GITC **2019** 春 準備編 UNIX・R・NGS の基礎 演習

復習問題１　UNIX 基本コマンド　（*印は応用問題です。時間に余裕があればトライしてみてください）

1. ターミナルを起動して以下のコマンドを実行せよ。

1-1. ~/data/1_unix ディレクトリに移動せよ。

1-2. カレントディレクトリ（現在のディレクトリ）の名前を確認せよ。

1-3. カレントディレクトリの内容を表示せよ（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する）。

（使用するコマンド：cd, pwd, ls）

2. ~/data/1_unix/sprot ディレクトリ内には複数の FASTA ファイル（拡張子が.fasta のファイル）がある。

2-1. それらの FASTA ファイル全てを、ワイルドカード「＊」を使って ~/unixtest/FASTA-EX ディレクトリにコピーせよ。ディレクトリがない場合は新規に作成すること。

2-2. 正しくコピーされたかを確認するために、~/unixtest/FASTA-EX ディレクトリの内容を表示せよ。

（使用するコマンド：mkdir, cp, cd（必要であれば）, ls）

3. ~/unixtest/FASTA-EX ディレクトリに移動せよ。

3-1. **2** でコピーした全ての FASTA ファイル内にある配列名（「>」で始まる行）を、grep コマンドを使用して抜き出せ。

3-2. 上記の grep コマンドの出力をパイプ「｜」で less コマンドに送り、どのように表示されているか確認せよ。

3-3. 複数のファイルに対して grep を実行すると、結果行にファイル名も付加される。 grep において、ファイル名を表示しないオプションを man コマンドで調べよ。調べる際には"filename"をキーワードとして検索すること。

3-4. 調べたオプションを使って、ファイル名が付加されない grep 結果を確認せよ。

（使用するコマンド：grep, less, man）

4. ~/unixtest/FASTA-EX にコピーした FASTA ファイルから、生物種ごとに Multi-FASTA 形式のファイルを作成することを考える（Multi-FASTA とは、1 ファイルの中に複数の FASTA 形式の配列が含まれるファイル）。

4-1. どの生物種の配列であるかは、ファイル名に含まれる文字：HUMAN, MOUSE, DROME によってわかる。cat コマンドおよびワイルドカードを使用して、ファイル名に「HUMAN」を含む全てのファイルの内容を画面に出力してみよ。

4-2. 上記の出力をリダイレクト「>」を使って、human.fasta というファイルに書き出せ。

4-3. less コマンドで human.fasta の内容を確認せよ。

*4-4. 同様に「MOUSE」→ mouse.fasta として、「DROME」→ drome.fasta として作成せよ。

（使用するコマンド：cat, less）

***5.** FASTA-EX ディレクトリのバックアップを作成してから削除する。

5-1. 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 コマンドで作成せよ(tar のオプションは"zcvf"を使用)。

5-2. 作成した、圧縮アーカイブの中身を確認せよ(tar のオプションは"ztvf"を使用)。

5-3. 確認できたら FASTA-EX ディレクトリを削除しせよ。

（使用するコマンド：tar, rm）

***6.** 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に)アクセス権を変更せよ。

***7.** UNIX にはファイル検索に用いる 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"を探せ。

復習問題２ エディタとスクリプト

この演習では、以下のフォルダのファイルを使用用する。
~/data/2_editor/

１） テキストに記載している （演習）引数、および（演習）引数の使用用 のスライドを読むこと。

２） example4.sh を作成せよ。新規にファイルを作成してもよいし、（もしあるなら）exapmle3.sh を修正したあと、別名で保存しても良い。ファイルの編集には Emacs を使用用せよ。

３） $ ./exapmle4.sh GO
として、example4.sh を実行行し、実行行結果を確認せよ。
実行行できない場合、実行行権が付与されているかを確認せよ。

この example4.sh は、実行行した際に .tmp という中間ファイルが作成される。
中間ファイルは必要ないので、これを最終的に消したい。
そうなるように example4.sh を編集せよ。

編集した後のスクリプトを実行行し、 ls コマンドで .tmp ファイルが存在しないことを確認せよ。

復習問題３　R

（基本演算編）

R で標準で使える women データを使って、以下の問題を考えよう。

1. まずコンソール上で women とタイプしてデータを表示せよ。women データは身長(height)が inch、体重(weight)が pound であらわされている。これを、身長を cm、体重を kg の単位に直したい。以下の手順でこれを行え。

(a) women から身長の列を抜き出し、これを cm に変換して、h という変数に代入せよ。ただし、1 inch=2.54cm である。

(b) women から体重の列を抜き出し、これを kg に変換して、w という変数に代入せよ。ただし、1 pound=0.454kg である。

(c) data.frame(height=h, weight=w)によって新しいデータフレームを作り、women2 という変数に代入せよ。`

2. 前問で作成した women2 の各行について、その身長と体重からボディマス指数(BMI)を計算せよ。ただし、体重 w kg、身長 h m （cm ではない）の人の BMI は w/h^2 で定義される。

（統計解析編）

R 入門の講義で用いた cancer データを使って、以下の問題を考えよう。変数 cancer が残っていない場合は、作業ディレクトリを~/data/3_R に変更してから read.table を使って読み込むこと（テキスト「データフレームの読込み１」）。

3. (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。

4. (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。

*5. 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。

*6. (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。

（関数の作成）

7. 与えられたベクトルに対し、二乗平均平方根(root mean square)を計算する関数を RMS という名前で作成せよ。ただし、二乗平均平方根は、ベクトルの各要素を二乗した値の平均値の平方根であり、与えられた値（ベクトル）の平方根をとる関数は sqrt である。また、関数はエディタを使って作成すること。作成した関数を使って RMS(1:5)を計算せよ。

*8. 「関数の作成(2)」のスライドで使用した plotAll 関数について考えよう。

(a)プログラムのソースコード（plotAll.R）を直接読み込むのではなく、エディタで開いてからマウスでコマンド全体を選択して実行してみよう（「エディタからのコマンドの入力と実行」参照）。これで plotAll 関数が定義される。これを用いて plotAll(cancer[,1:4])を実行せよ。

(b) plotAll 関数は、引数が一つのときは、そのデータフレーム内での総当たりのプロットを作成するが、対角線上とそれ以外とでは異なるコマンドでプロットを作成している。左上のプロット、およびその下の２行１列目のプロットと同じプロットを直接作成する plot コマンドはそれぞれどのようなものか、plotAll.R のプログラムから考えてみよ。ただし、タイトル(main)やラベル(xlab,ylab)をつけるところは難しいので無視してよい。

復習問題４　NGS 基本データフォーマット

~/data/4_format に移動せよ

1. SRR073576（SRA のアクセッション番号）はエンドウヒゲナガアブラムシのバクテリオームの RNA-seq 解析結果のデータである。
   1) SRR073576 を NCBI で検索し、情報を確認せよ。
      ＊シングルリードなのか、ペアエンドリードなのか確認しよう。
   2) SRA Toolkit の prefetch コマンドを使用し、SRA データをダウンロードせよ。
      ＊prefetch コマンドの使用方法はコマンドのヘルプ機能で調べること。
      ＊デフォルトではファイルの出力先は ~/ncbi/pubkic/sra となる。
        --output-directory オプションを使用することで､出力先ディレクトリを指定可能。
   3) SRA Toolkit の fastq-dump コマンドを使用し、sra 形式のファイルから fastq ファイルを抽出せよ。

2. bed ファイル(ex4.bed)と gtf ファイル(ex5.gtf)はヒト染色体上にある遺伝子群について同じ情報を表している。それぞれのファイルの形式の違いに注意しつつ、以下の問に答えよ。
   1) 何番染色体にコードされているか。
   2) いくつの遺伝子(重複領域に別名のものもそれぞれ数える)が含まれているか。
   3) 遺伝子 BC041449 にエキソンはいくつ含まれているか。
   4) 遺伝子 BC041449 の最初のエキソンの開始位置と最後のエキソンの終了位置はそれぞれ何か。ただし、最初の塩基の位置座標は 1 とし、エキソンの開始、終了は転写される向きに沿って考えること

3. bed ファイルはタブ区切りのファイルである。
   1) R を使って ex4.bed からデータを読み込み、変数 bed に代入せよ。また変数 bed の内容を確認せよ。
   2) ex4.bed にはエキソンを一つから最大六つまでもつ遺伝子が含まれている。変数 bed からエキソン数の情報を取り出し、それぞれのエキソン数をもつ遺伝子がいくつずつあるかカウントせよ。ただし、与えられたベクトルの要素の頻度をカウントする関数は table である。

4. Sam ファイル(review_4-4.sam)は paired-end の map 結果である。
   1) ここに上がっている paired-end 数はいくつか。
   2) そのうち正しい paired-end の方向で map しているものはいくつか。

復習問題5　クオリティコントロールと NGS 基本ツール

~/data/5_ngs に移動せよ

1. 2D2L_rep1_R1.fastq と 2D2L_rep1_R2.fastq ファイルはアラビドプシスの発芽・緑化後の芽生えをサンプリング、ライブラリー作製した Paired-end read(76base x2)の RNA-Seq の生リードの fastq ファイルである。これを用いて、以下のパラメータを参考にし、paired-end での cutadapt にかけよ。

```
-q 30
-O 7
-m 50
-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC
-A AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATC
```

   1）Cutadapt の log を見て、pass した pair 数、quality trim された base 数を調べよ。
   2）Cutadapt 処理前後の fastq ファイルを less コマンド等で見比べよ
   3）wc コマンドで cutadapt 前後の read 数を調べよ。
   4）Cutadapt 処理前後の fastq ファイルを fastqc にかけ、cutadapt 処理による、低品質配列が除かれていることを確認せよ。

2. Seqkit を使ってリードファイル ecoli.2.fastq, ecoli.3.fastq の statistic 情報を確認せよ。

3. bowtie2 を使って、リードファイル ecoli.2.fastq, ecoli.3.fastq を、リファレンス：eco にマッピングし、結果をファイル eco_ex.sam に出力せよ。その際、リードファイルはカンマ区切りで複数指定できることを使え。

4. samtools を使って、eco_ex.sam を bam に変換し、eco_ex.bam として保存せよ

5. samtools を使って、eco_ex.bam をソートし、eco_ex_sorted.bam として保存せよ
   現行 samtools は 4.5.の作業は一度にできうるが過程確認のため、今回は個別に行う

6. samtools を使って、eco_ex_sorted.bam にインデックスを作成せよ

7. samtools を使って、eco_ex_sorted.bam から以下の遺伝子にマップされたリードを取り出して数を数えよ。抽出された行を数えるには、 wc コマンドを使うこと。

染色体名	開始位置-終了位置	遺伝子名
chr	337 - 2799	thrA
chr	4179268 - 4183296	rpoB

復習問題6　UNIX によるテキストファイル処理

この演習では、ex6.sam を使用する。ファイルは下記のパスにある。

~/data/6_text/

ex6.sam ファイルは SAM 形式で記されているデータである。内容に関しては「NGS 基本データフォーマット」の章を参照すること。

ex6.sam の中で、順鎖にも逆鎖にもマッピングされていないフラグメントがあるかどうかが知りたい。そのために以下の操作をせよ。

1)　ex6.sam からヘッダー部のみを抜き出して出力せよ。（ヒント： grep を使用せよ）

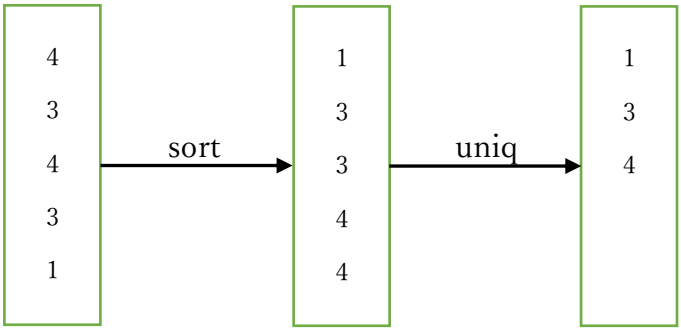
2)　ex6.sam からヘッダー部以外の行を抜き出し、ex6_2.sam として保存せよ。

ex6_2.sam ファイルはマッピング結果部分のみのファイルとなった。

3)　ex6_2.sam にある各フラグメントの FLAG 値を確認するために、「2 カラム目」のみの値を出力せよ。（ヒント： awk を使用せよ）

4)　3)で出力された値がどのようなものであるか知りたい。このような場合、パイプ(|)を使い sort コマンドを実行してから、uniq コマンドを実行することで、「重複している値」を全て取り除くことができる。

例）



3)の結果に対して sort|uniq を使用し、どのような値の種類があるかを調べよ。

*5)　ex6.sam には順鎖にも逆鎖にもマッピングされていないフラグメントがあるか？
あるならば、それはどのフラグメント名であるかを出力せよ。
（ヒント：SAM フォーマットの FLAG 値はどのような意味を持つかを確認せよ。
その上で、4)で得られた結果と比較して考えるとよい。）

*実践演習 1 RNA-Seq 解析結果の集計(1)

RNA-Seq 解析のデータを使って、Unix や R の基本コマンドを使ってもう一歩先の解析を行ってみよう。`~/data/8_ex/rnaseq` に移動しよう。この下の `results` ディレクトリには、12 サンプルの RNA-Seq データをそれぞれ大腸菌ゲノムにマッピングした結果から、`htseq-count` コマンド(https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/count.html)を使って、遺伝子ごとにその領域に重なるリード数を単純にカウントした結果(`ecoli.*.htseq`)が格納されている。UNIX コマンドを使って、この結果を整理してみよう。

なお、ここで使うサンプルデータ（NCBI GEO データベースの GSE59468 からデータを間引いて作成したもの）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いる。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。

番号	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` ファイルには、それぞれのサンプルにおける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 ecoli.count_all.tmp1 というファイル名で保存せよ。

2）ecoli.count_all.tmp1 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, 8, . . . , 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。cut コマンドを使って上記の処理を行い、結果を ecoli.count_all.tmp2 というファイルに保存せよ。

3）ecoli.count_all.tmp2 の最後の５行は、特定の遺伝子にきちんと対応づけられなかったリードに関する情報が記載されている。tail コマンドで確認しよう。

```
$ tail ecoli.count_all.tmp2
```

これらの行はいずれも__で始まっており、例えば、__nofeature は遺伝子領域以外にマップされたリードの数、__ambiguous は複数の遺伝子にまたがる領域にマップされたために１つの遺伝子には対応づけできなかったリードの数を表している。これらの行を、grep コマンドを使って除き、結果を、ecoli.count_all に格納せよ。

結果として、以下のようなファイルができるはずである。

```
b0001    11    0    7   4    7   17  9    0   0   3   7   1
b0002    117   9    131 51   20  161 20   1   0   32  34  2
b0003    33    1    31  10   4   30  9    1   2   7   9   4
.....
b4660    3     0    1   0    1   0   0    0   0   0   0   0
b4661    5     0    2   1    1   6   0    0   0   0   0   0
```

*実践演習 2　RNA-Seq 解析結果の集計(2)

実践演習 1 で作成したファイルは、各遺伝子について 12 個のサンプルのリード数を記録したタブ区切りのテーブルであり、R で処理するのに適した形になっている。12 個のサンプルは、4 つの条件について、それぞれ 3 つずつのレプリケートをとったデータであった。そこで、 R を用いて、各条件についてそれぞれ 3 つのレプリケーションの平均値を計算してみよう。ただし、サンプルごとにリード数の総和が違っているため、それを補正するためにまず標準化（ノーマライズ）を行う必要がある。

ここでは、各サンプルのリード数の総和が 100 万になるように標準化する CPM (Counts per million reads) という値を計算しよう。それには、もとのリード数をサンプルごとに各サンプルのリード数の総和で割って 100 万倍すればよい。なお、標準化については実践編で詳しく説明されるが、異なる遺伝子間で発現量を比較する場合は、リード数に加えて遺伝子の長さについての補正も必要で、そのために RPKM (Read per kilobase per million reads)という値がよく用いられる。これはもとのリード数を、遺伝子の長さ 1,000 bp あたり、各サンプルのリード数の和 100 万あたりになるように標準化したものである。ここではより簡単な CPM を計算するが、同じ遺伝子の発現量をサンプル間で比較するだけの場合にはこれも有効な指標である。

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/8_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.count_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
b0001   11   0   7   4   7  17   9   0   0   3   7   1
b0002  117   9 131 51 20 161 20   1   0  32  34   2
b0003   33   1  31 10  4  30   9   1   2   7   9   4
....
```

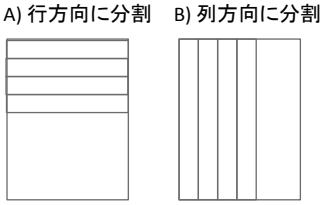
最初の行で V1 がないことに注意。1 列目はデータではなく、行の名前として読み込まれている。行に名前をつけると、eco_rna["b0020",]のように名前で行を抽出することが可能となり、興味のある遺伝子の情報を抽出したい場合などには便利である。

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) CPM を計算するには、eco_rna の値をそれぞれのサンプルのリード数の和で割る必要がある。この和をまず計算しよう。eco_rna の各列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のは sum 関数で行えるので、たとえば eco_rna の 1 列目の和は sum(eco_rna[,1])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、それに特定の関数を適用する処理を繰り返すときは、apply 関数を使うのが便利である。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 1A）、2 は列（縦）方向（図 1B）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）。

図1 行列のベクトルへの分割



この apply を使って、eco_rna の各列について列方向にベクトルを抽出し、sum 関数を適用して、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[,1])と一致することを確認せよ。

3) CPM を計算するには eco_rna 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 倍すればよい。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が、再び apply 関数を使うことができる。

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[1,] / eco_rna_readsum
```

apply を使うには関数の形にする必要があるが、実は割り算の演算子 / は、クオートで囲むことによって 2 つの引数を持つ関数名としても表すことができる。例えば、6 / 3 は、関数形で表すと、'/'(6,3)と書ける（試して見よ）。

従って，上記の計算を行うには apply に関数名として'/'を与えればよい。ただし、sum と違って'/'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、除数 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_cpm0 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、ここでの結果は行と列が入れ替わってしまっており（これは apply 関数の仕様）、1 行の長さが非常に長くなっている。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)と dim(eco_rna_cpm0)を比較してみよう。

これでは扱いづらいので、eco_rna_cpm0 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_cpm に代入しよう。head で結果を確認すると、以下のようになるはずである。

```
             V2        V3         V4         V5        V6         V7        V8
b0001  107.05284   0.00000   67.87681  105.54368 260.74648  119.41976  72.98145
b0002 1138.65289 776.73255 1270.26608 1345.68194 744.98994 1130.97538 162.18101
b0003  321.15851  86.30362  300.59732  263.85920 148.99799  210.74075  72.98145
```

4) 最後に、標準化した値を使って、サンプルごとに 3 つのレプリケートの平均値を計算しよう。各行（遺伝子）について、各サンプルは、それぞれ 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 列目に対応しているので、それらの値の平均値を計算すればよい。

再び apply 関数を使おう。そのために、まず各行について、上記の 4 つの平均値を計算するための関数 calc_means を作る。関数の作成は、コマンドラインからそのまま打ち込んでもよいが、ちょっと複雑なのでエディタを使って行うとよいだろう。

```
calc_means <- function(v) {
    c( mean(v[1:3]), mean(v[4:6]), mean(v[7:9]), mean(v[10:12]) )
}
```

この関数は、引数に v として各行における要素 12 のベクトル値をとり、それを 3 要素ずつの 4 つのベクトルに分けて、それぞれの平均値を計算し、c()関数によって値をまとめたベクトルとして返している。calc_means(1:12) を実行して動作を確認しよう。

前問と同様にして、apply 関数によってこの関数を eco_rna_cpm に適用し、サンプルごとの平均値を計算しよう。その際、行と列の入れ換えにも注意すること。正しく作成できれば、head で確認すると、以下のような結果が得られるはずである。

```
            [,1]       [,2]      [,3]      [,4]
b0001   58.30988  161.90331  24.32715  46.25669
b0002 1061.88384 1073.88242 106.92005 222.94657
b0003  236.01981  207.86598 153.35993 116.14609
```

解答

実践演習 1　RNA-Seq 解析結果の集計(1)

1) ファイルが 1,2,3,...の順に表示されるのは B)の方。

```
$ paste results/ecoli.{?,1?}.htseq > ecoli.count_all.tmp1
```

2) cut で該当する列を抽出し、次に_で始まる行を除く。grep –v はマッチする行を除いて、それ以外の行を出力する。

```
$ cut –f 1,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 ecoli.count_all.tmp1 >
ecoli.count_all.tmp2
$ grep -v '^_' ecoli.count_all.tmp2 > ecoli.count_all
```

実践演習 2　RNA-Seq 解析結果の集計(2)

1) セパレータはタブ(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.count_all", sep="¥t", header=F,
row.names=1)
```

2) 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, sum)
```

3) eco_rna 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。

```
> eco_rna_cpm0 <- apply(eco_rna, 1, '/', eco_rna_readsum) * 1000000
> eco_rna_cpm <- t(eco_rna_cpm0)
```

4) apply 関数を使って関数 calc_means を eco_rna_cpm の各行に対して適用する（calc_means があらかじめ定義されていることが前提）。結果は、前問と同様に行と列が入れ替わるので、転置行列をとる。以下では、関数の適用と転置行列をとる操作を一つのコマンドにまとめている。

```
> eco_rna_mean <- t( apply(eco_rna_cpm, 1, calc_means) )
```