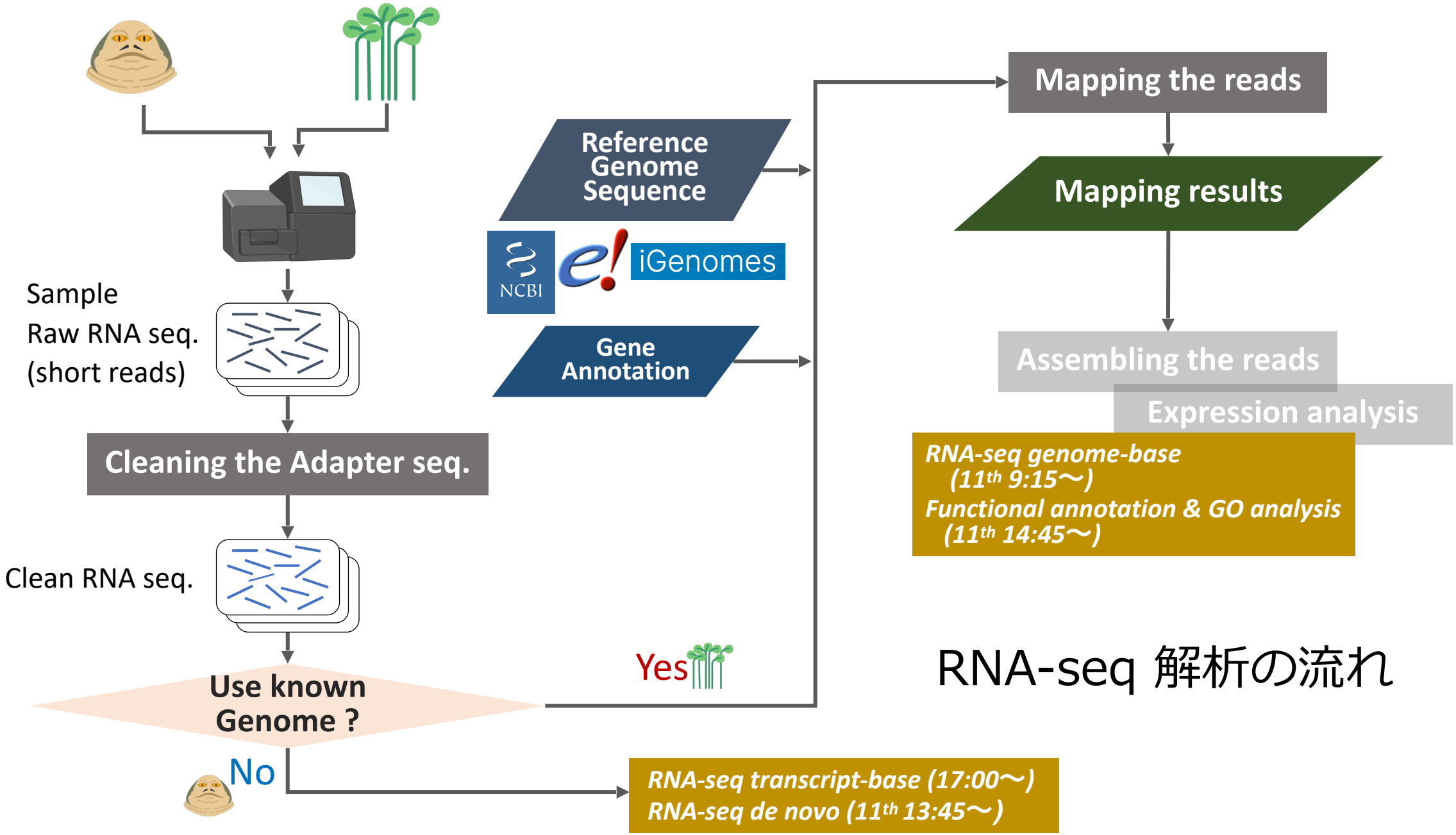
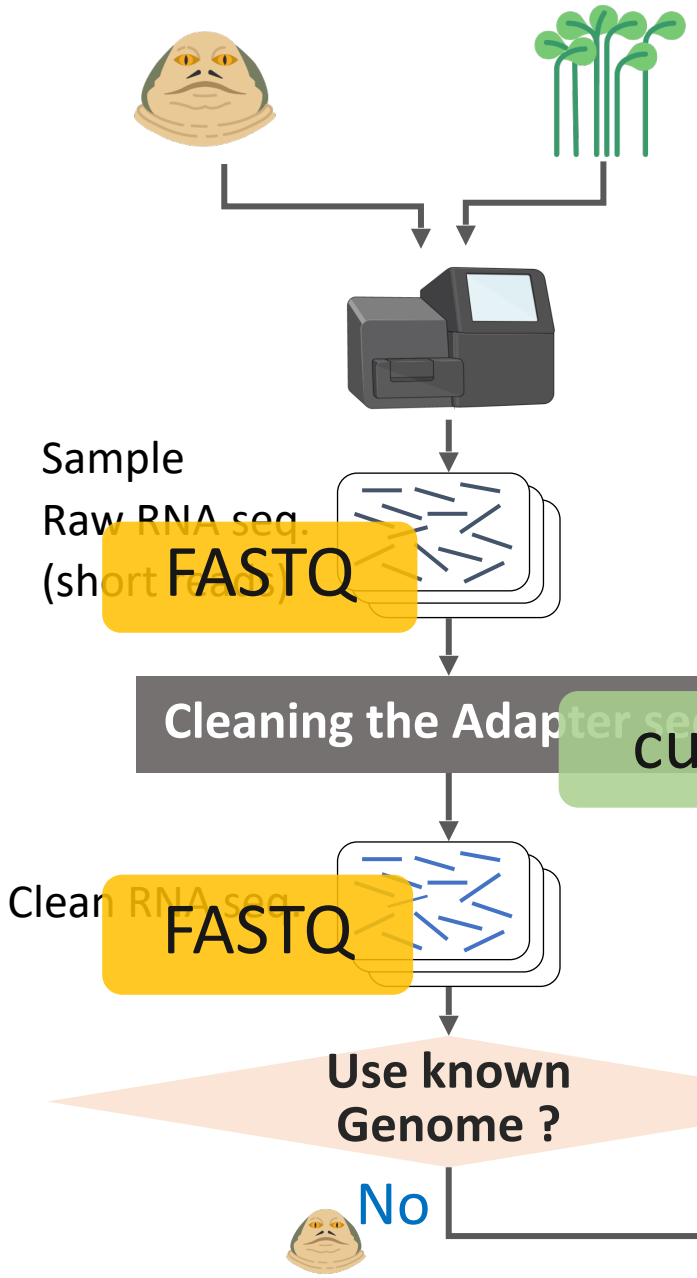
NGS 基本フォーマットとツール
復習と補足

基礎生物学研究所　情報管理解析室

西出 浩世 @piroyon



RNA-seq 解析の流れ



Sample
Raw RNA seq.
(short reads)

FASTQ

Cleaning the Adapter seq.

cutadapt

Clean RNA seq.

FASTQ

Use known Genome ?

Yes

No

FASTA

Reference Genome Sequence

NCBI

iGenomes

Gene Annotation

GFF3/GTF

bowtie2

Mapping the reads

Mapping results

SAM/BAM

Assembling the reads

Expression analysis

RNA-seq genome-base (11th 9:15～)
Functional annotation & GO analysis (11th 14:45～)

RNA-seq transcript-base (17:00～)
RNA-seq de novo (11th 13:45～)

RNA-seq 解析の流れ

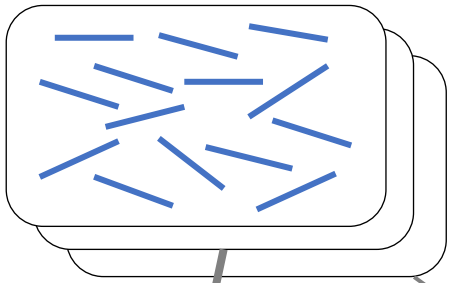
ショートリードのマッピングとデータのフォーマット

ゲノム（リファレンス ）配列

フォーマット（配列）

```
>chr
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCT
CTGTGTGGATTAAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGC
TTCTGAACTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTAAAA
TTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACTTTAACCAA
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAATTACAG
AGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
```

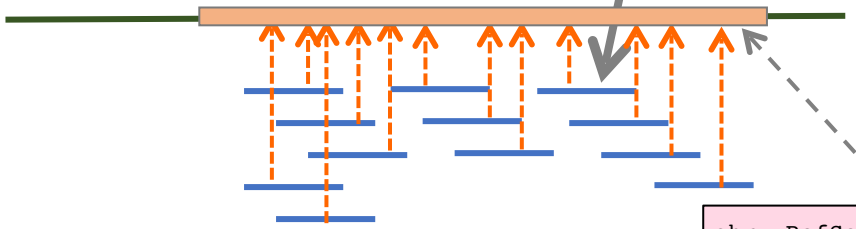
サンプル（リード） 配列



フォーマット（配列＋クオリティ値）

```
@SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
ATCCGGCTGGCGCACCGACCTATGTTCCGGGCGAATACAAGCTGGGTGAAG
+SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
@@@AD>DDFF7DC?FFEBF@DFII<DF@AAA6AEFBDBDCA?>A?B=>B::
@SRR1515276.2 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CACCGTGTAGTACCAGCATCCTGCGTACAATCAGCAATCCCAGTCCTCCCC
+SRR1515276.2 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CCCFFDFDFHDFFHIIIEGIHJJJJGFHGGHGGHGGIIJDGIJHHGGGHIH
@SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CAGGACATCGCCTTTGATCGGTTCAGACTTCGGACCAACCTGCATTTTCAG
+SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CCCFFFDFAFHFHIJGHIJIJJIJJHEHIIJGHIFEHIIA@FIFHGGIIGI
```

リファレンス配列へのマッピング



クオリティチェック

アダプター除去

```
chr   RefSeq   start_codon   190   192   1.000   +   .   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr   RefSeq   CDS           190   252   1.000   +   0   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr   RefSeq   stop_codon    253   255   1.000   +   .   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr   RefSeq   exon          190   255   1.000   +   .   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
```

フォーマット（遺伝子アノテーション）

フォーマット（マッピング結果）

```
@HD          VN:1.0       SO:unsorted
@SQ          SN:chr       LN:4639675
@PG          ID:bowtie2   PN:bowtie2   VN:2.2.4     CL:"/bio/bin/bowtie2-alig
SRR1515276.40              0   chr     4423609      42   51M   *  0   0   GGAATTCCTCACTGCCA
SRR1515276.158             16  chr     501700       42   51M   *  0   0   ACGCACCGAGTGCAAAG
SRR1515276.212             4   *       0            0    *     *  0   0   GGCCGCTTTCAGCGTGT
SRR1515276.319             0   chr     2922768      42   51M   *  0   0   GCTTAAGTTGATTAAGG
SRR1515276.367             16  chr     2753873      42   51M   *  0   0   GCGTGTCCGTCCGCAGC
SRR1515276.411             0   chr     3440721      42   51M   *  0   0   ACGGCATAATTTCTTGA
SRR1515276.434             0   chr     4198737      42   51M   *  0   0   GCGCGGTACGCATCTGG
```

バイナリ化

フォーマット（マッピング結果）

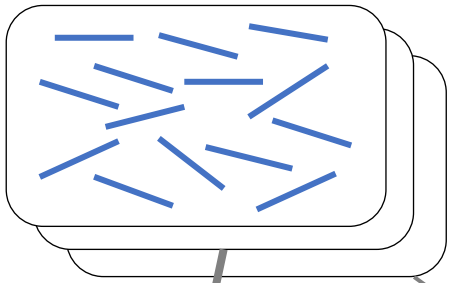
ショートリードのマッピングとデータのフォーマット

ゲノム（リファレンス ）配列

FASTAフォーマット（配列）

```
>chr
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCT
CTGTGTGGATTAAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGC
TTCTGAACTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTAAAA
TTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACTTTAACCAA
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAATTACAG
AGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
```

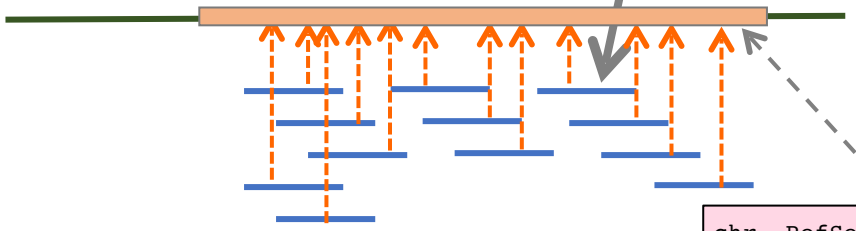
サンプル（リード） 配列



FASTQ フォーマット（配列＋クオリティ値）

```
@SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
ATCCGGCTGGCGCACCGACCTATGTTCCGGGCGAATACAAGCTGGGTGAAG
+SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
@@@AD>DDFF7DC?FFEBF@DFII<DF@AAA6AEFBDBDCA?>A?B=>B::
@SRR1515276.2 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CACCGTGTAGTACCAGCATCCTGCGTACAATCAGCAATCCCAGTCCTCCCC
+SRR1515276.2 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CCCFFDFDFHDFFHIIIEGIHJJJJGFHGGHGGHGGIIJDGIJHHGGGHIH
@SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CAGGACATCGCCTTTGATCGGTTCAGACTTCGGACCAACCTGCATTTTCAG
+SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CCCFFFDFAFHFHIJGHIJIJJIJJHEHIIJGHIFEHIIA@FIFHGGIIGI
```

リファレンス配列へのマッピング



クオリティチェック

アダプター除去

```
chr   RefSeq   start_codon   190   192   1.000   +   .   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr   RefSeq   CDS           190   252   1.000   +   0   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr   RefSeq   stop_codon    253   255   1.000   +   .   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr   RefSeq   exon          190   255   1.000   +   .   gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
```

GTF (GFF3) フォーマット
（遺伝子アノテーション）

SAM フォーマット（マッピング結果）

```
@HD          VN:1.0        SO:unsorted
@SQ          SN:chr        LN:4639675
@PG          ID:bowtie2    PN:bowtie2    VN:2.2.4      CL:"/bio/bin/bowtie2-alig
SRR1515276.40              0    chr      4423609       42    51M    *  0     0      GGAATTCCTCACTGCCA
SRR1515276.158             16   chr      501700        42    51M    *  0     0      ACGCACCGAGTGCAAAG
SRR1515276.212             4    *        0             0     *      *  0     0      GGCCGCTTTCAGCGTGT
SRR1515276.319             0    chr      2922768       42    51M    *  0     0      GCTTAAGTTGATTAAGG
SRR1515276.367             16   chr      2753873       42    51M    *  0     0      GCGTGTCCGTCCGCAGC
SRR1515276.411             0    chr      3440721       42    51M    *  0     0      ACGGCATAATTTCTTGA
SRR1515276.434             0    chr      4198737       42    51M    *  0     0      GCGCGGTACGCATCTGG
```

バイナリ化

BAM フォーマット
（マッピング結果）

復習：cutadaptによる アダプター配列の除去

実習用ディレクトリ　~/gitc/data/HN

入力

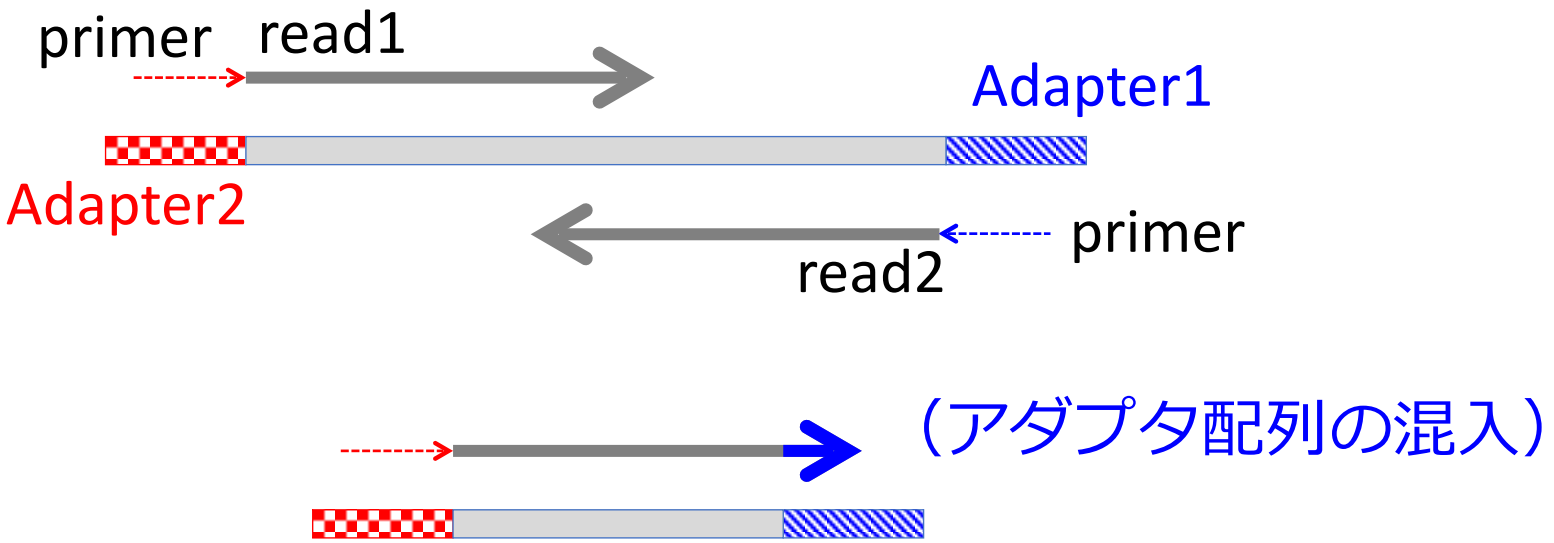
- ショートリード配列（FASTQ フォーマット, paired-end）
  - **etec_1.fq**
  - **etec_2.fq**
- アダプター配列　（それぞれを3'端から除去）
  - Adapter1: AGATCGGAAGAGCGGTT
  - Adapter2: AGATCGGAAGAGCGTCG

◆アダプター配列除去の実行

除去後のデータ（FASTQフォーマット）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。

リード　　アダプター

復習：bowtie2 用インデックスの作成

実習用ディレクトリ　~/gitc/data/HN

bowtie2でマッピングをするには、リファレンスゲノム配列にインデックスが必要

入力

- ゲノム配列　（FASTAフォーマット）

  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** とする）

```
$ bowtie2-build eco_o139.fa etec
```

復習：bowtie2の実行 (paired-end)

実習用ディレクトリ　~/gitc/data/HN

入力

- ショートリード配列（FASTQフォーマット, paired-end, アダプター除去済）

  etec_1.cut.fq

  etec_2.cut.fq

- リファレンスゲノム配列のインデックス名　（先ほど作ったもの）

  etec

◆bowtie2によるマッピングの実行（結果ファイル：**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フォーマット)

ヘッダ（@で始まる）

```
@HD     VN:1.0  SO:unsorted
@SQ     SN:ETEC_chr     LN:4979619
@SQ     SN:pETEC_80     LN:79237
@SQ     SN:pETEC_35     LN:34367
@SQ     SN:pETEC_73     LN:70609
@SQ     SN:pETEC_6      LN:6199
@SQ     SN:pETEC_74     LN:74224
@SQ     SN:pETEC_5      LN:5033
@PG     ID:bowtie2      PN:bowtie2      VN:2.3.0        CL:"/bio/bin/bowtie2-align-s --wrapper basic-0 -x etec -S etec_bowtie2.sam -1 etec_1.cut.fq -2 etec_2.cut.fq"
SRR345261.25    89      ETEC_chr        3758170 1       49M     =       3758170 0       ACACGCGGCATGGCTG...     ###?ED>EBDBDDE,E...     AS:i:-1 XS:i:-1 XN:i:0  XM:i:1  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:1  MD:Z:24T24      YT:Z:UP
SRR345261.25    133     ETEC_chr        3758170 0       *       =       3758170 0       NNNNNNNNNNNNNNNN...     ################...     YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.50    73      ETEC_chr        4361458 1       49M     =       4361458 0       CAAGCGTTAATCGGAA...     :HEGDFHHHH@BGG=B...     AS:i:0  XS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YT:Z:UP
SRR345261.50    133     ETEC_chr        4361458 0       *       =       4361458 0       NNNNNNNATNNNNNNN...     ################...     YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.75    73      ETEC_chr        4362922 1       49M     =       4362922 0       CGGTGGATGCCCTGGC...     DDDDBD6<B>DB>BB>1>>     AS:i:-2 XS:i:-2 XN:i:0  XM:i:1  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:1  MD:Z:37T11      YT:Z:UP
SRR345261.75    133     ETEC_chr        4362922 0       *       =       4362922 0       NNNNNNTTTNNNTCGG...     ################...     YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.100   73      ETEC_chr        679991  42      49M     =       679991  0       GTGGTTTAATGAGTCC...     GGGGGGGGB=ED=EEG...     AS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YT:Z:UP
SRR345261.100   133     ETEC_chr        679991  0       *       =       679991  0       NNNNNNCACCGNTAGT...     ################...     YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.125   73      ETEC_chr        4376280 42      49M     =       4376280 0       CTCAGGATGAGGGTCA...     EEEE=B<<@BDEEDE:...     AS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YT:Z:UP
SRR345261.125   133     ETEC_chr        4376280 0       *       =       4376280 0       NNNNNTTTTCCNTTAG...     ################...     YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.150   89      ETEC_chr        779844  42      49M     =       779844  0       TTCAGGAAACCCTGAA...     B@8D>ECC?BG@ECC>...     AS:i:-5 XN:i:0  XM:i:1  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:1  MD:Z:43T5        YT:Z:UP
SRR345261.150   133     ETEC_chr        779844  0       *       =       779844  0       CNCNGGAGTACNTTGA...     ################...     YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.175   83      ETEC_chr        3605306 42      49M     =       3605113 -242    CCGCTTGCGCGGGCCA...     EDE<8??;??@DGGDDE...     AS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YS:i:-3 YT:Z:CP
SRR345261.175   163     ETEC_chr        3605113 42      49M     =       3605306 242     CCGGGTTCTGTCGTGG...     DGGDGFDGGGGGGEGD...     AS:i:-3 XN:i:0  XM:i:3  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:3  MD:Z:38A6C2T0    YS:i:0  YT:Z:CP
SRR345261.200   77      *               0       0       *       *       0       0       AAAAAAAAAAAAAAAA...     ################...     YT:Z:UP
SRR345261.200   141     *               0       0       *       *       0       0       AAAAAAAAAAAAAAAA...     8@###############...     YT:Z:UP
SRR345261.225   83      ETEC_chr        2879707 1       49M     =       2879600 -156    CACAACACGAGCTGAC...     8?D8BEBGD@GG8GCE...     AS:i:0  XS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YS:i:-1 YT:Z:CP
SRR345261.225   163     ETEC_chr        2879600 1       49M     =       2879707 156     CCCACCTTCCTCCAGT...     GGGBGDEGGG@GG<G8...     AS:i:-1 XS:i:-1 XN:i:0  XM:i:1  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:1  MD:Z:45G3        YS:i:0
YT:Z:CP
SRR345261.250   99      ETEC_chr        4361346 1       49M     =       4361525 228     GTACTTTCAGCGGGGA...     ECE=>EC?FDG<EGDA...     AS:i:0  XS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YS:i:0  YT:Z:CP
SRR345261.250   147     ETEC_chr        4361525 1       49M     =       4361346 -228    CCGGGCTCAACCTGGG...     ##############BC...     AS:i:0  XS:i:0  XN:i:0  XM:i:0  XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:49 YS:i:0  YT:Z:CP
```

同じ名前のリード＝ペアエンドのリード対

FLAG

マップされた染色体と位置（* はマップされなかった）

MAPQ

CIGAR

ペアの相手がマップされた染色体（同じなら=）と位置、フラグメントの長さ（右側のリードは負値）

リード配列

配列クオリティ値

オプション

AS	アライメントスコア
XS	他の位置でのベストスコア
YF	リードがfiltering out された理由

復習：SAMからBAMへの変換

実習用ディレクトリ　~/gitc/data/HN

人が読めるテキストデータのSAMから、コンピュータが扱い易いBAM（圧縮したバイナリデータ）へ変換する

入力

- SAMフォーマットファイル （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 (結果ファイル：**etec_bowtie2.bam**)

```
$ samtools view –b  etec_bowtie2.sam –o 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 view –h etec_bowtie2.bam | less
```

復習：BAMのインデックス作成と検索

実習用ディレクトリ　~/gitc/data/HN

BAMフォーマットファイルを扱いやすくするためにソートし、インデックスを作成する

入力

•BAMフォーマットファイル （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

（結果ファイル：**etec_bowtie2_sorted.bam**）

```
$ samtools sort etec_bowtie2.bam –o etec_bowtie2_sorted.bam
```

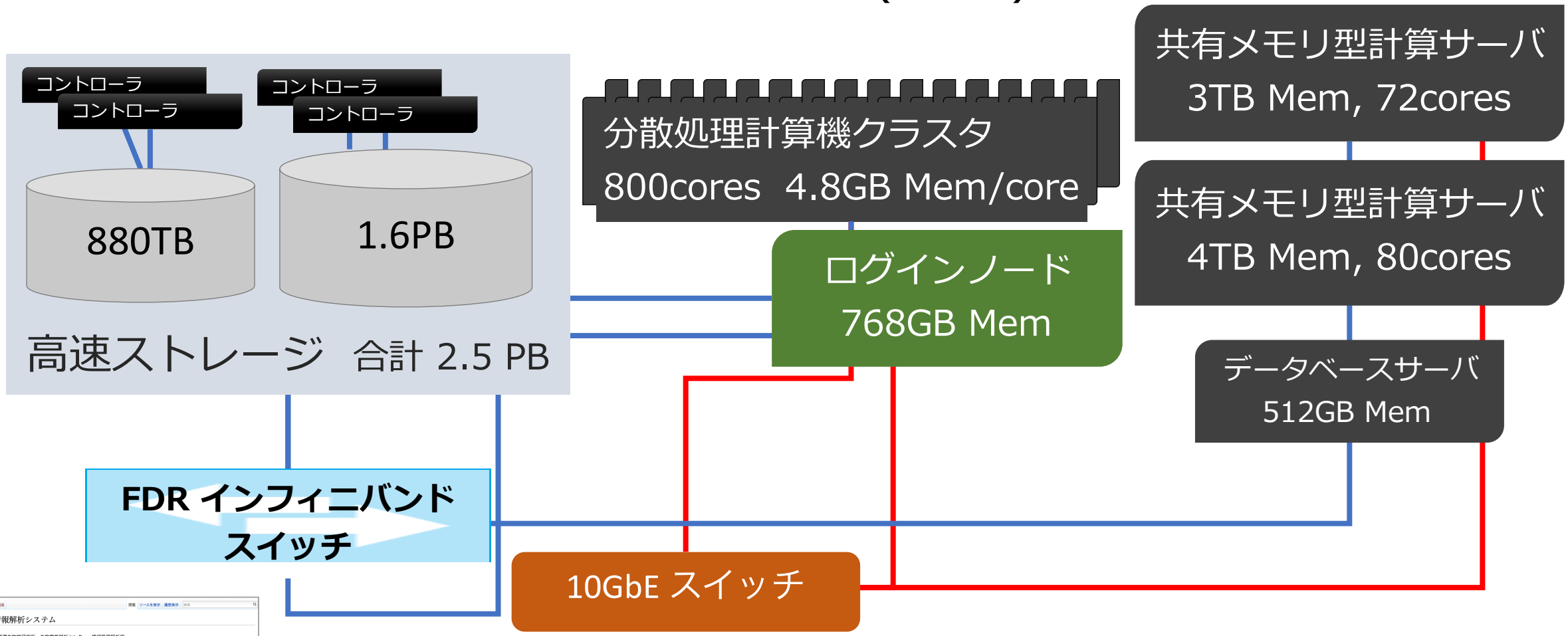
◆ソートされたBAMファイルに対してインデックスを作成する（.baiファイルができる）

```
$ samtools index 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 view etec_bowtie2_sorted.bam ETEC_chr:10000-12000
```

生物情報解析システム (bias5)



生物情報解析システムWiki　http://www.nibb.ac.jp/cproom/wiki3

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、元の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。

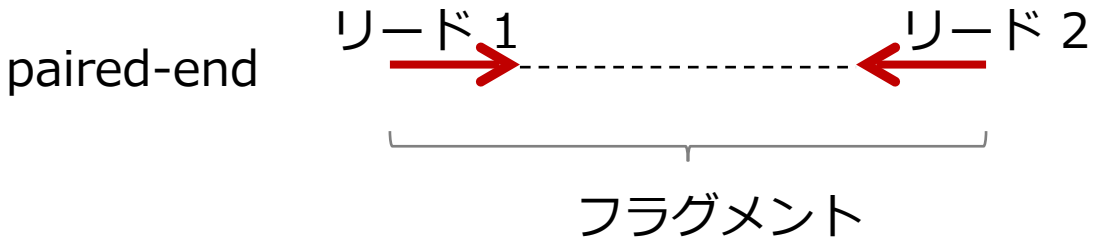
```
$ samtools fastq etec_bowtie2.bam -1 r1.fq -2 r2.fq
```

- 個々のリード配列を記録する代わりに、リファレンス配列を参照して、各リードの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
```

Bowtie2のオプション1

ペアエンドリード対の検索



- **`-I`** ***`min_length`*** フラグメント長の最小値 (default: `0`)
- **`-X`** ***`max_length`*** 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。

マッピング結果のフラグ (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 を使ったフラグ値についての確認

```
$ 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）

- `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

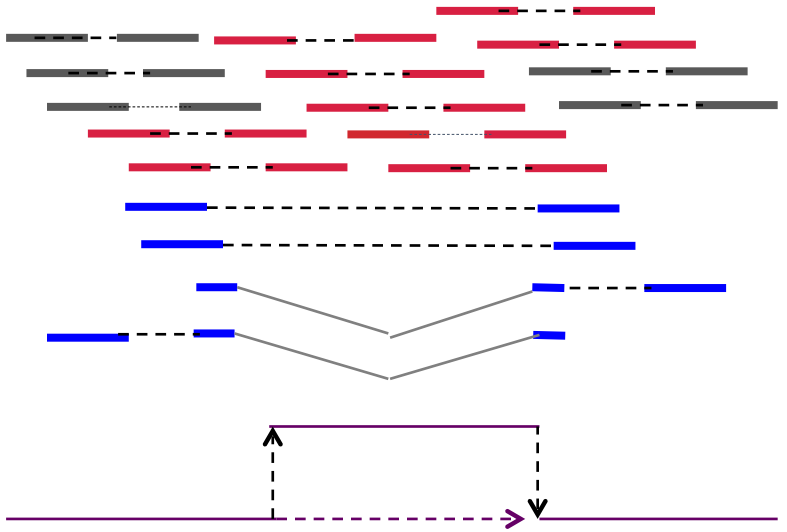
Bowtie2におけるスコア ＝
ミスマッチに対するペナルティ

- 一般に、1つのリードは複数の箇所にマップされる。

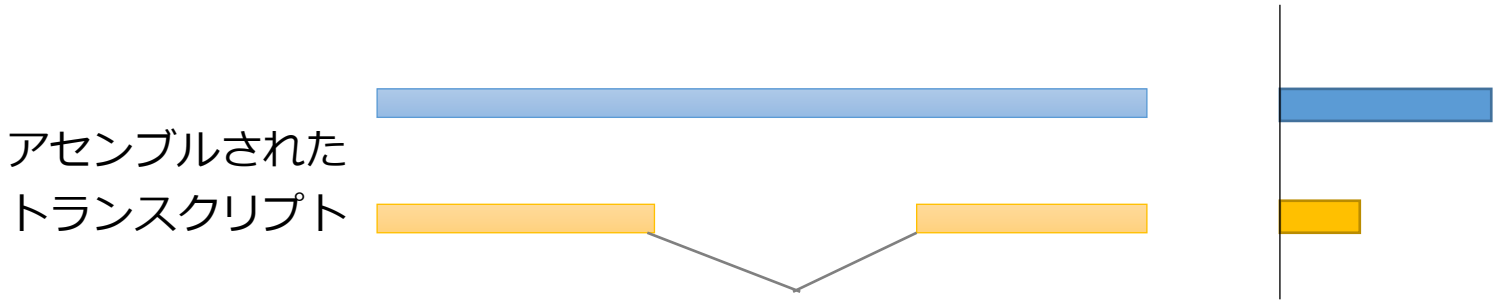
- `default` (best one mode)
  条件を満たすアライメントを検索し、最高スコアのものを１つ出力
  （ただし、検索は完全でないので、最高スコアを取りこぼす可能性はある）
  上記の例では、BまたはD （どちらかがランダムに選ばれる）
- **`-a`** 条件を満たすアライメントをすべて出力　上記の例では、A,B,C,D,E
- **`-k`** *`num_of_alignment`*
  条件を満たすアライメントを、見つかった順に指定した数だけ出力
  上記の例で、**`-k 2`** のとき、左から順に見つかるとすると、AとBが出力される
  （実際には位置の順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



RSEM: 各バリアントの存在量の推定



一つのリードを複数のトランスクリプトにマップした上で存在量を推定する　→

–a オプションを指定（または**–k**で大きい値を指定）

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。

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

- 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MAPQによるフィルタリング

- `samtools view –q` 閾値 BAMファイル

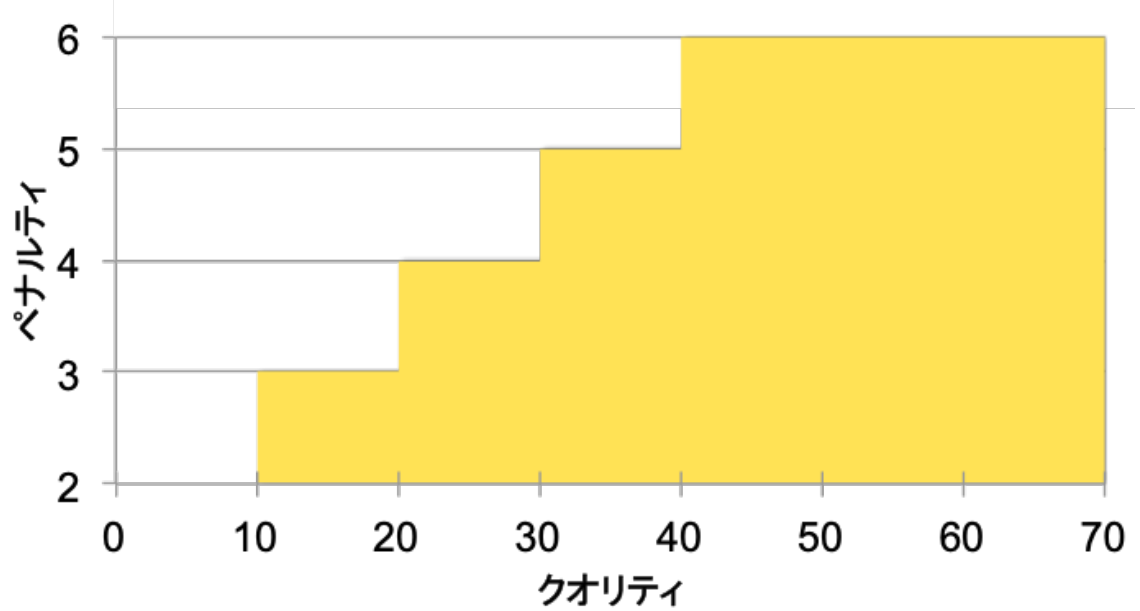
  MAPQの値が閾値より小さい行を除く

例）MAPQが20以上の行のみを出力

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

（参考）Bowtie2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（最高スコアは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 $-(5 + 3n)$
- スコアのカットオフは、長さLに対して $-0.6(L+1)$



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*は欠失/挿入長さ）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.....

①インデックス作成

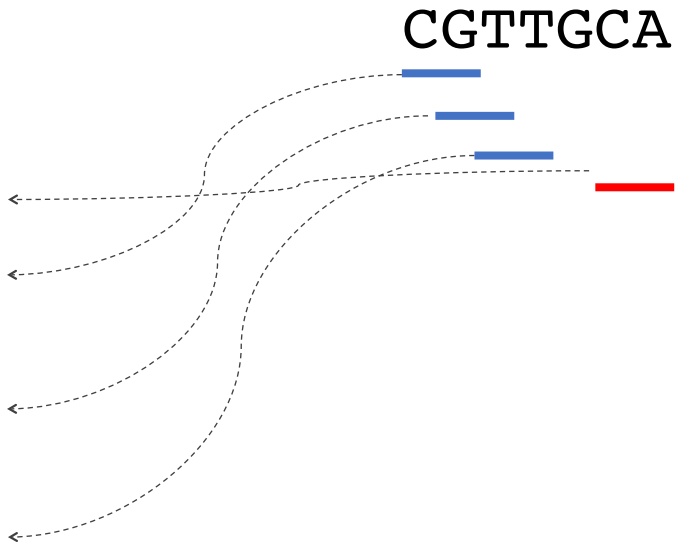
ハッシュテーブル
各2-merの出現位置を記録

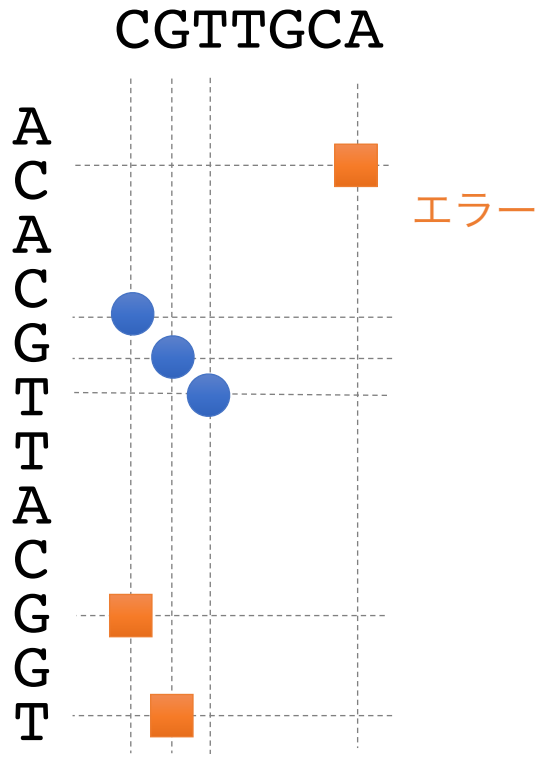
2-mer	positions
AC	1,3,8
CA	2
CG	4,9
GG	10
GT	5,11
TA	7
TT	6

リード配列

CGTTGCA

② インデックスを使った初期検索(seed検索)



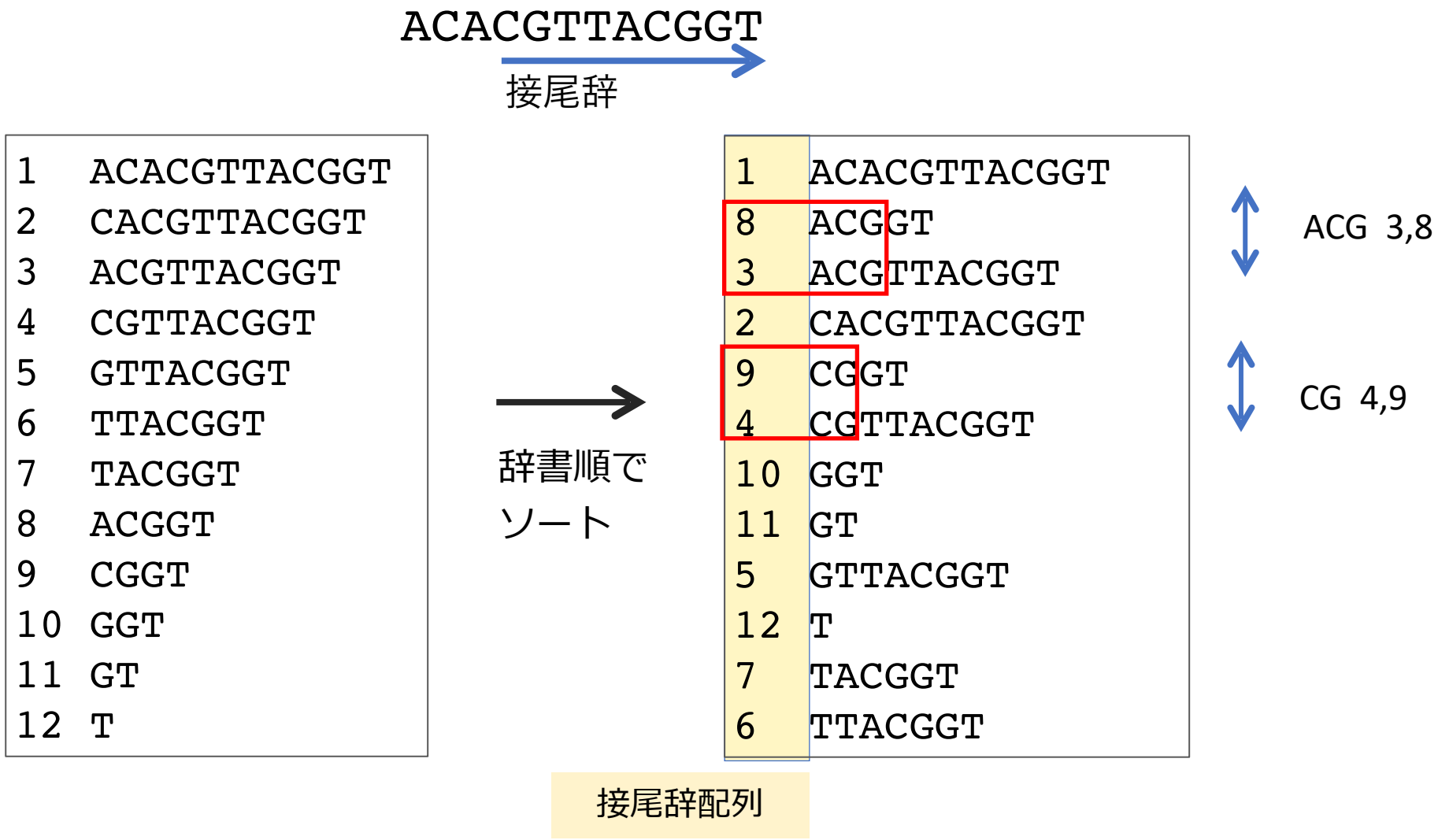


③ 見つかったseedを延長してアライメント

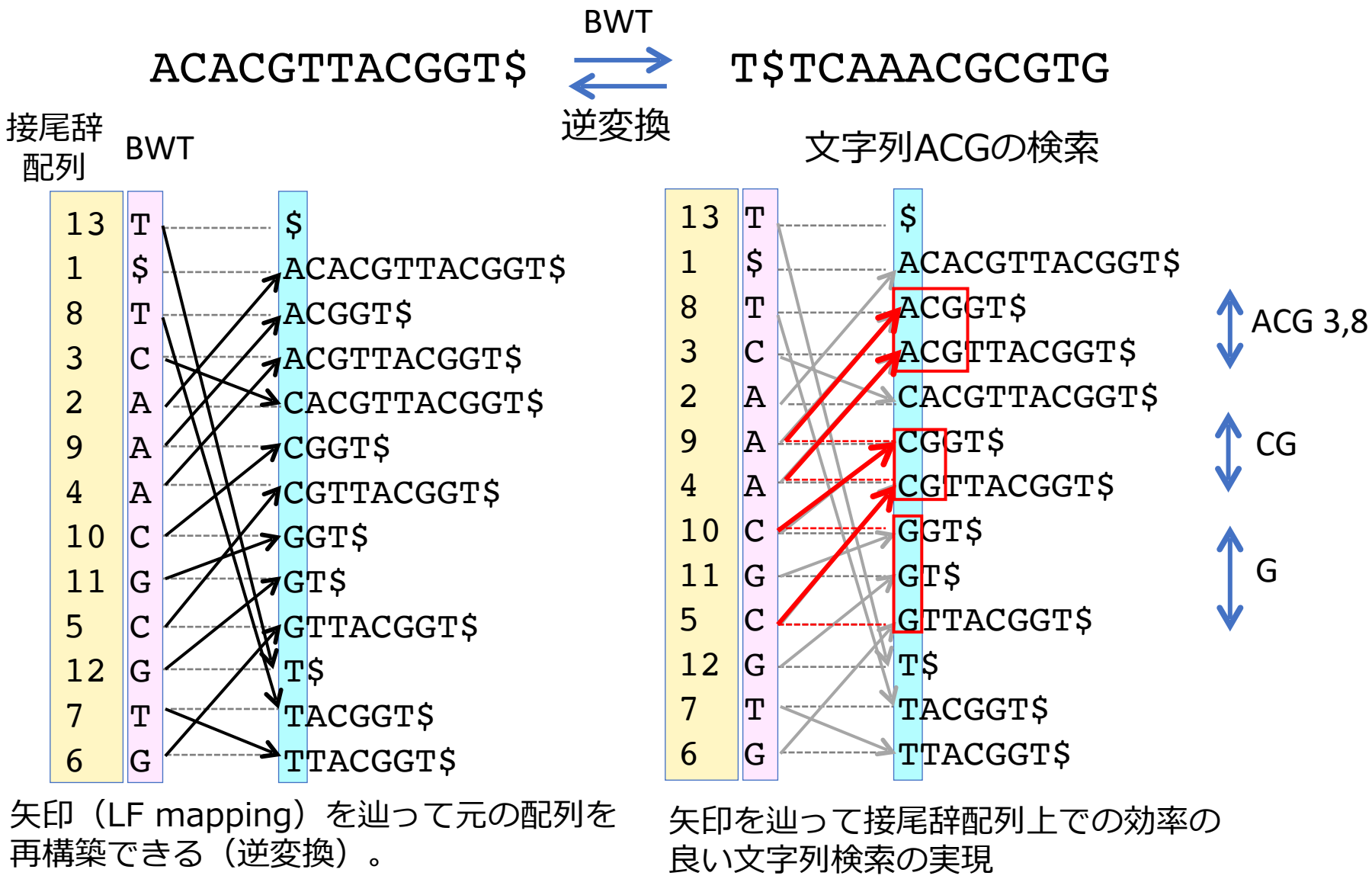
ACACGTTACGGT.....
CGTTGCA

インデックスを使った高速検索

接尾辞配列（suffix array）



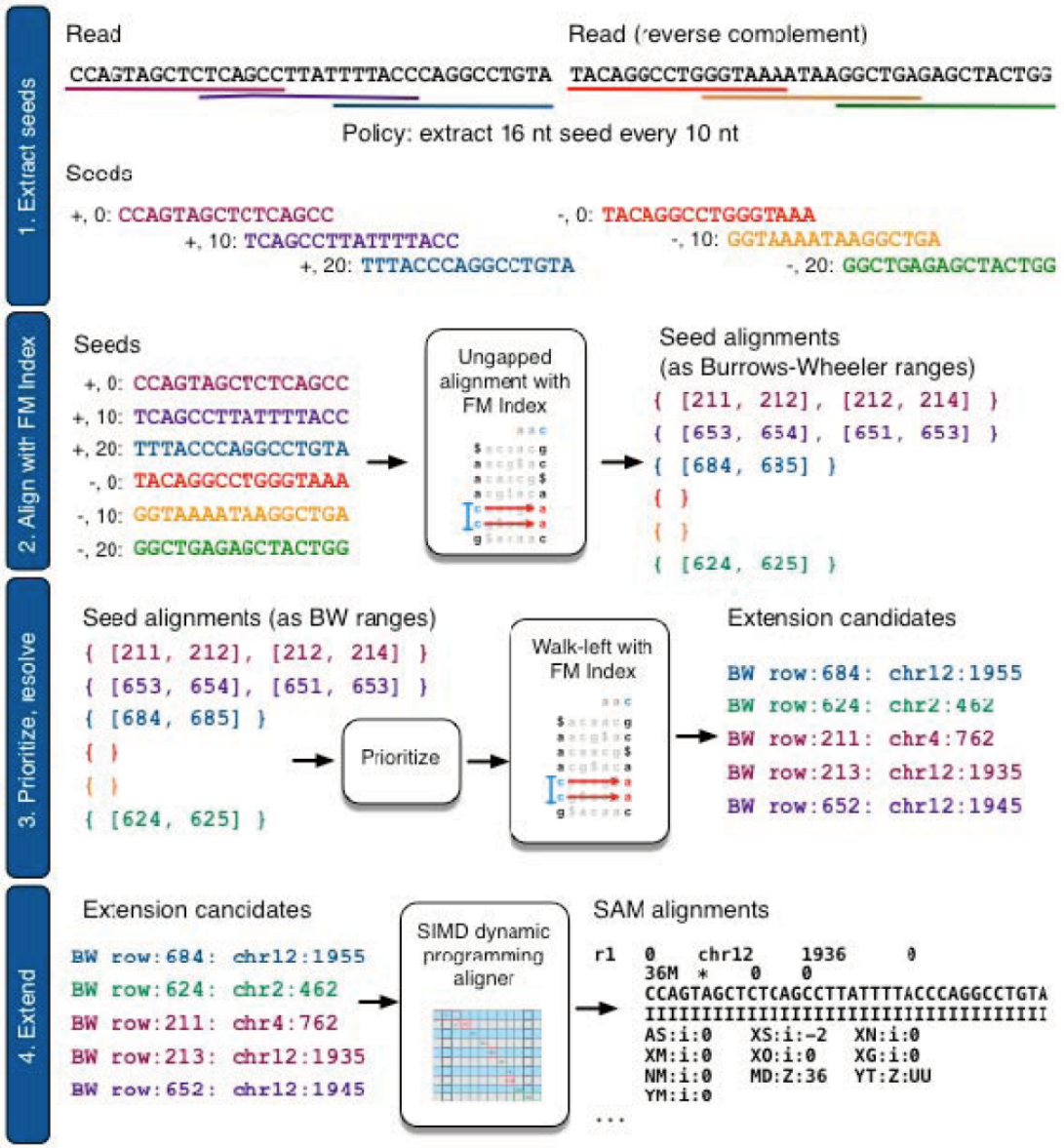
Burrows-Wheeler 変換 (BWT)に基づくインデックス（FM-Index）



矢印（LF mapping）を辿って元の配列を再構築できる（逆変換）。

矢印を辿って接尾辞配列上での効率の良い文字列検索の実現

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`