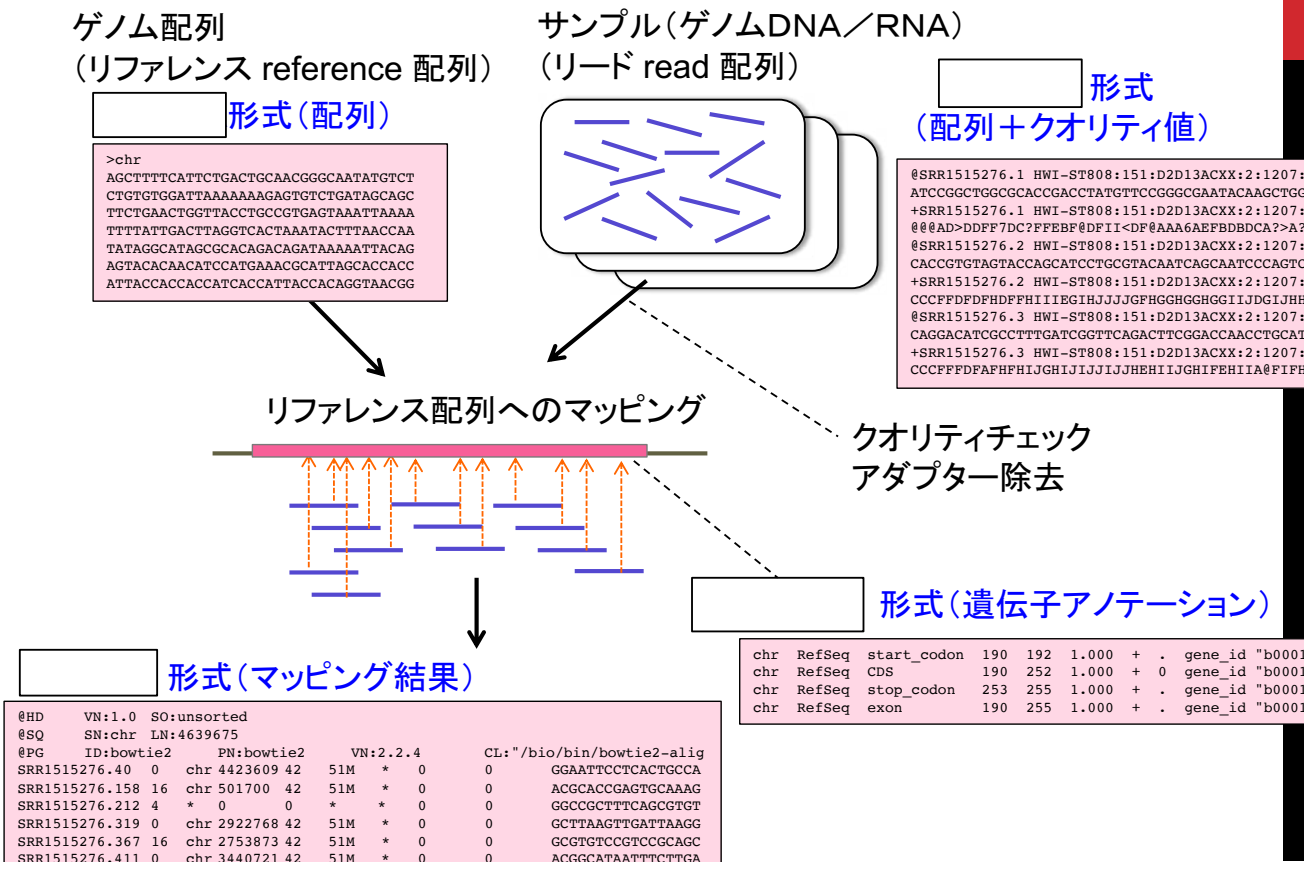
NGS 基本フォーマットとツール 復習と補足

基礎生物学研究所
ゲノムインフォマティクストレーニングコース
内山　郁夫 **(uchiyama@nibb.ac.jp)**

ショートリードのマッピング



復習：cutadaptによる アダプターの除去

実習用ディレクトリ　~/data/IU

入力

- **リード配列（FASTQ 形式; paired-end）**
  etec_1.fq
  etec_2.fq
- **アダプター配列　（それぞれを3'端から除去）**

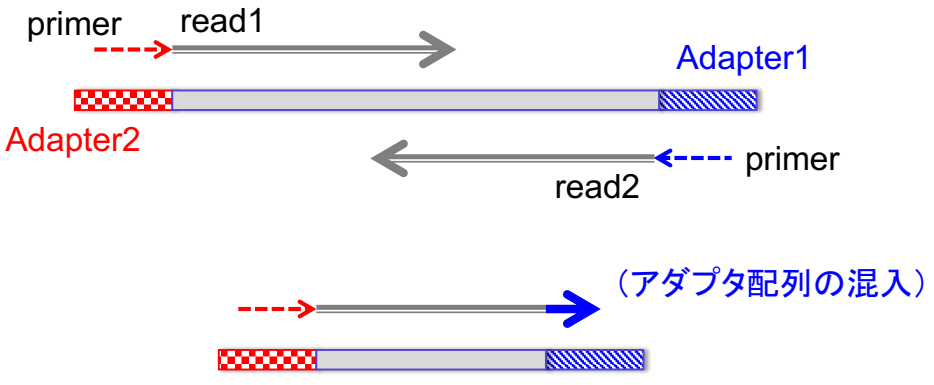
Adapter1: AGATCGGAAGAGCGGTT

Adapter2: AGATCGGAAGAGCGTCG

◆ **アダプター配列除去の実行**
除去後のデータ（FASTQ形式）は etec_1.cut.fq, etec_2.cut.fqとする。

```
$ cutadapt  -a AGATCGGAAGAGCGGTT  -A AGATCGGAAGAGCGTCG
            -o etec_1.cut.fq  -p etec_2.cut.fq
            etec_1.fq  etec_2.fq
```

Illuminaにおけるアダプター配列



Adapter1:　AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC

Adapter2:　AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTA

cutadapt –a　(-A) オプションでは、指定した配列とマッチした箇所以降の3'側を切り捨てるので、アダプタ配列は全長を指定しなくてもよい。

cutadapt その他のオプション

- **-q** *[5' cutoff,] 3' cutoff*　　(例：-q 20)
  - クオリティ値が指定したカットオフより低い塩基を3'端から除く（カンマ区切りでカットオフを2つ指定した場合は5'端からも除く）
- **-m** *min_length*　　(例：-m 30)
  - アダプター除去後の配列長が指定した長さ以下になったら配列全体を捨てる。
  - ペアエンドの場合、ペアのどちらかが捨てられる場合は両方を捨てる。
    →2つのファイルで対応する配列の出現順が揃うようにする。
- **-O** *overlap_length*　　(例：-O 5)
  - アダプターとリードとの間で、マッチしたと見なす最低のオーバーラップ長を指定。デフォルトは3。

復習：bowtie2 用インデックスの作成

実習用ディレクトリ　`~/data/IU`

入力

- **ゲノムデータ（FASTA形式）**
  `eco_o139.fa`　腸管毒素原性大腸菌(ETEC) O139:H28のゲノム配列

◆ **bowtie2用インデックスの作成（インデックス名は `etec`）**

```
$ bowtie2-build
```

復習：bowtie2の実行 (paired-end)

実習用ディレクトリ　~/data/IU

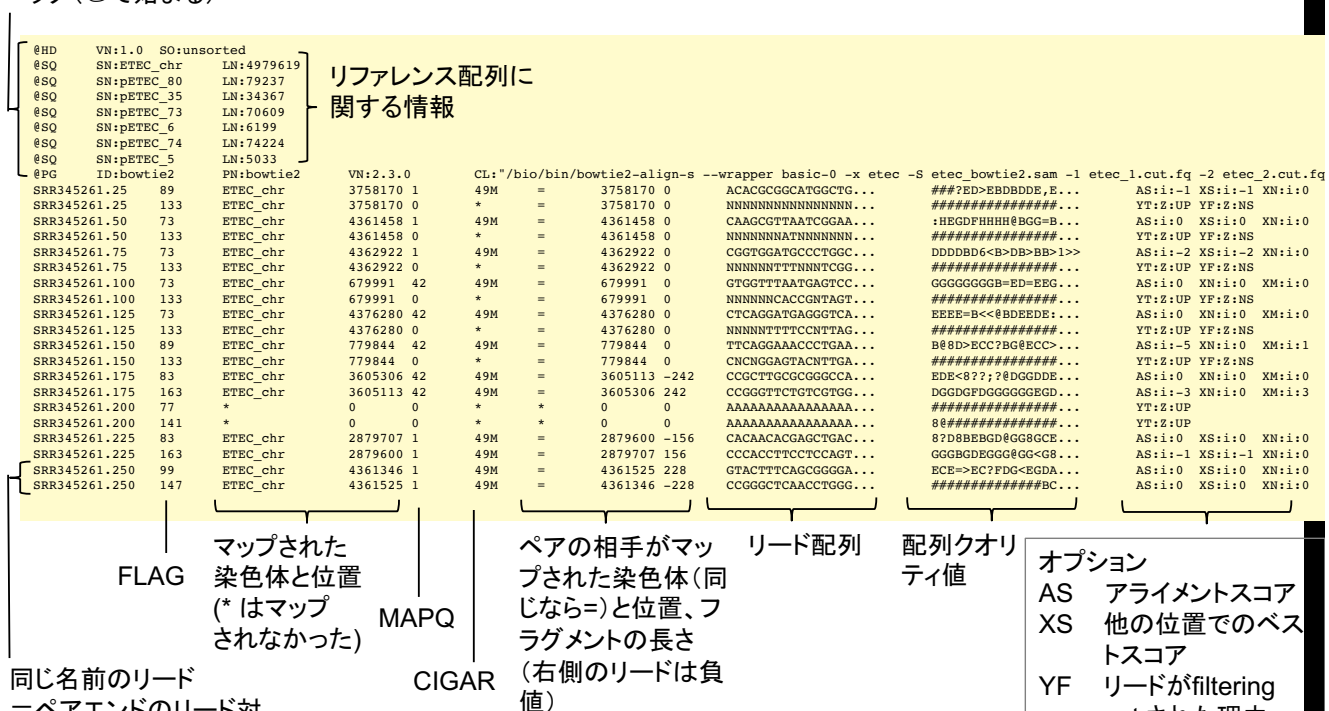
入力

- リード配列（FASTQ 形式; paired-end; アダプターを除去したもの）
  `etec_1.cut.fq`
  `etec_2.cut.fq`
- リファレンス配列のインデックス名
  `etec`　（先ほど作ったもの）

◆ **bowtie2によるマッピングの実行　（出力：etec_bowtie2.sam）**

```
$ bowtie2 -x etec -1 etec_1.cut.fq -2 etec_2.cut.fq
          -S etec_bowtie2.sam
```

マッピング結果ファイル(SAMファイル)



復習：SAMからBAMへの変換

実習用ディレクトリ　~/data/IU

入力

- SAMファイル（さきほどbowtie2によって作成されたもの）
  etec_bowtie2.sam

◆　SAMからBAMへ変換する（出力ファイル名：etec_bowtie2.bam）

```
$ samtools [ ] [ ] etec_bowtie2.sam [ ]
etec_bowtie2.bam
```

◆ 作成したBAMファイルをヘッダ付きでSAMに変換してlessで表示する

```
$ samtools [ ] [ ] etec_bowtie2.bam [ ] less
```

復習：BAMファイルのインデックスづけと検索

実習用ディレクトリ　~/data/IU

入力

- BAMファイル（さきほどSAMからの変換によって作成されたもの）
  etec_bowtie2.bam

◆ リファレンス配列上の位置の順にソートする
（出力ファイル：etec_bowtie2_sorted.bam)

```
$ samtools [ ] etec_bowtie2.bam
          [ ] etec_bowtie2_sorted.bam
```

◆ ソートされたBAMファイルに対してインデックスを作成する

```
$ samtools [ ] etec_bowtie2_sorted.bam
```

◆ インデックスを使って、リファレンスの染色体配列（染色体名：ETEC_chr）の10000-12000　の範囲にマッピングされた結果のみを表示する

```
% samtools [ ] etec_bowtie2_sorted.bam
           [                          ]
```

SAM/BAM フォーマット補足

- Bowtie2のデフォルトオプションでマッピングした結果のSAM/BAMファイルは、もとのFASTQファイルに含まれている各リードの配列とクオリティデータをすべて含んでいる。以下のコマンドでSAM/BAMファイルからFASTQファイルを作成できる。

```
$ samtools fastq etec_bowtie2.bam -1 r1.fq -2 r2.fq
```

- リファレンス配列を参照して、配列を記録する代わりにリファレンス上の位置とアライメント情報のみを記録することによって、さらに圧縮率を高めたバイナリ形式としてCRAM形式がある。

```
$ samtools view -C etec_bowtie2.sam -T eco_o139.fa
              -o etec_bowtie2.cram
```

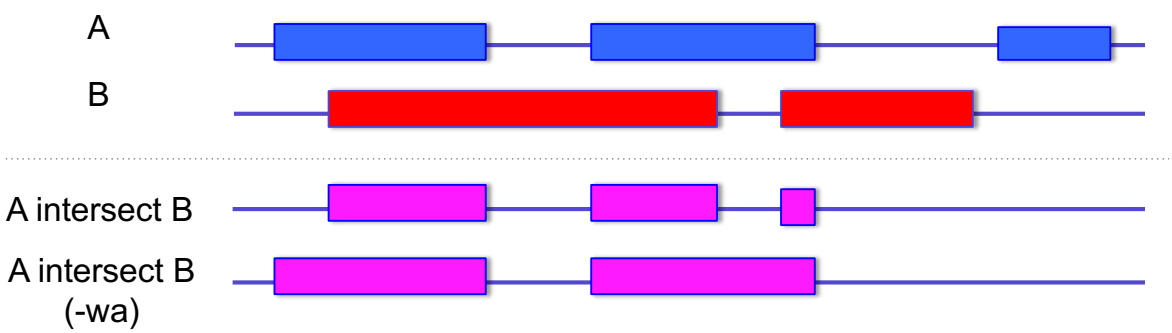
Bedtools

- BED, GFF(GTF), BAM 形式で記述された「ゲノム上の領域の集合」に対して様々な操作を行うツールを集めたもの。

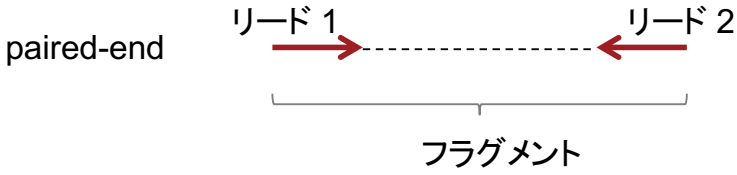
例）intersection

BAM形式のマッピング結果(etec_bowtie2.bam)の中で、コード領域(eco_o130_cds.gff) とオーバーラップしているリードを抽出して、BED形式で表示する。

```
$ bedtools intersect -abam etec_bowtie2.bam
          -b eco_o139_cds.gff -wa -bed |less
```



Bowtie2のオプション1
ペアエンドリード対の検索



- `-I` *int*　フラグメント長の最小値(default: 0)
- `-X` *int*　フラグメント長の最大値(default: 500)
- `--fr` / `--rf` / `--ff`　リード1とリード2の相対的な向き（default:`fr`）

- 条件を満たさない(discordant)リード対もデフォルトでは出力される。その際、2カラム目(FLAG)の2ビット目（ペアが正しくアラインされたか？）に0がセットされる。

フラグ(FLAG)

- True/Falseの2状態を1/0で表した変数。複数のフラグをまとめて、2進数の数値で表現される。
- フラグ値は10進数で表示されるが、2進数に変換することで解釈される。

FLAG値

10進数	2進数	解釈
83	01010011	ペアリードである
		各リードが適切にアラインされている
		逆鎖にマップされている
		1番目のリードである

```
# unix コマンドによる 10進数→2進数の変換
% echo 'obase=2;83' | bc
1010011
# samtools を使ったフラグの解釈
% samtools flags 83
0x53    83      PAIRED,PROPER_PAIR,REVERSE,READ1
# 各フラグの説明を表示
% samtools flags
```

Paired end readでのFLAG値

	Read2の配列である	Read1の配列である	ペア相手は逆鎖にマップされた	逆鎖にマップされた	ペア相手がマップされていない	自分がマップされていない	両方適切にマップされている	ペアリードがある	2進数表記	samファイルの記載は10進数表記
	1	1	1	1	1	1	1	1	11111111	255
通常のpaired end seqで	0	1	0	1	0	0	1	1	01010011	83
consistentにアラインしていれば	0	1	1	0	0	0	1	1	01100011	99
この4通りになる	1	0	0	1	0	0	1	1	10010011	147
	1	0	1	0	0	0	1	1	10100011	163
片方しかアラインしてない場合	0	1	0	0	1	0	0	1	01001001	73
	0	1	0	1	1	0	0	1	01011001	89
	0	1	0	0	0	1	0	1	01000101	69
	0	1	1	0	0	1	0	1	01100101	101
	1	0	0	0	1	0	0	1	10001001	137
	1	0	0	1	1	0	0	1	10011001	153
	1	0	0	0	0	1	0	1	10000101	133
	1	0	1	0	0	1	0	1	10100101	165
どっちもアラインしていない場合	0	1	0	0	1	1	0	1	01001101	77
	1	0	0	0	1	1	0	1	10001101	141

Samtoolsを用いた フラグによるフィルタリング

- **samtools view –f フラグ値　BAMファイル**

指定したフラグ値中で1であるフラグが、BAMファイル中のフラグ値でもすべて1になっている行のみを抜き出す。

例）ペアリードでかつ両方が適切にアラインされている行のみを抜き出す

```
% samtools view –f 3 etec_bowtie2_sorted.bam
```

3は2進数で 11 だから、1番目と2番目のフラグが1である行を抜き出す（それ以外のフラグは無視する）。

- **samtools view –F フラグ値　BAMファイル**

指定したフラグ値中で1であるフラグが、BAMファイル中のフラグ値ではすべて0になっている行のみを抜き出す。

例）ペアリードの両方が適切にアラインされていない行のみを抜き出す

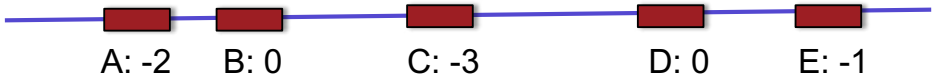
```
% samtools view –F 2 etec_bowtie2_sorted.bam
```

2番目のフラグが0である行を抜き出す。

Bowtie2のオプション2
アライメント出力のモード

- 一般に、1つのリードは複数の箇所にマップされる。

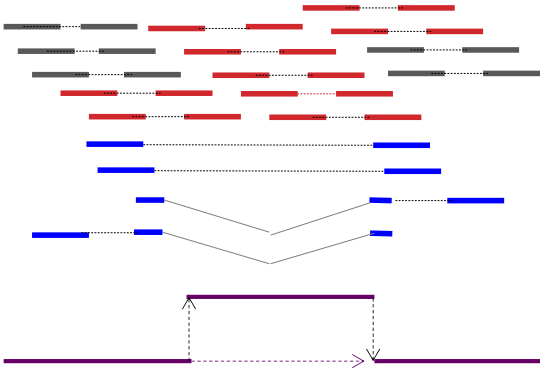
スコア＝ミスマッチに対するペナルティ



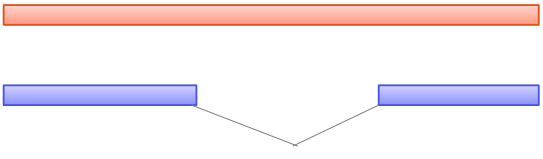
- default (best one　mode)
  条件を満たすアライメントを検索し、最高スコアのものを1つ出力
  （ただし、検索は完全でないので、最高スコアを取りこぼす可能性はある）
  上記の例では、BまたはD（どちらかがランダムに選ばれる）
- –k <int>
  条件を満たすアライメントを、見つかった順に指定した数だけ出力
  上記の例で、-k 2 のとき、左から順に見つかるとすると、AとB
  （実際には位置の順に見つかるわけではない）
- –a
  条件を満たすアライメントをすべて出力
  上記の例では、A,B,C,D,E
- –kや–aを指定したとき、最高スコアでないアライメントには9番目のフラグ(secondary alignment)に1がセットされる

（参考）デノボ・アセンブルによるRNA-Seq解析

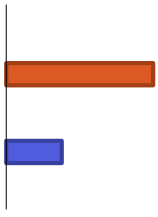
デノボ・アセンブルによる転写配列の構築



アセンブルされたトランスクリプト

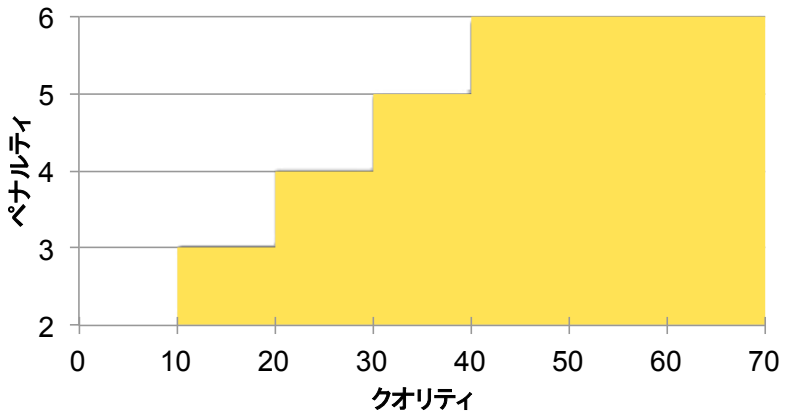


RSEM: 各バリアントの存在量の推定



（参考）Bowttie2における アライメントスコア

- マッチは0で、ミスマッチにマイナスのペナルティ（最高スコアが0点）
- ミスマッチペナルティは、クオリティ値に応じて –2 から –6 の値をとる（下図）
- あいまい塩基（N）のペナルティは –1
- ギャップペナルティは、ギャップの長さ *n* に対して – (5 + 3*n*)
- スコアのカットオフは、長さ*L*に対して –0.6(*L*+1)



マッピングクオリティ(MAPQ)

- マッピングクオリティ(MAPQ)値は以下の式で計算される。

$$MAPQ = -10\log_{10}(P_e)$$

ただし、P_eはリードが間違った位置にマップされている確率の推定値。

- MAPQは、リードがその位置にどの程度ユニークにマップされたかを示す指標であり、その位置でのアライメントスコアが、他のすべての位置におけるスコアよりずっと大きいときに大きくなる。
- Bowtie2のデフォルトでは同じスコアのアライメントが複数の位置で得られた場合、ランダムに一つの位置を出力し、MAPQに低い値を設定する。
- MAPQが低いアライメントの位置は信用できないので、下流の解析の際には捨てた方が良い場合もある。

Samtoolsを用いた MAPQによるフィルタリング

- samtools view –q 閾値　BAMファイル名

MAPQの値が閾値より小さい行を除く

例）MAPQが20以上の行のみを出力

```
$ samtools view –q 20 etec_bowtie2.bam
```

Bowtie2のオプション3 アライメントのモード

- `--end-to-end`　リード配列全長に渡るアライメント(default)

```
Read:      GACTGGGCGATCTCGACTTCG
           |||||  |||||||||| |||
Reference: GACTG--CGATCTCGACATCG
```

- `--local` リード配列のうち、類似度の高い一部の領域のみを抜き出してアラインしたもの

```
Read:      ACGGTTGCGTTAA-TCCGCCACG
                 ||||||||| ||||||
Reference: TAACTTGCGTTAAATCCGCCTGG
```

CIGAR文字列

- リードとリファレンス配列とのアライメントの詳細を表す。
- ギャップなしでアラインされている場合、*n*M （*n*はリード配列の長さ）となる。
- ギャップが入っている場合、*n*D（欠失）または*n*I（挿入） （*n*は挿入・欠失の長さ）が入る。

5M2D4M1I5M

```
ref   AGACGAGATTA-GCATG
       :  :::   :::: :: ::
read  ACACG--ATTAGGCTTG
```

- ローカルアライメントのとき、両端の除かれる部分は *n*Sで、またTopHatなどのスプライシングを考慮するアライメントにおいて、イントロンとしてスキップされるリファレンス配列上の領域は *n*Nで表される。

5S4M1I5M

```
ref   ACGGCTGATTA-GCATG
               :::: :: ::
read    taaccATTAGGCTTG
```

インデックスを使った高速検索
ハッシュテーブル

ゲノム配列

ACACGTTACGGT.....

リード配列

CGTTGCA

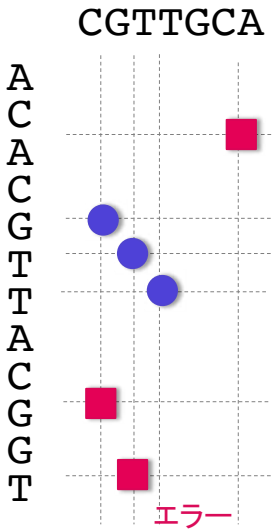
①インデックス作成

ハッシュテーブル
各2-merの出現位置を記録

2-mer	positions
AC	1,3,8
CA	2
CG	4,9
GG	10
GT	5,11
TA	7
TT	6

② インデックスを使った初期検索(seed検索)

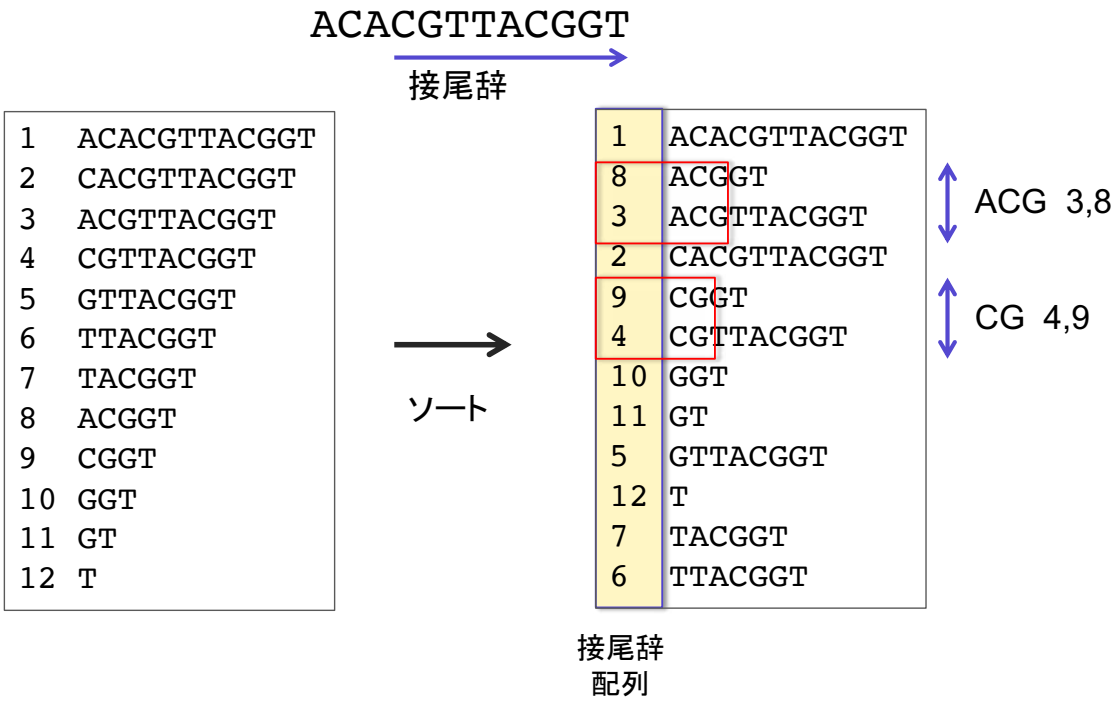
CGTTGCA



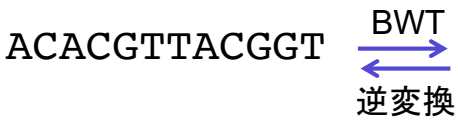
③ 見つかったseedを延長してアライメント

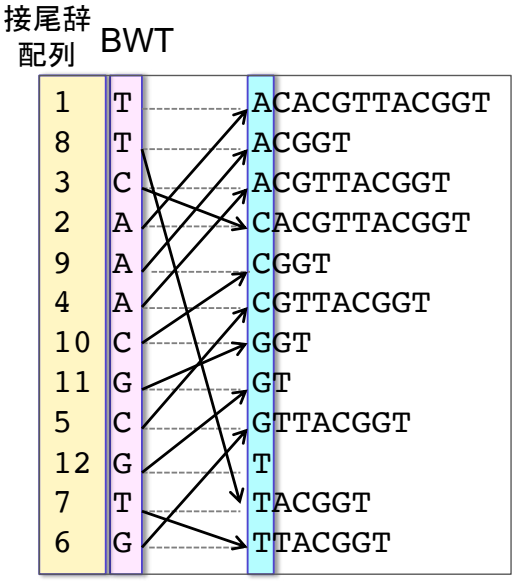
ACACGTTACGGT.....
CGTTGCA

インデックスを使った高速検索
接尾辞配列（**suffix array**）

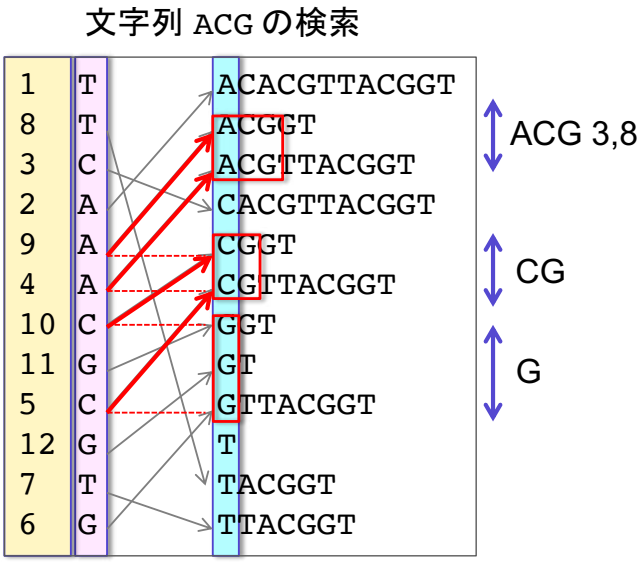


Burrows-Wheeler 変換 **(BWT)**に基づく
インデックス（**FM-Index**）



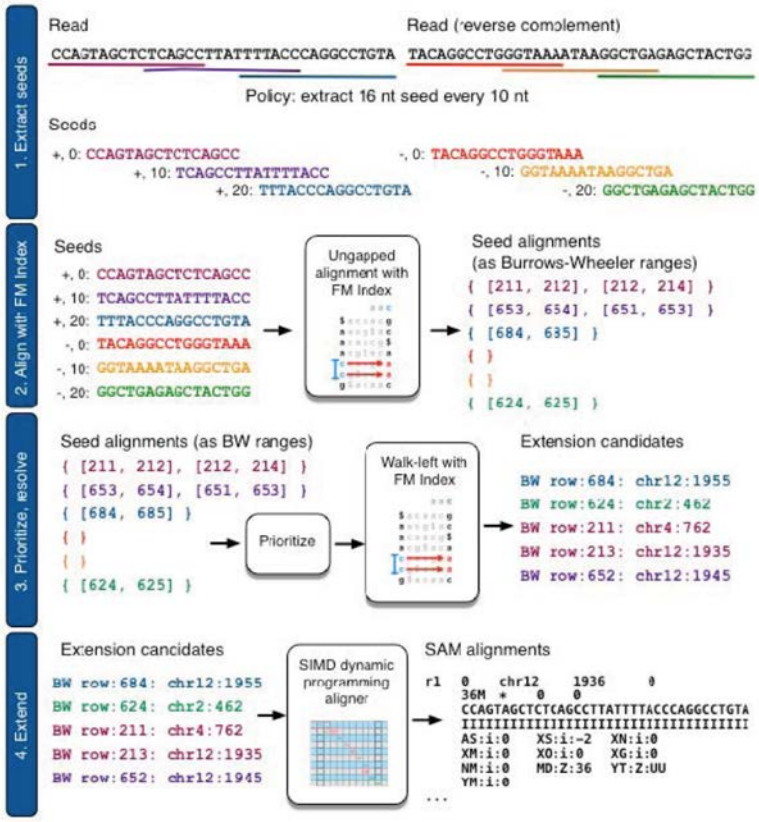


矢印（LF mapping）を辿って元の配列を再構築できる（逆変換）。



メモリ使用量、計算量とも効率のよい検索の実現

Bowtie2 アルゴリズムの詳細



1. Seed 配列の抽出
各リード配列およびその相補配列から *i* 塩基ごとに *L* 塩基の配列を抽出してseed配列とする（図では*i*=10, *L*=16)。

2. FM index を用いた検索
各seed配列がゲノム上に出現する位置がBW rangeとして得られる。最大1つのミスマッチを考慮した検索が可能。

3. ヒットの優先付け、位置の取得
BW rangeの幅が小さいヒットに高い優先度をつけて、ランダムに候補をピックアップし、ゲノム上の位置を取得。

4. アライメントの計算
得られた位置の周辺で、ギャップ入りのアライメントスコアを計算。これを各候補位置について繰り返して、最高スコアを与えるゲノム上の位置を出力。

Bowtie2のオプション4
検索の精度と速度に関するオプション

- `-N` *int* seed 検索時にミスマッチを許す数(0 or 1)
- `-L` *int* seed の長さ
- `-i` *func* seed をとる間隔（リード長を基に決める式を指定）
- `-D` *int* 最高スコアが更新されないときアライメント計算を打ち切るまでの回数
- `-R` *int* リードが高反復のseedをもつときにre-seedを行う最大回数

上記のオプションを同時に設定するpreset optionがある。高速（低感度）→高感度（低速）の順に4段階のオプションが用意されている。

- `end-to-end`モードの場合 (default: `sensitive`)
  `--very-fast` / `--fast` / `--sensitive` / `--very-sensitive`

- `local`モードの場合 (default: `sensitive-local`)
  `--very-fast-local` / `--fast-local` / `--sensitive-local` / `--very-sensitive-local`

（参考）HISAT2 スプライシング を考慮した高速マッピングツール

- スプライシングを考慮して、一つのリードをゲノム上で離れた箇所にまたがってマッピングする。
- global とlocalの2つのインデックスを2段階で用いることにより、高速かつ正確にスプライスされたアライメントを実現。