Track Hubを使ってオリジナルデータと公共データを比較 した図を作成する

UCSC Track Hubには、さまざまな公共データが登録されており、ゲノム情報を必要に合わせてカスタマイズすることができます。また、Custom trackでUCSC genome browser 上にファイルをアップロード、もしくはURLを指定することで、ゲノム地図上にオリジナルデータなどを載せ、目的とする遺伝子座などの地図を作成して論文のfigureなどを作成することができます。

UCSC GB上で可視化し、図を作成する際は、主にエピゲノムデータなどの **定性的な情報を表示してオーバーラップを確認できる図**を作成することが多いと思います。今回は先ほど紹介した**ATF3遺伝子**について、その上流シス領域に注目して、さらにATF3のChIP-seqデータを加えることで、ATF3が自身の転写制御(autoregulation)に関係している可能性を示唆するデータを作成してみたいと思います。

Track Hubからテストデータをつくる

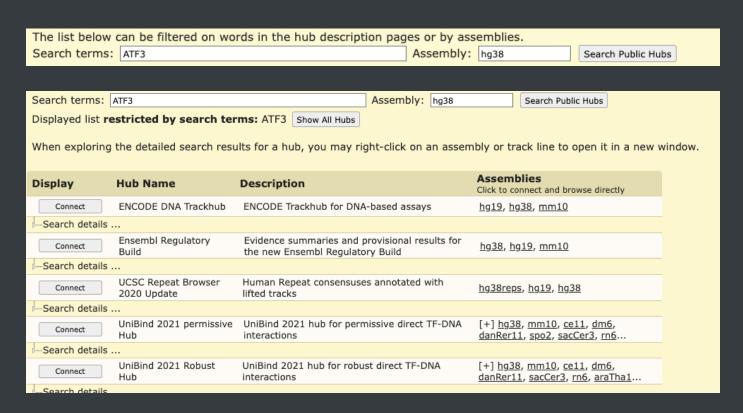
オリジナルデータの例として、すでにUCSC GBに存在するATF3 ChIP-seqデータのダウンロードを行いたいと思います。UCSC GBのTrack Hubには、おおよそbigWigファイルとよばれるバイナリーデータが読み込まれています。in-Houseでのデータは、ゲノムへマップ後のBAMファイルが多いと思いますが、UCSC GBに存在するUtility スクリプトで変換することでデータを読み込むことができます。今回はURLが公開できる公共サーバーにアップロードできる場合は、bigWigファイルを作成してアップロードできますが、UCSC GBにアップロードする場合はファイルサイズを小さくして、目的の箇所だけを可視化する必要があります。今回は実習を簡単にするために、BigWigファイルからbedGraph(テキストファイル)に変換し、そのファイルに設定を書き込み、UCSC GBにアップロードしたいと思います。

補足: オリジナルのBAMファイルからBigWigファイルを作成するには、<u>こちらのパイプラ</u> <u>イン</u>を利用すると可能です。**samtools, bedtools**そしてUtilityのスクリプトである bedGraphToBigWigをインストールすると利用することができます。

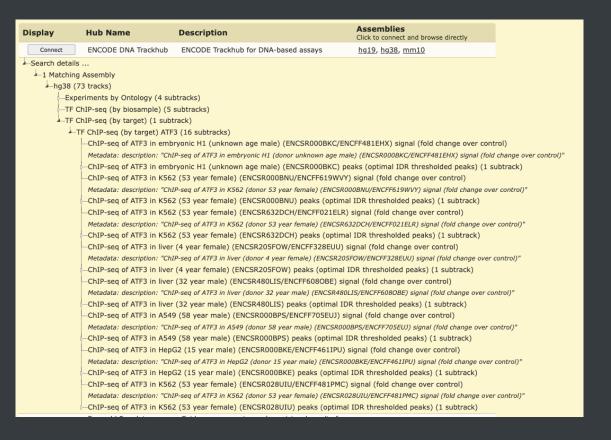
まず、Track Hubへ移動します。



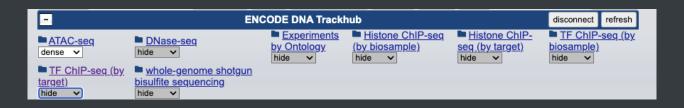
Track Hubでは、UCSC GBに登録されている接続可能なデータを**横断的に検索**することができます。**Search terms**に**ATF3**,assemblyに**hg38**を入力して**submit**してください。すこし時間がかかりますが結果が表示されます。



ATF3に関連するデータセットが接続されているHubとして、5つの候補が存在するようです。この中からChIP-seqのデータを得るためにENCODE DNA Track hubの**Search details**をクリックして階層を辿っていきます。



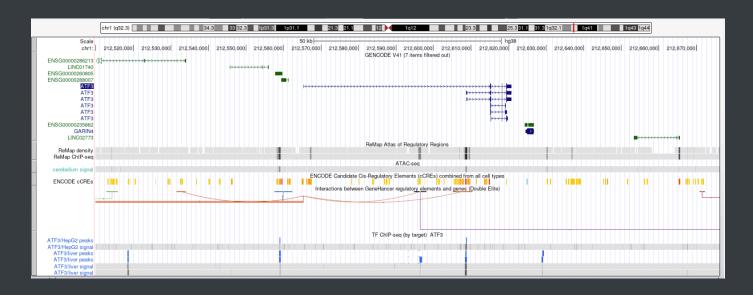
ATF3のChIP-seqの複数のデータに辿り着くことができました。このHubに接続したいと思いますのでConnectボタンを押します。成功すれば ~ **Successful** という表示が一瞬だけ現れてgatewayに飛びます。gatewayから、**genomes -> hg38**をクリックしてください。



ゲノムブラウザは、 ATF3遺伝子座が表示された以前の状態のままですが、その下段 にENCODE DNA Trackhubが上段にきて接続されている様子がわかります(実は元からあるのですが練習のため)。この中から、TF ChIP-seq by targetの文字をクリックしてください。

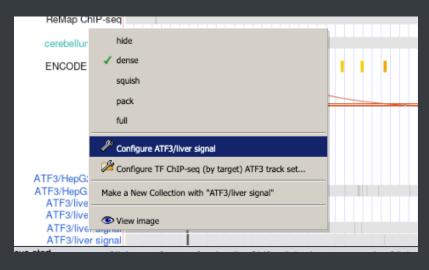


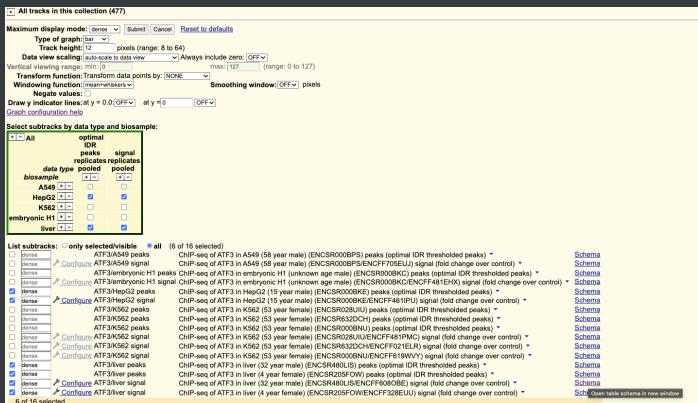
ChIP-seqのデータ一覧が表示されます。ATF3を上記のように**dense**モードでsubmitして表示させましょう。



最下段にATF3のChIP-seqのpeak summitが現れました。この遺伝子座の面白いのは、ATF3のプロモーターなどのシス領域にATF3自身が結合してそうなところです。さらに、最長ATF3の上流にあるENCODEでは遺伝子アノテーションとして登録されている exon1つの領域がReMap, ATF3の結合サイト、GenHancerと密にオーバーラップしています(みなさんのブラウザでは、これらのトラックをONにしていないので、わからないかもしれません、実習のために先に表示してATF3が自己応答することをcheckしていました。ONの方法は後ほど)。

さあ、ATF3の自己応答の目処がつきました。トラックにすでにシス情報を載せて確認している時点でチートで恐縮ですが、このChIP-seqデータをオリジナルデータだと思っていただいて、このATF3遺伝子領域への結合性を図示するために、擬似オリジナルデータを用意するためにこのデータをダウンロードします。ATF3/liver signalのtrackの上で右クリックして、Configure ATF3/liver signal (by target) ATF3 track set...を選択してください。





するとtrackの設定をいろいろ変更するページが出てきます。ATF3/liver peaksの右側にある Schemaをクリックしてください。

Schema for TF ChIP-seq (by target) ATF3 - TF ChIP-seq (by target) ATF3

 $Binary\ file\ of\ type\ bigWig\ stored\ at\ https://www.encodeproject.org/files/ENCFF608OBE/@@download/ENCFF608OBE.bigWig?proxy=true$

ATF3/liver signal (hub_98678_666de091988f270877834856fb7e2835) Track Description

Transcription factor ChIP-seq supertrack

This supertrack contains all available ENCODE data produced by transcription factor ChIP-seq, which profiles the binding sites of transcription factor proteins. All experiments at the ENCODE Portal which have data processed through the ChIP-seq uniform processing pipeline have data available in this supertrack. Available data types for ChIP-seq include unreplicated fold change signal, unreplicated peaks, and IDR-thresholded peaks.

This supertrack is a component of the ENCODE DNA mega-trackhub, which also includes data from experiments produced using ATAC-seq, histone ChIP-seq, DNase-seq, RRBS, WGBS, and repli-seq. You can visualize the results from those assays using their corresponding supertracks, or, if you are interested in viewing data from a particular tissue or biosample across multiple assays, you can use the Experiments by Tissue supertrack.

Acknowledgments

Thanks to the ENCODE Consortium, the ENCODE production laboratories, and the ENCODE Data Coordination Center for generating and processing the datasets used here. The ENCODE accession numbers of the constituent datasets are available from the peak details page. Henry Pratt, Jill Moore, Michael Purcaro, and Zhiping Weng, PI, at the ENCODE Data Analysis Center (ZLab at UMass Medical Center) developed this trackhub. Special thanks to Kate Rosenbloom and Jim Kent at UCSC for guidance developing this trackhub.

References

ENCODE Project Consortium, Jill E. Moore, Michael J. Purcaro, Henry E. Pratt, Charles B. Epstein, Noam Shoresh, Jessika Adrian, et al. 2020. "Expanded Encyclopaedias of DNA Elements in the Human and Mouse Genomes." Nature 583 (7818): 699¢€Ā*710

Contact

Please contact henry.pratt@umassmed.edu with any questions or comments about this trackhub.

すると、そのデータの詳細な情報(実験の情報、論文の情報など)を閲覧することができます。ここで実はこのデータが一体どこにあるかが記載されています。上段のURLに実はデータが存在していて、track hubはweb上にあるそのデータを読み込んでブラウザに表示していることがわかります。今回このデータをダウンロードしてまるで自分のデータであるようにテストデータとして利用します。データはご覧の通りbigWigファイルですね。ダウンロードには20分ほどかかりますし、その後のファイル整形はあくまで例として記載します。レクチャー内では行わないでください。?proxy=trueを除いてwgetでダウンロードします。

wget

https://www.encodeproject.org/files/ENCFF6080BE/@@download/ENCFF6080BE.bigWig

ダウンロードしたbigWigファイルを編集し、UCSC GBで読み込みやすいように**染色体1番だけのbedGraphファイル**を作成します。そのために**bedGraphにファイル変換操作**を行います。

必要なツールとファイルをダウンロード

wget

http://hgdownload.soe.ucsc.edu/admin/exe/macOSX.x86_64/bigWigToBedGraph wget https://genome.ucsc.edu/goldenPath/help/hg38.chrom.sizes

chmod 755 bigWigToBedGraph
chmod 755 bedGraphToBigWig

変換を実行

./bigWigToBedGraph -chrom=chr1 ENCFF6080BE.bigWig
ENCFF6080BE.chr1.bedGraph

./bigWigToBedGraph -chrom=chr1 -start=212509895 -end=212676211 ENCFF6080BE.bigWig ENCFF6080BE.chr.1212509895.212505D9895.bedGraph

これで**テスト用のbedGraphファイル**が完成しました。さてこのデータにグラフの設定用の headerを追加します。**テキストエディタ** で

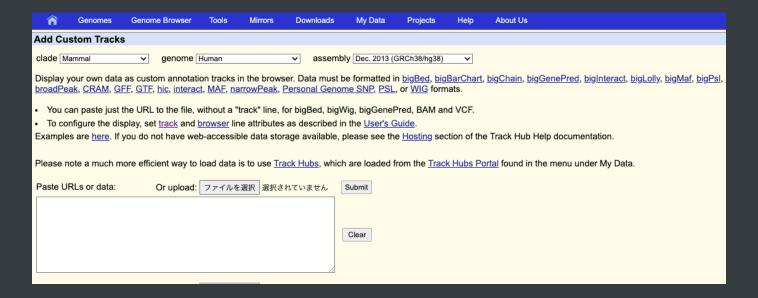
ENCFF608OBE.chr.1212509895.212505D9895.bedGraphファイルを開き、先頭に以下の文字を入力し、保存します。

browser position chr1:212509895-212676211
browser hide all
track type=bedGraph name=ATF3_ChIP description="ATF3 ChIP-seq"
visibility=full color=200,128,0 altcolor=0,100,200
#chrom chromStart chromEnd score

この設定の詳細は、<u>こちらに</u>記載されています。編集したbedGraphを**Custom Tracks**から 読み込みます。



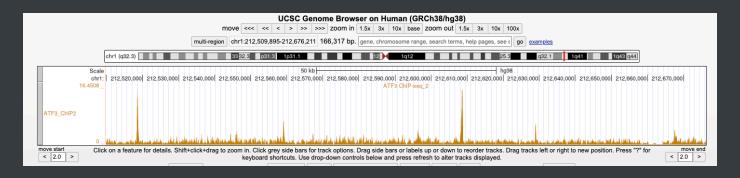
Custom tracks are a wonderful tool for research scientists using the Genome Browser. Because space is limited in the Genome Browser track window, many excellent with the browser. Other tracks of interest may be excluded from distribution because the annotation track data is too specific to be of general interest or can't be share custom tracks to the Genome Browser website for use by others. To view a list of these custom annotation tracks, click here.



ファイルを選択し、submitしてください。



無事読み込まれたら、Manage Custom Tracksにデータが表示されているはずです。return to current positionを押して、genome browserに移動します。

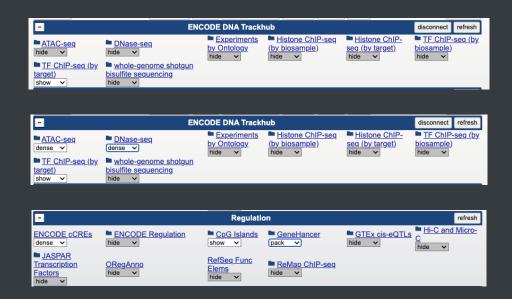


ATF3のChIP-seqデータが表示されました。このように、custom trackでデータをロードすると他のtrackの情報は失われてしまうので、ここから必要な情報を足していきます。

公共データベースの情報をゲノム地図に追加する

地図の下にあるデータのコレクションからGENCODE V41,、**DNase-seq、CpGの情報**、そしてエンハンサー候補を眺めるために**ReMap, GeneHancer**をONにしていきます。初めは画面を見やすくするようにdenseやpackモードで表示するといいかもしれません。

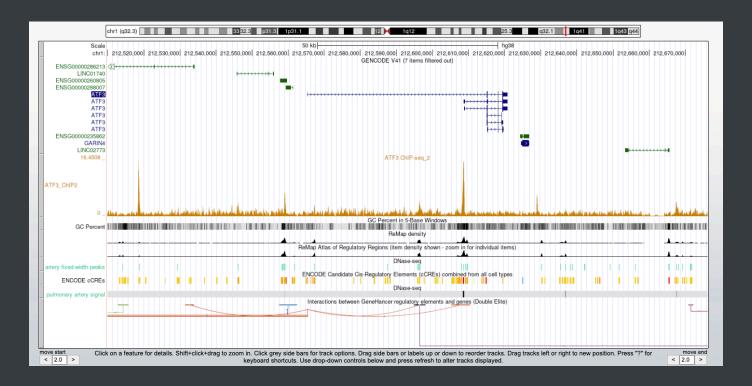
GeneHancerは相互作用の推定が見えるようにfullで設定します。



最後に一番底にあるrefreshボタンを押すと選んだデータが表示されます。

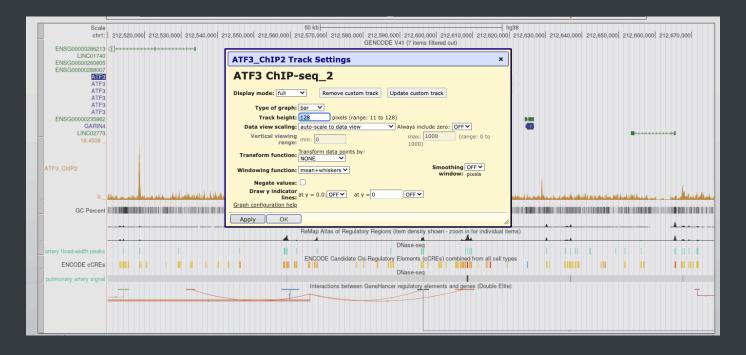


次に、表示したデータの順番を変更します。**トラックの左端をドラックアンドドロップ**すると上下を入れ替えることができます。入れ替えた後は次のような図です。どう見せるかは好みなので、見えやすい順序を模索してください。

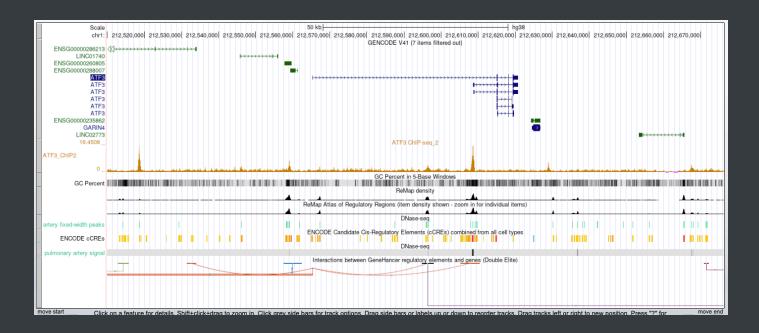


一番上の段にGENCODEアノテーションにしました。ATF3の結合がプロモーター付近や、gene body最長のATF3より**上流の位置**にシグナルがみられます。そして、**GeneHancer**によって推定されたエンハンサー領域の相互作用として、この2つが繋がっていますね。もしかすると上流シスはindirectなATF3結合をChIP-seqでみているのではないかと想像させる一枚です。

さて、このfigure、ChIP-seqのデータが少し背が高い気がするので調節します(これでいいかもしれませんが、練習のため)。ATF3-ChIPのトラック上で右クリックをしてください。



ここでさまざまな設定ができますが、ひとまず**Track heightを60**、**smoothing windowを5** ぐらいにセットします。

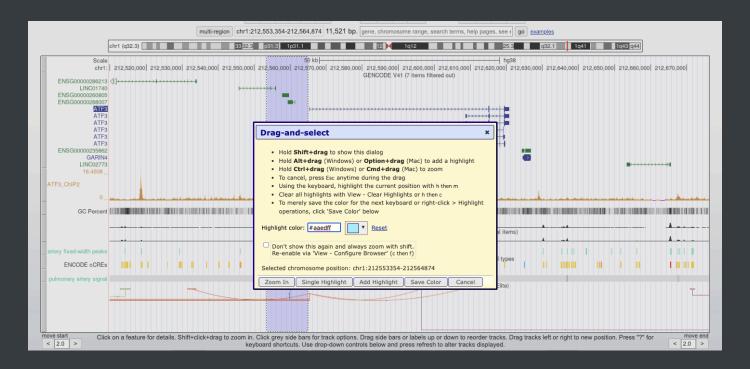


このように、trackの高さも好みに合わせて調整が可能です。

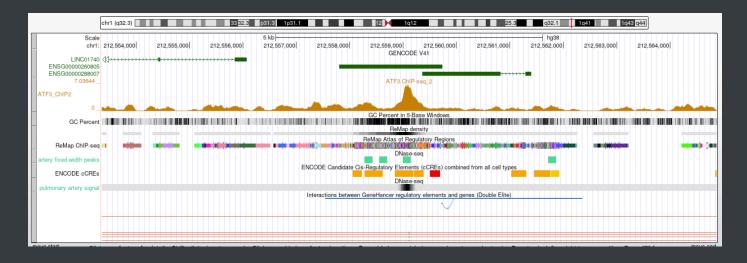
論文用の図のために、魅せたいところをハイライトする

最後に、この図を完成させるために、**ATF3プロモータとエンハンサー相互作用の場所をハイライト**して見たいと思います。GeneHancerによる推定が相互作用を想わせるよいfigure と思いますが、さらに見た目にこだわるには、重要な箇所をハイライトすると良いと思い ます。

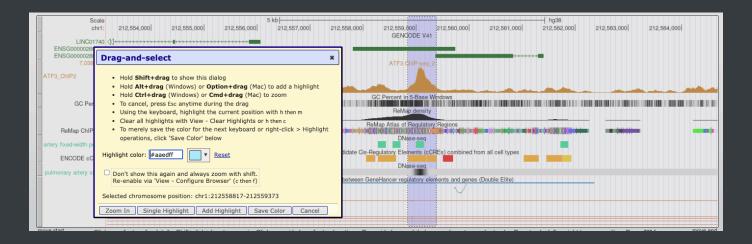
まず、Shift keyを押しながら上流シスを左クリックで囲います。



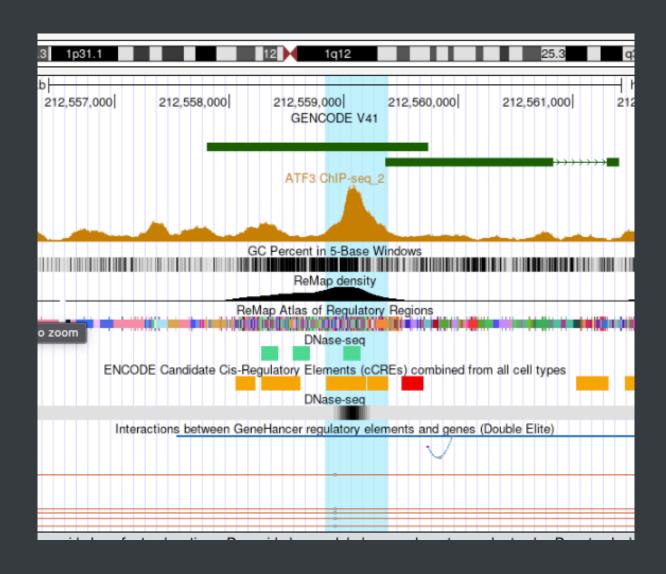
すると薄青い枠でかこまれた後、オプションのwindowがあらわれますので、zoom inしてください。

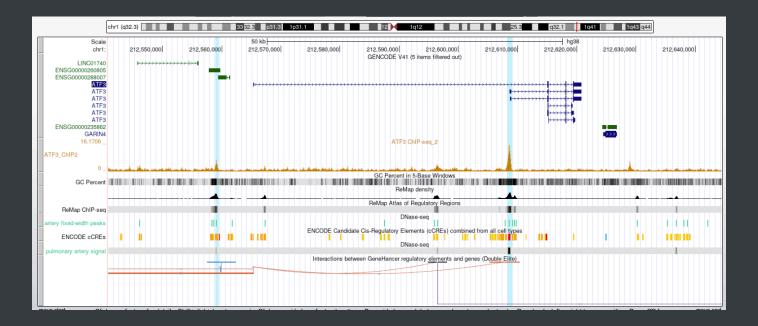


ChIP-seqのpeakを拡大することができました。この領域を綺麗に囲ってハイライト(もしくはGenHancerのエリアを囲ってもいいかもしれません)したいので拡大しました。先ほどと同様にShiftを押しながら左クリックで囲ってください。



この領域にハイライトを加えます。色はデフォルトの水色にして、Add Highlightしてください(Single Highlightを選択した場合、1つのエリアをハイライトしたら他のハイライトしていたエリアが消えてしまいます)。同様の操作を下流のプロモータ領域でも行いましょう。

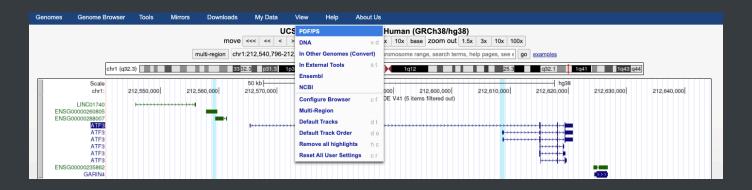




これで図の完成です。

完成した図はPDF or EPSで保管

作成した図をillustratorなどで編集可能な**PDF, EPS**で保管する方法になります。Viewから PDF/PSを選択してください。



PDF Output

PDF images can be printed with Acrobat Reader and edited by many drawing programs such as Adobe Illustrator or Inkscape.

- Download the current browser graphic in PDF
- · Download the current chromosome ideogram in PDF

EPS (Postscript) images are a variant of PDF and easier to import into some drawing programs.

- Download the current browser graphic in EPS
- · Download the current chromosome ideogram in EPS

Tips for producing quality images for publication:

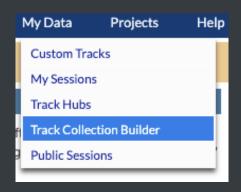
- · Add assembly name and chromosome range to the image on the configuration page of the base position track.
- · If using the UCSC Genes track, consider showing only one transcript per gene by turning off splice variants on the track configuration page.
- Increase the font size and remove the light blue vertical guidelines in the image configuration menu.
- In the image configuration menu, change the size of the image, to make it look more square.

Return to Browser

PDFやEPSとしてダウンロードすることができます。フォントや線の太さ、いらない空白などの削除など細かい設定は描画ソフトで調整する方がよいでしょう。また、保存したファイルはトラックが縦に長くてもしっかり保存されますので、必要な情報を全て載せておいて保存することもできます。

おまけ: Track Collection Builderはトラックを統合する

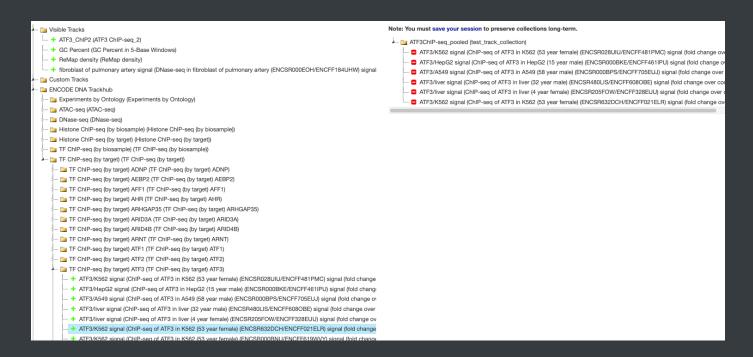
UCSC genome browserで**複数のオリジナルファイルを一つのトラックで表示** したり、**ファイルを結合**したい場合に**Track Collection Builder**を利用します。MyDataからTrack Collection Builderを選択してください。



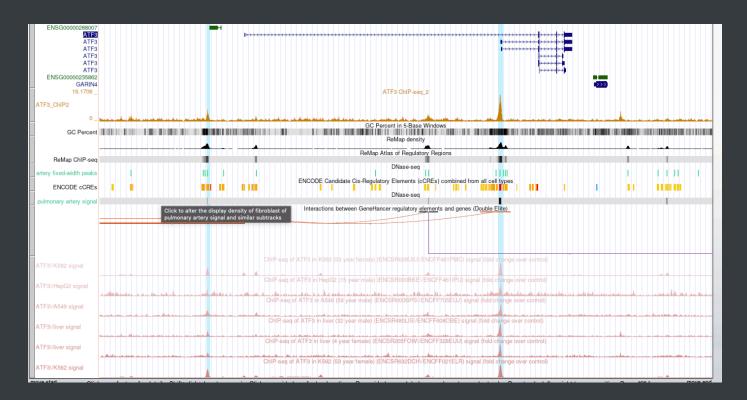
まず、利用するデータをコレクションするフォルダ(兼トラック)を右のAdd Collectionから作成します。この時の名前がトラックに表示されるので、中に入れるファイルや、そのファイルから作成するファイルを意識した名前にしたほうがいいです。

| Create New Collection | × | | | | | | | | |
|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Enter the name and description of the collection. | | | | | | | | | |
| Name: ATF3ChIP-seq_pooled | | | | | | | | | |
| Description: test_track_collection | | | | | | | | | |
| Color: #d27f7f | | | | | | | | | |
| Save | | | | | | | | | |
| y target) ARHGAP35) | | | | | | | | | |

saveを押した後、そのフォルダにファイルを加えていきます。



右のファイルリストから加えたいファイルの plusボタンを押すと、右に追加されていきます。その後、右上にあるGO!ボタンを押しましょう。



先ほどの図に6つのATF3 ChIP-seqのトラックが追加されました。このようにグループにまとめて1つのトラックにしていると編集にも便利だと思います。色が薄いですが、これは私の色の選択ミスです(後で修正しています)。つぎにこれはあまり需要があるかわかりませんが、この6つのファイルのシグナルを一つのファイルに統合してみたいと思います。トラック上で右クリックを押して、configureを選択します。

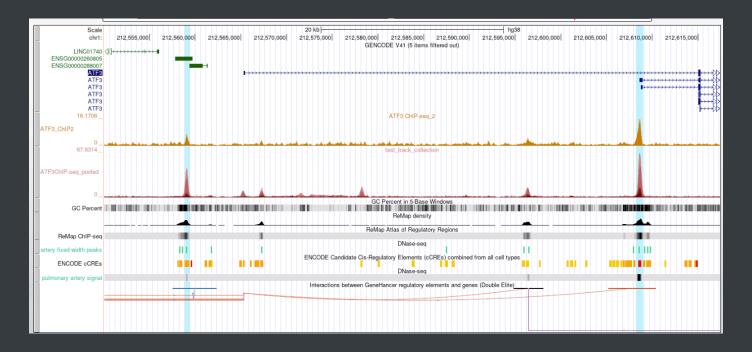
| ô | Genomes | Genome Browser | Tools | Mirrors | Downloads | My Data | Projects | Help | About Us | | | |
|---|--------------|---------------------|-----------|--------------|-----------|---------|-------------|----------|---------------|--|--|--|
| ATF3ChIP-seq_pooled Track Settings | | | | | | | | | | | | |
| test_track_collection | | | | | | | | | | | | |
| Display mode: full Submit Cancel Reset to defaults Go to Track Collection Builder | | | | | | | | | | | | |
| Merge method: add ここがいままでのセッティング画面と違う Missing data treatment: ® missing is zero Omath with missing values is missing | | | | | | | | | | | | |
| | Type of grap | | s (range: | 11 to 19000) | | | | | てオートスケールで値が表示 | | | |
| Track height: 30 pixels (range: 11 to 1000) されるので、用途に合わせて変更してください Data view scaling: auto-scale to data view | | | | | | | | | | | | |
| Wind | - | on: mean+whiskers v |] | | | Smootl | ning window | r: OFF ✓ | pixels | | | |
| Negate values: □ Draw v indicator lines; at y = 0.0: OFF ✓ at y = 0 OFF ✓ | | | | | | | | | | | | |
| Graph configuration help | | | | | | | | | | | | |
| List subtracks: Only selected/visible all (6 of 6 selected) full | | | | | | | | | | | | |

このsetting画面では今までとは異なり、Merge methodが加わっています。addを選択することで6つのシグナルをマージしたデータをブラウザ上で表示してくれます。他には、transpalent, solid, stacked, subtractがあります。一番需要がありそうなのは、たとえばtranspalentで正規化後のシグナルを比較表示するのは使えるのではないか?と思います。

まず試しにaddを行い、somoothing windowを5で可視化してみたものを表示します。



auto scaleのため、あんまり変わらなくみえるかもしれませんが、データが足されたものが 表示されています。次にtranspalentを試してみましょう。



Peakの変化が見えてなかなかエレガントな図が作れそうですね。 **時系列データ**などでこの 描画を行うと美しい変化を描画できるかもしれません。

このコレクションの情報はMySessionで保存しなければ残りませんので、必要な場合はかならず保存するようにしてください。また、コレクションの名前や色はTrack Collection Builderの画面に戻って、ダブルクリックすれば後からでも変更することができます。