2016 GITC 準備編 UNIX/R の基礎　演習問題

復習問題１　UNIX 基本コマンド

1. ターミナルを起動して、~/data/1_unix ディレクトリに移動しカレントディレクトリを確認します。加えてカレントディレクトリ(~/data/1_unix)以下にある全てのファイルを確認しましょう。オプション"-R"を使うとディレクトリを辿りながら全てのファイルを表示します。

2. ~/data/1_unix/sprot ディレクトリ内の FASTA ファイル全てを~/unixtest/FASTA-EX ディレクトリにコピーしましょう。ディレクトリがない場合は新規に作成します。上記の操作を行った後に、~/unixtest/FASTA-EX ディレクトリ内のファイルリストを確認しましょう。

3. ~/unixtest/FASTA-EX ディレクトリに移動して、コピーした FASTA ファイル全てのタイトル行のみを抜き出して less コマンドで確認しましょう。ただし、ここではすべてのファイルに配列は 1 つずつ入っています。確認方法は、grep コマンドを使用します。オプションを使用しないと結果にファイル名が付加されてしまうので、ファイル名を表示しないオプションを man コマンドで調べましょう。

4. 同じように、FASTA ファイル全ての配列行のみを less コマンドで確認しましょう。こちらは、tail コマンドのみを使用します。

5. ~/unixtest/FASTA-EX にコピーした FASTA ファイルから HUMAN,MOUSE,DROME に関する（ファイル名に含まれる）Multi-FASTA 形式のファイルをそれぞれ human.fasta, mouse.fasta, drome.fasta として~/unixtest/の下に cat コマンドを使用して作成しましょう。

6. FASTA-EX ディレクトリを削除しますが、削除する前にこのディレクトリ全体の圧縮アーカイブを~/unixtest/FASTA-EX.tar.gz として tar コマンドで作成しましょう。作成できたら、圧縮アーカイブの中身を確認してから FASTA-EX ディレクトリ全体を削除します。

7. 圧縮アーカイブ FASTA-EX.tar.gz は自分自身のみ読み書きできるよう chmod コマンドを使用して(グループとその他は読み書きできないよう)アクセス権を変更します。

*8. UNIX にはファイルの検索に用いる find という非常に便利なコマンドがある。man コマンドを使用して find コマンドの使用方法を確認し、この find コマンドを使用してホームディレクトリ配下のどこかにある"SYYM_DROME.sprot"を探しましょう。

*9. 同じく、find コマンドでは探しだしたファイル（複数も可能）を対象にして（引数にして）コマンドを実行することができます（-exec を使用）。この機能を使って、ホームディレクトリ配下にある Swiss-Prot ファイル(拡張子.sprot)を全て探し出して ~/SP/ ディレクトリに一度にコピーしましょう。

復習問題２　R 入門

cancer データを使って、以下の問題を考えよう。

1.(a) 男性で喫煙歴がある人のデータを抜き出し、結果を cancer.subset という変数に代入せよ。何人いるか。

(b) それらの人の gene1 の発現データを取り出し、その平均値を計算せよ。

(c) 抽出した結果をタブ区切りテキストとして cancer.subset.txt というファイルに保存せよ。

2. (a) gene1 と gene2 の散布図を作成し、gender によって点を色分けせよ。

(b) 散布図に回帰直線を引け。この回帰直線へのあてはめは、有意水準を 0.01 として有意であると言えるか。

*3. テキストでは、gene1 の発現量(gene1)が性別(gender)によって違いがあるという結論が t 検定で得られ、また癌のステージ(stage)によっても違いがあるという結論が分散分析から得られた。ただし、癌のステージの中で明らかな違いがあるのは stage III のみであった（これは boxpot (gene1 ~ stage, cancer)で確認できる）。

そこで、gender の効果を考慮しつつ stage の比較を行うため、Trellis Plot の技法を使ったプロットを作成してみよう。これを行う lattice package は R に標準で含まれているが、使う際にはライブラリのロードが必要である。

```
> library(lattice)
> bwplot(gene1 ~ stage | gender, cancer)
```

bwplot は boxplot と同様に箱ひげ図を作成するが、特定の因子によって条件付けしたプロットを作成できる。ここでは、gender によってまず被験者を female と male に分けて、そのそれぞれで箱ひげ図を作成している。この結果から stage の gene1 の発現量への効果について、どのような結論が得られるか考察せよ。

*4. (a) cancer データから各患者の gene1 から gene6 の発現量を抜き出した部分データフレームを作成し、変数 expr に代入せよ。

(b) 各遺伝子間の発現量の相関（散布図を描いたときに傾きを持つ直線上に分布する傾向）の強さは相関係数によって表される。相関係数は-1 から 1 までの値を取り、0 が無相関を表す。相関係数が負の値のときは、傾きが負、すなわち一方が大きくなれば他方が小さくなる関係を表す。R では、行列の各カラム間の相関係数は、cor 関数によって一度に計算できる。これを用いて expr の各カラム間の相関係数を計算せよ。

(c) 相関係数の絶対値が 0.5 以上のときに強い相関があるとして、gene1～gene6 を、発現の

相関の強さによっていくつかのグループに分けることができるかを検討せよ。ただし、絶対値をとるのは abs 関数で行える。

復習問題 3　UNIX によるテキストファイル処理

この演習では、ecoli.htseq ファイルを使用する。ファイルは下記のパスにある。

```
~/data/7_ex/ex2/
```

ecoli.htseq には、アノテーションテーブルを使って、各遺伝子にマッピングされたリード数をカウントしたものが書かれている。

1. ecoli.htseq に記載されていて、カウントされた値が 100 回以上である行を標準出力に表示せよ。
2. そのうち、必要なのは b**** という文字列で始まる行である。それらだけを取り出して、ecoli.temp というファイルに保存せよ。
3. ecoli.temp を、カウントされた回数の多い順にソートし、ecoli.htseq.sorted というファイルに保存せよ。
4. 1.~3.の操作を一つのコマンドで出来るように、htsort.sh というシェルスクリプトを作成せよ。 シェルスクリプトの実行後に中間ファイル(ecoli.temp)を消せることができていればなお良い。

*5. 4.で作成したスクリプトは、ecoli.htseq という特定のファイルにのみ使用できる。上記のよう処理を他のファイルに対しても行えるように、引数を 1 つ取るように書き換えよ。例えば、ecoli_other.htseq というファイルに対し、

```
$ ./htsort.sh ecoli_other.htseq
```

というコマンド書式で同じことが行えるようにせよ。

復習問題４　シェルスクリプト

~/data/5_script/more ディレクトリの中には、ecoli.4.fastq 〜 ecoli.6.fastq の 3 つの fastq ファイルがあります。

1. これらを bowtie2 で ~/data/5_script/ecoli_genome.fa にマッピングし、~/data/5_script/more 内に sam ファイルとして保存するスクリプトを作成しましょう。講義内で作成した ex5.sh を改造しても良いです。fastq ファイル名の「ecoli」部分は引数から得ても、スクリプト内に直書きしてもどちらでもかまいません。ecoli_genome.fa（とそのインデックス）は、~/data/5_script/more 内ではなく、~/data/5_script 内にあることに注意してください。

*2. 1.で作成したスクリプトを以下のように書き換えました。1 のスクリプトを実行後、下記のスクリプトを~/data/5_script/more 内で実行すると標準出力には何が出力されるか答えなさい。また、この改良は何を目的としたものかを 2 つ答えなさい。

```
#!/bin/sh
org=${1}
for i in 1 2 3 4 5 6
 do
  if [ -e "${org}.${i}.sam" ]
   then
     echo "${org}.${i}.fastq has already been mapped"
  elif [ -e "${org}.${i}.fastq" ]
   then
     bowtie2 –x ../${org}_genome –U ${org}.${i}.fastq –S ${org}.${i}.sam
  else
     echo "${org}.${i}.fastq was not found"
  fi
 done
```

*実践演習 1 RNA-Seq 解析結果の集計

大腸菌の RNA-Seq の例題をもう一度考える。`~/data/7_ex/rnaseq` に移動しよう。この下の `results` ディレクトリには、大腸菌ゲノムにマッピングした結果から `htseq-count` を使って各遺伝子領域に重なるリード数を集計した結果(`*.htseq`)が格納されている。この結果を基に、UNIX コマンドを使って、簡単な解析結果の集計を行ってみよう。

なお、ここで使ったサンプルデータ（NCBI GEO データベースの GSE59468）には、大腸菌の 2 つの系統を、それぞれ 2 つの異なる条件で培養して、それぞれについて 3 つの反復をとった、計 12 個のサンプルのデータが含まれており、ファイルについた番号は、それぞれ以下の系統・条件の組合せに対応している（ただし、サイズを縮小するためにデータを大幅に間引いている）。

	strain	condition	replicate	SRA accession
1	MG1655	MPOS	1	SRR1515282
2	MG1655	MPOS	2	SRR1515283
3	MG1655	MPOS	3	SRR1515284
4	MG1655	Urine	1	SRR1515285
5	MG1655	Urine	2	SRR1515286
6	MG1655	Urine	3	SRR1515287
7	CFT_073	MPOS	1	SRR1515276
8	CFT_073	MPOS	2	SRR1515277
9	CFT_073	MPOS	3	SRR1515278
10	CFT_073	Urine	1	SRR1515279
11	CFT_073	Urine	2	SRR1515280
12	CFT_073	Urine	3	SRR1515281

以下で、コマンド先頭の `$` は Unix のプロンプトを表すので、それ以降を改行なしで入力すること。

1) 各 `*.htseq` は遺伝子ごとのリード数が記載されている。この１２個のファイルを、以下のようにすべて横に並べて 1 つのファイルを作りたい。

```
(ecoli.1.htseq)   (ecoli.2.htseq)   (ecoli3.htseq)   ..... (ecoli12.htseq)
b0001   11    b0001   0     b0001   7
b0002   117   b0002   9     b0002   131
b0003   33    b0003   1     b0003   31
b0004   44    b0004   4     b0004   58
b0005   3     b0005   0     b0005   2
```

ファイルを行単位で結合する UNIX コマンドとして、`paste` がある。以下を実行してみよう。

```
$ paste results/ecoli.[1-3].htseq |less
```

paste は引数の順にファイルを結合するので、引数の順番に注意する必要がある。以下のワイルドカードを使った 2 つのコマンドの出力を比べてみよう。ただし、echo は受け取った引数をそのままの順で表示するコマンドである。

A) `echo results/ecoli.*.htseq`

B) `echo results/ecoli.?.htseq results/ecoli.1?.htseq`

ファイルが 1, 2, 3, ...の順に並ぶのはどちらか。なお、コマンド B)は、以下のようにより簡潔に書くこともできる（試してみよ）: `echo results/ecoli.{?,1?}.htseq`

この結果を用いて、paste コマンドによって htseq の出力ファイルを 1, 2, 3, ...の順に結合したファイルを作成し、結果をファイル ecoli.paste_all に格納せよ。

2) ecoli.paste_all は、b0001 などの遺伝子名が奇数列に繰り返し出現するため、冗長である。そこで最初の列だけ残して、あとの遺伝子名の列は除きたい。すなわち、1,2,4,6,...,22,24 列目のみを残したい。これは awk を使っても行えるが、cut の方がより簡潔に書ける。cut は-f オプションによって指定された列のみを出力する。たとえば、`cut -f 1,3,4 file` は、file からタブ区切りで 1,3,4 番目の列を抜き出して表示する。

また、ecoli.paste_all の最後の 5 行は遺伝子領域にマッチしなかったリード数が記載されているが、これらの行を除きたい。grep コマンドを使って除くことを考えよ。これらの処理を行った結果を、ecoli.count_all に格納せよ。

3) 発現解析でよく行われる標準化の方法に RPKM (Read Per Kilobase per Million mapped reads)がある。これを計算するには各遺伝子の長さの情報が必要である。遺伝子アノテーションファイル ecoli.gtf には各遺伝子（exon）の開始位置と終了位置の情報が含まれている。awk を使ってこれから遺伝子の長さを計算しよう。3 列目が exon である行について、開始位置（4 列目）と終了位置（5 列目）を使って長さを計算し、10 列目にある遺伝子名、長さの順に出力する。

正しく実行すると、以下のような出力が得られるはずである。

```
"b0001"; 66
"b0002"; 2463
"b0003"; 933
"b0004"; 1287
"b0005"; 297
.....
```

ダブルクォート(")とセミコロン(;)が余分なので、取り除こう。これには sed コマンドが使える。sed はファイルの簡単な編集を行うプログラムで、's/置換する文字列/置換後の文字列/g'によって、ファイル中の指定した文字列を一斉に置換することができる。置換後の文字列を空にすることで、特定の文字列を除去することもできる。また、置換する文字列には正規表現が使えるので、〔ダブルクォートまたはセミコロン〕という指定は正規表現を使って書ける。

そこで、以下のコマンドによって、file 中のすべてのダブルクォートとセミコロンを除くことができる。

```
$ sed 's/[";]//g' file
```

これによって、以下のような出力が得られるはずである。

```
b0001 66
b0002 2463
b0003 933
b0004 1287
b0005 297
....
```

これをファイル ecoli.gene_length に保存せよ。

4) ecoli.count_all と ecoli.gene_length を結合して一つのファイルにしよう。実は、ecoli.count_all は遺伝子名でソートされているが、ecoli.gene_length は遺伝子名でソートされていない（ecoli.gtf が位置によってソートされているため)。従って、そのまま paste すると正しく結合されない（確認せよ)。そこで、まず ecoli.gene_length を遺伝子名によってソートし、ecoli.gene_length_sorted というファイルに保存しよう。

ecoli.count_all と ecoli.gene_length_sorted を paste コマンドで結合することもできるが、また遺伝子名の行が余分にできてしまう。ここでは別のコマンド join を使った結合をしてみよう。join は２つのファイルに共通の列（ここでは１列目の遺伝子名）があり、かつファイルがいずれもそれらの列に関してソートされているとき、それらの列をキーとして２つのファイルを対応づけて結合するコマンドである。

```
$ join -1 1 -2 1 ecoli.gene_length_sorted ecoli.count_all
```

引数の -1 1 -2 1 は１番目のファイルの１列目と２番目のファイルの１列目をキーとして対応づけることを意味しているが、これはデフォルトの動作なので、省略しても同じ結果になる。

paste はキー（ここでは遺伝子）の並びが２つのファイルで完全に一致していないと、行が合わなくなって意味がなくなるが、join はキーに重複や抜けがあって２つのファイルの間でずれていても、同じキーを持つ行を正しく対応づけてくれる。非常に強力なコマンドである。

なお、join はタブ区切りのファイルをスペース区切りに変更してしまう。見やすさを維持するためにタブ区切りに直したい場合は、sed 's/ /	/g' file によって、タブ区切りに変換できる。ただし、sed コマンドのスラッシュ(/)で区切られた文字列は、最初がスペースで２番目はタブである。コマンドラインでタブを入力するには Control-v を押してから Tab キーを押す。これによって以下のようなファイルができるはずである。

```
b0001	66	11	0	7	4	7	17	9	0	0	3	7	1
b0002	2463	117	9	131	51	20	161	20	1	0	32	34	2
b0003	933	33	1	31	10	4	30	9	1	2	7	9	4
.....
```

この結果を `ecoli.result_all` に保存しよう。

`ecoli.result_all` のようなタブ区切りテキストは、Excel などの表計算ソフトや R などの統計解析ソフトに読み込んで処理できる。実践演習 2 では、このデータから `R` を使って、`RNA-seq` データの標準化の方法としてよく用いられている RPKM 値を計算してみよう。

*実践演習 2　R を用いた RPKM 値の計算

ここでは R を使って、RNA-seq データの標準化の方法としてよく用いられている RPKM 値を計算してみよう。RPKM 値は、もとのリード数を、遺伝子の長さ 1000 bp あたり、各サンプルのリード数の和 1,000,000 read あたりになるように標準化する。

本実習では、実践演習 1 でディレクトリ~/data/7_ex/rnaseq の下に ecoli.result_all というファイルが作成されていることを前提としている。これを確認せよ。実践演習 1 をスキップする場合は、同じディレクトリの下の answer というディレクトリにある eco.result_all をコピーして使うこと。

以下でコマンド先頭の > は R のプロンプトを表すので、それ以降を改行なしで入力すること。

1) まず R の作業ディレクトリを~/data/7_ex/rnaseq に移動しよう。メニュー（その他→作業ディレクトリの変更）から移動しても、コンソールから setwd("ディレクトリ名")を打ち込んでもよい。移動したら、getwd()で正しく移動できていることを確認しよう。

次に、ecoli.result_all からデータを読み込む。read.table 関数を使ってデータを読み込み、変数 eco_rna に代入しよう。このファイルは、セパレータはタブで、ヘッダはなしである。1 列目に遺伝子名が入っているので、これを各行の「名前」として指定しよう。これには、read.table のオプションとして row.names=1 を指定する。このとき、row.names で指定した列（1 列目）が行の名前として読み込まれる。
読み込んだら、head 関数で先頭数行を表示して、正しく読めているかを確認しよう。

```
       V2  V3 V4  V5 V6 V7  V8 V9 V10 V11 V12 V13 V14
b0001   66  11  0   7  4  7  17  9   0   0   3   7   1
b0002 2463 117  9 131 51 20 161 20   1   0  32  34   2
b0003  933  33  1  31 10  4  30  9   1   2   7   9   4
....
```

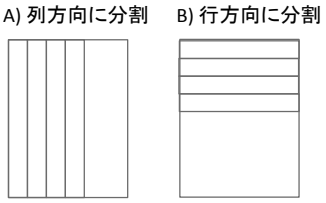
最初の行で V1 がないことに注意。1 列目はデータではなく、行の名前として読み込まれている。行に名前をつけると、eco_rna["b0002",]のように名前で行を抽出することが可能になる。

なお、1 行目はヘッダを表しており、最初のデータである b0001 は 2 行目から始まる。「入力ファイルにヘッダあり」として読み込んでしまうと行がずれてしまうので注意しよう。また、今回はファイルにヘッダ行が含まれないので、各列にはデフォルトで R がつけた名前（V+元のファイルの列番号）がついている。列名を変更したい場合は colnames という関数で行えるが、ここでは省略する。

2) eco_rna は 1 列目に遺伝子の長さが入っており、2,3,4 列目、5,6,7 列目、8,9,10 列目、11,12,13

列目が、それぞれ 4 つの条件の組合せについての 3 回ずつの反復実験の結果に対応している。まず長さを標準化するため、2-13 列のデータを取り出し、それらを 1 列目の遺伝子の長さで割った上で 1000 bp あたりの値に変換しよう。R では、このように行列を列（縦）方向のベクトルの並びとみて（図 1A）、それらと同じ長さのベクトルとの間で行うベクトル演算は、行列とベクトルの演算として簡潔に書ける。これを確認するため、以下を実行してみよう。

図1 行列のベクトルへの分割




```
> head(eco_rna / eco_rna[,1])
      V2        V3          V4          V5          V6          V7          V8
b0001  1 0.16666667 0.000000000 0.106060606 0.060606061 0.106060606 0.257575758
b0002  1 0.04750305 0.003654080 0.053187170 0.020706456 0.008120179 0.065367438
b0003  1 0.03536977 0.001071811 0.033226152 0.010718114 0.004287245 0.032154341
...
```

これが eco_rna の各値を同じ行の 1 列目の値（＝長さ）で割った値であることを確認しよう。1 列目は自分自身で割ることになるのですべて値が 1 になっている。また、1 行 2 列目は 11/66、2 行 2 列目は 117/2463 の値などとなっている（確認せよ）。

これを用いて、eco_rna から 2-13 列のデータを取り出し、それらを 1 列目の遺伝子の長さで割った上で 1000 bp あたりの値に標準化しよう。この結果を eco_rna_tmp という変数に代入しよう。結果を head で確認すると、以下の様になるはずである。

```
           V3       V4        V5        V6        V7        V8        V9
b0001 166.66667 0.000000 106.060606 60.606061 106.060606 257.575758 136.363636
b0002  47.50305 3.654080  53.187170 20.706456   8.120179  65.367438   8.120179
b0003  35.36977 1.071811  33.226152 10.718114   4.287245  32.154341   9.646302
```

3) RPKM を計算するには、eco_rna_tmp の値をさらにそれぞれのサンプルのリード数の和で割って標準化する必要がある。リード数の和を計算するため、eco_rna のデータに戻る。このデータの 2-13 列目に各サンプルのリード数が入っているので、それぞれの列を抽出したベクトルについて和をとるとよい。ベクトルの和をとるには sum 関数で行えるので、たとえば eco_rna の 2 列目の和は sum(eco_rna[,2])で計算することができる（試して見よ）。この計算を各列について繰り返し行えばよい。

このように、行列やデータフレームから各行または各列をベクトルとして抽出して、特定の関数を使った計算を繰り返すような処理を行う際は、apply 関数を使うことができる。apply は、apply(x, MARGIN, FUN)のように 3 つの引数をとる。x は入力データとなる行列（またはデータフレーム）、MARGIN は 1 または 2 をとり、1 は行（横）方向（図 1B）、2 は列（縦）方向（図 1A）のベクトルに分割した上で、行列全体にわたって処理を繰り返すことを指定する。FUN は適用する関数名である（help(apply)で確認せよ）。これを使って、eco_rna の 2-13 列目について、列方向にベクトルを抽出し、sum 関数を適用せよ。結果を eco_rna_readsum という変数に格納せよ。結果は要素数 12 のベクトルになるはずである。その最初の要素が sum(eco_rna[,2])と一致することを確認せよ。

4) これで RPKM を計算する準備が整った。あとは eco_rna_tmp の各行について、値を eco_rna_readsum の同じ位置の値で割って 1,000,000 倍すれば RPKM 値が計算できる。ただし、今回は列方向ではなく、行方向にベクトルを抽出して計算することになるので、これを行列とベクトルの割り算として eco_rna_tmp / eco_rna_readsum で計算することはできない。そこで再び apply 関数を使おう。

まずここで行う計算を確認しよう。たとえば 1 行目については以下のベクトルの割り算を行う。

```
> eco_rna_tmp[1,] / eco_rna_readsum
```

apply を使うには関数の形にする必要がある。そこで、function 関数を使って、2 つの引数間の割り算を行う簡単な関数 div を作ろう。

```
> div <- function(x,y){x/y}
```

うまく動作するかどうか確認しよう。

```
> div(eco_rna_tmp[1,], eco_rna_readsum)
```

これで apply には関数名として div を与えればよい。ただし、sum と違って div は引数を 2 つとる。1 つめの引数は apply 内部で与えられるが、2 番目の引数は外から与えなければならない。apply 関数では 4 番目以降の引数に、適用する関数の 2 番目以降の引数を与えることができるので、eco_rna_readsum を 4 番目の引数として指定する。これで行方向に関数を適用するように apply 関数を実行すればよい。apply を実行した後で全体を 1000000 倍する。この結果を eco_rna_rpkm0 という変数に代入せよ。

これを head で確認すると、結果が大量に表示されて流れてしまうはずである。実は結果は行と列が入れ替わってしまっており、1 行の長さが非常に長くなってしまっている。これは dim 関数で確認できる。dim 関数は、指定した行列やデータフレームの行数と列数を表示する。dim(eco_rna_tmp)と dim(eco_rna_rpkm0)を比較してみよう。

そこで、eco_rna_rpkm0 の行と列を入れ替えよう。これは転置行列をとる(transpose)という操作であり、R では t 関数で行う（help(t)で確認せよ）。この結果を eco_rna_rpkm に代入しよう。head で結果を確認すると、以下の様になるはずである。

```
           V3      V4        V5        V6        V7        V8        V9
b0001 1622.0127   0.0000 1028.43656 1599.14670 3950.70424 1809.39031 1105.77962
b0002  462.3032 315.3604  515.73937  546.35889  302.47257  459.18611   65.84694
b0003  344.2213  92.5012  322.18362  282.80729  159.69774  225.87433   78.22235
```