RNA-seq解析
基本フォーマットとツール

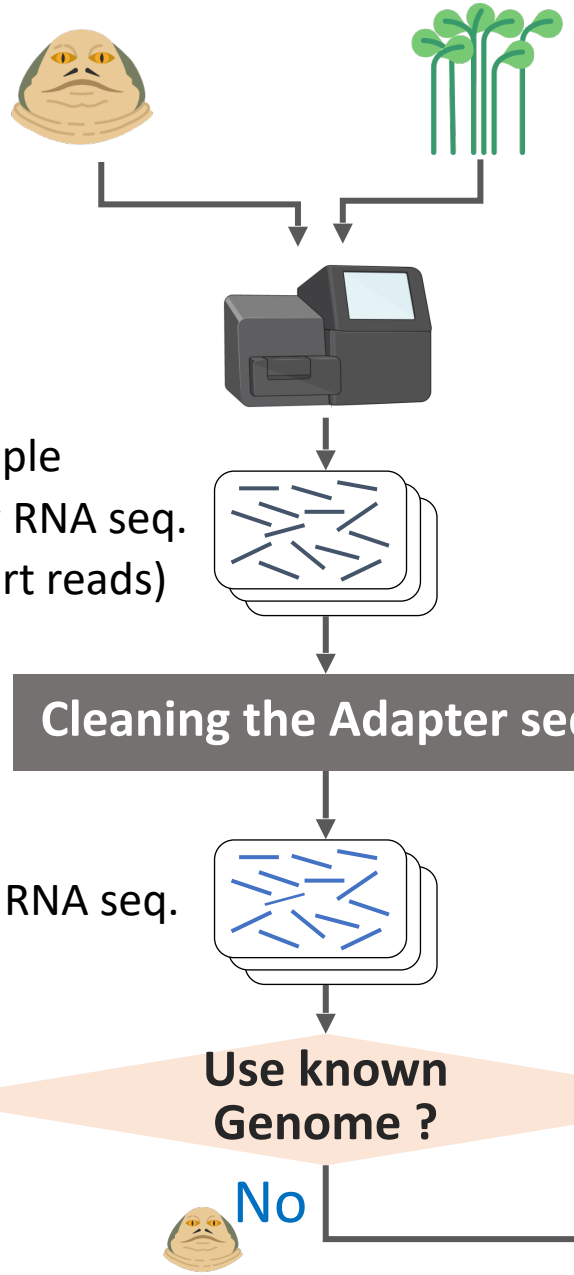
Basic Formats and Tools of RNA-seq analysis

NIBB

2024 Genome Informatics Training Course

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

Flowchart of RNA-seq analysis



Reference Genome Sequence

NCBI e! iGenomes

Gene Annotation

Mapping the reads

Mapping results

Assembling the reads

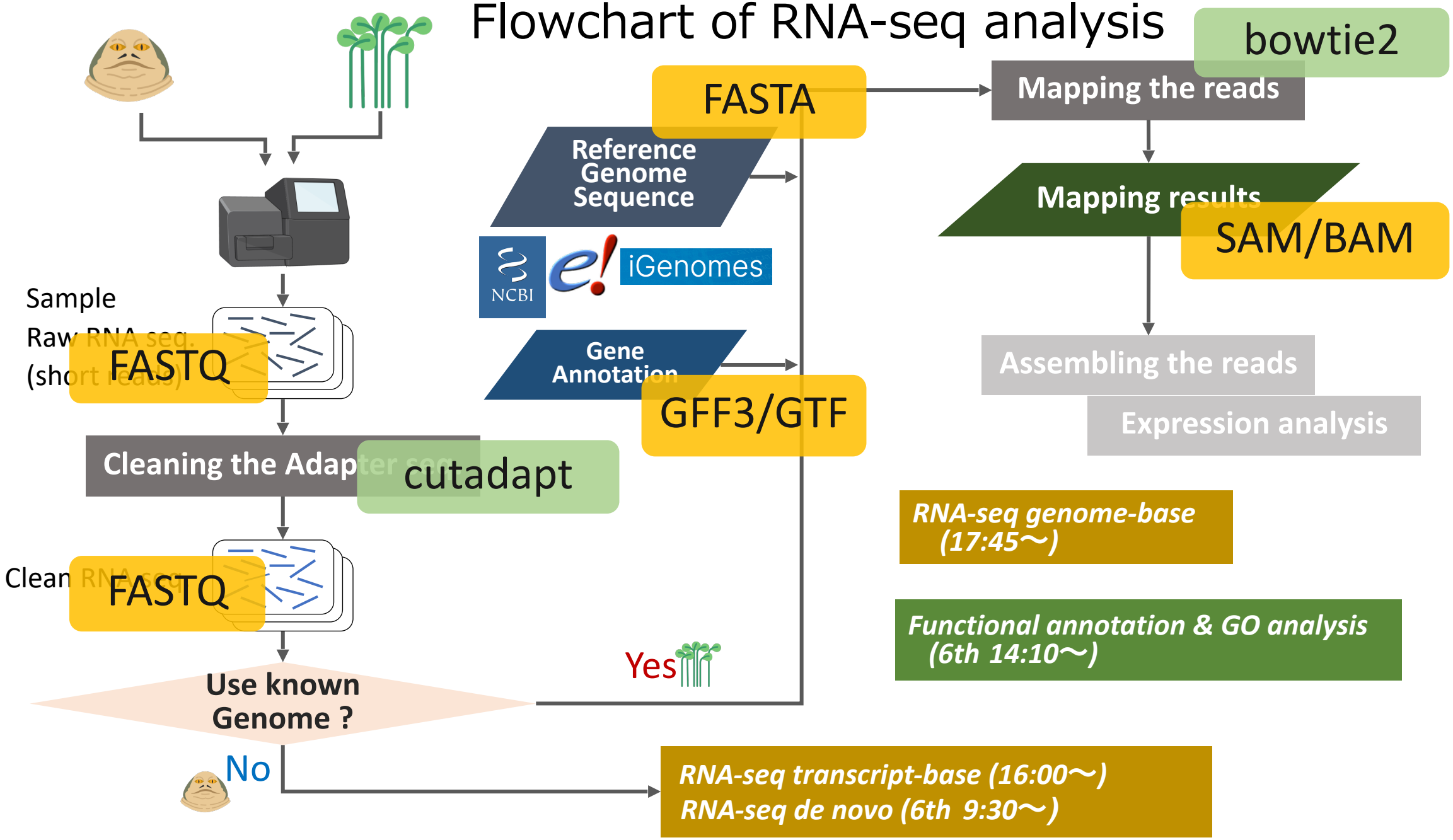
Expression analysis

RNA-seq genome-base (17:45～)

Functional annotation & GO analysis (6th 14:10～)

RNA-seq transcript-base (16:00～)
RNA-seq de novo (6th 9:30～)

Flowchart of RNA-seq analysis



Short Read Mapping & Data Format

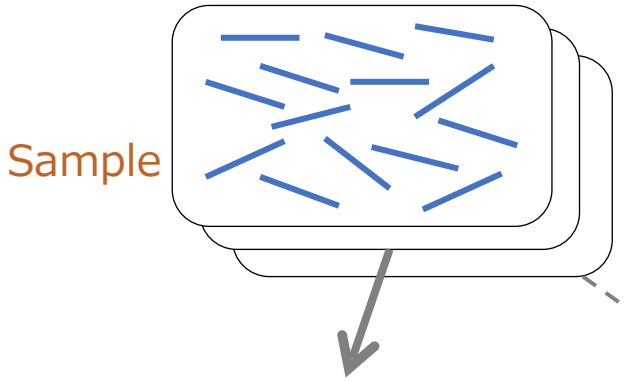
Genome (Reference) sequence

format (Sequence)

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

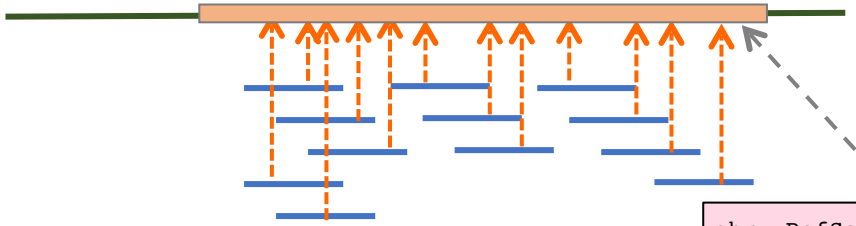
Short read sequence

format (Sequence + Quality)




```
@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
```

Mapping to a reference seq.



Quality control
Adapter removal

```
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)

format (Result of mapping)

```
@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
```

Binary
digitization

format
(Result of mapping)

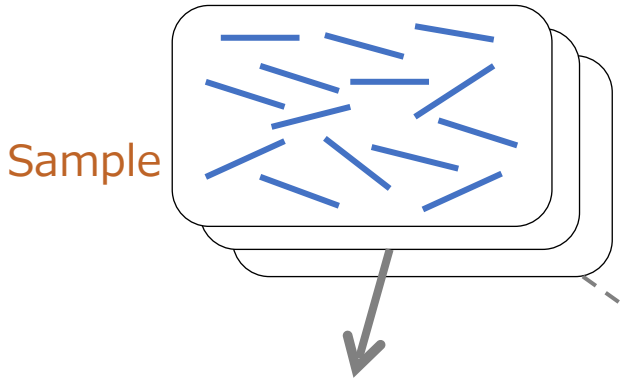
Short Read Mapping & Data Format

Genome (Reference) sequence

FASTA format (Sequence)

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

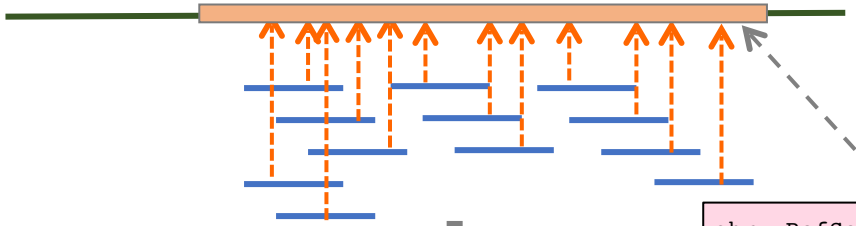
Short read sequence



FASTQ format (Sequence + Quality)

```
@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
```

Mapping to a reference seq.



Quality control
Adapter removal

```
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) format
(Gene annotation)

SAM format (Result of mapping)

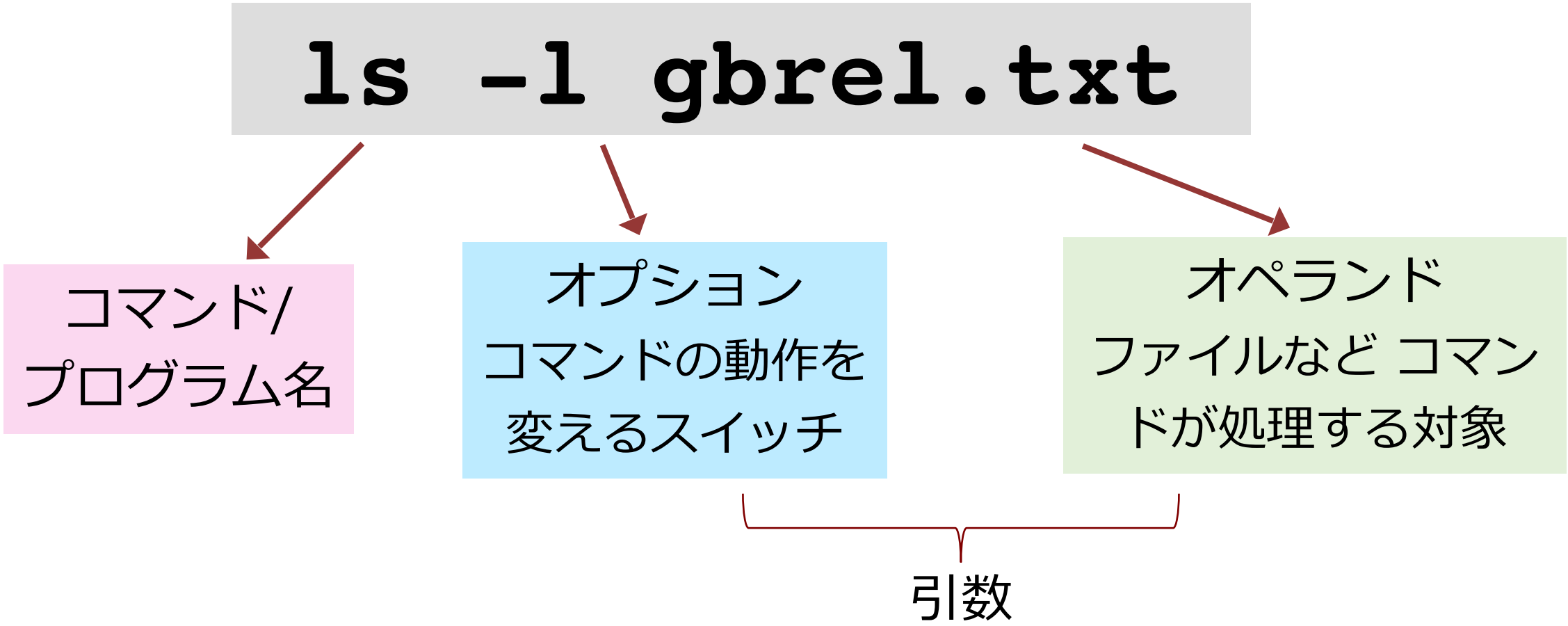
```
@HD          VN:1.0       SO:unsorted
@SQ          SN:chr       LN:4639675
@PG          ID:bowtie2   PN:bowtie2   VN:2.2.4      CL:"/bio/bin/bowtie2-alig
SRR1515276.40              0   chr      4423609       42   51M   *  0   0     GGAATTCCTCACTGCCA
SRR1515276.158             16  chr      501700        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
```

Binary
digitization

BAM format
(Result of mapping)

解析を実行する前に：

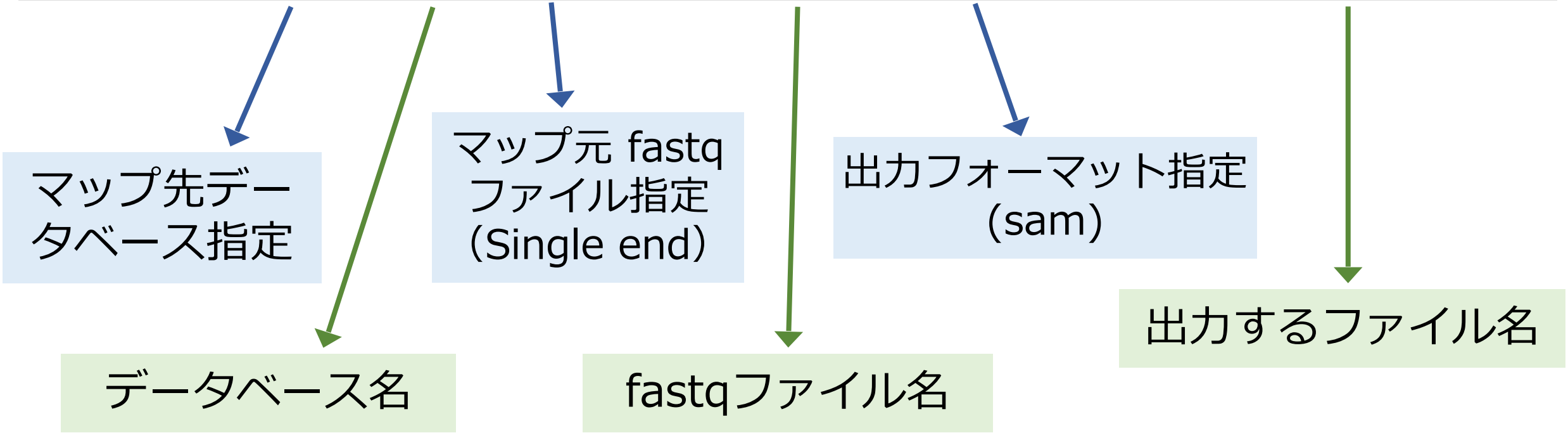
UNIXコマンド実行の基本形



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
```



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                                    sam
```

インプットとアウトプットは
何かを意識しよう

bowtie2の
オプション

今からマップするゲノムの
データベースインデックス名

bowtie2の
オプション

インプット：
私のshort readデータ
(fastqフォーマット)

bowtie2の
オプション

アウトプット：
マッピング結果
(SAMフォーマット)

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**　などを付けて実行してみる
- 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).
```

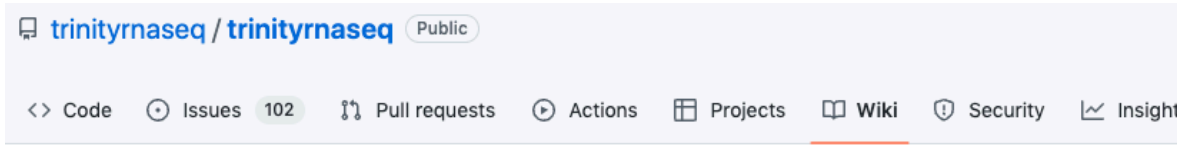
Webページなどでドキュメント/マニュアルを参照

- 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.

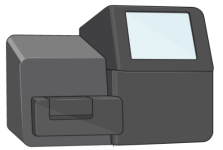
Download Trinity here.

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

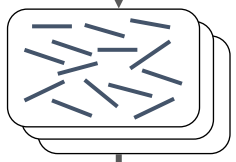
Assemble RNA-Seq data like so:

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

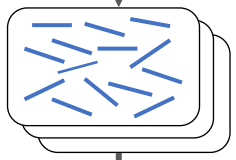
Step-by-step RNA-seq analysis



Sample
Raw RNA seq.
(short reads)



① Cleaning the Adapter seq.



Clean RNA seq.

Use known Genome ?

Yes

No

Reference Genome Sequence

NCBI e! iGenomes

Gene Annotation

② Mapping the reads

③ Mapping results SAM/BAM reading

Expression analysis

Assembling the reads

RNA-seq genome-base (17:45～)

Functional annotation & GO analysis (6sth 14:10～)

RNA-seq transcript-base (16:00～)
RNA-seq de novo (6th 9:30～)

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

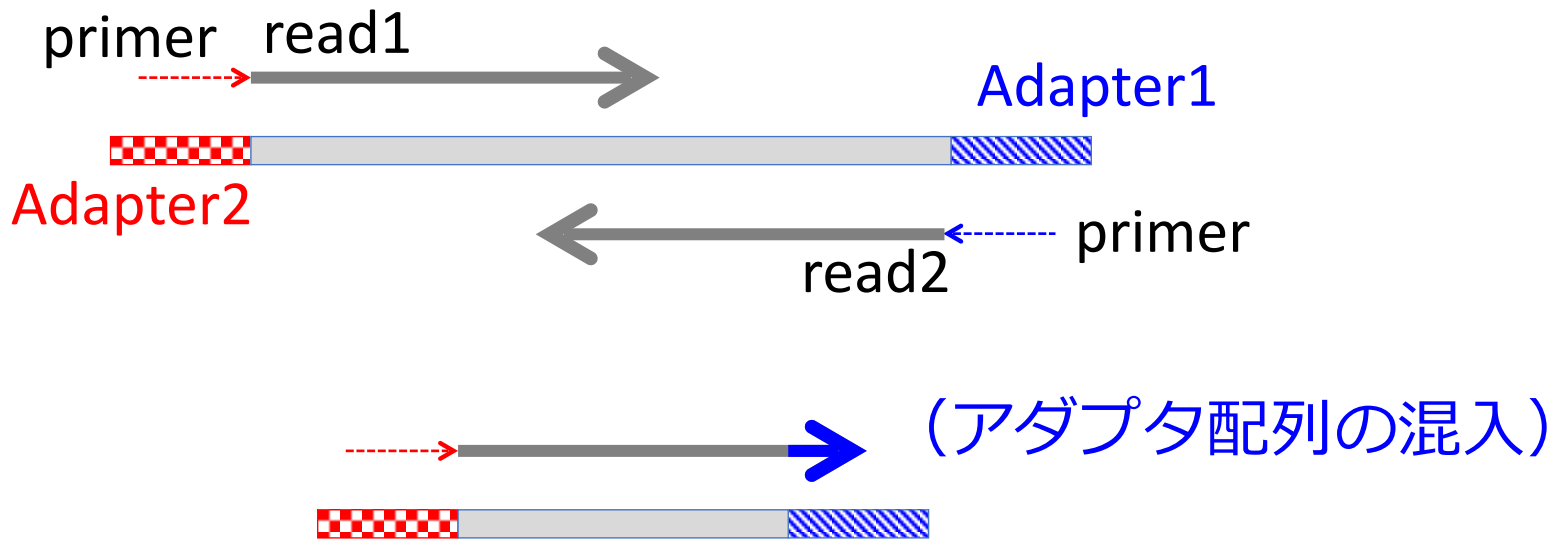
  Adapter2: AGATCGGAAGAGCGTCG

◆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。

話者のお勧め
アダプター除去ソフトは
fastp

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）

```
@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

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。

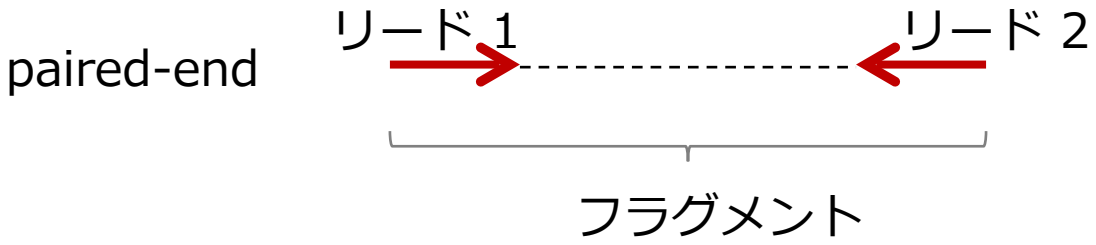
```
$ samtools view -C etec_bowtie2.sam -T eco_o139.fa
                -o etec_bowtie2.cram
```

マッピングにおけるあれこれ 

- Bowtieのオプション
- マッピング結果の見方
- マッピングソフトの高速化戦略

Bowtie2のオプション1

ペアエンドリード対の検索



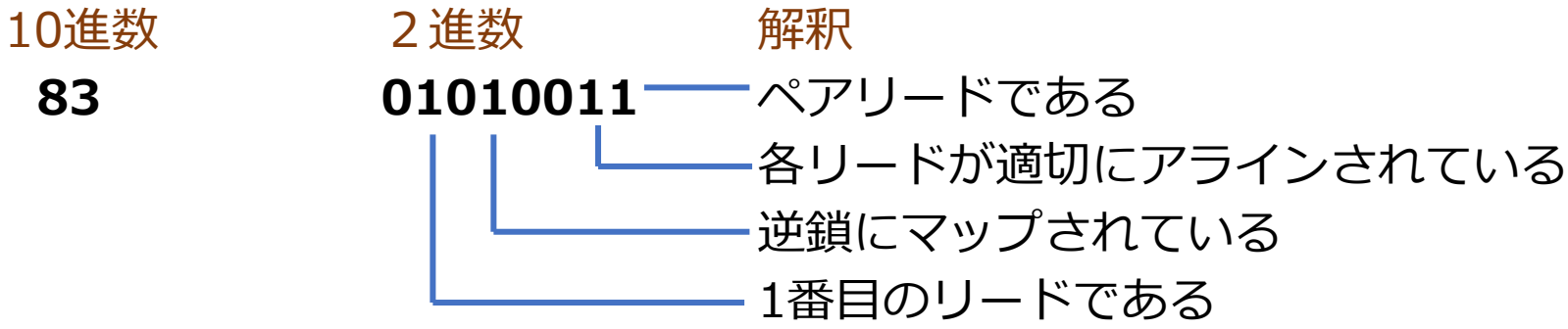
- **`-I`** ***`min_length`*** フラグメント長の最小値 (default: `0`)
- **`-X`** ***`max_length`*** フラグメント長の最大値 (default: `500`)
- **`--fr`** / **`--rf`** / **`--ff`** リード1とリード2の相対的な向き (default: `fr`)

- 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



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

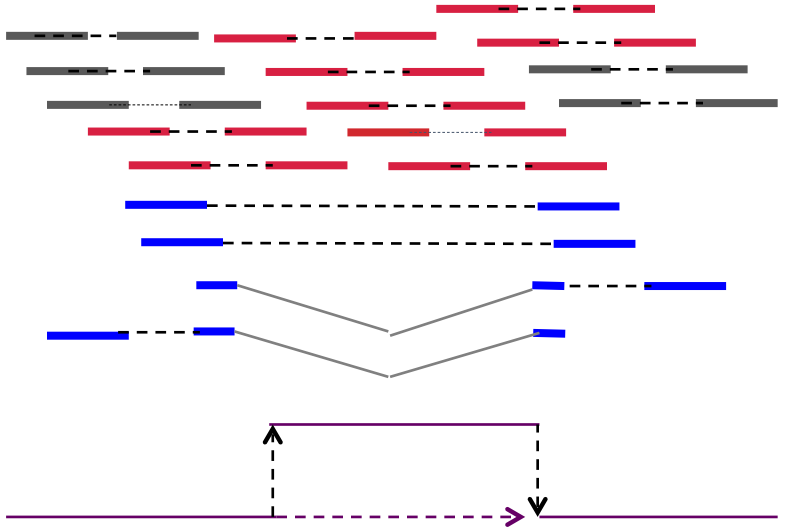
Bowtie2におけるスコア ＝
ミスマッチに対するペナルティ

- 一般に、1つのリードは複数の箇所にマップされる。

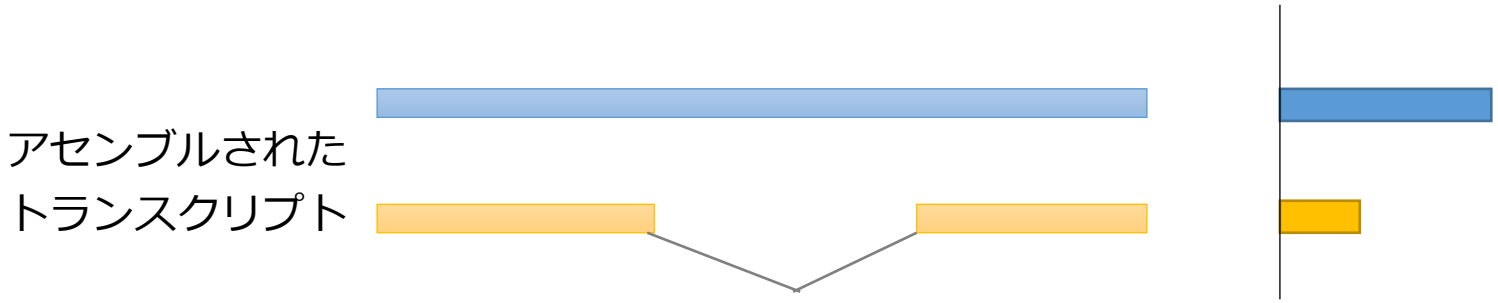
- `default` (best one mode)
  条件を満たすアライメントを検索し、最高スコアのものを１つ出力
  （ただし、検索は完全でないので、最高スコアを取りこぼす可能性はある）
  上記の例では、BまたはD （どちらかがランダムに選ばれる）
- **`-a`** 条件を満たすアライメントをすべて出力　上記の例では、A,B,C,D,E
- **`-k`** *`num_of_alignment`*
  条件を満たすアライメントを、見つかった順に指定した数だけ出力
  上記の例で、**`-k 2`** のとき、左から順に見つかるとすると、AとBが出力される
  （実際には位置の順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

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

- 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

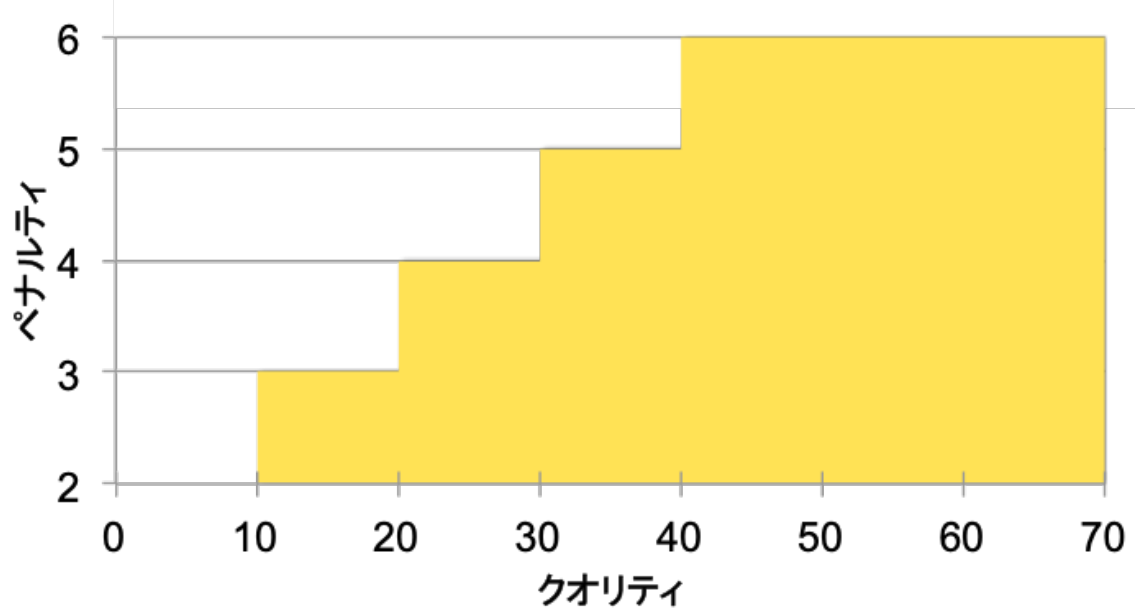
  MAPQの値が閾値より小さい行を除く

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 + 3*n*)
- 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 *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

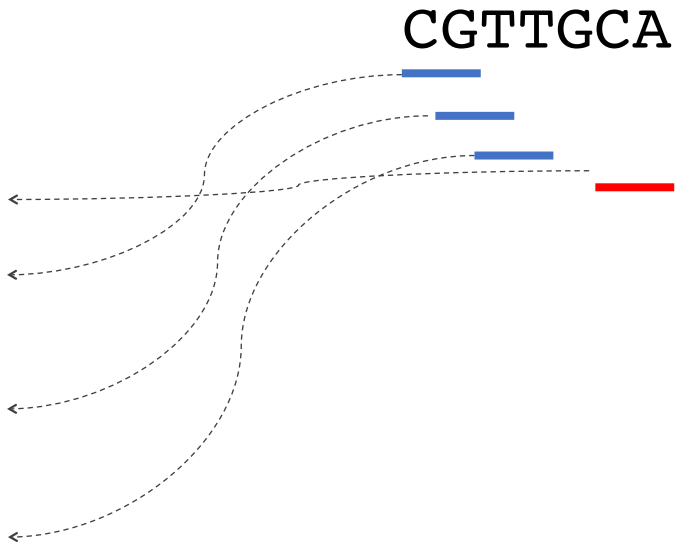
①インデックス作成

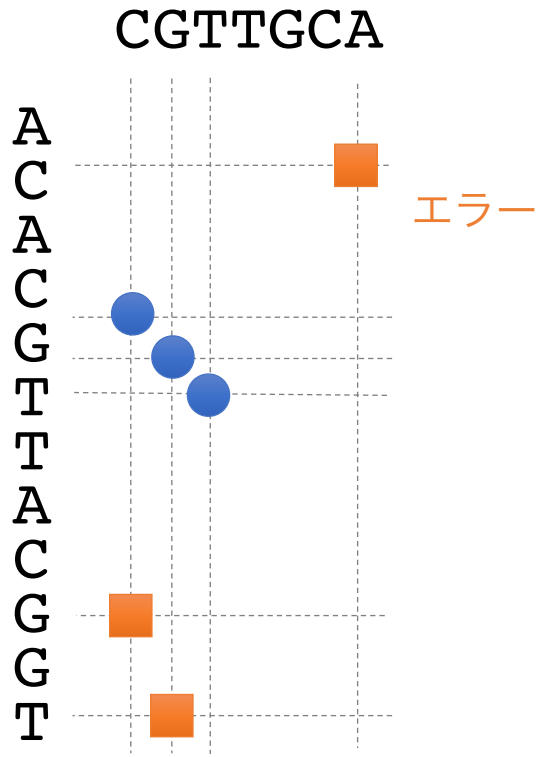
ハッシュテーブル

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)



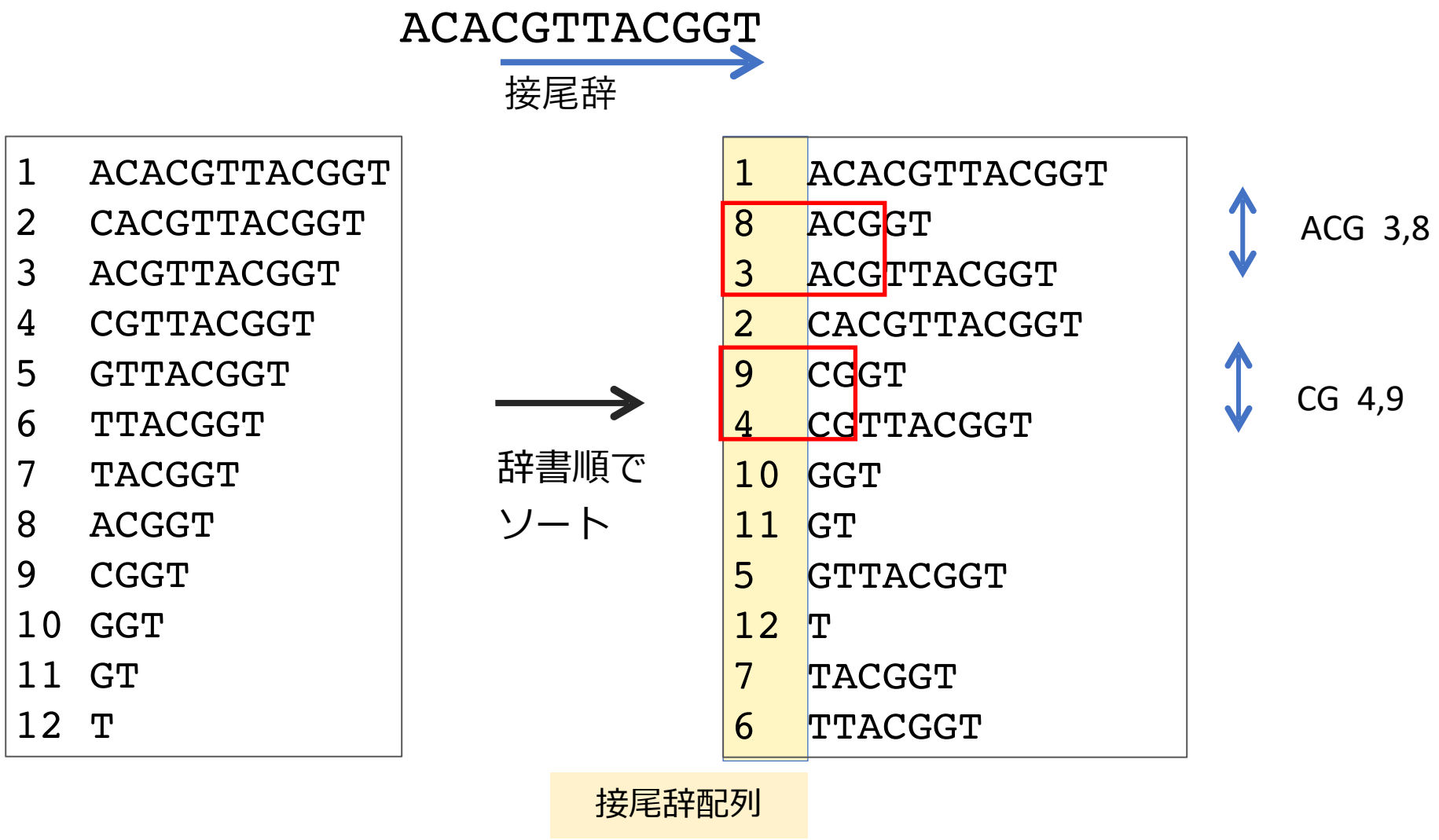


③ 見つかったseedを延長してアライメント

ACACGTTACGGT.....
CGTTGCA

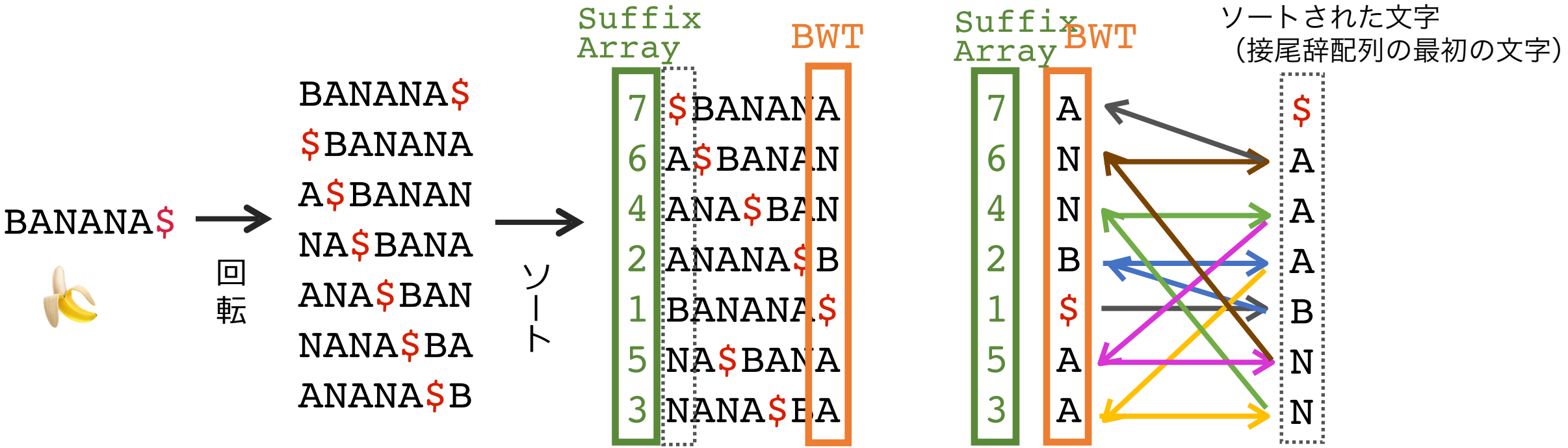
インデックスを使った高速検索

接尾辞配列（suffix array）



Burrows-Wheeler 変換 (BWT)

- 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$** に戻すことができる（逆変換）
- SuffixArrayは逆変換時には必要ないが、後のマッピングで使う



BW変換

（同じ文字が集まることが嬉しい ≒ 圧縮できる）

LF Mapping

LF(i)=C[BWT[i]]+rank(BWT[i],i)

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

BWT と LF Mapping を利用して、大規模な文字列検索を高速に行うデータ構造

ACACGTTACGGT$ ⇄ T$TCAAACGCGTG

BWT / 逆変換

接尾辞配列 BWT

接尾辞配列	BWT	
13	T	$
1	$	ACACGTTACGGT$
8	T	ACGGT$
3	C	ACGTTACGGT$
2	A	CACGTTACGGT$
9	A	CGGT$
4	A	CGTTACGGT$
10	C	GGT$
11	G	GT$
5	C	GTTACGGT$
12	G	T$
7	T	TACGGT$
6	G	TTACGGT$

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

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

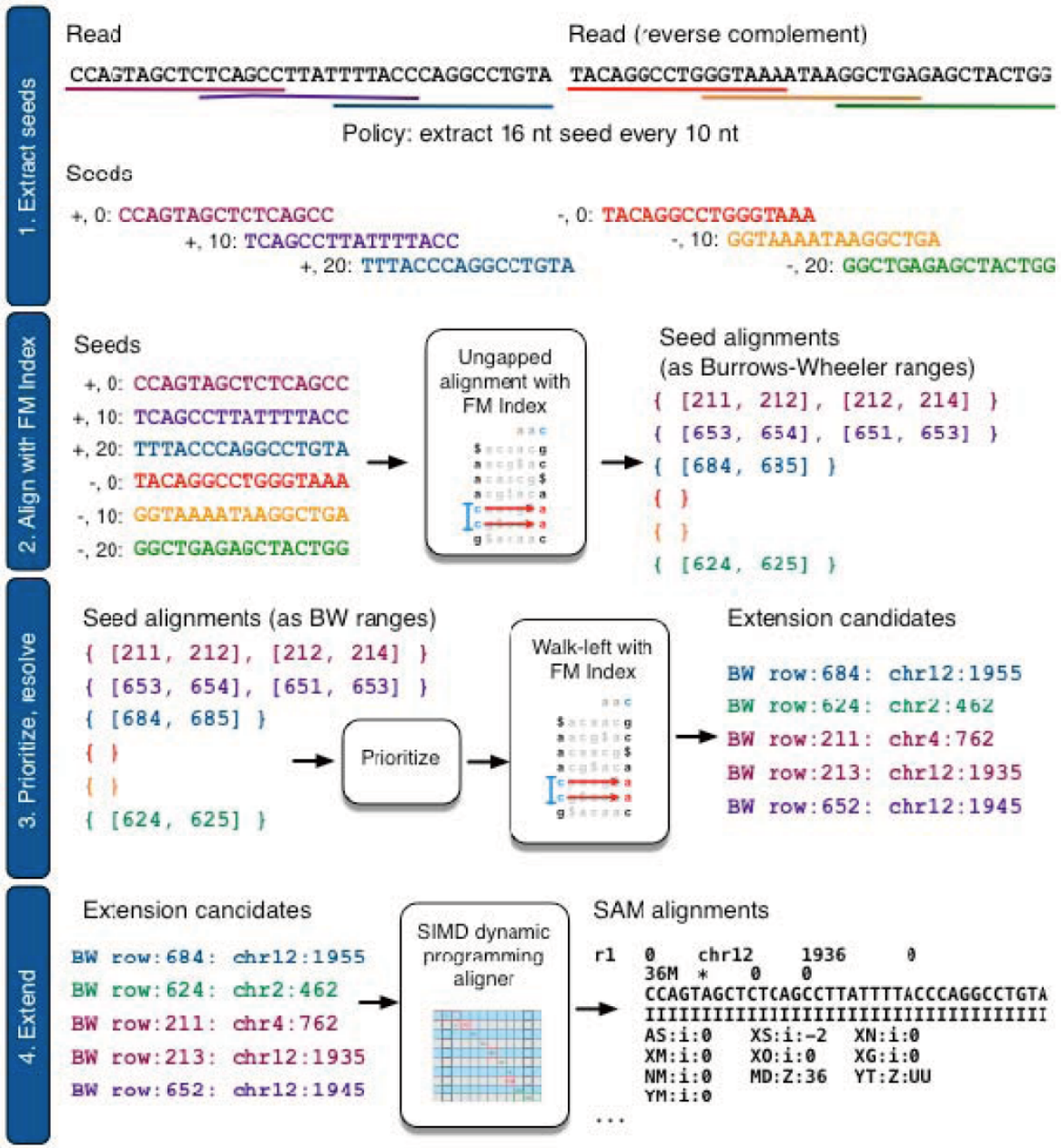
ACG 3,8

CG

G

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`

（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。