ゲノムインフォマティクストレーニングコース

RNA-seq入門・準備編
コース概要

基礎生物学研究所
情報管理解析室
内山　郁夫

ゲノムインフォマティクストレーニングコース　準備編
Unix・R・NGSの基本　　スケジュール

2月27日（木）

10:00-10:05	挨拶	
10:05-10:45	GITC概要	[内山]
10:45-12:00	UNIX基本コマンド（前編）	[西出]
12:00-13:00	（昼休憩）	
13:00-14:30	UNIX基本コマンド（後編）	[西出]
14:30-14:45	（休憩）	
14:45-17:15	R入門	[内山]
17:30-19:00	統計学入門	[佐藤]

2月28日（金）

08:30-09:00	（開場・復習）	
09:00-10:00	NGS基本データフォーマット	[杉浦]
10:00-10:30	クオリティコントロールとNGS基本ツール	[山口]
10:30-10:40	（休憩）	
10:40-12:00	クオリティコントロールとNGS基本ツール（続き）	[山口]
12:00-13:00	（昼休憩）	
13:00-14:00	エディタとスクリプト	[杉浦]
14:00-15:00	UNIXによるテキストファイル処理	[中村]
15:00-17:00	演習	

講師

- **生物機能解析センター・情報管理解析室**
  - 内山郁夫　助教（準備編オーガナイザー）
  - 西出浩世　技術職員
  - 中村貴宣　技術職員
  - 杉浦宏樹　技術職員
- **生物機能解析センター・生物機能情報分析室**
  - 重信秀治　教授（実践編オーガナイザー）
  - 山口勝司　技術職員
- **北海道大学大学院農学研究院**
  - 佐藤昌直　助教

RNA-seq 入門

準備編

- Unix基本コマンド
- エディタとスクリプト
- R入門
- NGS基本フォーマット
- NGS基本ツール
- Unixによるテキスト処理
- 生物情報解析システムの紹介
- 演習

実践編

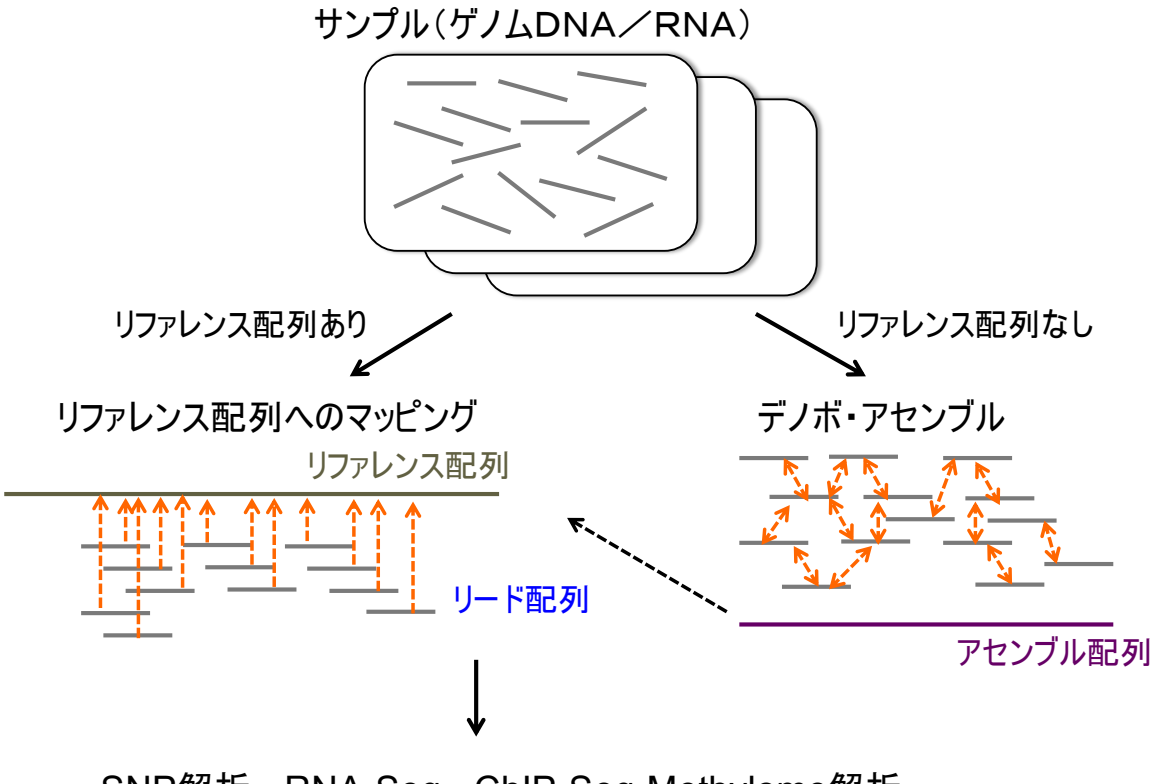
- NGS基本フォーマット・ツール復習
- NGSデータ可視化ツール
- 統計学入門
- RNA-seqパイプライン：基礎
- RNA-seqパイプライン：transcriptベース
- RNA-seqパイプライン：genomeベース
- 多変量解析
- 機能アノテーションとGO解析
- RNA-seqパイプライン：de novo
- 演習

準備編の狙い

- **実践編にむけての基礎固め**
  - **UNIXの基本コマンド、UNIX上でのコマンドの実行**
  - **Rによるデータ解析、統計解析**
  - **NGS解析のための基本コマンドとデータフォーマット**

- **計算機操作についての基本的なスキル**
  - コマンドタイプによる操作に慣れる
  - テキストファイルの扱いに慣れる
  - 習うより慣れよの精神で

次世代シーケンサデータ処理の概要

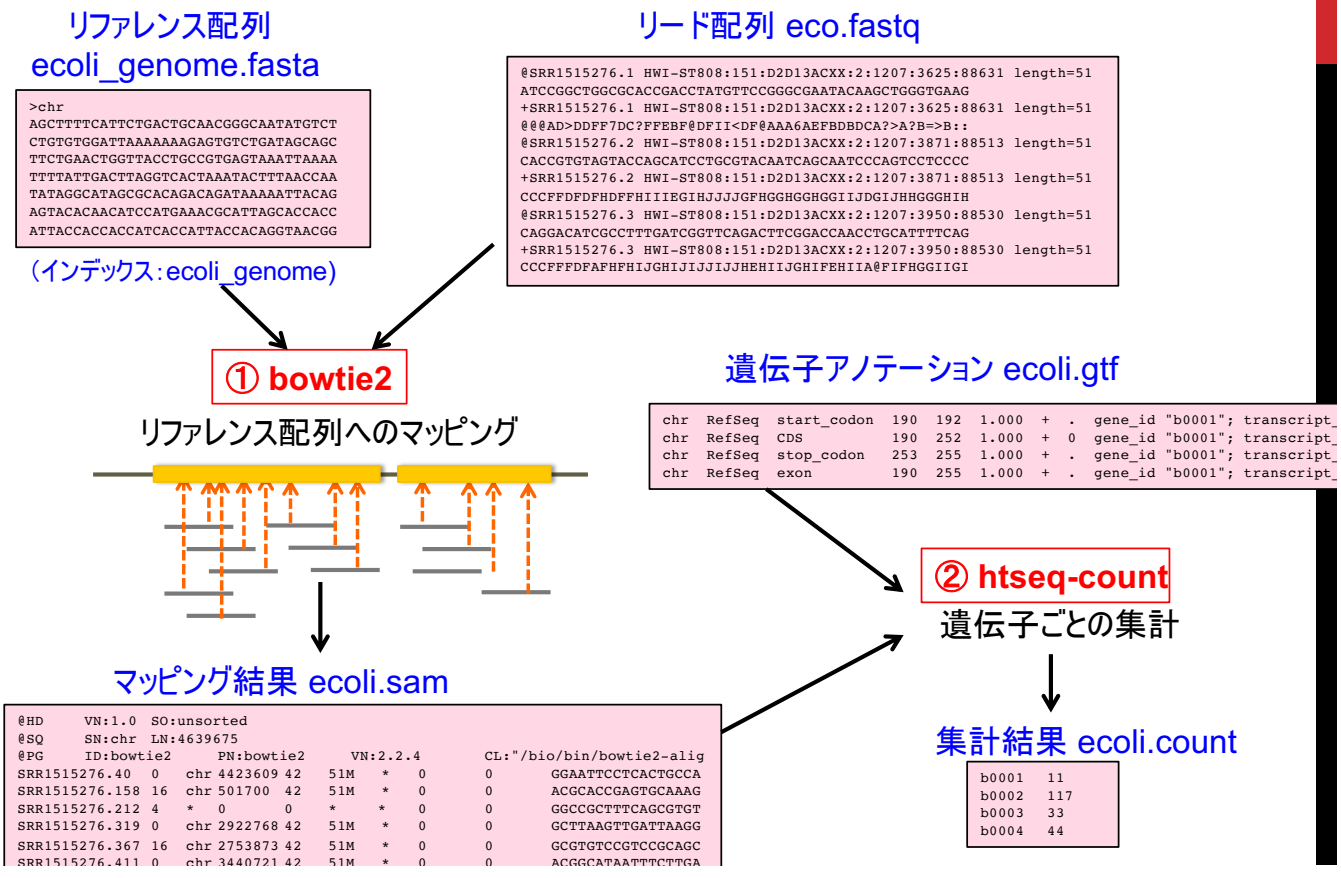


ちょっとやってみよう

Dockから「ターミナル」を開いて、以下のコマンドを順にタイプしてみよう

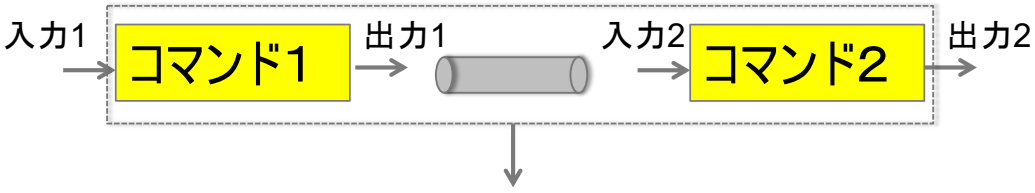
```
$ cd data/0_intro
      (ディレクトリの移動)
$ ls
      (ファイルの表示)
$ bowtie2 -x ecoli_genome -U eco.fastq -S ecoli.sam
      (NGSリード配列(eco.fastq)をゲノム配列上にマッピング)
$ htseq-count ecoli.sam ecoli.gtf > ecoli.count
      (マッピングした結果を使って遺伝子ごとにリード数をカウント)
$ head ecoli.count
      (結果ファイル ecoli.count の先頭10行を表示)
```

データ処理の流れ



複数のコマンド(プログラム)を組み合わせた複雑な処理の実行

コマンドのパイプライン



スクリプト:コマンドS

```
コマンド1
コマンド2
```

スクリプトによる実行

テキストデータ

リファレンス配列
ecoli_genome.fasta

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

リード配列 eco.fastq

```
@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
```

遺伝子アノテーション ecoli.gtf

```
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";
```

マッピング結果 ecoli.sam

```
@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
```

集計結果 ecoli.count

```
b0001   11
b0002   117
b0003   33¥
b0004   44
```

発現量データ(表形式のデータ)の解析

表データ

	条件1	条件2	条件3	条件4
遺伝子1	58.3	161.9	24.3	46.3
遺伝子2	1061.9	1073.9	106.9	222.9
遺伝子3	236.0	207.9	153.4	116.1
遺伝子4	16.2	38.3	0.0	0.0

条件1　　(58.3, 1061.9, 236.0, 16.2, ...)

条件2　　(161.9, 1073.9, 207.9, 38.3, ...)

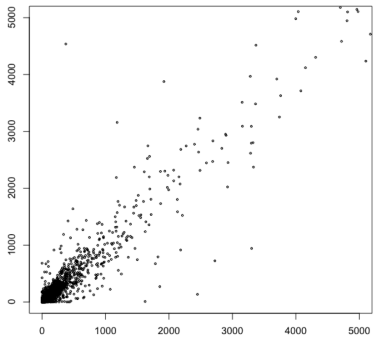
データ解析、統計解析

条件1と条件2の発現量比

$$\left(\frac{58.3}{161.9} \quad \frac{1061.9}{1073.9} \quad \frac{236.0}{207.9} \quad \frac{16.2}{38.3} \right)$$

データ可視化

散布図
(scatter plot)



ゲノムインフォマティクストレーニングコース　準備編

Unix･R･NGSの基本　スケジュール

2月27日(木)

10:00-10:05　挨拶
10:05-10:45　GITC概要　[内山]
10:45-12:00　UNIX基本コマンド(前編)　[西出]
12:00-13:00　(昼休憩)
13:00-14:30　UNIX基本コマンド(後編)　[西出]
14:30-14:45　(休憩)
14:45-17:15　R入門　[内山]
17:30-19:00　統計学入門　[佐藤]

2月28日(金)

08:30-09:00　(開場･復習)
09:00-10:00　NGS基本データフォーマット　[杉浦]
10:00-10:30　クオリティコントロールとNGS基本ツール　[山口]
10:30-10:40　(休憩)
10:40-12:00　クオリティコントロールとNGS基本ツール(続き)　[山口]
12:00-13:00　(昼休憩)
13:00-14:00　エディタとスクリプト　[杉浦]
14:00-15:00　UNIXによるテキストファイル処理　[中村]
15:00-17:00　演習

準備編を通しての目標

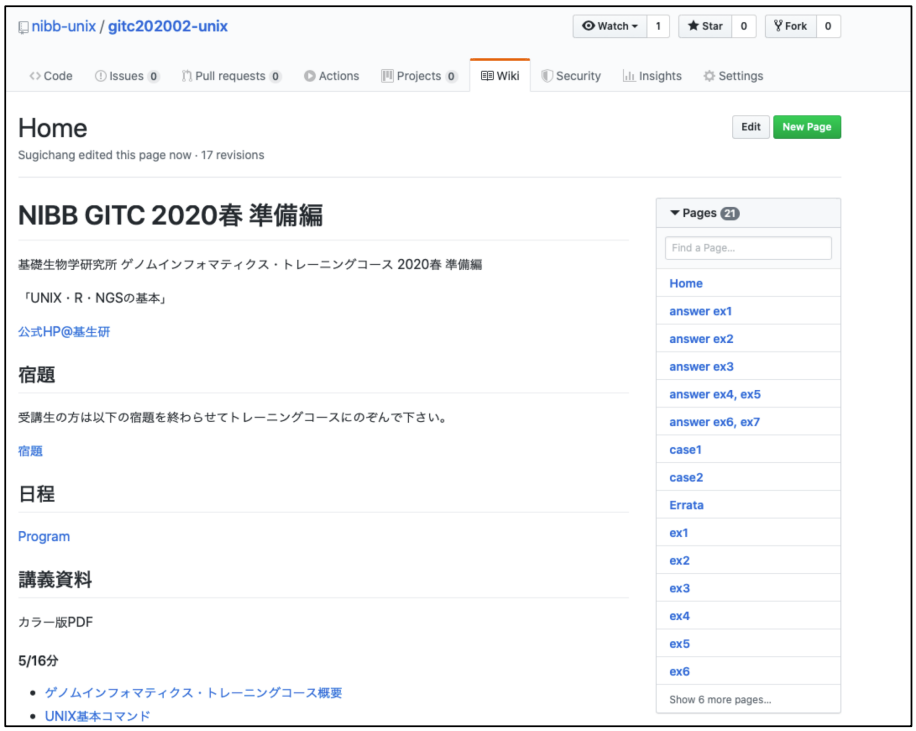
- **インフォマティクスに対する心的障壁を取り除く**
- **ゲノムインフォマティクスの基礎的技術と考え方を身に付ける**
  - UNIXコマンドラインの操作や環境に慣れる
  - タブ区切りテキストを処理する程度の簡単なプログラミングを学ぶきっかけをつかむ
- **独習するための基盤を身に付ける**
  - 今後独習する為に必要な基礎的なスキル
  - 今後何を学べば良いかの指針を得る
- **インフォマティクス専門家と対話できる程度の基礎知識を身に付ける**

オススメ勉強法

- **コマンドやプログラムは自分で試してみる。copy & pasteでなくタイピングすること。（熊楠メソッド）**
- **気軽に質問する。講師はもちろん、隣や前後の受講生にも。その一方で、ヘルプやマニュアルドキュメントをうまく活用する。**
- **自分の研究との接点を常に意識する。自分の研究に応用する。**

コースページ

https://github.com/nibb-unix/gitc202002-unix/wiki



それでは始めましょう