

ゲノムインフォマティクストレーニングコース

# NGS解析入門

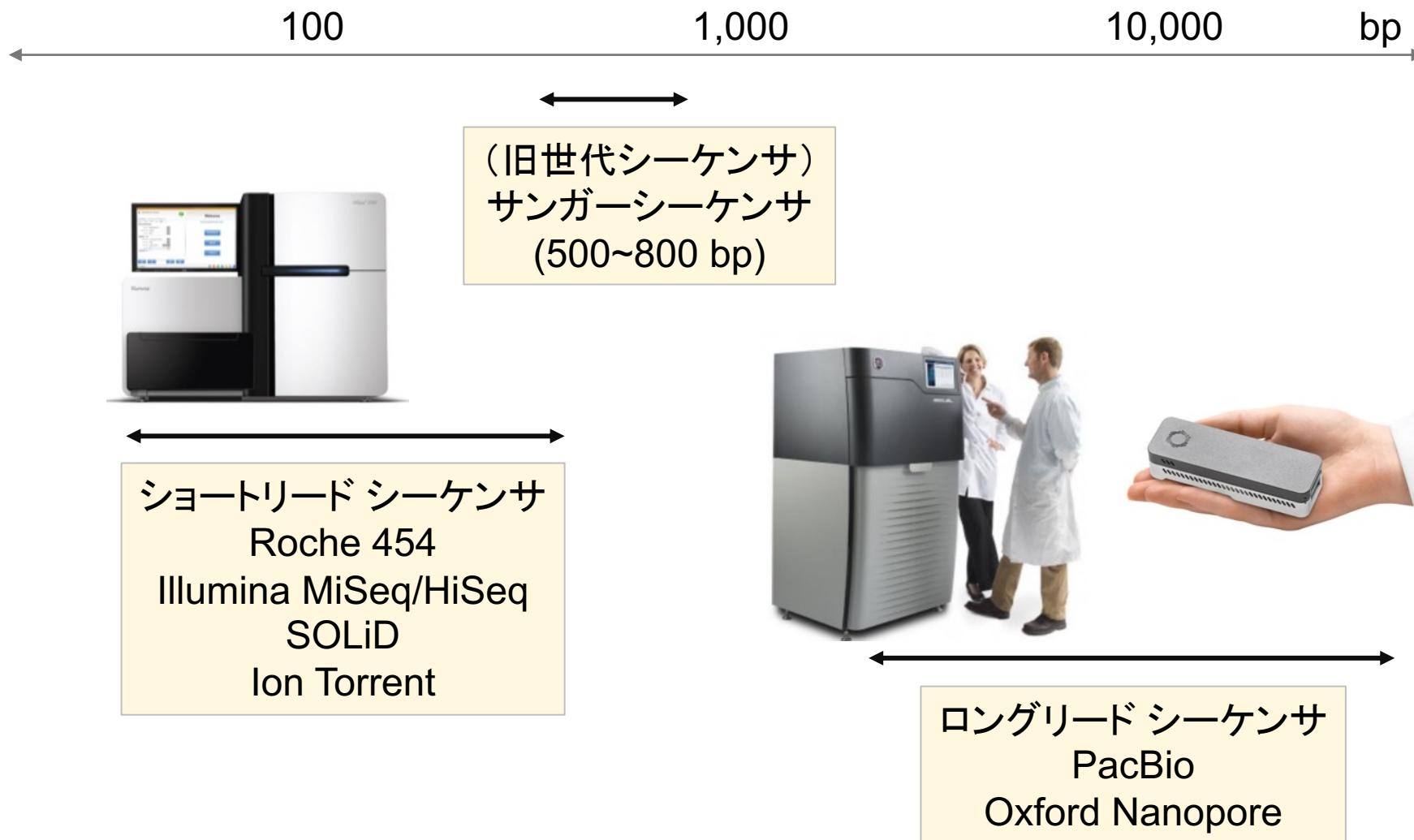
## コース概要

基礎生物学研究所

情報管理解析室

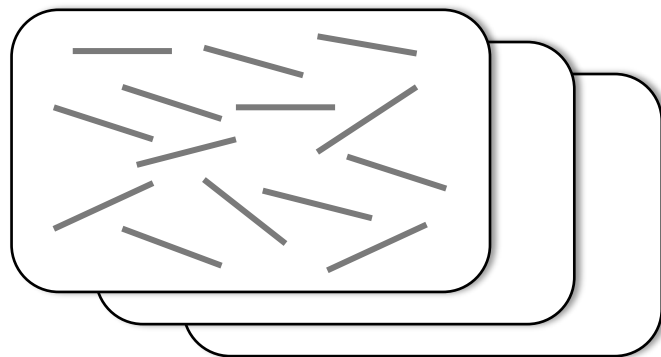
内山 郁夫

# 次世代シーケンサ Next Generation Sequencer (NGS)



# 次世代シーケンサデータ処理の概要

サンプル(ゲノムDNA/RNA)



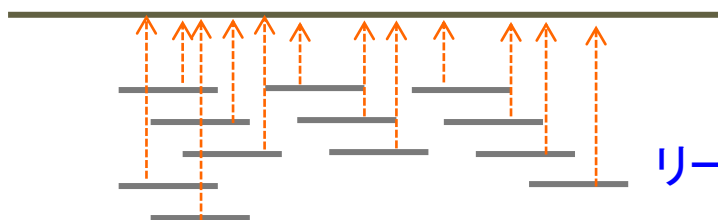
リファレンス配列あり

リファレンス配列なし

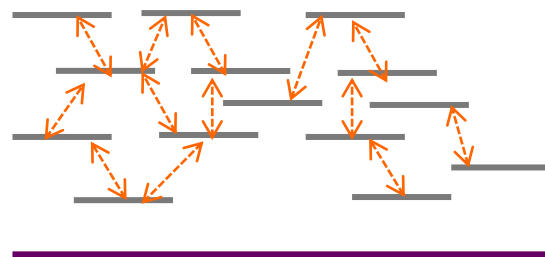
リファレンス配列へのマッピング

デノボ・アセンブル

リファレンス配列



リード配列



アセンブル配列

SNP解析 RNA-Seq ChIP-Seq Methylome解析 .....

# ちょっとやってみよう

「ターミナル」からサーバにログインした状態で、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

リファレンス配列

ecoli\_genome.fasta

```
>chr
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCT
CTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGC
TTCTGAACCTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATAAAA
TTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACTTTAACCA
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAATTACAG
AGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
ATTACCACCACCATCACCATTACCACAGGTAACGG
```

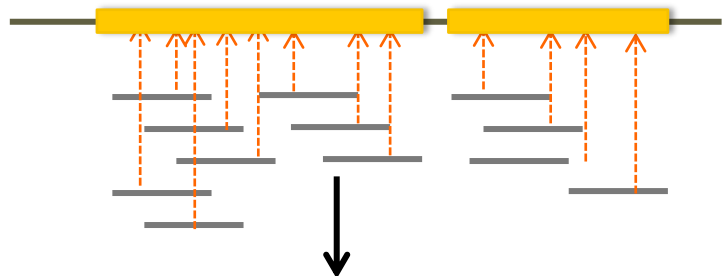
(インデックス: ecoli\_genome)

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
CACCGTGTAGTACCAGCATCCTGCGTACAATCAGCAATCCCAGTCTCCCC
+SRR1515276.2 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CCCFDFDFHDFHIIIEGIHJJJJGFHGGHGGHGGIJJGDIJHHGGGHHI
@SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CAGGACATCGCCTTTGATCGGTTTCAGACTTCGGACCAACCTGCATTTTCAG
+SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CCCFDFDFAFHFHJIJGHIJJIJJJHEHIIJGHIFEHIIA@FIFHGGIIGI
```

① bowtie2

リファレンス配列へのマッピング



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-align
SRR1515276.40 0 chr 4423609 42 51M * 0 0 GGAATTCCTCACTGCCA
SRR1515276.158 16 chr 501700 42 51M * 0 0 ACGCACCAGAGTGCAAA
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
```

遺伝子アノテーション ecoli.gtf

| chr | RefSeq | start_codon | 190 | 192 | 1.000 | + | . | gene_id | "b0001"; transcript |
|-----|--------|-------------|-----|-----|-------|---|---|---------|---------------------|
| chr | RefSeq | CDS         | 190 | 252 | 1.000 | + | 0 | gene_id | "b0001"; transcript |
| chr | RefSeq | stop_codon  | 253 | 255 | 1.000 | + | . | gene_id | "b0001"; transcript |
| chr | RefSeq | exon        | 190 | 255 | 1.000 | + | . | gene_id | "b0001"; transcript |

② htseq-count

遺伝子ごとの集計

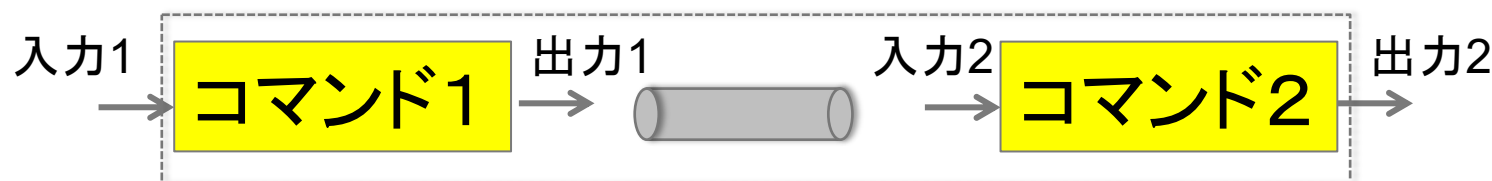
集計結果 ecoli.count

|       |     |
|-------|-----|
| b0001 | 11  |
| b0002 | 117 |
| b0003 | 33  |
| b0004 | 44  |

→UNIX基本コマンド、NGS 基本ツール

# 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
AGCTTTTCATCTGACTGCAACGGGCAATATGTCT
CTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGC
TTCTGAACCTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATAAAA
TTTTATTGACTTAGGTCATAAATACTTTAACCAG
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAAATTACAG
AGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
ATTACCACCACCATCACCATTACCACAGGTAACGG
```

## リード配列 eco.fastq

```
@SRR1515276.1 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
ATCCGGCTGGCGCACCGACCTATGTTCCGGCGGAATACAAGCTGGGTGAAG
+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
CCCFDFDFHDFHIIIEGIIHJJJGFHGGHGGHGGIIJDGIJHHGGGHHI
@SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CAGGACATCGCCTTTGATCGGTTTCAGACTTCGGACCAACCTGCATTTTCAG
+SRR1515276.3 HWI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3950:88530 length=51
CCCFDFDFAFHFHIIJGHIJJIJJHHEHIIJGHIFEHIIA@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-align
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  |

→基本データフォーマット、テキスト処理

# 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, ...)

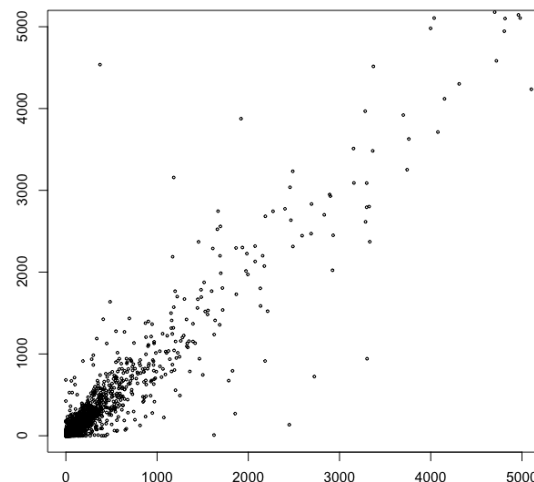
## 発現差解析

条件1と条件2の発現量比

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

散布図  
(scatter plot)

## データ可視化



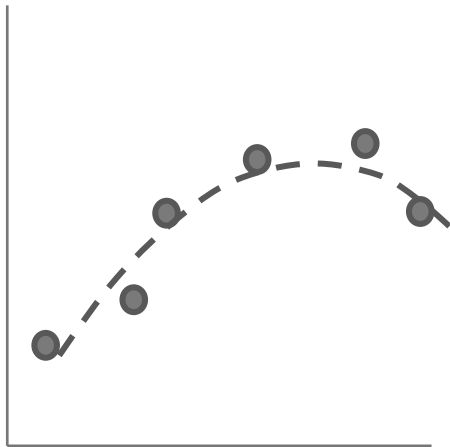
→R入門、統計解析入門



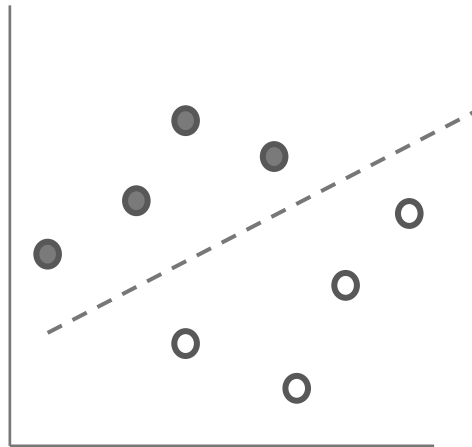
# より高度なデータ解析

教師あり学習

回帰

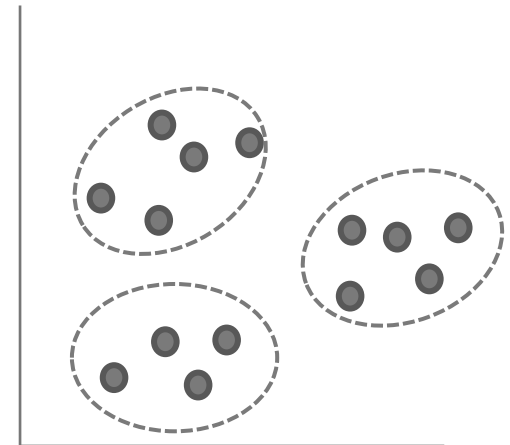


分類



教師なし学習

クラスタリング  
次元削減



→多変量解析(RNA-seq入門・実践編で扱う)  
→AI解析入門

# 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
  - 統計的な考え方やデータ処理の流れを理解する
  - NGSデータの基本的な見方、扱い方に習熟する
  - 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。