

RNA-seq解析 基本フォーマットとツール

Basic Formats and Tools of RNA-seq analysis

NIBB

2023 Genome Informatics Training Course

Hiroyo NISHIDE🐱 (hiroyo@nibb.ac.jp, @piroyon🐦🐙)

Remote login & file transfer

Remote login to bias.nibb-gitc.link

- log in

```
$ ssh courseXX@bias5.nibb.ac.jp
```

- log out

```
$ exit
```

「courseXX」 is
your account

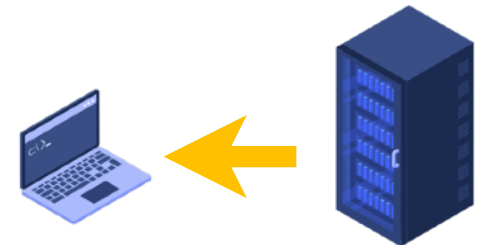
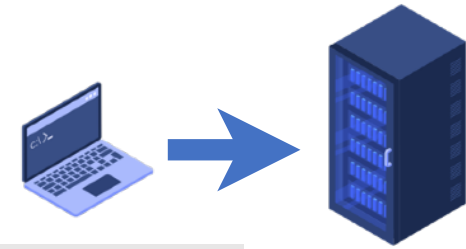
File transfer (optional)

- Your machine to bias5.nibb.ac.jp (~directory)

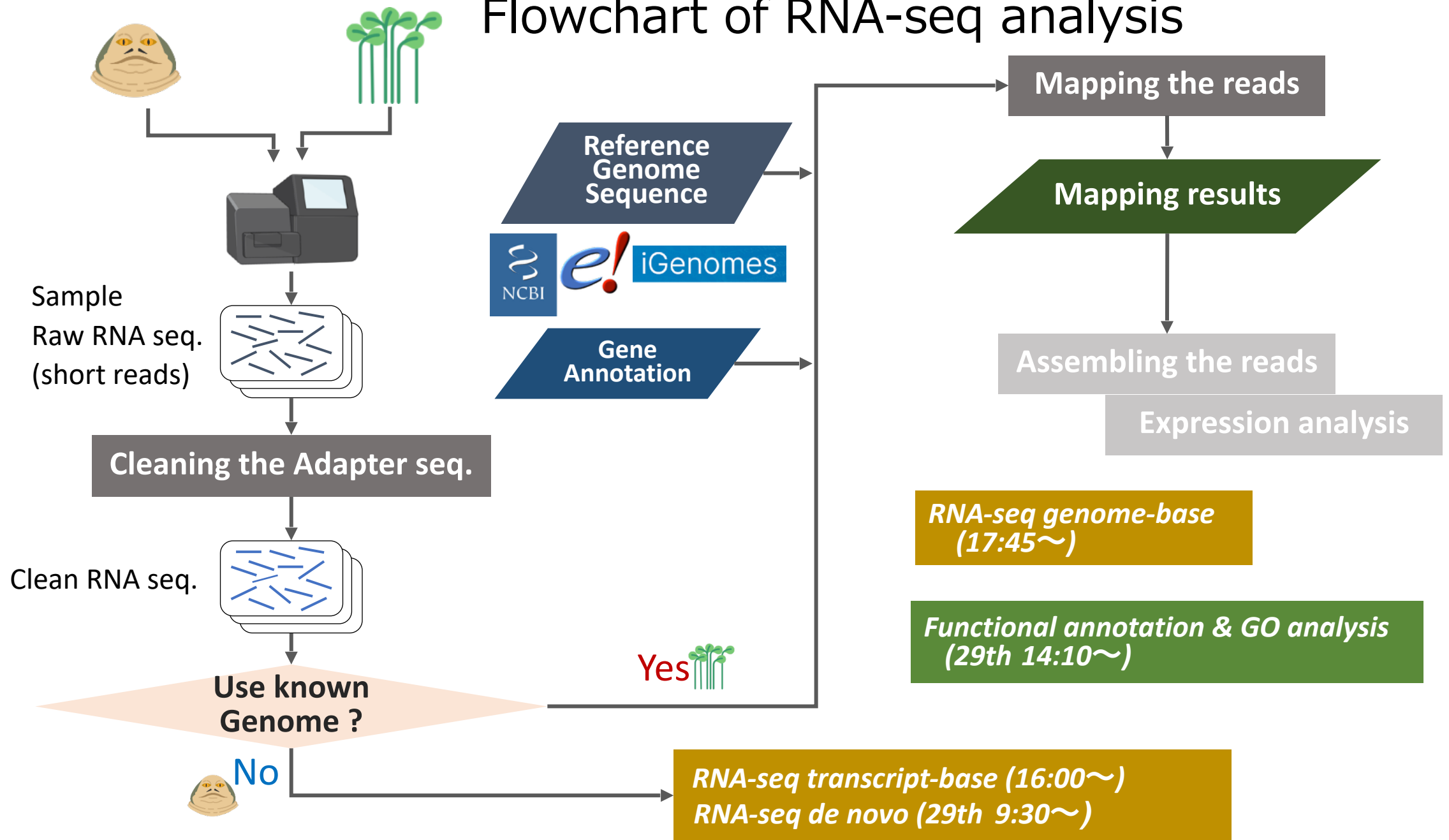
```
$ scp file courseXX@bias5.nibb.ac.jp:~/directory
```

- bias5.nibb.ac.jp (~directory/file) to your machine (.)

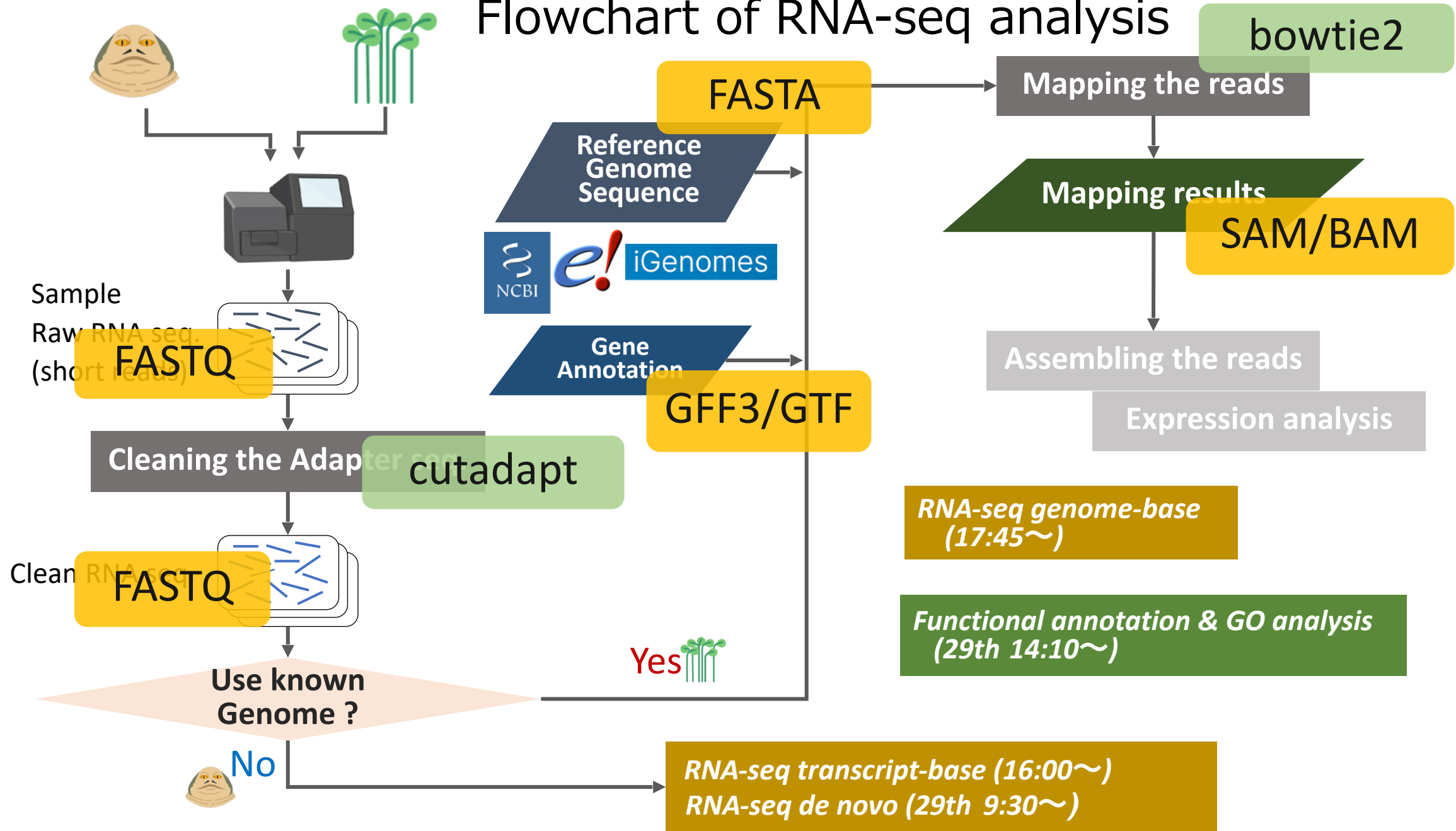
```
$ scp courseXX@bias5.nibb.ac.jp:directory/file .
```



Flowchart of RNA-seq analysis



Flowchart of RNA-seq analysis



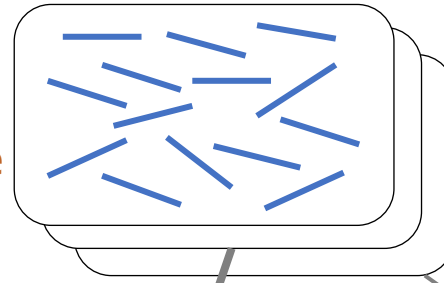
Short Read Mapping & Data Format

Genome (Reference) sequence
format (Sequence)

```
>chr
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCT
CTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGC
TTCTGAACCTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAA
TTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACTTTAACC
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAATTACAG
AGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
```

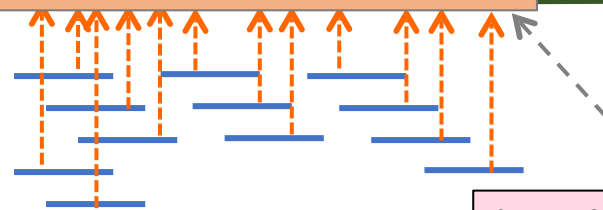
Short read sequence
format (Sequence + Quality)

Sample



```
@SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
ATCCGGCTGGCGCACCGACCTATGTTCGGGCGCAATACAAGCTGGGTGAAG
+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
CCCFDFDFHDFHIIIEGIHJJJGFGHGGHGGHGGIJDGIJHHGGGHHI
@SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CAGGACATCGCCTTTGATCGGTTTCAGACTTCGGACCAACCTGCATTTTCAG
+SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CCCFDFDFAFHFHIIJGHIJIIJIIJHEHIIJGHIFEHIIA@FIFHGGIIGI
```

Mapping to a reference seq.



Quality control
Adapter removal

format (Result of mapping)

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";

format
(Gene annotation)

```
@HD VN:1.0 SO:unsorted
@SQ SN:chr LN:4639675
@PG ID:bowtie2 PN:bowtie2 VN:2.2.4 CL:"/bio/bin/bowtie2-align
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 ACGGCATAATTCTTGA
SRR1515276.434 0 chr 4198737 42 51M * 0 0 GCGCGGTACGCATCTGG
```

Binary
digitization

format
(Result of mapping)

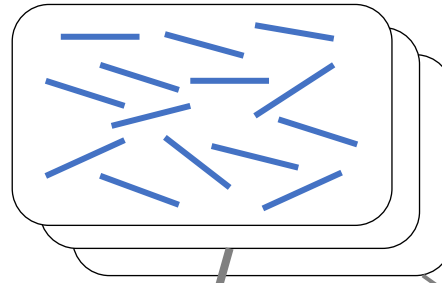
Short Read Mapping & Data Format

Genome (Reference) sequence
FASTA format (Sequence)

```
>chr
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCT
CTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGC
TTCTGAACCTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAA
TTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACTTTAACCBA
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAATTACAG
AGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
```

Short read sequence

Sample



FASTQ format (Sequence + Quality)

```
@SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
ATCCGGCTGGCGCACCGACCTATGTTCGGGCGAATACAAGCTGGGTGAAG
+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
CACCGTGTAGTACCAGCATCCTGCGTACAATCAGCAATCCCAGTCCCTCCCC
+SRR1515276.2 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CCCFDFDFHDFHIIIEGIHJJJGFHGGHGGHGGIJDGIJHHGGGHHI
@SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CAGGACATCGCCTTTGATCGGTTTCAGACTTCGGACCAACCTGCATTTTCAG
+SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CCCFDFDFHDFHIIJGHIJJJJJHEHIIJGHIFEHIIA@FIFHGGIIGI
```

Mapping to a reference seq.

Quality control
Adapter removal

SAM format (Result of mapping)

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";

```
@HD      VN:1.0      SO:unsorted
@SQ      SN:chr    LN:4639675
@PG      ID:bowtie2 PN:bowtie2  VN:2.2.4  CL:"/bio/bin/bowtie2-align
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 ACGGCATAATTCTTGA
SRR1515276.434 0 chr 4198737 42 51M * 0 0 GCGCGGTACGCATCTGG
```

GTF (GFF3) format
(Gene annotation)

Binary
digitization

BAM format
(Result of mapping)

解析を実行する前に：

UNIXコマンド実行の基本形

```
ls -l gbrel.txt
```

コマンド/
プログラム名

オプション
コマンドの動作を
変えるスイッチ

オペランド
ファイルなど コマン
ドが処理する対象

引数

一般的な解析プログラム実行例

実行プログラム名

```
bowtie2 -x etec -U mydata.fq -S etec_bowtie2.sam
```

マップ先データベース指定

データベース名

マップ元 fastq
ファイル指定
(Single end)

fastqファイル名

出力フォーマット指定
(sam)

出力するファイル名

使い方、指定可能なオプションの確認

コマンドライン上でヘルプの参照

- プログラム名の後ろに **-help --help -h** などをつけて実行してみる
- オプション無しで実行してみる

```
$ bowtie2 -h
Bowtie 2 version 2.4.5 by Ben Langmead (langmea@cs.jhu.edu, www.cs.jhu.edu/~langmea)
Usage:
  bowtie2 [options]* -x <bt2-idx> {-1 <m1> -2 <m2> | -U <r> | --interleaved <i> |
-b <bam>} [-S <sam>]

<bt2-idx>  Index filename prefix (minus trailing .X.bt2).
          NOTE: Bowtie 1 and Bowtie 2 indexes are not compatible.
<m1>      Files with #1 mates, paired with files in <m2>.
          Could be gzip'ed (extension: .gz) or bzip2'ed (extension: .bz2).
<m2>      Files with #2 mates, paired with files in <m1>.
          Could be gzip'ed (extension: .gz) or bzip2'ed (extension: .bz2).
<r>       Files with unpaired reads.
          Could be gzip'ed (extension: .gz) or bzip2'ed (extension: .bz2).
```

Webページなどでドキュメント/マニュアルを参照

- 可能な限り本家サイトをあたる



Introduction

[How is Bowtie 2 different from Bowtie 1?](#)

[What isn't Bowtie 2?](#)

Obtaining Bowtie 2

[Building from source](#)

[Adding to PATH](#)

The bowtie2 aligner

[End-to-end alignment versus local alignment](#)

[End-to-end alignment example](#)

[Local alignment example](#)

[Scores: higher = more similar](#)

[End-to-end alignment score example](#)

[Local alignment score example](#)

[Valid alignments meet or exceed the minimum score threshold](#)

[Mapping quality: higher = more unique](#)

Aligning pairs

[Paired inputs](#)

[Paired SAM output](#)

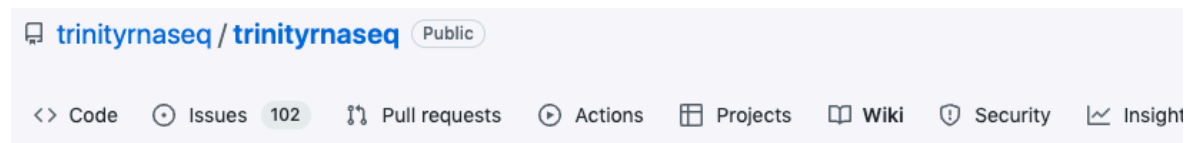
[Concordant pairs match pair expectations, discordant pairs don't](#)

[Mixed mode: paired where possible, unpaired otherwise](#)

[Some SAM FLAGS describe paired-end properties](#)

[Some SAM optional fields describe more paired-end properties](#)

[Mates can overlap, contain, or dovetail each other](#)



Home

Brian Haas edited this page on 10 Jun · 38 revisions

RNA-Seq De novo Assembly Using Trinity



Quick Guide for the Impatient

Trinity assembles transcript sequences from Illumina RNA-Seq data.

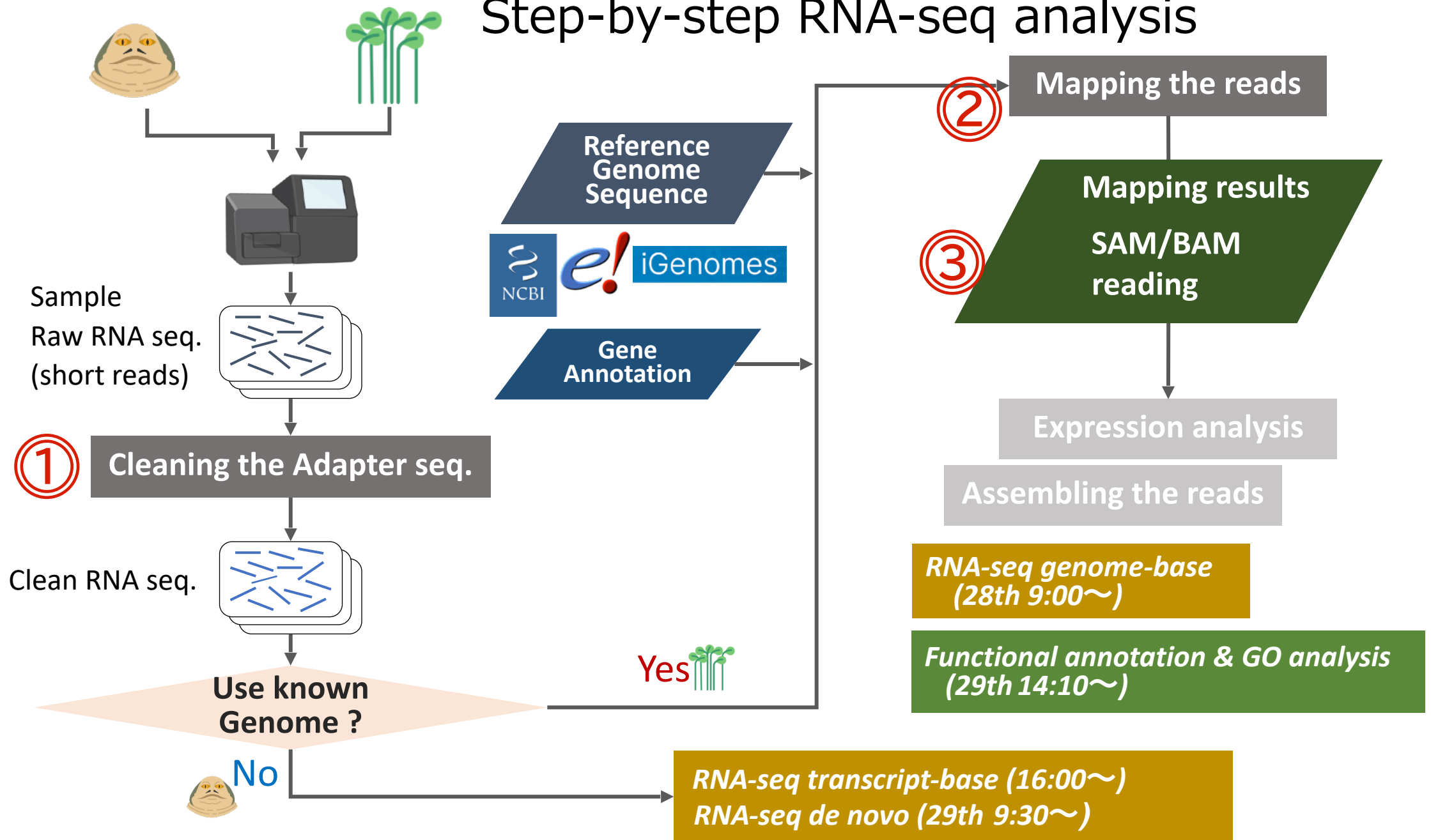
Download Trinity [here](#).

Build Trinity by typing 'make' in the base installation directory.

Assemble RNA-Seq data like so:

```
Trinity --seqType fq --left reads_1.fq --right reads_2.fq --CPU 6 --max_
```

Step-by-step RNA-seq analysis



① 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`

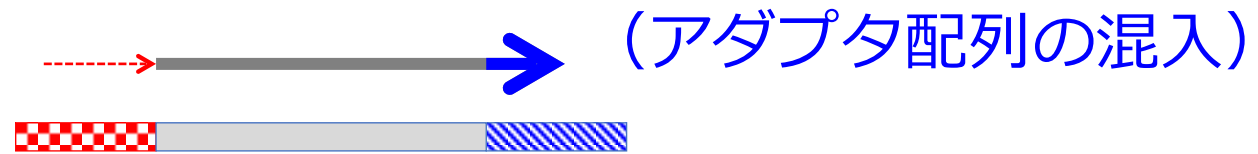
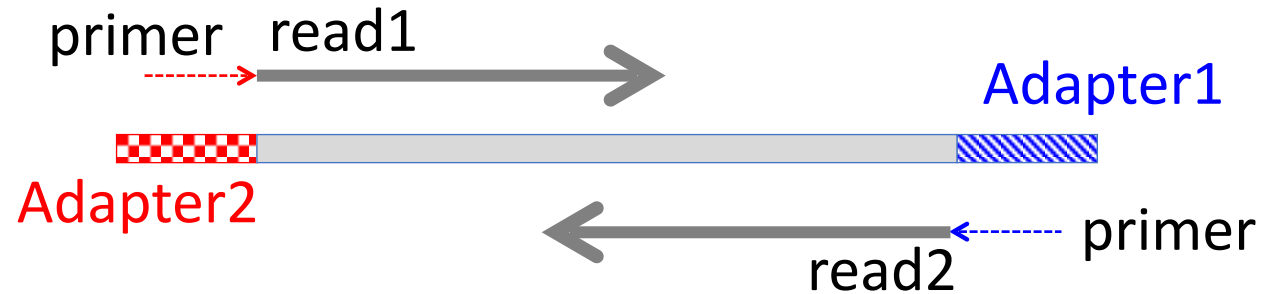
Adapter2: `AGATCGGAAGAGCGTCG`

◆ 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: AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGA

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。



②マッピング準備：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
```

② マッピング : 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
```


③ 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)

リファレンス配列に関する情報

```
@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 -l 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 NNNNNNNNNNNNNNN... #####... 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 NNNNNNNATNNNNNN... #####... 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 NNNNNTTTTCNNTTAG... #####... YT:Z:UP YF:Z:NS
SRR345261.150 89 ETEC_chr 779844 42 49M = 779844 0 TTCAGGAAACCTGAA... 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 CCGCTTGC CGCGGCCA... 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... DGGDGFDDGGGGGEGD... 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 AAAAAAAAAAAAAA... #####... YT:Z:UP
SRR345261.200 141 * 0 0 * * 0 0 AAAAAAAAAAAAAA... 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 GTACTTTTCAGCGGGGA... 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
```

FLAG

マップされた
染色体と位置
(* はマップ
されなかつ
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

同じ名前のリード
=ペアエンドの
リード対

③ 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
```

③ 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
```

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。

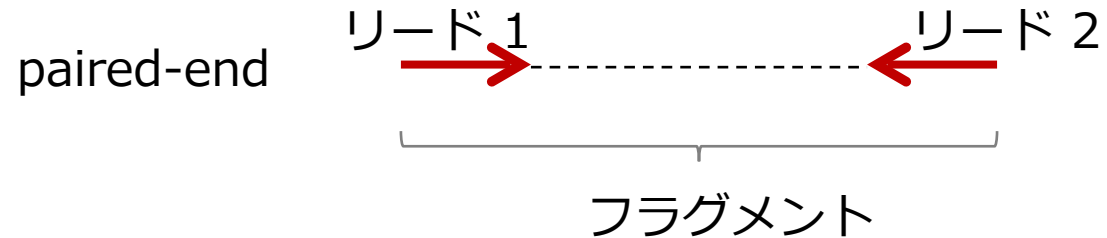
```
$ samtools fastq etec_bowtie2.bam -1 r1.fq -2 r2.fq
```

- 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

83

2進数

01010011

解釈

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



ペアリードがある 両方適切にマッピングされている 自分がマッピングされていない ペア相手がマッピングされていない 逆順にマッピングされた ペア相手は逆順にマッピングされた Read1の配列である Read2の配列である	2進数表記	10進数表記
1 1 1 1 1 1 1 1	11111111	255

通常のpaired end seqで consistentにアラインしていれば この4通りになる	0 1 0 1 0 0 1 1	01010011	83
	0 1 1 0 0 0 1 1	01100011	99
	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いない場合	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
```

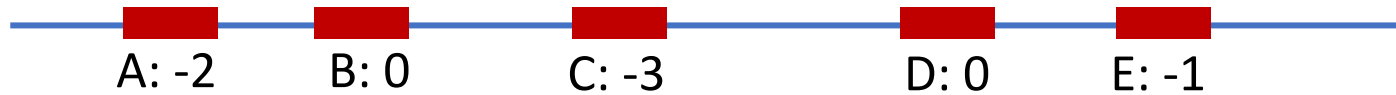
2番目のフラグが0である行を抜き出す。

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

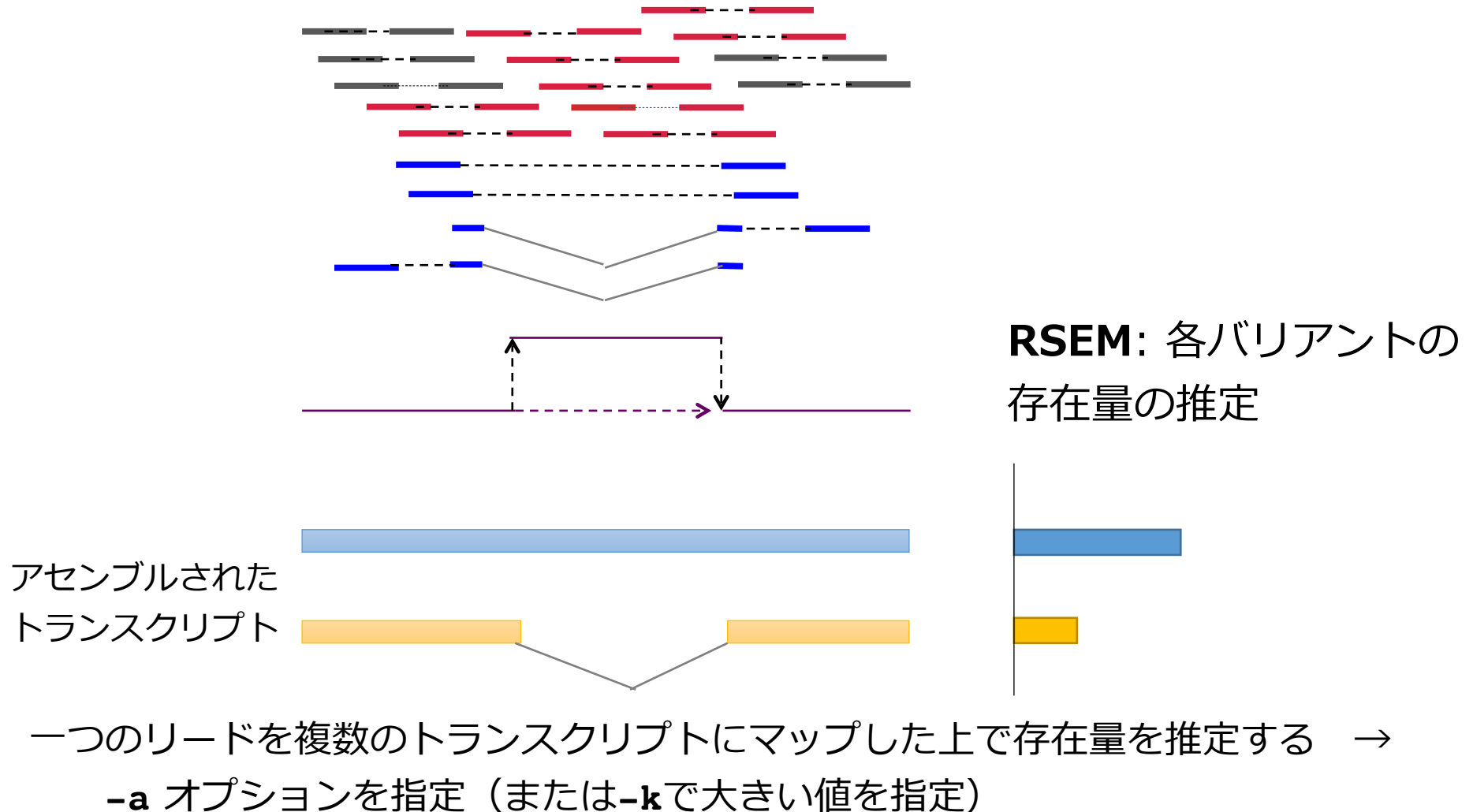
- **-k** num_of_alignment

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うすると、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



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。

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

- 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`

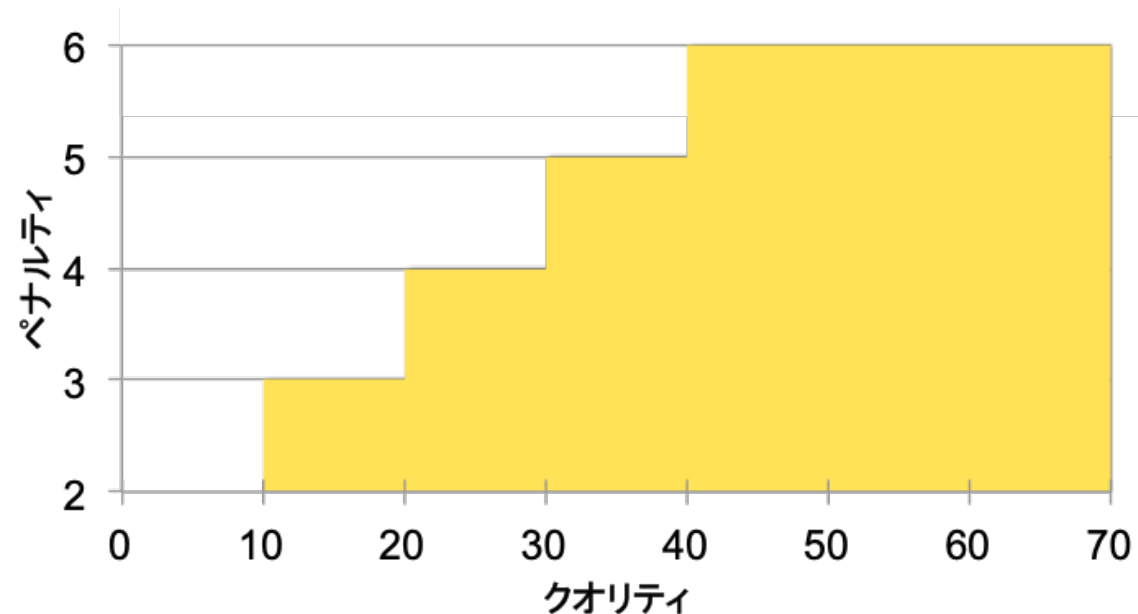
MAPQの値が閾値より小さい行を除く

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 nM (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、 nD (欠失) または nI (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 nS で、またhisat2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 nN 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

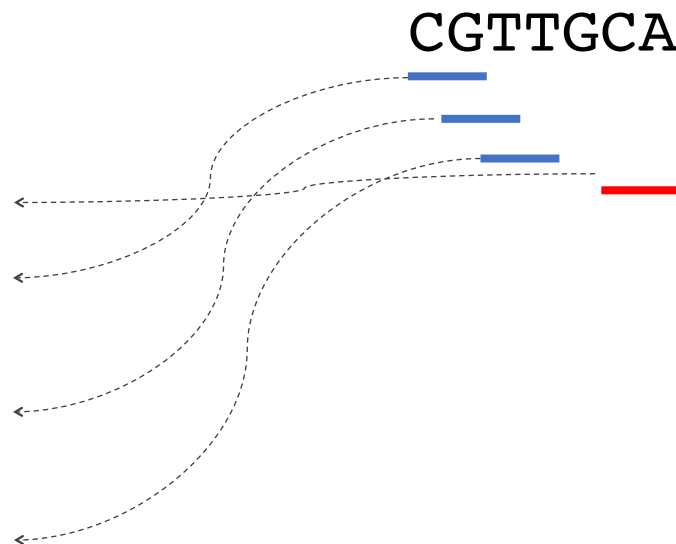
CGTTGCA

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

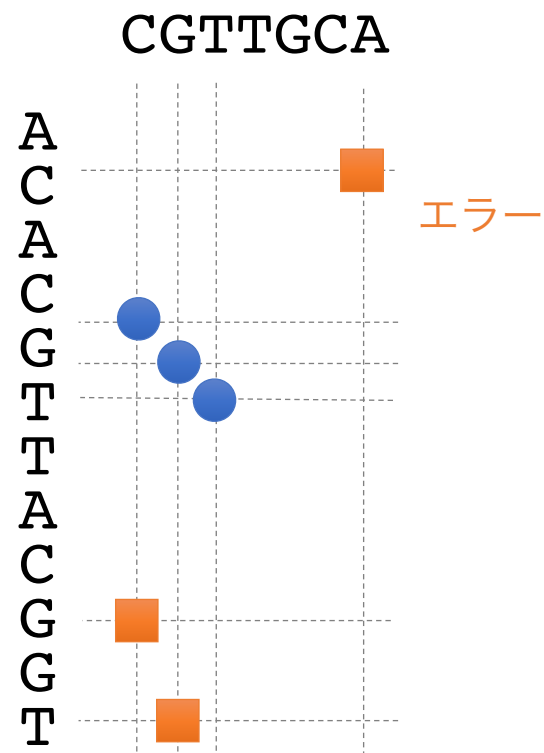
2-mer	positions
AC	1, 3, 8
CA	2
CG	4, 9
GG	10
GT	5, 11
TA	7
TT	6

② インデックスを使った初期検索(seed検索)



③ 見つかったseedを延長してアライメント

ACACGTTACGGT.....
CGTT**G**CA



インデックスを使った高速検索

接尾辞配列 (suffix array)

ACACGTTACGGT

接尾辞

1	ACACGTTACGGT
2	CACGTTACGGT
3	ACGTTACGGT
4	CGTTACGGT
5	GTTACGGT
6	TTACGGT
7	TACGGT
8	ACGGT
9	CGGT
10	GGT
11	GT
12	T

辞書順で
ソート

1	ACACGTTACGGT
8	ACGGT
3	ACGTTACGGT
2	CACGTTACGGT
9	CGGT
4	CGTTACGGT
10	GGT
11	GT
5	GTTACGGT
12	T
7	TACGGT
6	TTACGGT

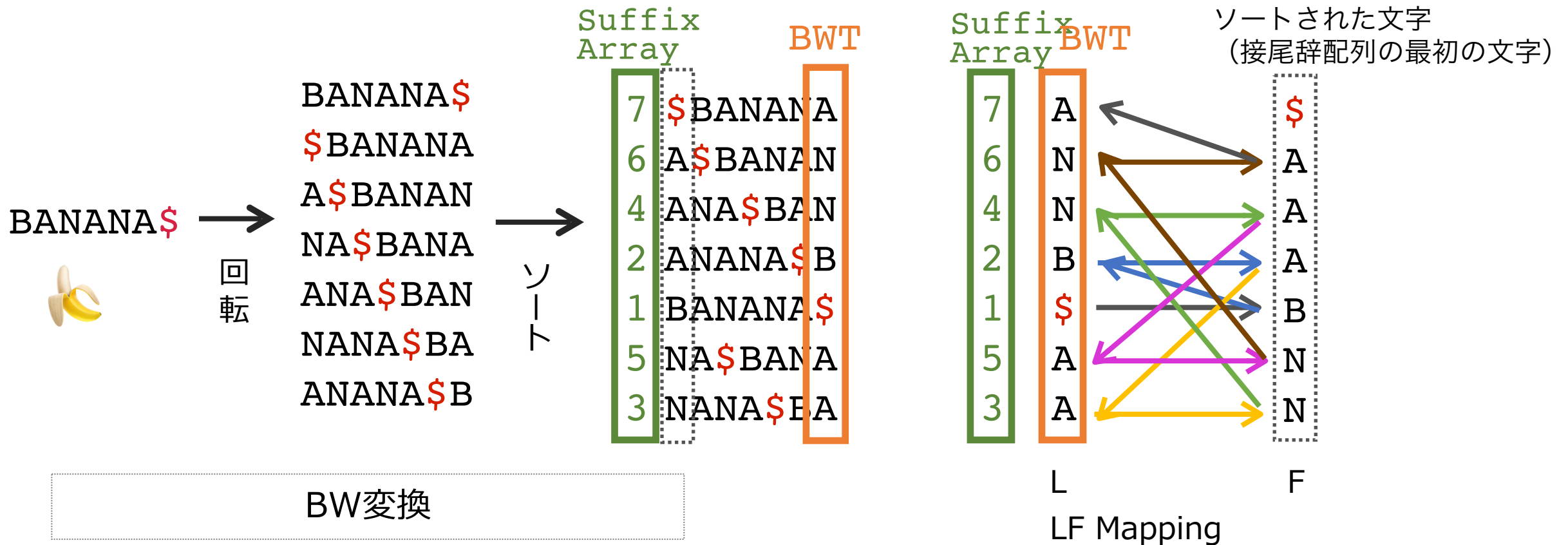
接尾辞配列

ACG 3,8

CG 4,9

Burrows-Wheeler 変換 (BWT)

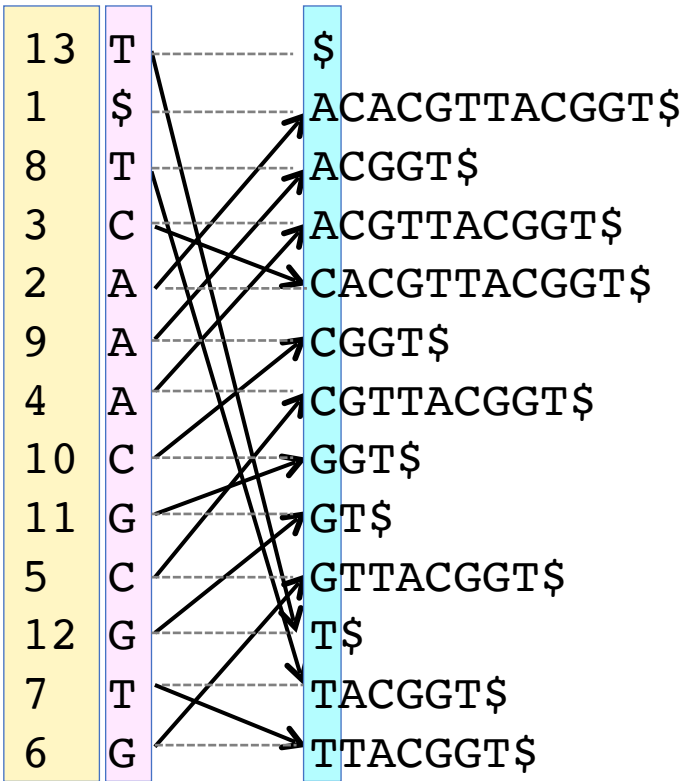
- そもそもはデータ圧縮のための変換
- **BANANA\$** の BWT は、**ANNB\$AA**
- BWTから元の **BANANA\$** に戻ることができる (逆変換)



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

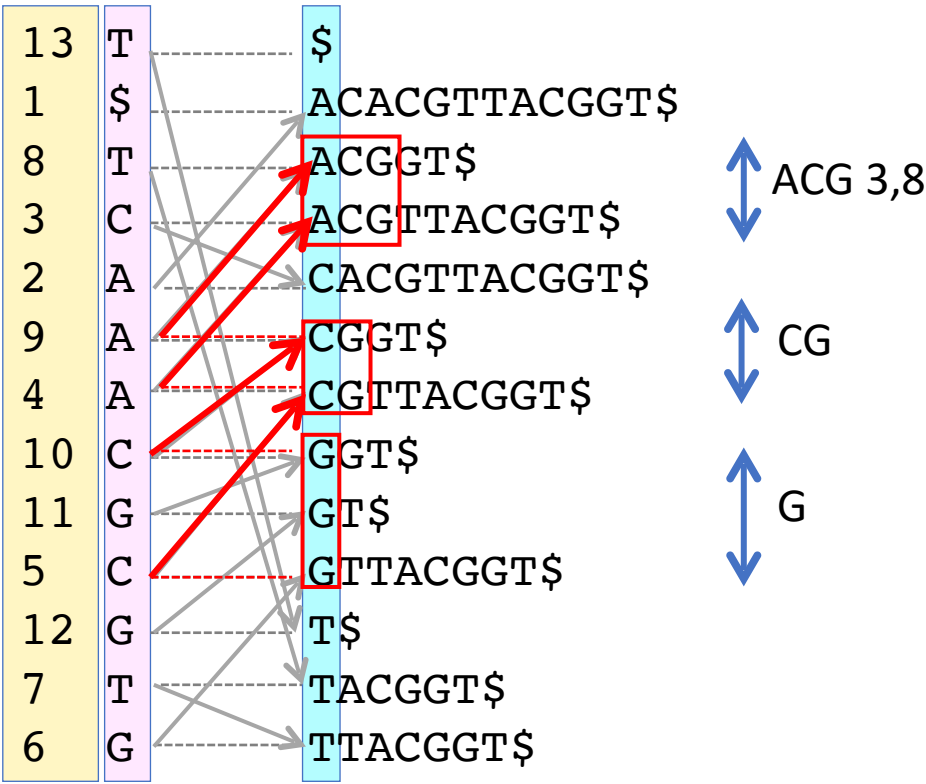


接尾辞
配列 BWT



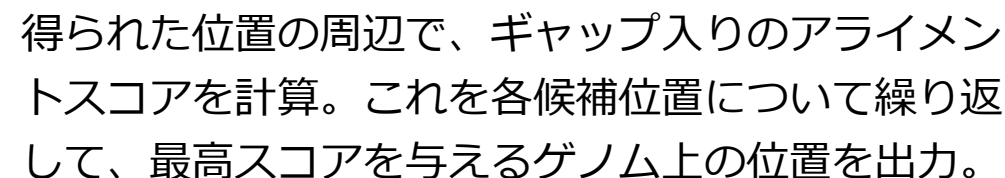
矢印 (LF mapping) を辿って元の配列を再構築できる (逆変換)。

文字列ACGの検索



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

1. Extract seeds



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もたがってマッピングする。
- global とlocalの2つのFM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。

