

## 演習問題 解答編

### 復習問題1 UNIX 基本コマンド

1.

```
アプリケーション > ユーティリティ > ターミナル
$ cd data/1_unix
$ pwd
$ ls -R
```

2. 以下は、先に~/unixtest ディレクトリに移動してから操作する場合となります。

```
$ cd ~/unixtest
$ mkdir FASTA-EX
$ cp ~/data/1_unix/sprot/*.fasta FASTA-EX
$ ls ~/unixtest/FASTA-EX
```

3. 以下は、~/unixtest がカレントディレクトリの場合です。

```
$ cd FASTA-EX
$ man grep
$ grep -h '^>' * | less
```

4. tail コマンドの引数に "-n +行数" を指定すると、先頭から数えて、指定された行数以降を表示します。

```
$ tail -n +2 -q * | less
```

5.

```
$ cat *HUMAN.fasta > ../human.fasta
$ cat *MOUSE.fasta > ../mouse.fasta
$ cat *DROME.fasta > ../drome.fasta
```

6. 以下は、~/unixtest/FASTA-EX がカレントディレクトリの場合です。

```
$ cd ..
$ tar zcvf FASTA-EX.tar.gz ./FASTA-EX
$ tar ztvf FASTA-EX.tar.gz
$ rm -rf FASTA-EX
```

上記のようにした場合は、解凍した際に FASTA-EX ディレクトリが作成されてその下にファイル群が配置される。一方

```
$ tar zcvf ../FASTA-EX.tar.gz .
```

のように対象ディレクトリにカレントディレクトリ(.)を指定すると、解凍時にカレントディレクトリに直に大量のファイルが作成されてしまうので注意すること。

7. chmod u+rw,g-rwx,o-rwx FASTA-EX.tar.gz でもよい。

```
$ chmod 600 FASTA-EX.tar.gz
```

\*8. `find` コマンドは検索の起点になるディレクトリパスを最初に指定し、評価式 `-name` の後ろにファイル名を指定することによって評価式に従ってディレクトリツリーを検索します。この時指定するファイル名にはワイルドカード等を使用したパターンマッチによる検索もできます (9. で使用)。

```
$ find ~ -name SYYM_DROME.sprot
```

\*9. `-exec` アクションは、それ以降に記述されたコマンドから";"までをコマンドラインとして実行でき、検索結果のファイルをコマンドの引数として使用することができます。'{}' は検索結果の中で現在の処理対象となるファイルに置き換えられます。ある条件に合致するディレクトリツリー下にあるファイル全てに対して特定の処理を行いたい時に便利です。

```
$ mkdir ~/SP
```

```
$ find ~ -name '*.sprot' -exec cp {} ~/SP ¥;
```

## 復習問題 2 R 入門

- `h <- women[,1] * 2.54`  
`w <- women[,2] * 0.454`  
`women2 <- data.frame(height=h, weight=w)`
- `women2[,2] / (women2[,1]/100)^2`  
値は 24.05638 23.65213 23.45671 ... 22.19570 22.26216 となる。
- 男性で喫煙歴がある人のデータを抽出し、その行数を数える。A %in% B (A が B の要素のうちどれかと一致する) を使う。  

```
> cancer.subset <- subset(cancer, gender=="male" & smoking %in%  
c("former", "current"))  
> nrow(cancer.subset)    (→62 個)
```
  - `cancer.subset` から `gene1` の発現データを抜き出してその平均値をとる。  

```
> mean(cancer.subset$gene1)    (→10.07379)
```
  - タブ区切りテキストファイルとして保存。  

```
> write.table(cancer.subset, sep="¥t", file="cancer.subset.txt")
```
- `gene1` と `gene2` の散布図を作成し、`gender` によって点を色分けする。  
解 1) x 軸、y 軸のデータを指定する一般的な書き方。`xlab`, `ylab` で、各軸のラベルを見やすく書き直している。  

```
> plot(cancer$gene1, cancer$gene2, col=cancer$gender, xlab="gene1",  
ylab="gene2")
```

  
解 2) モデル式を使った書き方。  

```
> plot(gene2 ~ gene1, cancer, col=gender)
```

  
(参考 1) 解 1 は `attach` を使うと以下のように簡潔に書ける。`attach` は変数名をデータフレームからとる (変数名のサーチパスに加える) ことを指示する。  

```
> attach(cancer)  
> plot(gene1, gene2, col=gender)
```

  
(参考 2) プロットの色を変更したい場合は以下のような書き方がある。

```
> color <- c("red", "blue")      # 色を1が赤、2が青に設定する
> plot(gene2 ~ gene1, cancer, col=color[gender])
(この動作を理解するために、color[cancer$gender]を実行して見よ)
```

(b) 散布図に回帰直線を引く。まず `lm` で線形モデルへのあてはめを行い、結果を変数(`ex.lm`)に格納する。それをを用いて `abline` で回帰直線を引く。

```
> ex.lm <- lm(gene2 ~ gene1, cancer)
> abline(ex.lm)
```

回帰直線の有意性については、`summary` で確認する。

```
> summary(ex.lm)
```

出力結果の最後の行から `p-value` は 0.3965 と有意水準より大きいので、有意ではない。

5. `gender` によってデータを分割すると、`stage` による違いが観察されなくなった。これは、もともと観察された `stage III` での `gene1` の発現量の減少は、`stage III` の患者が `gene1` の発現が低い女性に偏っているためであることを示唆している。このことは

```
> subset(cancer, stage=="stage III")
```

によって確認できる。

6. (a,b) `cancer` から 6~11 カラムを抜き出して変数 `expr` に代入し、`cor` を実行する。

```
> expr <- cancer[,6:11]
> cor(expr)
```

(c) 相関係数の絶対値が 0.5 以上であるかどうかは、以下のコマンドで調べられる。

```
> abs(cor(expr)) >= 0.5
```

	gene1	gene2	gene3	gene4	gene5	gene6
gene1	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE
gene2	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE
gene3	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE
gene4	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE
gene5	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE
gene6	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE

この結果から、相関の有無によって (`gene1, gene6`) と (`gene2, gene3, gene4, gene5`) の 2 つのグループに分けられることがわかる。

多変数間の関係を解析する多変量解析には、クラスタリングや主成分分析など様々な手法があるが、相関係数を計算することは、多くの手法においてその基盤となっている。

7. 関数は以下の通り。ただし仮引数 `x` は (関数内で一貫していれば) どんな名前に置き換えてもよい。

```
RMS <- function(x) {
  return( sqrt(mean(x^2)) )
}
```

`RMS(1:5)` の値は 3.316625 となる。

8. タイトルやラベルを無視すると以下の通り。

(左上) `plot(cancer[,1])`

(2行1列目) `plot(cancer[,2], cancer[,1])`

タイトルやラベルまでつけると以下のようになる。

(左上) `plot(cancer[,1], main=names(cancer[,1:4])[1])`

(2行1列目) `plot(cancer[,2], cancer[,1], xlab=names(cancer[,1:4])[2],  
ylab=names(cancer[,1:4])[1])`

### 復習問題 3 NGS 基本フォーマット

1-1) 第 21 染色体

1-2) 41 ( `$ wc Ex1_3.bed` )

1-3) 4

1-4) 33031813, 33025906

2-1) 10

2-2) 3

### 復習問題 4 NGS 基本ツール

1.

`$ bowtie2 -x eco -U ecoli.2.fastq,ecoli.3.fastq -S eco_ex.sam`

ファイルのカンマ区切りの後にスペースを入れないこと ☹

2.

`$ samtools view -bS eco_ex.sam -o eco_ex.bam`

3.

`$ samtools sort eco_ex.bam -o eco_ex_sorted.bam`

4.

`$ samtools index eco_ex_sorted.bam`

5.

`$ samtools view eco_ex_sorted.bam chr:377-2799 | wc`

275 リード

`$ samtools view eco_ex_sorted.bam chr:4179268-4183296 | wc`

1,015 リード

### 復習問題 5 UNIX によるテキストファイル処理

1. `$ awk '$2>=100{print}' ecoli.htseq`

2. `$ awk '$2>=100{print}' ecoli.htseq | grep -v '^_' > ecoli.temp`

3. `$ sort -k 2,2nr ecoli.temp > ecoli.htseq.sorted`

## 実践演習 1 RNA-Seq 解析結果の集計

- 1) ファイルが 1,2,3,...の順に表示されるのは B)の方。

```
$ paste ecoli.{?,1?}.htseq > ecoli.paste_all
```

- 2) 遺伝子にヒットしなかったリードの情報の行は、\_で始まっているのでこれを除く。

grep -v はマッチする行を除いて出力する。

```
$ cut -f 1,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 ecoli.paste_all | grep -v  
'^_' > ecoli.count_all
```

- 3) 長さは (終了位置) - (開始位置) + 1 で計算される

```
$ awk '$3=="exon" {print $10, $5-$4+1}' ecoli.gtf | sed 's/[";]//g' >  
ecoli.gene_length
```

- 4) 行の先頭からアルファベット順に並べたい場合は sort のオプションは不要。また、join のキーがどちらも 1 列目であるときは join のオプションは不要。最後の sed コマンド中の<TAB>は、Control-v を押してから Tab キーを押す。

```
$ sort ecoli.gene_length > ecoli.gene_length_sorted  
$ join ecoli.gene_length_sorted ecoli.count_all | sed 's/ /<TAB>/g' >  
ecoli.result_all
```

## 実践演習 2 R を用いた RPKM 値の計算

- 1) セバレータはタブ(`sep="\t"`)、ヘッダはなし(`header=F`)、1 列目を行の名前として読み込む (`row.names=1`)。

```
> eco_rna <- read.table("ecoli.result_all", sep="\t", header=F,
row.names=1)
```

- 2) `eco_rna` から 2-13 列目を抽出した行列を、1 列目を抽出したベクトルで割る。

```
> eco_rna_tmp <- eco_rna[,2:13] / eco_rna[,1] * 1000
```

- 3) `eco_rna` の 2-13 列目を列方向にベクトルとして取り出して `sum` 関数を適用する。

```
> eco_rna_readsum <- apply(eco_rna[,2:13], 2, sum)
```

- 4) `eco_rna_tmp` を行方向のベクトルとみて、同じ要素数のベクトル `eco_rna_readsum` で割る。それを 1,000,000 倍する。その後、転置行列をとる。

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

```
> eco_rna_rpk0 <- apply(eco_rna_tmp, 1, div, eco_rna_readsum) *
1000000
```

```
> eco_rna_rpk <- t(eco_rna_rpk0)
```

(別解) 行方向にベクトル演算をしたい場合、まず転置行列をとって列方向のベクトルとして演算した後 (これは簡潔に書ける)、再度転置行列をとる方法もある (結果を比べてみよ)。

```
> eco_rna_rpk2 <- t(t(eco_rna_tmp) / eco_rna_readsum) * 1000000
```