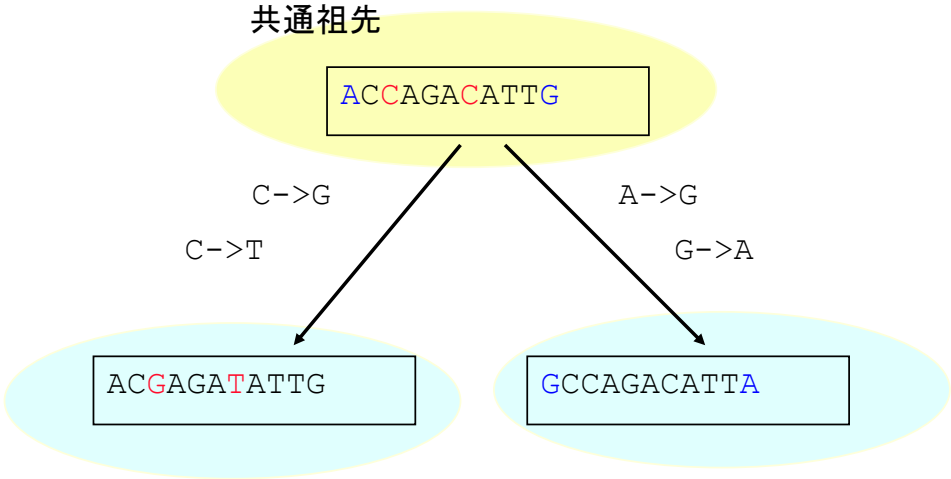
BLAST Inside
配列検索の理論的背景

内山郁夫(NIBB)

ホモロジー（相同性）

共通祖先の同一の構造から派生した構造であること



相同性(homology)は類似性(similarity)に基づいて推定する

十分高い類似性がある → 相同性がある

```
ACGAGATATTG
|  |||  |||
GCCAGACATTA
```

アライメントによる配列比較

2本の配列を、類似性スコアが最大になるように、
ギャップを適当に挿入して並べる

GCATGAGGA
GTATGGATAAGA

↓

スコアの定義　：　一致＋２、不一致－１、
ギャップ－２

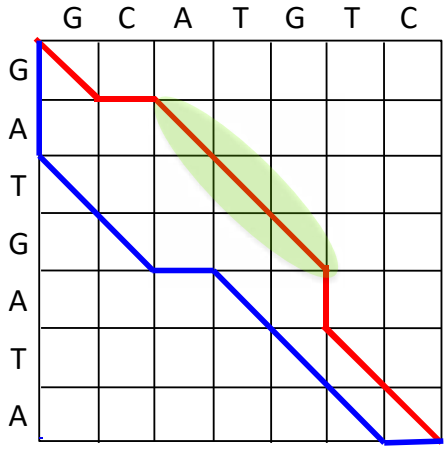
GCATG---AGGA

GTATGGATAAGA

+2-1+2+2+2-2-2-2+2-1+2+2 = +6

配列アライメントとマトリクス

あらゆるアライメントは、2つの配列を縦横に配置したマトリクス上のパスとして表される



アライメント1

GCATG-TC
G-ATGATA

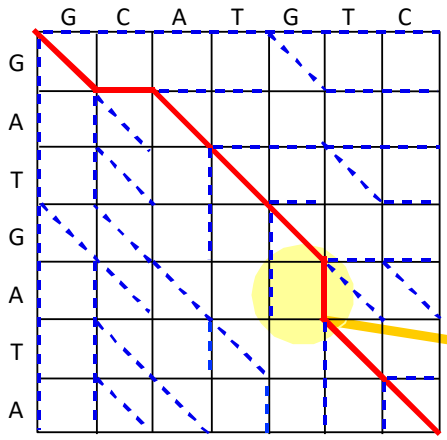
アライメント2

--GCATGTC
GATG-ATA-

斜め（対角線）方向　→　2つの配列をギャップを入れずに並べる
縦・横方向　→　一方の配列にギャップを挿入する

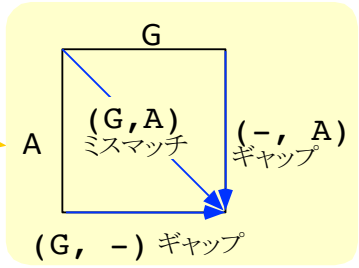
動的計画法による最適配列アライメント

Needleman-Wunsch 法



最適アライメント

GCATG-TC
G-ATGATA



$$S(i,\ j) = \max \begin{cases} S(i-1,\ j-1) + s(i,\ j) \\ S(i-1,\ j) + g \\ S(i,\ j-1) + g \end{cases}$$

2本の配列の長さを2辺とする長方形の升目を埋めるだけの計算量が必要

グローバルアライメントとローカルアライメント

- グローバル（大域）アライメント
  - 配列全長どうしを並べる。
  - 両者ともに全長にわたって相同性がある場合のみ意味を持つ。

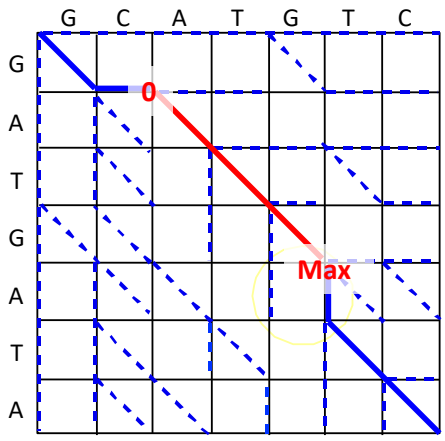
- ローカル（局所）アライメント
  - 部分配列間のアライメントで類似度が最大となるものを求める。
  - 配列の一部の領域（ドメイン）のみに相同性がある場合、もしくは相同性があっても類似性が低く、一部の領域のみしか類似性が認識できないような場合に効果的。
  - 類似度が低い場合にスコアがマイナスになるようなスコア体系を用いる必要がある。

相同性検索において、通常は全長に渡る相同性があることは確証できないので、ローカルアライメントがよりよい選択肢となる。

ローカルアライメントとマトリクス

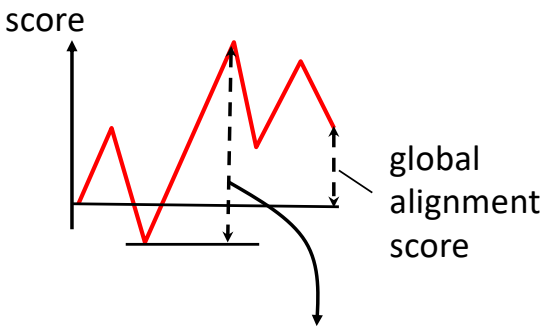
動的計画法による局所アライメント

Smith-Waterman法



局所最適アライメント

GCATG-TC
G-ATGATA



$$S(i,\ j) = \max \begin{cases} S(i-1,\ j-1) + s(i,\ j) \\ S(i-1,\ j) + g \\ S(i,\ j-1) + g \\ 0 \end{cases}$$

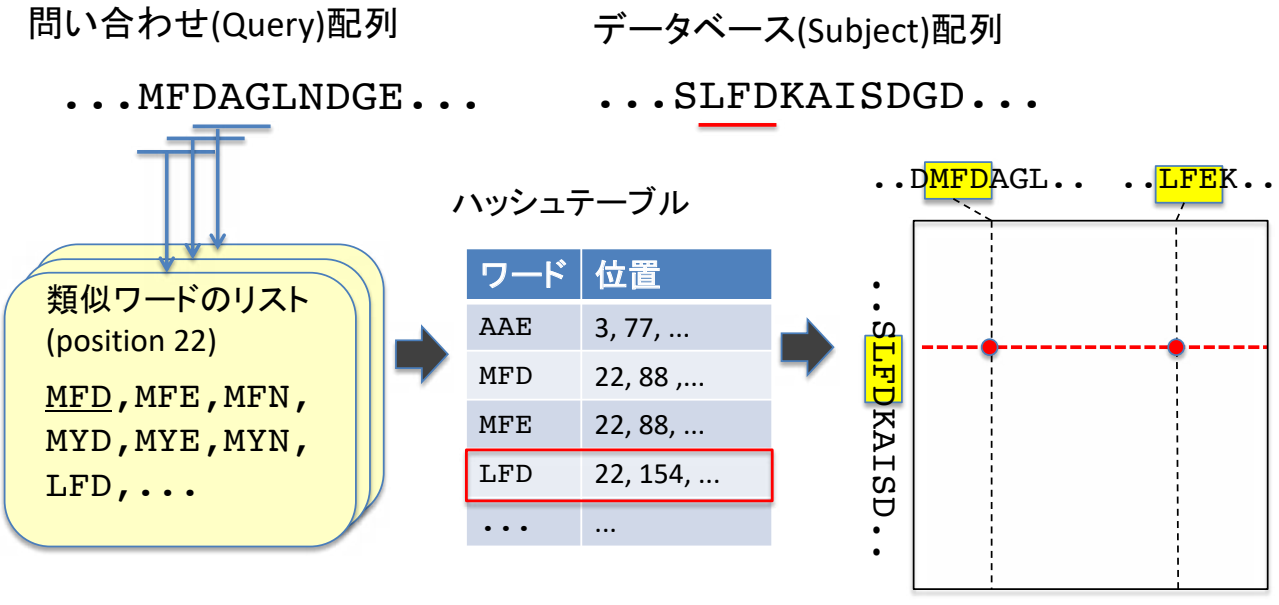
局所アライメントのスコアはつねに0以上になる

高速相同性検索

- データベース中からクエリ配列と十分に高い類似性（＝相同性）を持つ配列領域を検索する
  - そのような配列領域をいかにして高速に検索するか（アルゴリズムの問題）
  - 「十分に高い類似性」をどのようにして定義するか（類似性の定義と統計的検定の問題）

BLAST のアルゴリズム

初期検索

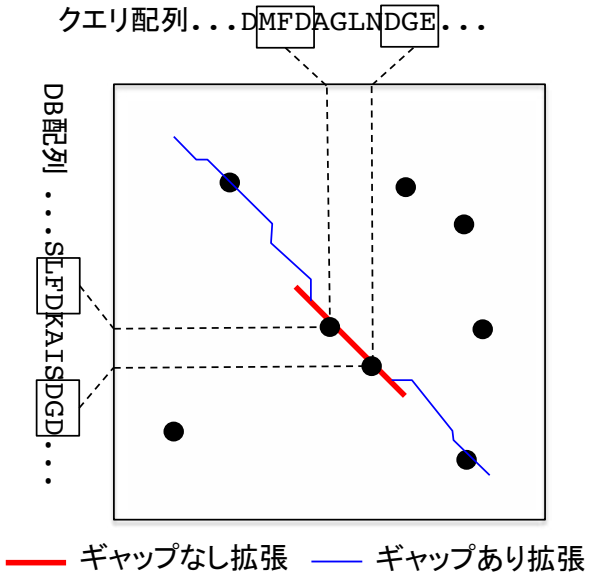


関連するオプション

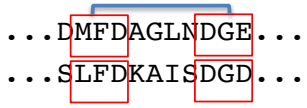
`-word_size` 初期検索で使うワードのサイズ

`-threshold` 類似ワードに加える際の類似性スコアの閾値

BLAST のアルゴリズム
類似領域の拡張（アライメント）

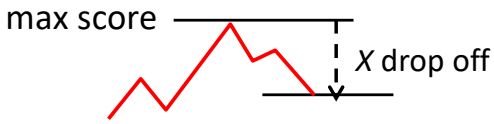


1) 一定のウィンドウ内に2回ヒットが見つかる領域をとる



2) ギャップなしで拡張して、閾値以上のスコアをとる領域について、ギャップありでさらにアライメントを拡張

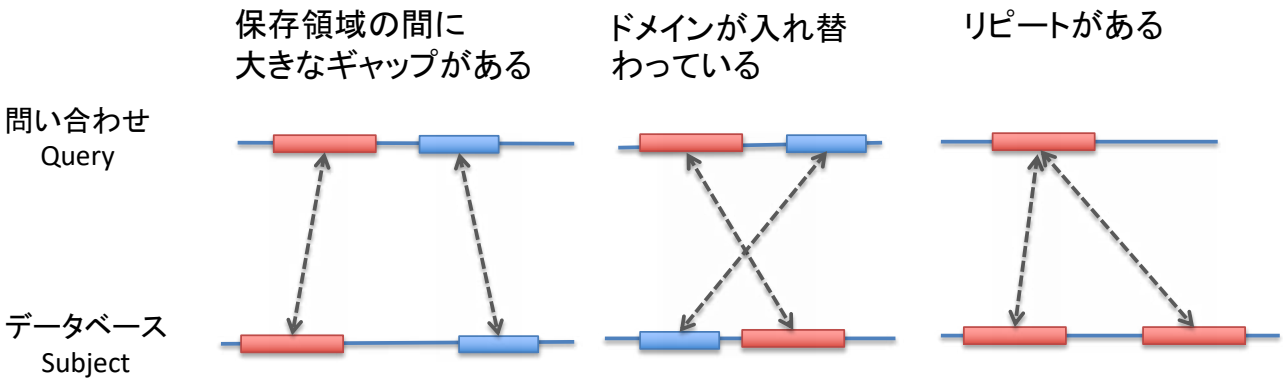
3)アライメントの拡張は、最高スコアから *X* 低くなったら打ち切る



4)統計的に有意なスコアを持つヒットを残す

関連するオプション
`-window_size` 2つのヒットを見つけるウィンドウのサイズを設定
`-xdrop_ungap/gap` Xdrop パラメータの設定

一つのエントリに対して
複数のアライメント(HSP)が含まれる場合



デフォルトでは最高スコアのHSPを全体のスコアとして評価する。
consistentなアライメントについてスコアの和をとって評価するオプションもある

関連するオプション
`-sum_stats` consistentなHSPが複数あるとき、スコアの和でE-valueを計算する

スコアの定義
ギャップペナルティ

スコアの定義(1) ： 一致＋２、不一致－１、ギャップ－２

GCATG-A-G-GA

GTATGGATAAGA

+2-1+2+2+2-2+2-2-1-2+2+2 = +6

スコアの定義(2) ： 一致＋２、不一致－１、
ギャップ開始－２、ギャップ延長－１

GCATG---AGGA

GTATGGATAAGA

+2-1+2+2+2-2-1-1+2-1+2+2 = +8

注）BLASTでは、最初のギャップペナルティを
ギャップ開始＋ギャップ延長
となるように定義している。従って、この例では開始、延長ともペナルティは -1 となる。

関連するオプション
-reward 一致のスコア（≥0； DNAのみ）
-penalty 不一致のペナルティ（≤0； DNAのみ）
-gapopen ギャップ開始に対するペナルティ(≥0)
-gapextend ギャップ延長に対するペナルティ(≥0)

スコアの定義
アミノ酸置換行列(PAM250)

	P	A	G	N	Q	D	E	T	S	C	V	I	M	L	K	R	H	F	Y	W
P	6																			
A	1	2																		
G	0	1	5																	
N	0	0	0	2																
Q	0	0	-1	1	4															
D	-1	0	1	2	2	4														
E	-1	0	0	1	2	3	4													
T	0	1	0	0	-1	0	0	3												
S	1	1	1	1	-1	0	0	1	2											
C	-3	-2	-3	-4	-5	-5	-5	-2	0	12										
V	-1	0	-1	-2	-2	-2	-2	0	-1	-2	4									
I	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	0	-1	-2	4	5								
M	-2	-1	-3	-2	-1	-3	-2	-1	-2	-5	2	2	6							
L	-3	-2	-4	-3	-2	-4	-3	-2	-3	-6	2	2	4	6						
K	-1	-1	-2	1	1	0	0	0	0	-5	-2	-2	0	-3	5					
R	0	-2	-3	0	1	-1	-1	-1	0	-4	-2	-2	0	-3	3	6				
H	0	-1	-2	2	3	1	1	-1	-1	-3	-2	-2	-2	-2	0	2	6			
F	-5	-3	-5	-3	-5	-6	-5	-3	-3	-4	-1	1	0	2	-5	-4	-2	9		
Y	-5	-3	-5	-2	-4	-4	-4	-3	-3	0	-2	-1	-2	-1	-4	-4	0	7	10	
W	-6	-6	-7	-4	-5	-7	-7	-5	-2	-8	-6	-5	-4	-2	-3	2	-3	0	0	17

small
amide
acidic
hydroxyl
aliphatic (V,I,L)
basic
aromatic

形や大きさ、性質が似たアミノ酸間には高いスコア
似ていないアミノ酸間には低いスコア

関連するオプション
-matrix スコア行列を指定（タンパク質のみ）

スコアの定義

アミノ酸置換行列(BLOSUM62)

	P	A	G	N	Q	D	E	T	S	C	V	I	M	L	K	R	H	F	Y	W
P	7																			
A	-1	4																		
G	-2	0	6																	
N	-2	-2	0	6																
Q	-1	-1	-2	0	5															
D	-1	-2	-1	1	0	6														
E	-1	-1	-2	0	2	2	5													
T	-1	0	-2	0	-1	-1	-1	5												
S	-1	1	0	1	0	0	0	1	4											
C	-3	0	-3	-3	-3	-3	-4	-1	-1	9										
V	-2	0	-3	-3	-2	-3	-2	0	-2	-1	4									
I	-3	-1	-4	-3	-3	-3	-3	-1	-2	-1	3	4								
M	-2	-1	-3	-2	0	-3	-2	-1	-1	-1	1	1	5							
L	-3	-1	-4	-3	-2	-4	-3	-1	-2	-1	1	2	2	4						
K	-1	-1	-2	0	1	-1	1	-1	0	-3	-2	-3	-1	-2	5					
R	-2	-1	-2	0	1	-2	0	-1	-1	-3	-3	-3	-1	-2	2	5				
H	-2	-2	-2	1	0	-1	0	-2	-1	-3	-3	-3	-2	-3	-1	0	8			
F	-4	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-2	-2	-1	0	0	0	-3	-3	-1	6		
Y	-3	-2	-3	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-2	2	3	7	
W	-4	-3	-2	-4	-2	-4	-3	-2	-3	-2	-3	-3	-1	-2	-3	-3	-2	1	2	11

small

amide

acidic

hydroxyl

aliphatic (V,I,L)

basic

aromatic

形や大きさ、性質が似たアミノ酸間には高いスコア
似ていないアミノ酸間には低いスコア

関連するオプション
-matrix　スコア行列を指定（タンパク質のみ）

置換頻度の統計に基づく アミノ酸置換行列の定義

相同配列間でアミノ酸a,b が置換する確率

$$S(a,b) = \alpha \log \frac{q(a,b)}{p(a)p(b)}$$

非相同配列間でアミノ酸 i,j が偶然揃う確率

配列をランダムに並べ替えたもの

実際のアライメント中でaとbが並ぶ頻度

```
PDSTIQMINRYLAKHPEQTNRFRILVCGGDG
|   |           |       |||||||
PIKAVQLCTLL....PYYS..ARVLVCGGDG

TIDKANLPVLPPIAVLPLGTGNDLARCLRWG
  |||||    ||||||||||||||||||||
CIDKANFTKHPPVAVLPLGTGNDLARCLRWG
```

配列間の近さによって置換頻度は異なる

アライメントをどう計算するか？
（スコア行列を使わずに）

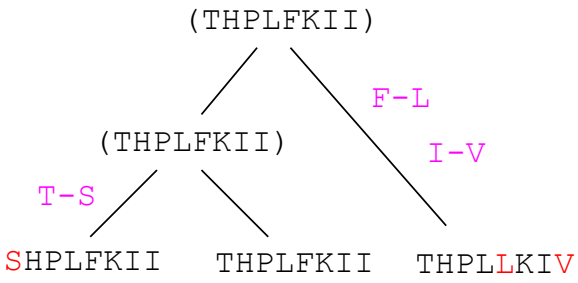
対数オッズスコア

S＞＞0　相同である
S＜＜0　相同でない

PAM行列 (Dayhoff 1978)

PAM (accepted point mutation)
100残基あたりで受容された点突然変異の回数。
配列間の進化的な距離（時間）の単位。

1）近縁配列間の最節約系統樹に基づいて、置換頻度をカウント



2）置換頻度（f(a,b)）を規格化して1PAMあたりの置換確率行列 *M*を計算

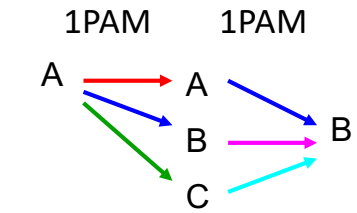
$$M(a,b) = \frac{f(a,b)}{\sum_{x \neq a} f(a,x)} m(a)$$

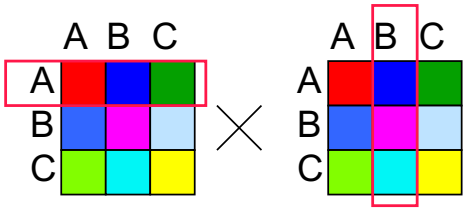
M(a, b)： あるアミノ酸aが、1PAMの期間内にｂに置換する確率
m(a)：アミノ酸aの相対的な置換しやすさ

PAM行列 (Dayhoff 1978)

PAM (accepted point mutation)
受容された点突然変異の100残基あたりの回数。
配列間の進化的な距離（時間）の単位。

3）置換確率行列 *M* を*n*回掛け合わせることにより、*n*PAMの置換確率行列 M_n を計算





4）対数オッズをとって、PAM*n*のスコア行列を計算

$$S_n(a,b) = \log \frac{M_n(a,b)}{p(b)}$$

$$= \log \frac{q_n(a,b)}{p(a)p(b)}$$

BLOSUM行列

Blocksデータベース

```
FA12_HUMAN ( 217) CYDGRGLSYRGLARTTLSGAPCQPWAS

HGFA_HUMAN ( 286) CFLGNGTGYRGVASTSASGLSCLAWNS

UROK_CHICK (  79) CYSGNGEDYRGMAEDPGCLYWDHPSVI

UROT_HUMAN ( 215) CYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNS

APOA_HUMAN (  28) CYHGDGQSYRGTYSTTVTGRTCQAWSS
PLMN_BOVIN ( 358) CYHGNGQSYRGTSSTTITGRKCQSWSS
PLMN_HUMAN ( 377) CYHGDGQSYRGTSSTTTTGKKCQSWSS
PLMN_MACMU ( 377) CYHGDGQSYRGTSSTTTTGKKCQSWSS
PLMN_MOUSE ( 377) CYQSDGQSYRGTSSTTITGKKCQSWAA
  PLMN_PIG ( 358) CYRGNGESYRGTSSTTITGRKCQSWVS

HGFL_HUMAN ( 283) CFRGKGEGYRGTANTTTAGVPCQRWDA
HGFL_MOUSE ( 292) CFRGKGEDYRGTTNTTSAGVPCQRWDA
```

n%以上一致する配列をグループ化（クラスタリング）

グループの和が1となるよう配列を重みづけして頻度をカウント

Y:4, F:2

S:2, G:1.5,D:1.5, A:1

$$Y \leftrightarrow F : 4 \times 2 = 8$$
$$F \leftrightarrow F : 2 / 2 = 1$$
$$Y \leftrightarrow Y : 4 \times 3 / 2 = 6$$

カラムごとにアミノ酸置換数を数え上げて、置換頻度q(a,b)を計算

対数オッズ

$$M(a,b) = \log \frac{q(a,b)}{p(a)p(b)}$$

BLOSUM *n* 行列

	A	R	N	D	C
A	7	-3	-3	-3	-1
R	-3	9	-1	-3	-6
N	-3	-1	9	2	-5
D	-3	-3	2	10	-7
C	-1	-6	-5	-7	13

スコア行列の使い分け

PAM
(Dayhoff et al. 1978)

近縁蛋白質配列間のマニュアルアライメントをもとに作成

120
160
210
250

強くて短い類似領域の検出

弱くて長い類似領域の検出

BLOSUM
(Henikoff et al. 1992)

自動生成された、保存部位周辺のマルチプルアライメントから作成

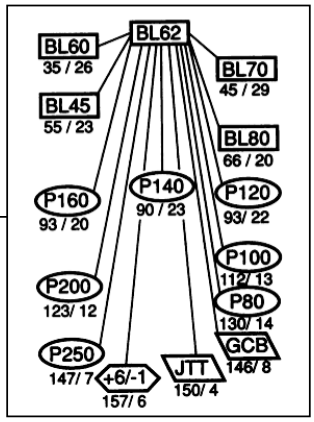
80
62 → BLAST 標準
50 → FASTA 標準
45

BLOSUM 80

	A	R	N	D	C
A	7	-3	-3	-3	-1
R	-3	9	-1	-3	-6
N	-3	-1	9	2	-5
D	-3	-3	2	10	-7
C	-1	-6	-5	-7	13

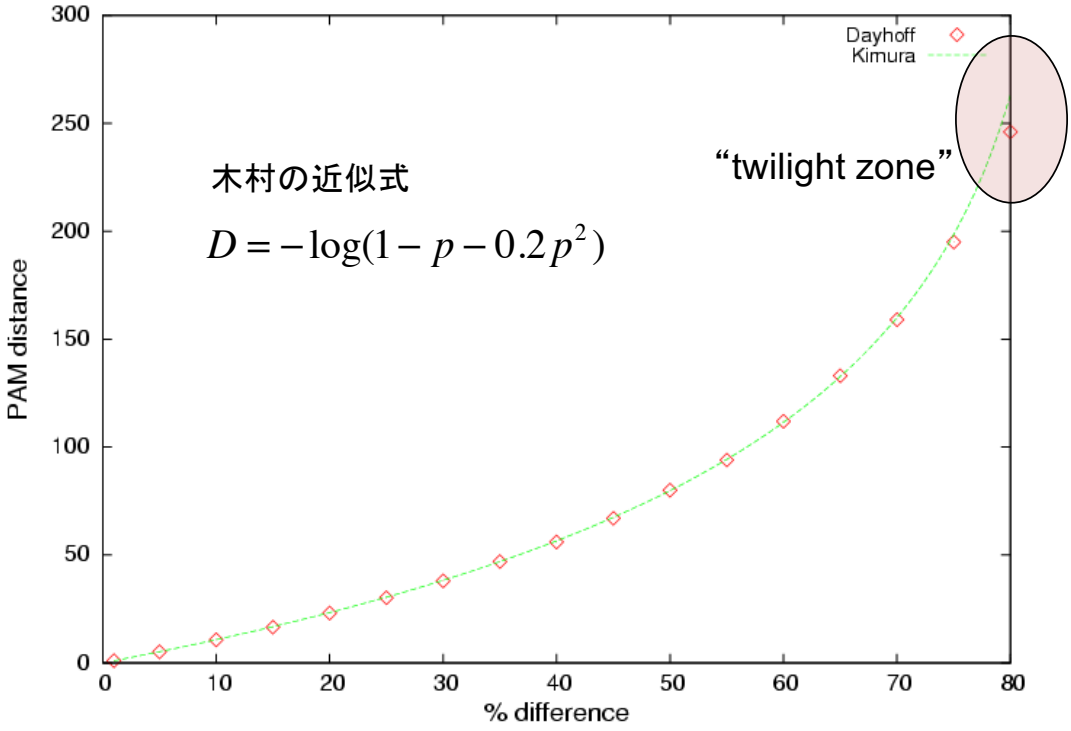
BLOSUM 45

	A	R	N	D	C
A	5	-2	-1	-2	-1
R	-2	7	0	-1	-3
N	-1	0	6	2	-2
D	-2	-1	2	7	-3
C	-1	-3	-2	-3	12



BLASTパフォーマンス試験による比較
(Henikoff et al. 1992)

観察される配列間の違い(%difference)と実際に起きた変異数(PAM)との関係



統計的評価(*E*-value)

- E-value : 同じ大きさのランダム配列データベースを検索したとき、スコアS以上のヒットが偶然に得られる個数の期待値

$$E = Kmne^{-\lambda S}$$

m: データベース全体の長さ
n: 問い合わせ配列の長さ
K, λ : スコア行列とアミノ酸組成に依存するパラメータ
（BLAST内部で計算される）

関連するオプション
`-evalue` E-valueの閾値を設定
`-dbsize` データベースサイズを設定
`-searchsp` 検索空間（データベースサイズxクエリ配列サイズ）を設定

統計的評価(*p*-value)

- p-value：同じ大きさのランダム配列データベースを検索したとき、スコアS以上のヒットが（少なくとも一つ）見つかる確率

$$p = 1 - e^{-E} = 1 - e^{-Kmne^{-\lambda S}}$$

［期待値*E*のポアソン分布の式 $P(k) = \frac{E^k e^{-E}}{k!}$ から、1-*P*(0)として求められる］

E→0のとき、$p=1-e^{-E}$→Eとなるので、
Eが小さければp-value は E-valueと同じと考えてよい

標準化されたスコア (bit-score)

bit-score: $S' = \frac{\lambda S - \log K}{\log 2}$

このとき、E-valueは $E = mn2^{-S'}$ で計算できる。

ビットスコアは、スコア行列に固有のパラメータ*λ*, *K*に依存せず、
統計的評価と直接結びついている

例） ビットスコア S'=30, データベース長 *m*=5,000,000, クエリ長 *n*=200のとき、
$E = 5 \times 10^6 \times 200 \times 2^{-30} = 0.93$

統計的検定についての注意

- E-valueが低い→帰無仮説を否定
- ここでの帰無仮説は、「得られたスコアが、同じアミノ酸組成を持つランダムなアミノ酸配列から得られるスコアと変わらないこと」
- 大抵はE-valueが低いことから2つの配列が相同であると結論づけられるが、そこには若干の飛躍があり、必ずしもそうはいえないこともある。

低複雑性領域のフィルタリング

SEG - 低複雑性（＝アミノ酸組成の偏った）領域を除く

クエリ配列

```
>SOS_DROME son-of-sevenless
MFSGPSGHAHTISYGGGIGLGTGGGGGSGG
SGSGSQGGGGGIGIGGGGVAGLQDCDGYDF
TKCENAARWRGLFTPSLKKVLEQVHPRVTA
KEDALLYVEKLCLRLLAMLCAKPLPHSVQD
```

検索結果

```
SOS_DROME   SON OF SEVENLESS PROTEIN.   0.0
GNRP_RAT    GUANINE NUCLEOTIDE RELEAS   7.5e-43
GNRP_MOUSE  GUANINE NUCLEOTIDE RELEAS   5.7e-42
CC25_SACKL  CELL DIVISION CONTROL PRO   3.4e-32
CC25_YEAST  CELL DIVISION CONTROL PRO   3.9e-22
CC25_CANAL  CELL DIVISION CONTROL PRO   4.0e-21
STE6_SCHPO  STE6 PROTEIN.               2.0e-17
SC25_YEAST  SCD25 PROTEIN.              3.1e-16
GNDS_MOUSE  GUANINE NUCLEOTIDE DISSOC   5.8e-14
GNDS_RAT    GUANINE NUCLEOTIDE DISSOC   1.2e-13
BRN1_HUMAN  BRAIN-SPECIFIC HOMEOBOX/P   1.1e-10
DISC_DROME  DISCONNECTED PROTEIN.       3.0e-10
```

生物学的に意味のない（相同でない）ヒット

```
>BRN1_HUMAN BRAIN-SPECIFIC HOMEOBOX/POU DOMAIN PRO

Query: 9  AHTISYGGGIGLGTGGGGGSGGSGSGSQGGGGGIGIGGGGV 49
          A +I +    G G GGGGG GG G G+ GGGGG+  G   V
Sbjct:18 AGSIVHSDAAGAGGGGGGGGGGGGGAGGGGGGMQPGSAAV 58
```

フィルタリング後のクエリ配列

```
>SOS_DROME son-of-sevenless
MFSGPSGHAHTISYXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXVAGLQDCDGYDF
TKCENAARWRGLFTPSLKKVLEQVHPRVTA
KEDALLYVEKLCLRLLAMLCAKPLPHSVQD
```

検索結果

```
SOS_DROME   SON OF SEVENLESS PROTEIN.   0.0
GNRP_RAT    GUANINE NUCLEOTIDE RELEAS   3.3e-37
GNRP_MOUSE  GUANINE NUCLEOTIDE RELEAS   2.5e-36
CC25_SACKL  CELL DIVISION CONTROL PRO   6.0e-26
CC25_CANAL  CELL DIVISION CONTROL PRO   2.1e-16
CC25_YEAST  CELL DIVISION CONTROL PRO   1.1e-15
SC25_YEAST  SCD25 PROTEIN.              8.0e-11
GNDS_MOUSE  GUANINE NUCLEOTIDE DISSOC   2.5e-10
STE6_SCHPO  STE6 PROTEIN.               3.2e-10
GNDS_RAT    GUANINE NUCLEOTIDE DISSOC   5.3e-09
H2A1_MOUSE  HISTONE H2A.1.              5.3e-05
H2A2_HUMAN  HISTONE H2A.2.              5.3e-05
```

生物学的に意味のあるヒットが上位に出現する

BLASTで利用可能なフィルタリングプログラム

- **`-seg`**: for protein; default OFF
  - アミノ酸組成の偏った（複雑度が小さい）領域をマスクする。（プログラムsegmasker）
- **`-dust`**: for DNA; default ON
  - 3塩基ワードの出現が偏った領域をマスクする。（プログラムdustmasker)
- **`-window_masker_db <file>`**: for DNA; optional
  - ゲノム内で多数出現するワードをマスクする。ワード数を数える前処理が必要。（プログラムwindowmasker）
- **`-filtering_db <db>`**: for DNA; optional
  - 指定したデータベース（例えばRepBase）とヒットする領域をマスクする。
- **`-lcasemasking`**: for protein and DNA; optional
  - 小文字の部分をマスクする（クエリ、データベースとも）。

ハードマスクとソフトマスク

- ハードマスク
  - クエリ配列中でマスクする領域を、"X"（DNAの場合"N"）で置き換えることにより、完全に検索対象から外す。

  （問題点）クエリ配列をハードマスクしてしまうと、配列間の正確なアライメントや類似性スコアが計算できなくなる。
- ソフトマスク
  - クエリ配列中でマスクする領域は、初期検索における類似ワードリストの作成の対象からは外すが、その後のアライメント拡張フェイズでは通常の配列と同様に扱う 。

    →アライメントや類似性スコアはマスクせずに計算される。

関連するオプション

`-soft_masking` フィルタをソフトマスクとして使用

Composition-based statistics

アミノ酸スコア行列

$$S(a,b) = \log \frac{q(a,b)}{p(a)p(b)}$$

相同配列間で観察される置換の頻度

平均的なアミノ酸の出現頻度

配列のアミノ酸組成が平均の組成と比べて大きく偏っている場合、
このスコア行列は最適ではない

アミノ酸組成に基づくスコアの補正

$$S'(a,b) = \log \frac{q'(a,b)}{p'(a)p''(b)}$$

p', p'' に合わせて補正した置換頻度

クエリ配列の
アミノ酸頻度

データベース配列の
アミノ酸頻度

関連するオプション
`-comp_based_stats` 組成に基づくスコア統計を使用

オプションのまとめ

- 検索の速度を上げる（感度は下がる）
  - word_sizeを大きく、thresholdを大きくする。
  - window_sizeを小さく、xdrop_(ungap/gap}を小さくする。
- 高い類似性での一致にフォーカスする
  - タンパク質の場合、matrix としてBLOSUMの大きいものかPAMの小さいものを指定する。
  - DNAの場合、rewardに対してpenaltyの絶対値を大きくする。
- 出力を類似性スコアが高いものに絞る（速度も若干向上）
  - evalue（閾値）を小さくする。
  - max_target_seqs（最大出力数）を小さくする (outfmt>=5の場合）。
- 繰り返し配列のフィルタリング
  - 組成が偏った領域を除くには、タンパク質ではseg、DNAではdustを使う。タンパク質ではcomp_base_statsによっても緩和される。
  - ゲノム中に散在する反復配列を除くには、window_maskerかfiltering_dbを使う。

デフォルトのオプション設定 (blastp/blastx/tblastn)

program/task	blastp	blastp-short	blastx	tblastn
word_size	3	2	3	3
threshold	11	16	12	13
window_size	40	15	40	40
gapopen	11	9	11	11
gapextend	1	1	1	1
matrix	BLOSUM62	PAM30	BLOSUM62	BLOSUM62
seg	no	no	yes	yes
soft_masking	false	false	false	false
comp_based_stats	2	0 (false)	2	2
purpose	general	to find short &strong match	translate nucl query	translate nucl DB

デフォルトのオプション設定(blastn)

task	blastn	blastn-short	megablast	dc-megablast
word_size	11	7	28	11
window_size	0	0	0	40
gapopen	5	5	0	5
gapextend	2	2	2.5	2
reward (match)	2	1	1	2
penalty (mismatch)	-3	-3	-2	-3
dust	yes	yes	yes	yes
soft_masking	true	true	true	true
purpose	general	to find short & strong match	to find strong match for large query	to find moderate match for large query

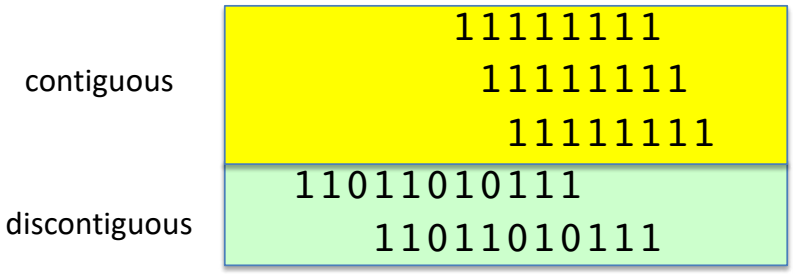
Discontiguous seed (spaced seed)

連続した文字列ではなく、途中の文字を飛ばしてマッチさせることを許す

Contiguous seed: 11111111
Discontiguous seed: 11011010111

0=don't care

CAGTGTAGGACGTGATCAC
GAGTGTACGACGTGATCAG



Consecutive seed は連続して（同じ高保存領域に複数回）ヒットする傾向にある

ヒットする個数の期待値は1の個数が同じならほぼ同じだが、置換を含む配列対に対しては、spaced seedの方がより多くの高保存領域をカバーすることが期待できる。