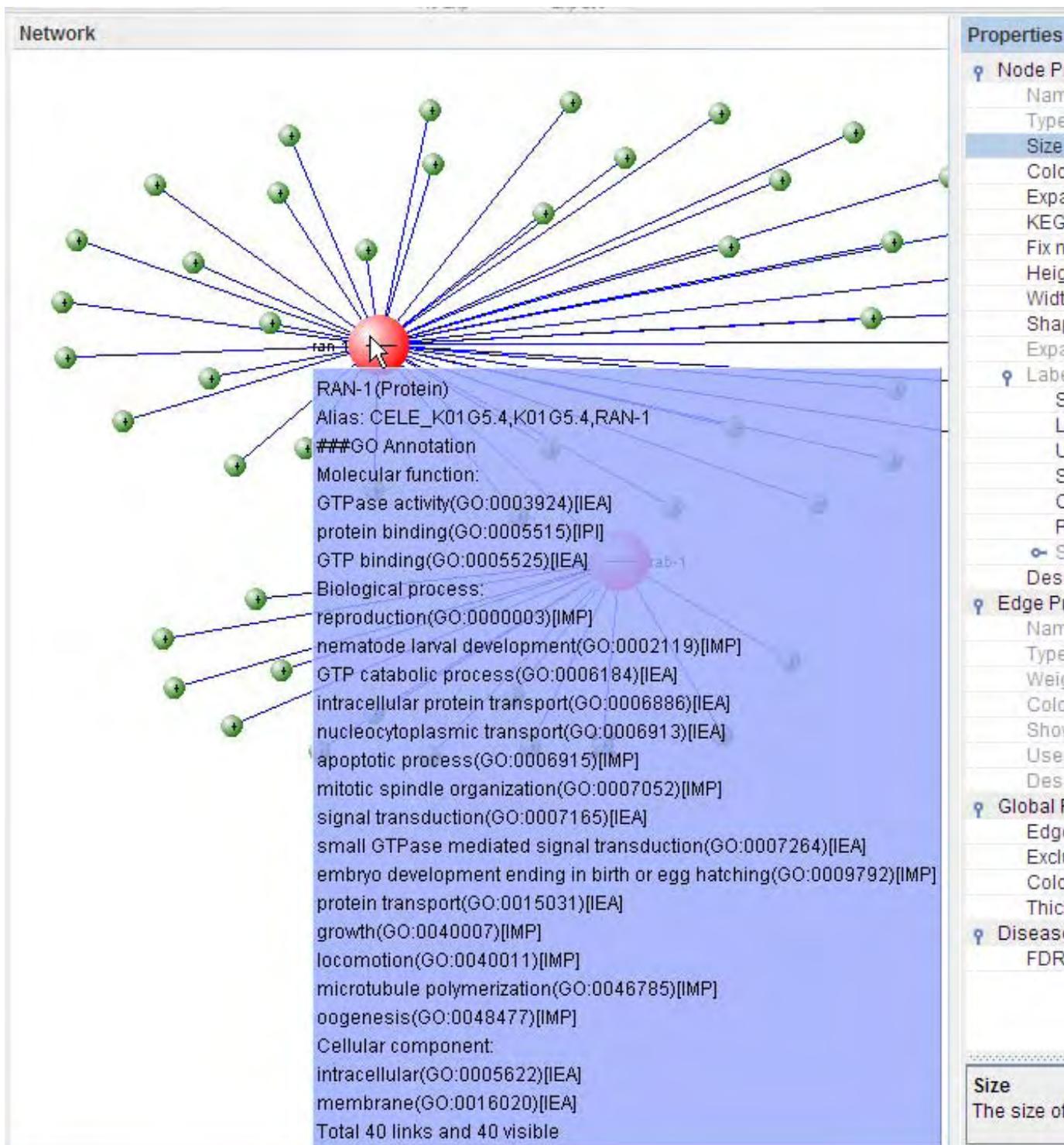
The screenshot displays the VISANT software interface. On the left, a red box highlights the 'GO Explorer' panel, which shows a hierarchical tree of GO terms. The 'signal transduction' term is selected. Below this panel are input fields for 'GO' and 'Search', and several configuration sections: 'General Options' (Cutoff of informative terms: 75, Cutoff of number of genes: 145, Link to network checked), 'NMEA Configuration' (alpha: 0.05, beta: -0.3, Number of iteration: 2000, P-value/FDR cutoff: 0.01), and 'GOTEA Configuration' (alpha: 0.6, beta: -0.3, Number of iteration: 2000, FDR cutoff: 0.01, Number of top terms: 3).

In the center, the 'Node(s)' menu is open, showing options like 'Query Interaction of Selected Nodes', 'GO Annotation', 'Disease Annotation', and 'Configurations...'. A red arrow points to the 'Configurations...' option. The 'GO Annotation' sub-menu is also visible, listing options such as 'Using Most Specific GO Terms', 'Using Informative GO Terms (cutoff=75)', and 'Using Selected GO Terms Only'.

The main window shows a network graph with green nodes and blue edges. The status bar at the bottom indicates 'Displayed total 703 paths of the GO tree' and provides instructions for panning and zooming.

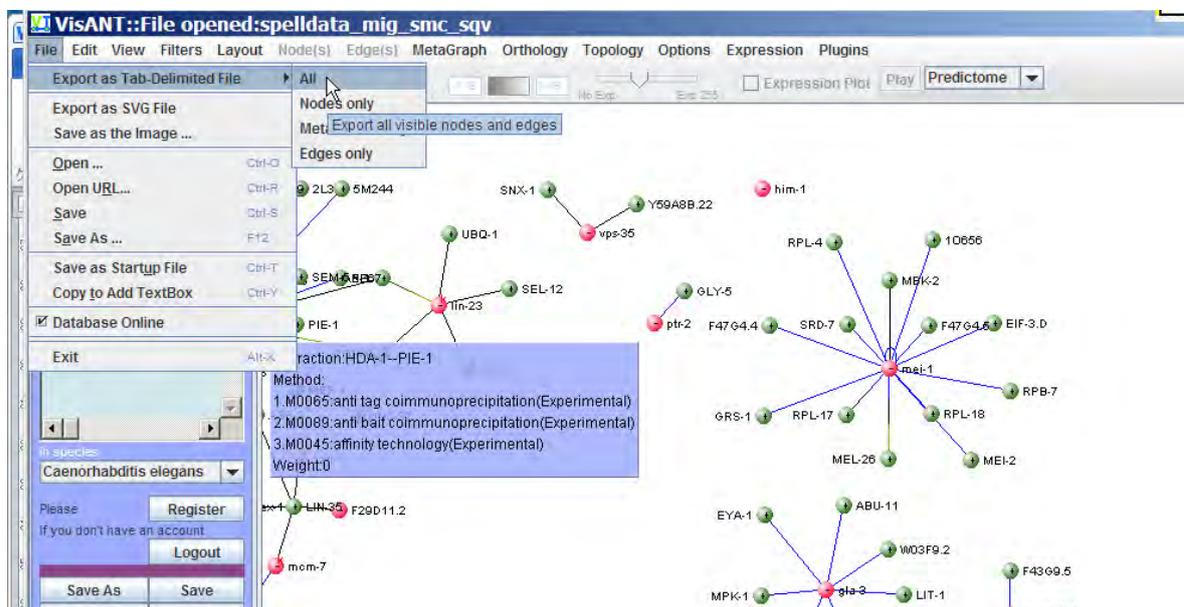
次の図は

ran-1 遺伝子についてノードにカーソルをあわせて GO term の annotation を表示したところ。



◎最後に、全部の遺伝子名を一括で出力するには、File menu から **Export as Tab-Delimited File** を選ぶ。

これで tab で区切られたファイルができる。できたファイルは **Excel** で開くことができる。



ALL を選択すると以下のような tab 区切りテキストファイルができる。

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	T19A5.1	SPK-1		0 M0034		0 14704431		
2	VPS-35	SNX-1		0 M0074		0 20133524		
3	VPS-35	Y59A8B.22		0 M0074		0 20133524		
4	CPG-2	RAN-1		0 M0034		0 14704431		
5	CED-5	4F419		0 M0045		0 14645848		
6	CED-5	PSR-1		0 M0045		0 14645848		
7	CED-5	PSR-1		0 M0034		0 14645848		
8	ZYG-11	1G930		0 M0034		0 14704431		
9	ZYG-11	1D354		0 M0034		0 14704431		
10	ZYG-11	CUL-2		0 M0065		0 #####		
11	ZYG-11	PAL-1		0 M0034		0 14704431		
12	ZYG-11	FTT-2		0 M0034		0 14704431		
13	ZYG-11	MUT-2		0 M0034		0 14704431		
14	MCM-7	FEM-3		0 M0034		0 18692475		

一列目が遺伝子、二列めが一列目と相互作用する遺伝子名である。M0034 というのは **Two hybrid interaction** のこと。最後の列は **Pubmed ID** で、例えば 14704431 というのは、two hybrid 実験の記載されている文献の **Pubmed ID** である。

VISANT はここで記載した以外にも多数の機能を備えたすぐれたネットワーク解析用システムであり、更新も着実に進められている。ヒトやマウスについても簡単にネットワーク解析が行えるので、この原稿をもとにして、是非、多くの方に気軽に活用して頂きたいと思う。