AJACS尾張

次世代シーケンサー（NGS）解析・実践編：目的別データ解析

仲里 猛留

NAKAZATO, Takeru

@chalkless

情報・システム研究機構 データサイエンス共同利用基盤施設
ライフサイエンス統合データベースセンター

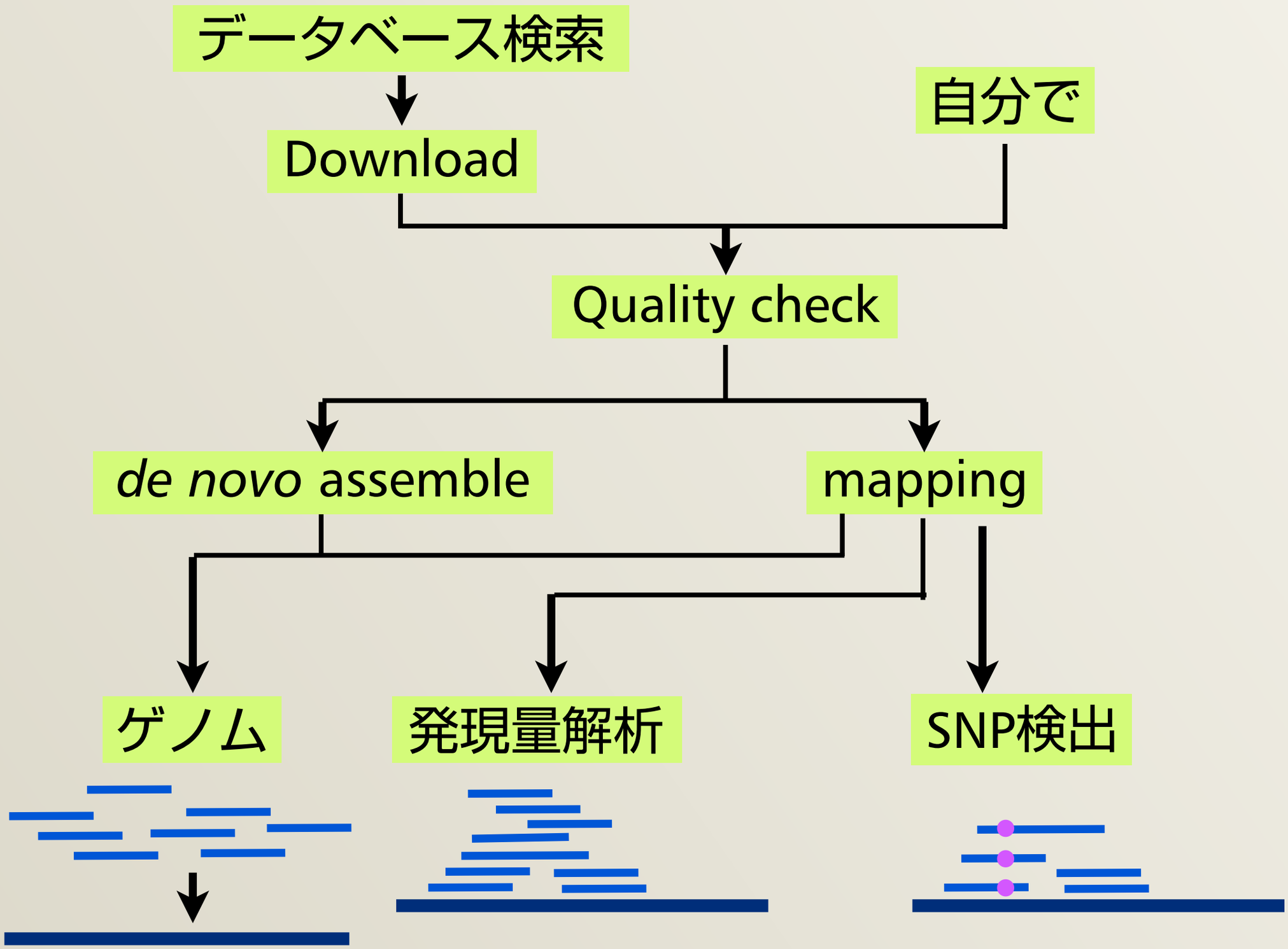
Database Center for Life Science (DBCLS),
Joint Support-Center for Data Science Research, Research Organization of Information and Systems (ROIS)

2017/2/1

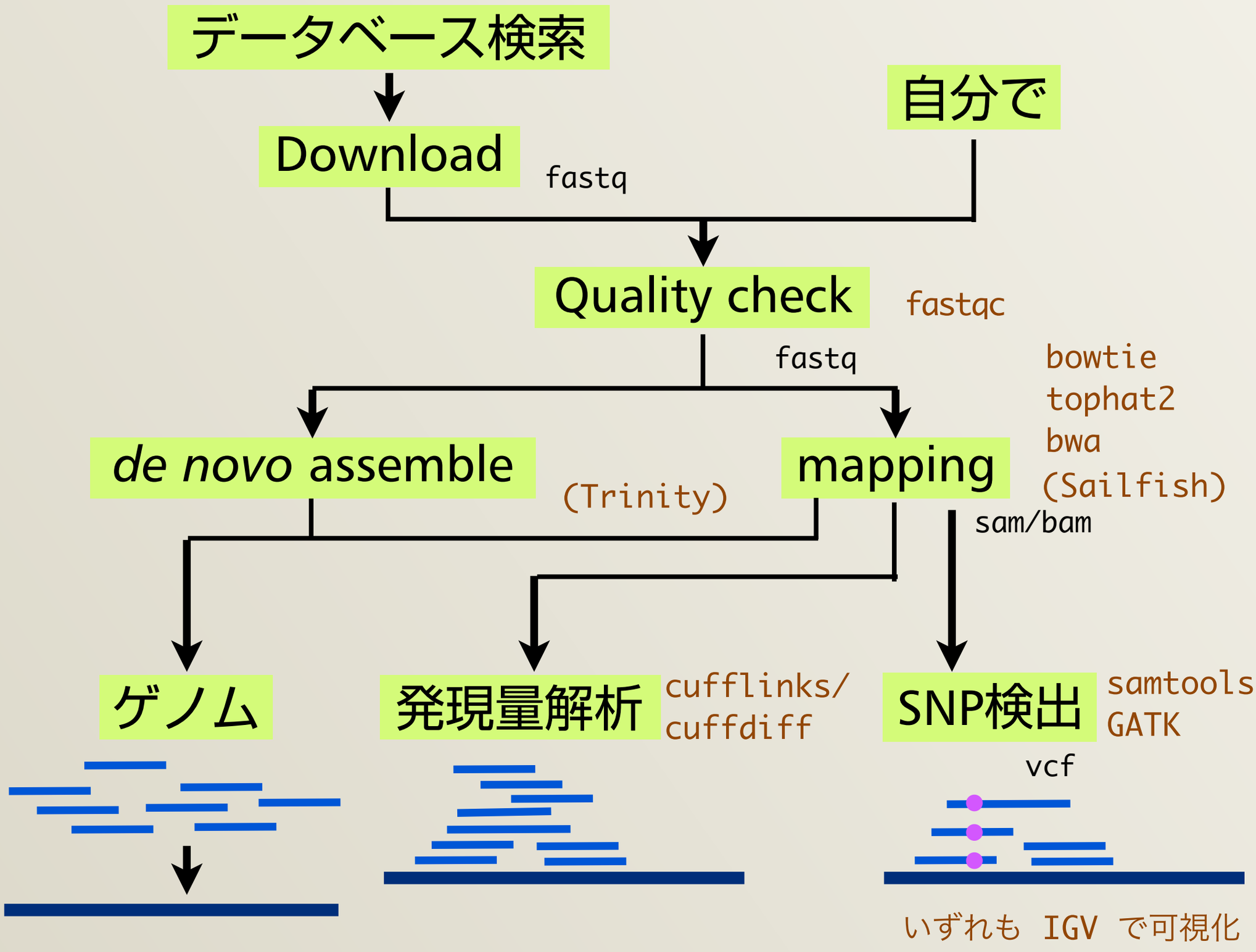
@藤田保健衛生大学

概略

NGSデータ解析の流れ



NGSデータ解析の流れ（詳細版）



参考リソース

参考図書・その1 ～ 実験もやる人向け

本 › 医学・薬学・看護学・歯科学 › 基礎医学

次世代シークエンス解析スタンダード～NGSのポテンシャルを活かしきる WET&DRY 単行本 – 2014/8/23

二階堂 愛 (編集)

★★★½☆ ▾ 3件のカスタマーレビュー

▸ その他 () の形式およびエディションを表示する

単行本
￥ 5,940

￥ 5,682 より 4 中古品の出品
￥ 5,940 より 1 新品

住所からお届け予定日を確認 既定の住所を使用 詳細

9/1 木曜日 にお届けするには、今から14 時間 57 分以内に「お急ぎ便」または「当日お急ぎ便」を選択して注文を確定してください（有料オプション。Amazonプライム会員は無料）

amazonstudent Amazon Student会員なら、この商品は+10%Amazonポイント還元(Amazonマーケットプレイスでのご注文は対象外)。無料体験でもれなくポイント1,000円分プレゼントキャンペーン実施中。

この画像を表示

実験デザイン・サンプルの用意から解析まで

参考図書・その2 ～ 解析を詳しく

次世代シークエンサーDRY解析教本 (細胞工学別冊) 単行本 –

2015/10/15

清水厚志 (監修), 坊農秀雅 (監修)

★★★★☆ 5件のカスタマーレビュー

その他（2）の形式およびエディションを表示する

Kindle版	単行本
￥ 5,400	￥ 5,832
今すぐお読みいただけます: 無料アプリ	￥ 4,013 より 11 中古品の出品 ￥ 5,832 より 1 新品

1/26 木曜日 にお届けするには、今から23 時間 8 分以内にお急ぎ便を選択して注文を確定してください（有料オプション。Amazonプライム会員は無料）

amazonstudent Amazon Student会員なら、この商品は+10%Amazonポイント還元(Amazonマーケットプレイスでのご注文は対象外)。

この画像を表示

NGSデータ解析を丁寧に解説。Kindle版あり

詳細な解析をひととおり知りたい

NGSハンズオン講習会

JST-NBDC＋東大アグリバイオ

ここのところ毎年やっています

統合TVで録画・公開済

https://biosciencedbc.jp/human/human-resources/workshop/h28-2

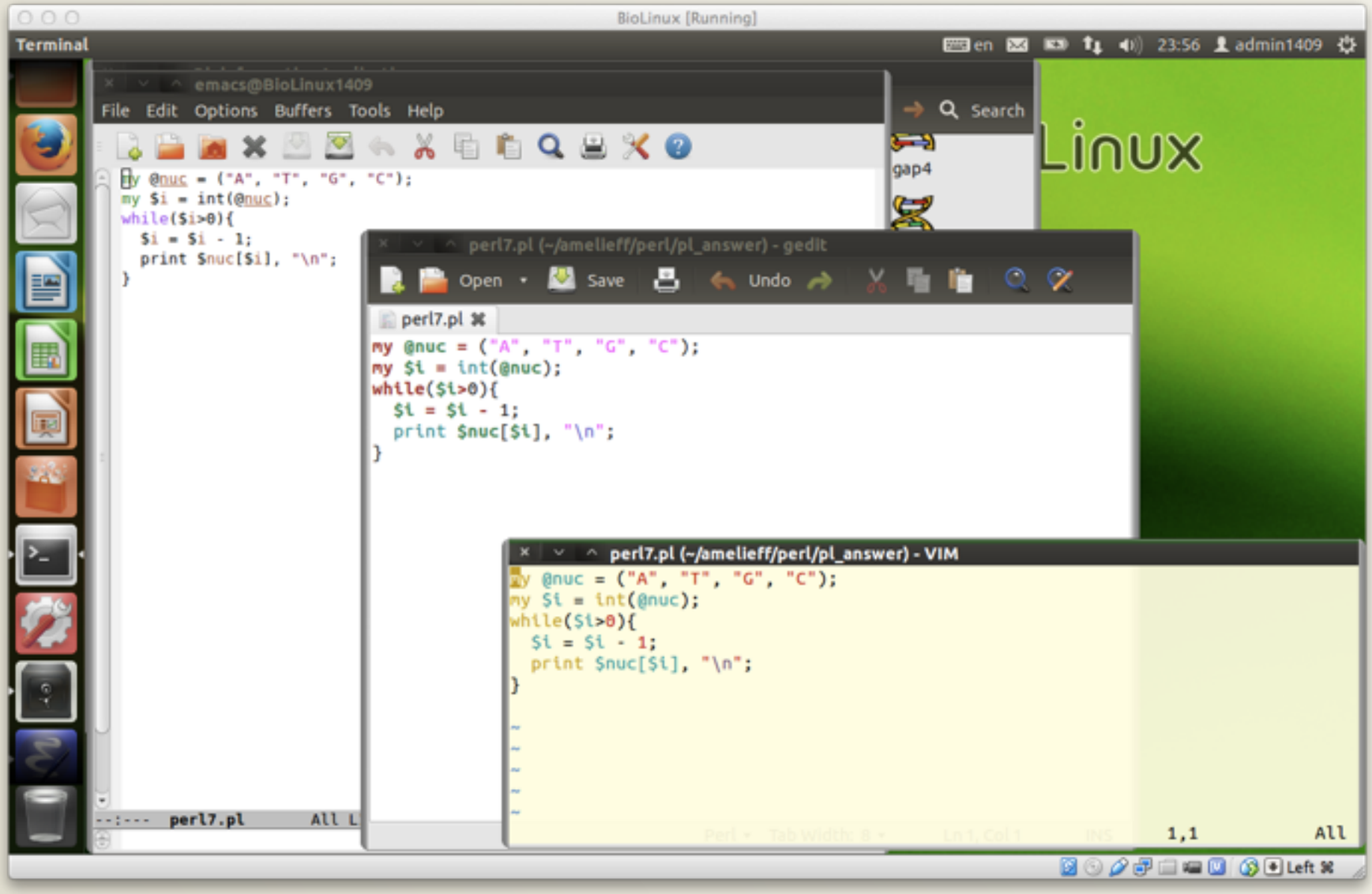
※「NGS 講習会」でググれ

解析について詳細な情報を探したい

門田さん（東大アグリバイオ）

http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html

解析環境・コマンドラインベース

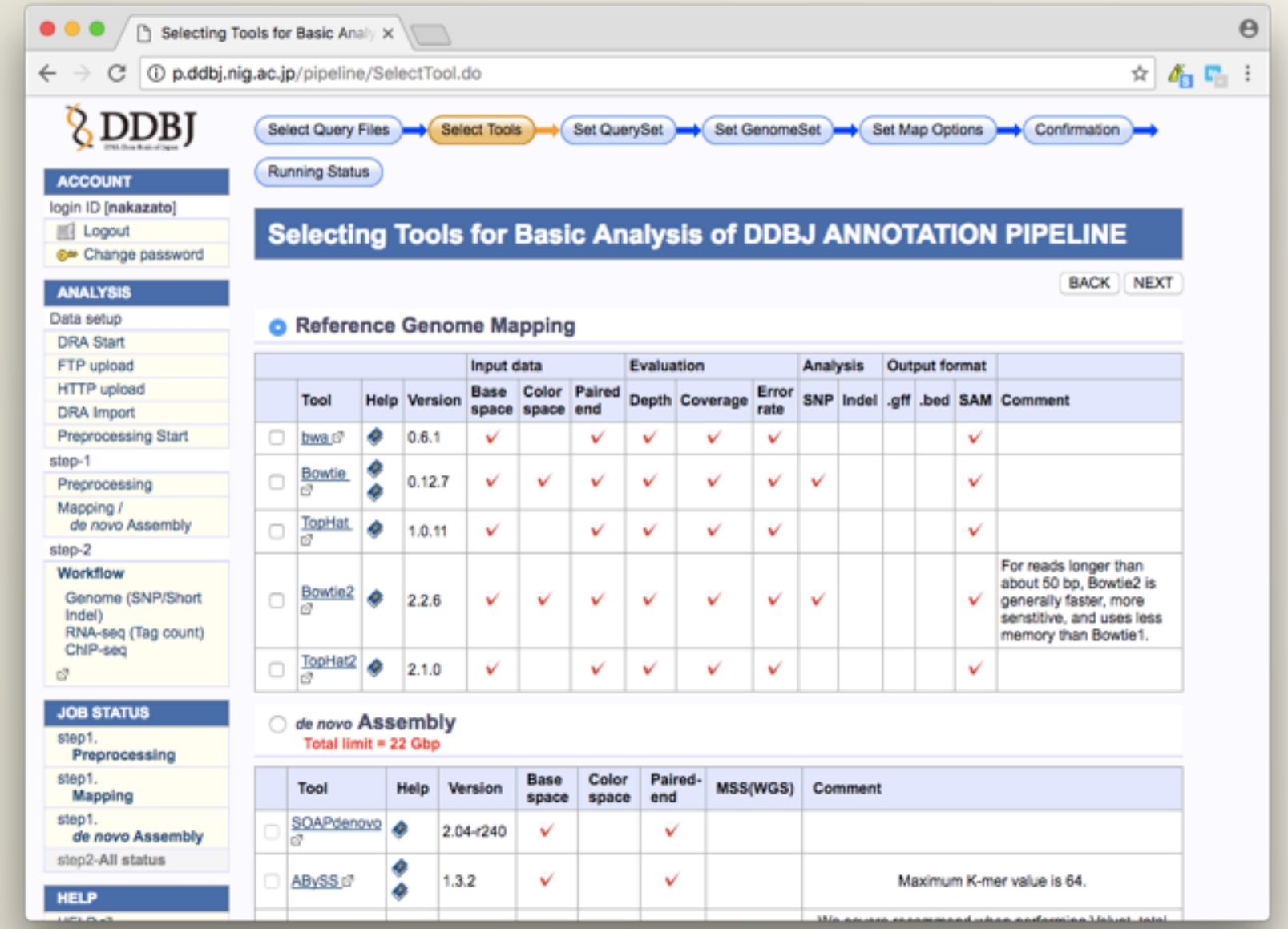


BioLinux（カスタマイズVer.）
NGSハンズオン講習会で使う解析環境

ツールをひととおりインストール済
VirtualBoxの上で仮想環境構築

http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html#bioinfo_ngs_sokushu_2016_20160719

解析環境・ウェブベース



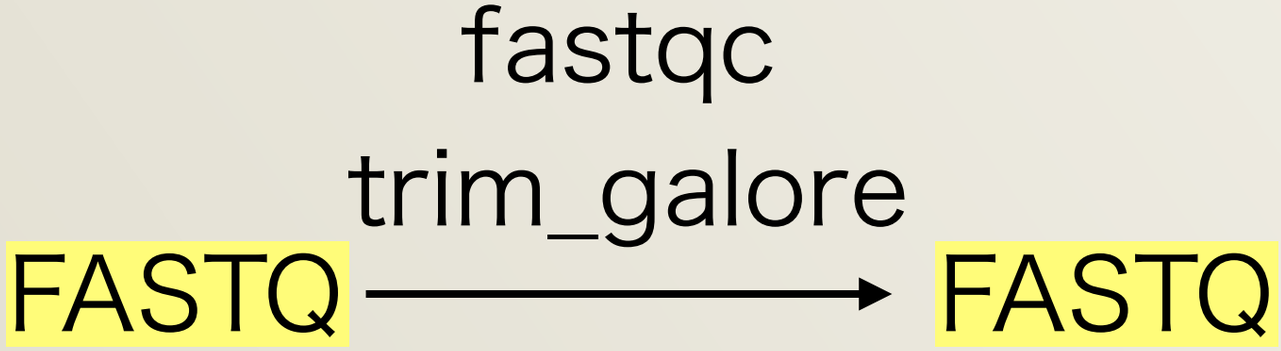
DDBJ Read Annotation Pipeline

http://p.ddbj.nig.ac.jp/

※ 要利用申請

クオリティチェック・トリミング

クオリティチェック・トリミングの流れ



FASTQフォーマット

```
@DRR001107.1 GEZQ5FO01EEA7F length=77
GCAACATTCAACACATATGTGTTGAATGTTGCACGACGGNGTG...
+DRR001107.1 GEZQ5FO01EEA7F length=77
C@BBBECCECDBBBAAAAA<441111<?@>?=?????44!000...
```

4行1組

×

数千万

数十億

1行目： @ + タイトル

2行目：塩基配列

3行目： + （+ タイトル）

4行目：シーケンスクオリティ

[参考] FASTAフォーマット

塩基配列を表現するフォーマット

```
>AB084425.1 eel SLC26A6
GACCCAAAACTGATAGGTGATGTTCACGTAGTGGC
CATCGCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTGACGTT
GGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTGAGTAAA …
```

1行目： ＞ ＋ タイトル

2行目以降：塩基配列

コマンド例

Quality Check

```
$ fastqc --nogroup -o DRR1234567.fastq
```

コマンド名　おまじない　対象ファイル名

trimming

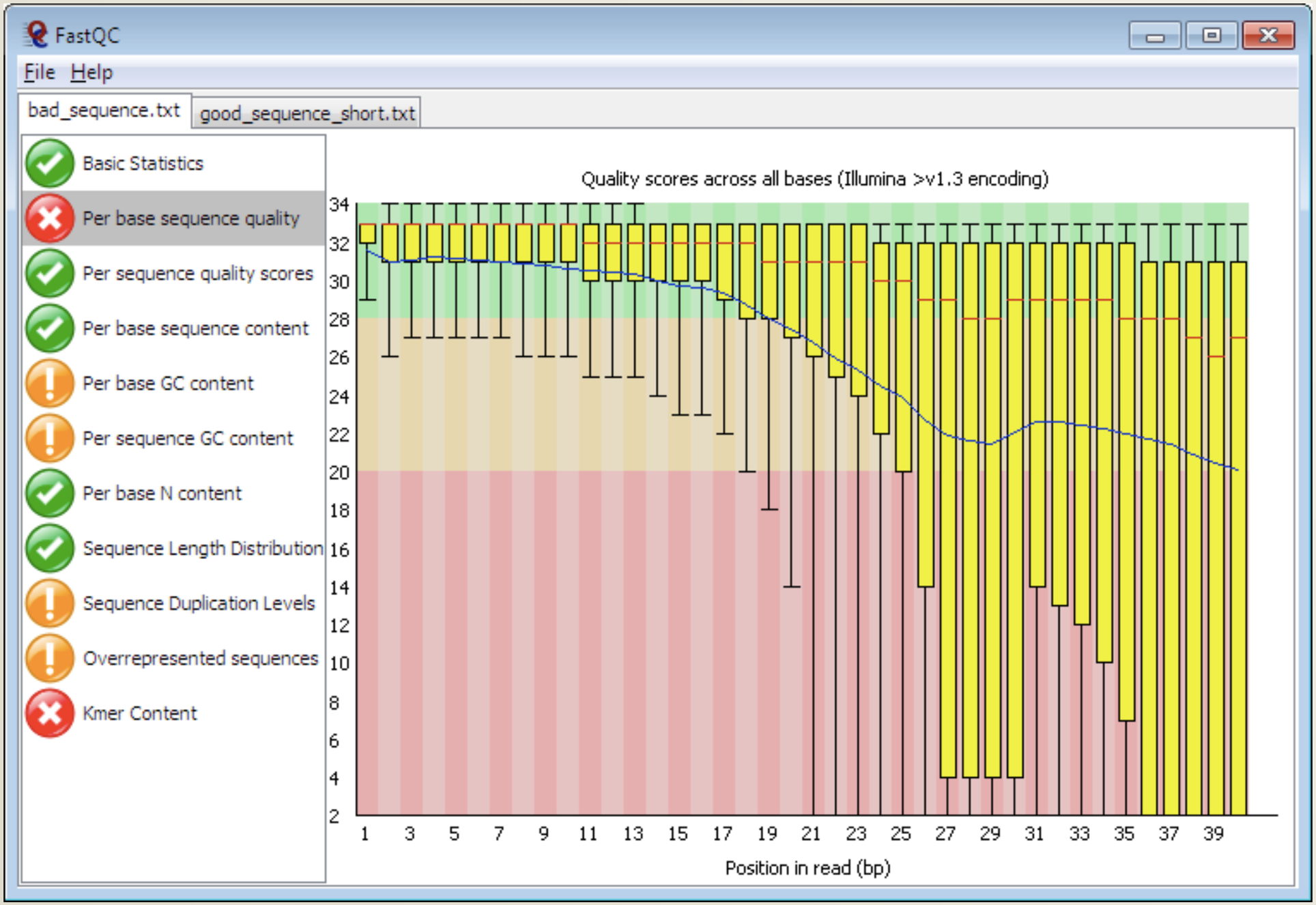
```
$ trim_galore --paired --illumina --fastqc -o trimmed/
```

コマンド名　pair–end　Illuminaデータ　fastqcもかける　出力先

```
DRR1234567.R1.fastq DRR1234567.R2.fastq
```

対象ファイル名・その1　対象ファイル名・その2

fastqc結果例


FastQC
File Help
bad_sequence.txt
good_sequence_short.txt
Basic Statistics
Per base sequence quality
Per sequence quality scores
Per base sequence content
Per base GC content
Per sequence GC content
Per base N content
Sequence Length Distribution
Sequence Duplication Levels
Overrepresented sequences
Kmer Content
Quality scores across all bases (Illumina >v1.3 encoding)
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39
Position in read (bp)

発現解析
(mapping)

マッピングの流れ

tophat2

FASTQ → bam

FASTA

コマンド例

tophat2

```
$ tophat -p 2 -G annotation.gtf -o results/
```

コマンド名　プロセス数　アノテーションファイル　　出力先

```
Hsapiens.genome.fasta DRR1234567.trimmed.fastq
```

マップ先（ゲノム等）　　マップするリードファイル

形式変換

```
$ samtools view -h DRR1234567.bam -o DRR1234567.sam
```

コマンド名　　変換前ファイル　　出力先ファイル

sam/bamフォーマット

(Sequence Alignment/Map Format)

```
SRR445820.39542705    0    chr17    1      0    4M1I31M    *    0    0    AAAGCTTCTCACCCTGTTCCTGCATAGATAATTGCA    ?5>7(+2;'1..'+<
SRR445820.29211975    16   chr17    88     42   36M        *    0    0    CCACGACCAACTCCCTGGGCCTGGCACCAGGGAGCT    ######BDB8DACCC
SRR445820.7156374     16   chr17    138    42   36M        *    0    0    CCAGCGAATACCTGCATCCCTAGAAGTGAAGCCACC    BBB=:;BBEABFBFB
SRR445820.22614977    0    chr17    156    30   36M        *    0    0    CCTAGAAGTGAAGCCACCGCCCAAAGACACGCCCAT    GGGD>DBB3D=??=<
SRR445820.19222309    0    chr17    185    42   36M        *    0    0    CGCCCATGTCCAGCTTAACCTGCATCCCTAGAAGTG    IIIIIIIIIIIIHH
SRR445820.32725447    16   chr17    213    31   36M        *    0    0    TAGAAGTGAAGGCACCGCCCAAAGACACGCCCATGT    CGCGGGGDGGGBGAA
SRR445820.43349427    0    chr17    221    31   36M        *    0    0    AAGGCACCGCCCAAAGACACGCCCATGTCCAGCTTA    IIIIIIIIIIIIII
```

各リードの名前

mapされた染色体/scaffold

mapされた場所（何塩基目）

各リードの配列

各リードのクオリティ

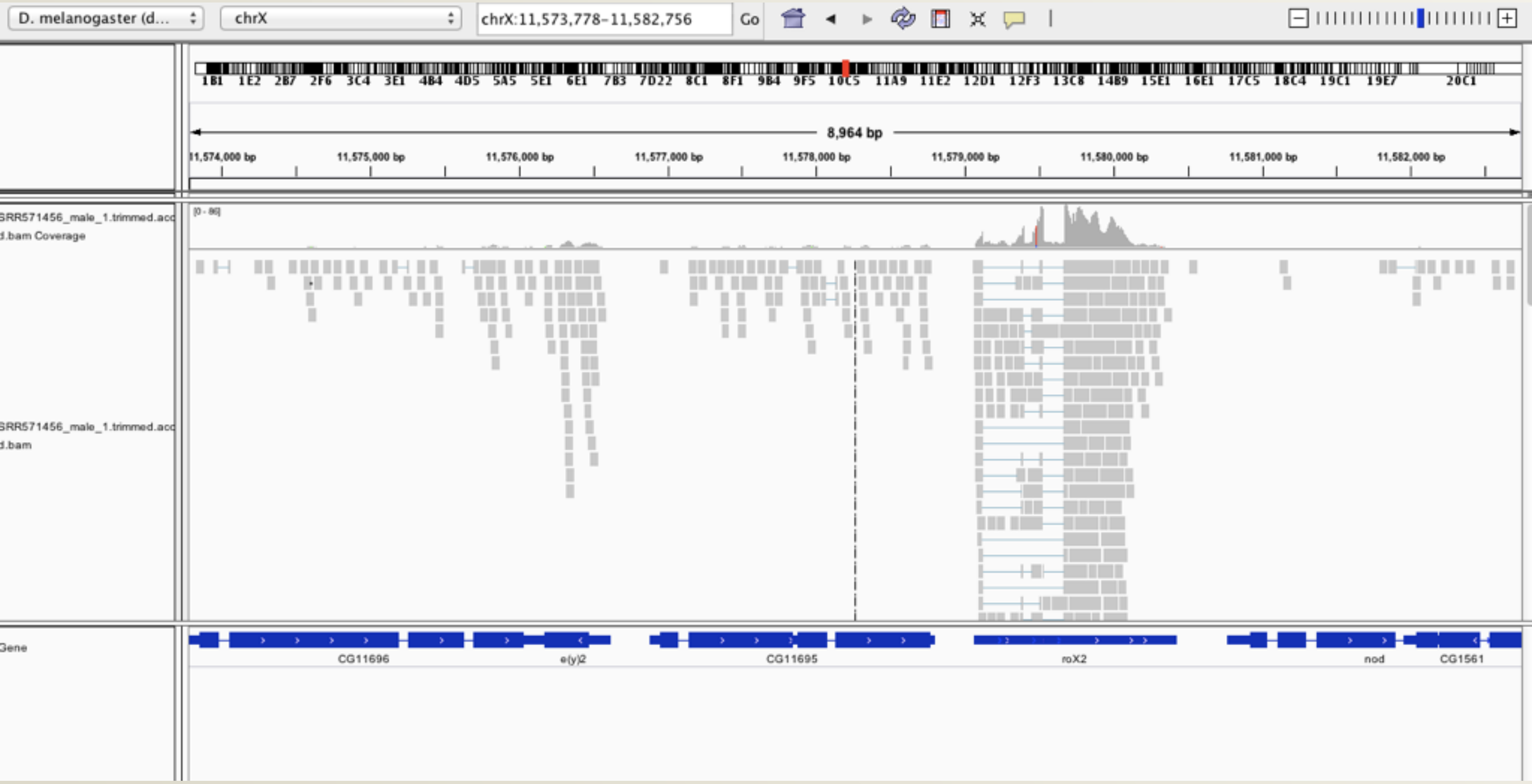
※ その他、マッピングの状況など

※ bam は sam をバイナリにしたもの

（人間が読めるデータからコンピューター用に変換）

（sam だとデータサイズが非常に大きくなるのでbamにして圧縮

IGVによる可視化


D. melanogaster (d...
chrX
chrX:11,573,778-11,582,756
Go
1B1 1E2 2B7 2F6 3C4 3E1 4B4 4D5 5A5 5E1 6E1 7B3 7D22 8C1 8F1 9B4 9F5 10C5 11A9 11E2 12D1 12F3 13C8 14B9 15E1 16E1 17C5 18C4 19C1 19E7 20C1
8,964 bp
11,574,000 bp
11,575,000 bp
11,576,000 bp
11,577,000 bp
11,578,000 bp
11,579,000 bp
11,580,000 bp
11,581,000 bp
11,582,000 bp
SRR571456_male_1.trimmed.acc
d.bam Coverage
[0 - 86]
SRR571456_male_1.trimmed.acc
d.bam
Gene
CG11696
e(y)2
CG11695
roX2
nod
CG1561

発現解析
(de novo)

de novo assemble（発現データ）の流れ

Trinity

FASTQ → FASTA

コマンド例

Trinity

```
$ Trinity --seqType fq
```
コマンド名　ファイル形式指定

```
 --left SRR1234567.R1.fastq --right SRR1234567.R2.fastq
```
対象ファイル・その1　対象ファイル・その2

```
--max_memory 24G --CPU 16
```
利用メモリ　プロセス数

その後の発現解析

発現量解析：マッピング後の場合

- FPKMの計算
  - Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments
  - mapされたうちのその遺伝子にはりついたフラグメント（リード）の量
  - 「何本」はりついたか数えるとはりつけた遺伝子の長さに依存するので長さで正規化していると思えばよい

```
$ cufflinks                    ← コマンド
      -p 8                     ← プロセス数（同時に計算する数）
      -g Homo_sapiens/.../genes.gtf      ← 遺伝子（exon）の情報
      tophat/.../ERR266335_P0.bam        ← 対応させるNGSデータ
      -o tophat/.../cufflinks_results    ← 出力先
```

```
1       Cufflinks       transcript      12190   13639   1000    +       .       gene_id “CUF...
1       Cufflinks       exon    12190   12227   1000    +       .       gene_id “CUFF...
1       Cufflinks       exon    12595   12721   1000    +       .       gene_id “CUFF...
```

発現量解析：de novoの場合

```
$ ./align_and_estimate_abundance.pl
    --thread_count 12
    --transcripts trinity_out_dir/Trinity.fasta --seqType fq
    --left DRR1234567.R1.fastq --right DRR123456.R2.fastq
    --est_method RSEM --aln_method bowtie2
    --trinity_mode --prep_reference --output_dir rsem_outdir
```

```
gene_id transcript_id(s)        length  effective_length        expected_count  TPM     FPKM
TRINITY_DN0_c0_g1       TRINITY_DN0_c0_g1_i1    390.00  158.40  3.00    4.04    5.75
TRINITY_DN10000_c0_g1   TRINITY_DN10000_c0_g1_i1      1199.29 961.07  101.00  22.42   31.88
TRINITY_DN10001_c0_g1   TRINITY_DN10001_c0_g1_i1        497.00  260.68  1.20    0.98    1.39
```

遺伝子機能アノテーション

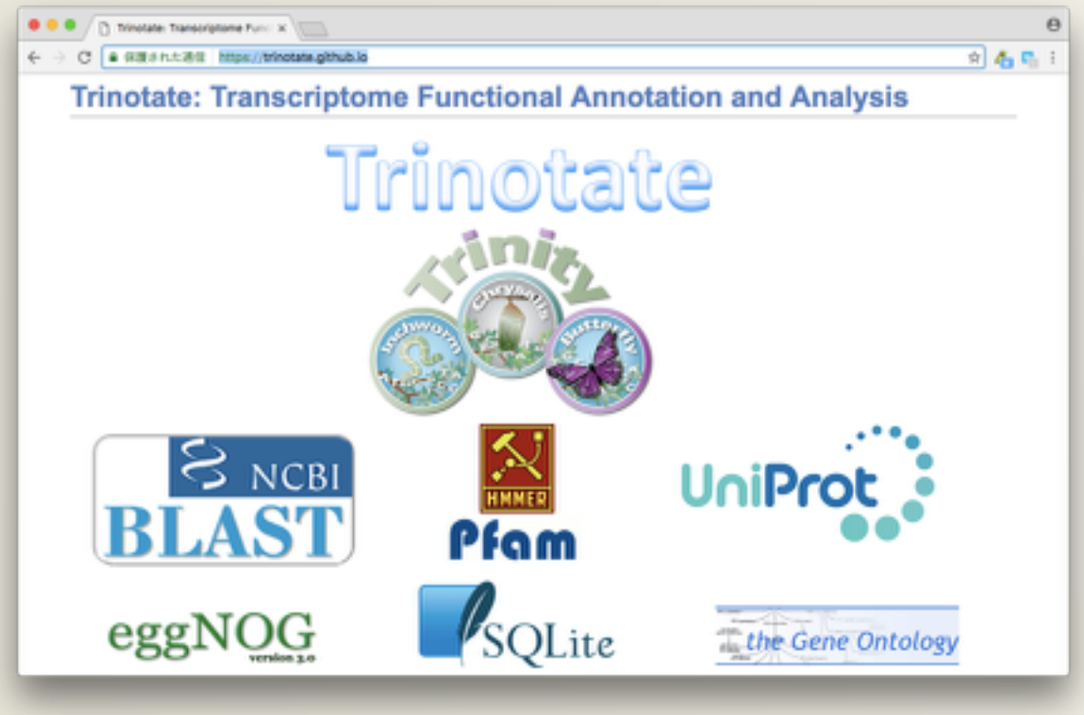
・BLASTで類似性のある遺伝子を検索

```
$ blastx -query Trinity.fasta -db uniprot_sprot.pep
  -num_threads 8 -max_target_seqs 1 -outfmt 6 > blastx.outfmt6
```

```
TRINITY_DN15083_c2_g1_i1   tr|O22669|O22669_PANGI  99.160  119     1       0       1       357     85      203     2.33e-79        242
TRINITY_DN15083_c2_g1_i2   tr|A0A089WZX0|A0A089WZX0_KALFE  92.884  267     19      0       74      874     1       267     2.20e-175
498
TRINITY_DN15083_c2_g1_i3   tr|Q1KLZ3|Q1KLZ3_9ROSI  86.364  66      9       0       95      292     1       66      6.90e-31        117
TRINITY_DN15083_c2_g1_i4   tr|I3SIW2|I3SIW2_LOTJA  97.458  118     3       0       1       354     84      201     8.34e-79        238
TRINITY_DN15083_c2_g1_i5   tr|Q1KLZ3|Q1KLZ3_9ROSI  95.270  148     7       0       3       446     26      173     2.31e-99        294
```

・hmmerでドメイン検索

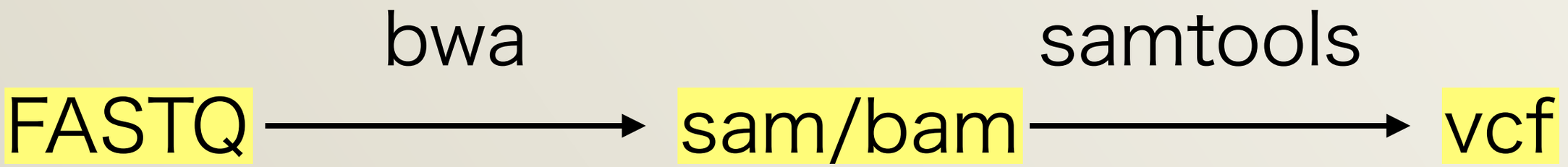
```
$ hmmscan --cpu 8 –domtblout
  TrinotatePFAM.out Pfam-A.hmm
  transdecoder.pep > pfam.log
```



https://trinotate.github.io/

SNV/Indel解析

SNV/Indel解析の流れ



コマンド例

bwa

細かくmapping

```
$ bwa aln -t 2 genome.fasta DRR1234567.fastq> DRR1234567.sai
$ bwa samse genome.fasta DRR1234567.sai DRR1234567.fastq > DRR1234567.sam
```

samtools

variant call

```
$ samtools mpileup -Bugf in_genome.fasta in_sorted.bam
  | ./bcftools view -bvcg -    ←結果をbcftoolsに渡す
  > out_raw.vcf                ← 結果をout_raw.vcfに出力
```

vcfデータ （variant call format）

```
3       178738432       rs6790867       T       C       1061.77 PASS    AC=2
3       178739594       rs1542  C       G       1466.77 PASS    AC=2;AF=1.00
3       178740415       rs146675821     G       GA      168.74  PASS    AC=2
3       178740422       rs7641761       T       A       316.77  PASS    AC=2
3       178740425       rs61798175      T       A       313.77  PASS    AC=2
```

染色体/scaffold

変異の場所
（何塩基目）

変異のID

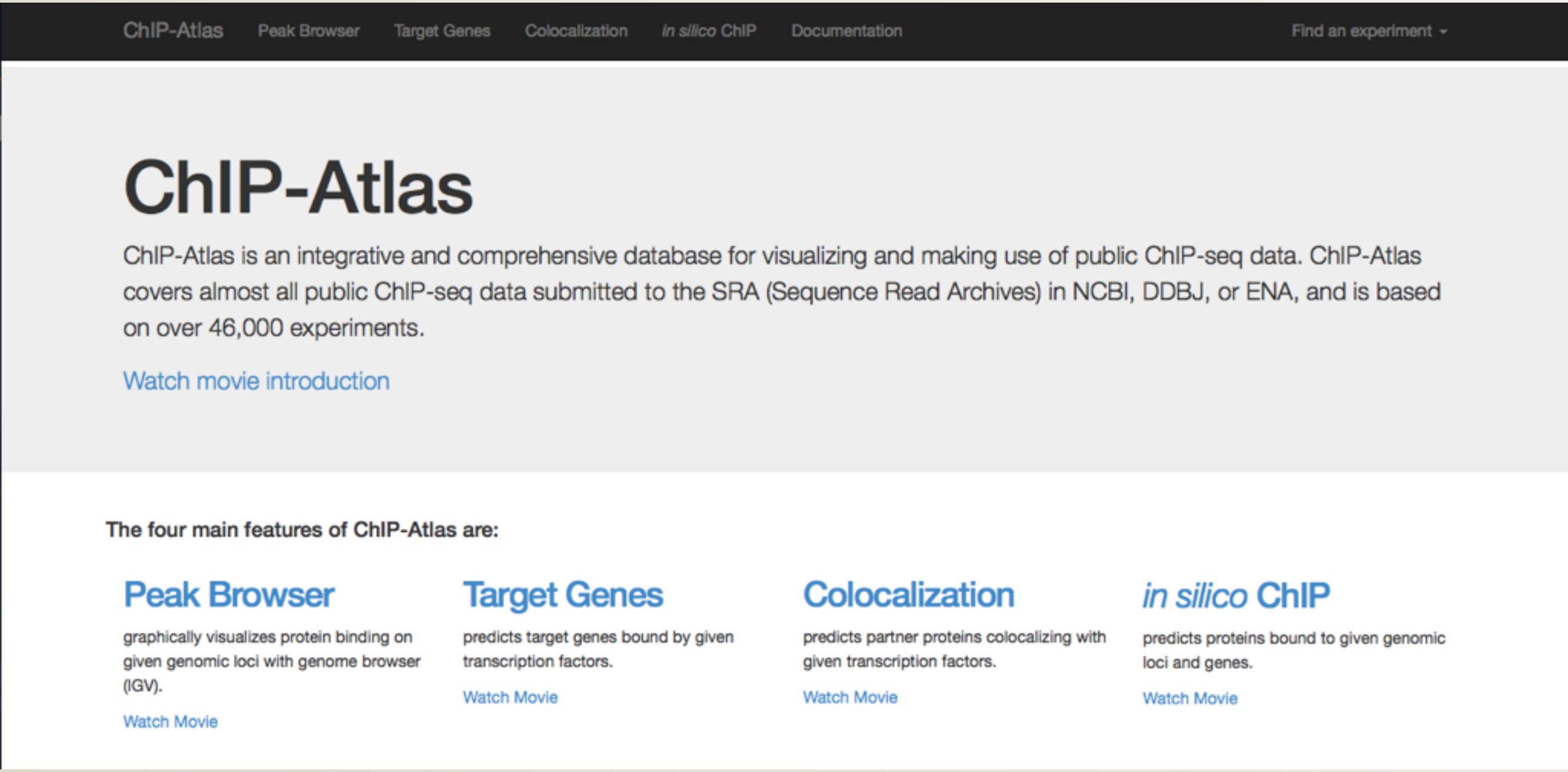
referenceの
塩基

リードの
塩基

※ この場合、変異のIDとはdbSNPのIDをさしています

ChIP–Seq

ChIP-Atlas



すでにゲノムにマップして可視化できるようにしたサイトが

http://chip-atlas.org/

メタゲノム

MicrobeDB.jp

http://microbedb.jp/