2017.08.04版

スライド30までは自習。8/28の自習日か、8/29の10:30までにスライド31から始められる状態にしておいてください

NGS解析（初～中級）
ゲノムアセンブリ後の各種解析

東京大学・大学院農学生命科学研究科
アグリバイオインフォマティクス教育研究プログラム
門田幸二（かどた　こうじ）
kadota@iu.a.u-tokyo.ac.jp
http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/

Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

予習事項

①乳酸菌ゲノム配列決定論文のPacBioデータを用いて、*de novo*アセンブリ後の各種解析を行う。②主目的は、LinuxおよびNGS解析周辺のスキルアップ。昨年度からの継続性も重視

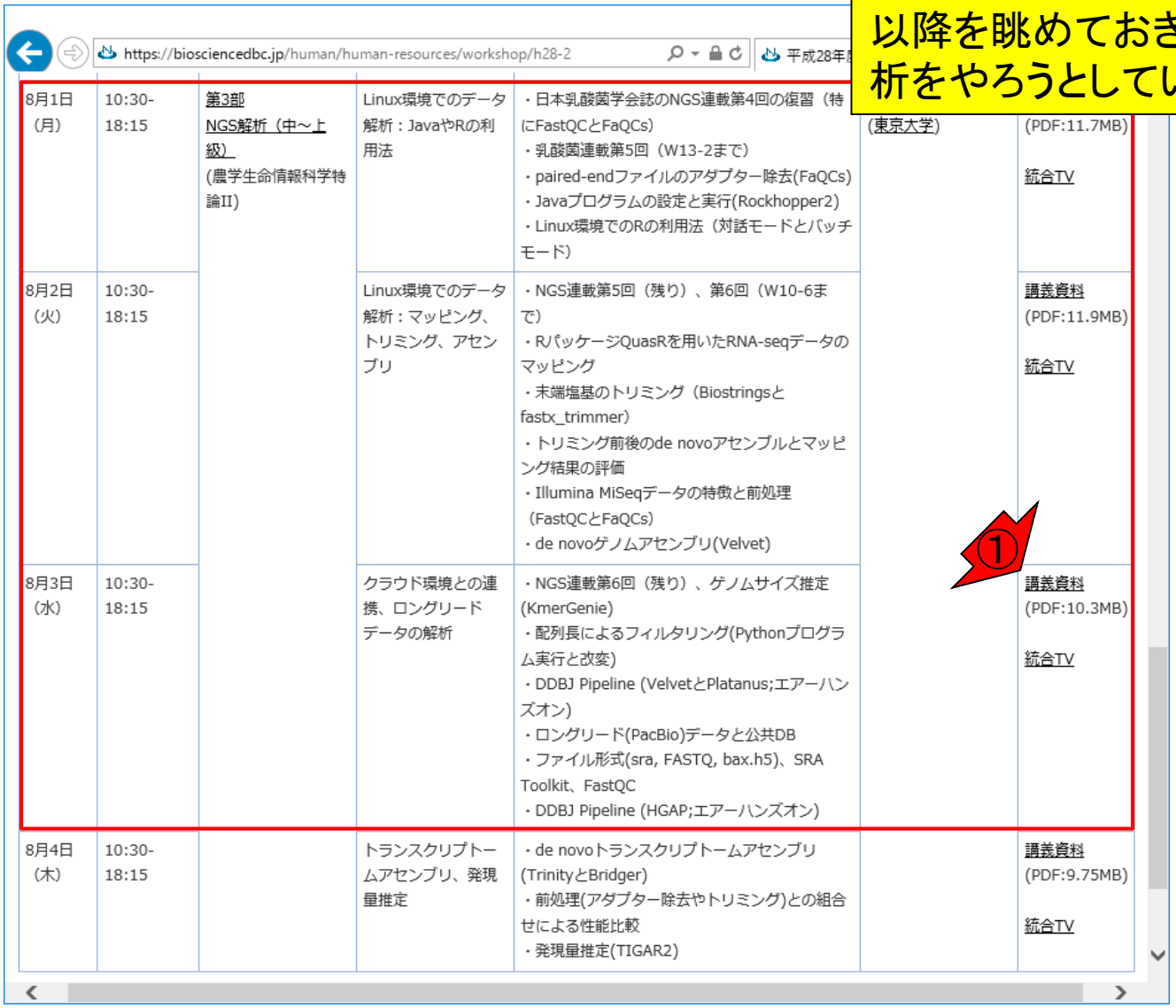
- 平成28年度NGSハンズオン講習会
  - 日本乳酸菌学会誌NGS連載第7回のウェブ資料W9-3までの内容を実施
- 平成29年度NGSハンズオン講習会
  - 8/29-30は、第7回の残りと第8回の内容が中心 ②

①

Tanizawa et al., *BMC Genomics*, **16**: 240, 2015

予習事項

乳酸菌NGS連載第4回までは自習。第5-7回途中までは、赤枠内の平成28年度講習会の8/1-3で実施済み。特に、①2016年8月3日の講習会資料のスライド121以降を眺めておき、どんなデータのアセンブリ後の解析をやろうとしているかは把握しておきましょう



8月1日（月）	10:30-18:15	第3部 NGS解析（中～上級）（農学生命情報科学特論II）	Linux環境でのデータ解析：JavaやRの利用法	・日本乳酸菌学会誌のNGS連載第4回の復習（特にFastQCとFaQCs） ・乳酸菌連載第5回（W13-2まで） ・paired-endファイルのアダプター除去(FaQCs) ・Javaプログラムの設定と実行(Rockhopper2) ・Linux環境でのRの利用法（対話モードとバッチモード）	(東京大学)	(PDF:11.7MB) 統合TV
8月2日（火）	10:30-18:15		Linux環境でのデータ解析：マッピング、トリミング、アセンブリ	・NGS連載第5回（残り）、第6回（W10-6まで） ・RパッケージQuasRを用いたRNA-seqデータのマッピング ・末端塩基のトリミング（Biostringsとfastx_trimmer） ・トリミング前後のde novoアセンブルとマッピング結果の評価 ・Illumina MiSeqデータの特徴と前処理（FastQCとFaQCs） ・de novoゲノムアセンブリ(Velvet)		講義資料 (PDF:11.9MB) 統合TV
8月3日（水）	10:30-18:15		クラウド環境との連携、ロングリードデータの解析	・NGS連載第6回（残り）、ゲノムサイズ推定(KmerGenie) ・配列長によるフィルタリング(Pythonプログラム実行と改変) ・DDBJ Pipeline (VelvetとPlatanus;エアーハンズオン) ・ロングリード(PacBio)データと公共DB ・ファイル形式(sra, FASTQ, bax.h5)、SRA Toolkit、FastQC ・DDBJ Pipeline (HGAP;エアーハンズオン)		講義資料 (PDF:10.3MB) 統合TV
8月4日（木）	10:30-18:15		トランスクリプトームアセンブリ、発現量推定	・de novoトランスクリプトームアセンブリ(TrinityとBridger) ・前処理(アダプター除去やトリミング)との組合せによる性能比較 ・発現量推定(TIGAR2)		講義資料 (PDF:9.75MB) 統合TV

https://biosciencedbc.jp/human/human-resources/workshop/h28-2

予習事項

（実質的に同じなので）もちろん①乳酸菌NGS連載第7回の、②ウェブ資料のW9あたりまでを眺めておくのでも構いません

(Rで)塩基配列解析

(last modified 2017/06/04, since 2010)

このウェブページのR関連部分は、インストール | について の推奨手順 (Windows2015.04.0 Macintosh2015.04.03版)に従って フリーソフトRと必要なパッケージをインストール済みであいます。初心者の 方は基本的な利用法(Windows2015.04.03版と Macintosh2015.04.03版)ウェブページを体系的にまとめた書籍もあります。(2015/04/03)

What's new?

- 解析 | 菌叢解析 | について
- 平成29年度NGSハンズオ (月)14時00分～6月23日
- 平成28年度NGSハンズオ
- Galaxyのウェブサイトのリ
- 日本乳酸菌学会誌のNGS

- 書籍 | トランスクリプトーム解析 | 4.3.4 他の実験デザイン(3群間) (last modified 2014/04/28)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | について (last modified 2017/03/13)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第1回イントロダクション (last modified 2016/12/22)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第2回GUI環境からコマンドライン環境へ (last modified 2015/11/26)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第3回Linux環境構築からNGSデータ取得まで (last modified 2015/12/07)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第4回クオリティコントロールとプログラムのインストール (last modified 2016/06/03)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第5回アセンブル、マッピング、そしてQC (last modified 2016/07/05)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第6回ゲノムアセンブリ (last modified 2016/06/17)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第7回ロングリードアセンブリ (last modified 2017/01/26)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第8回アセンブリ後の解析 (last modified 2016/11/10)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第9回ゲノムアノテーションとその可視化、DDBJへの登録 (last modified 2017/03/13)
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第10回DDBJへの塩基
- 書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第11回統合データ解析
- イントロ | 一般 | ランダムに行を抽出 (last modified

① ②

書籍 | 日本乳酸菌学会誌 | 第7回ロングリードアセンブリ

日本乳酸菌学会誌の第7回分です。Linuxコマンドのリンク先は主に日経BP社様です。

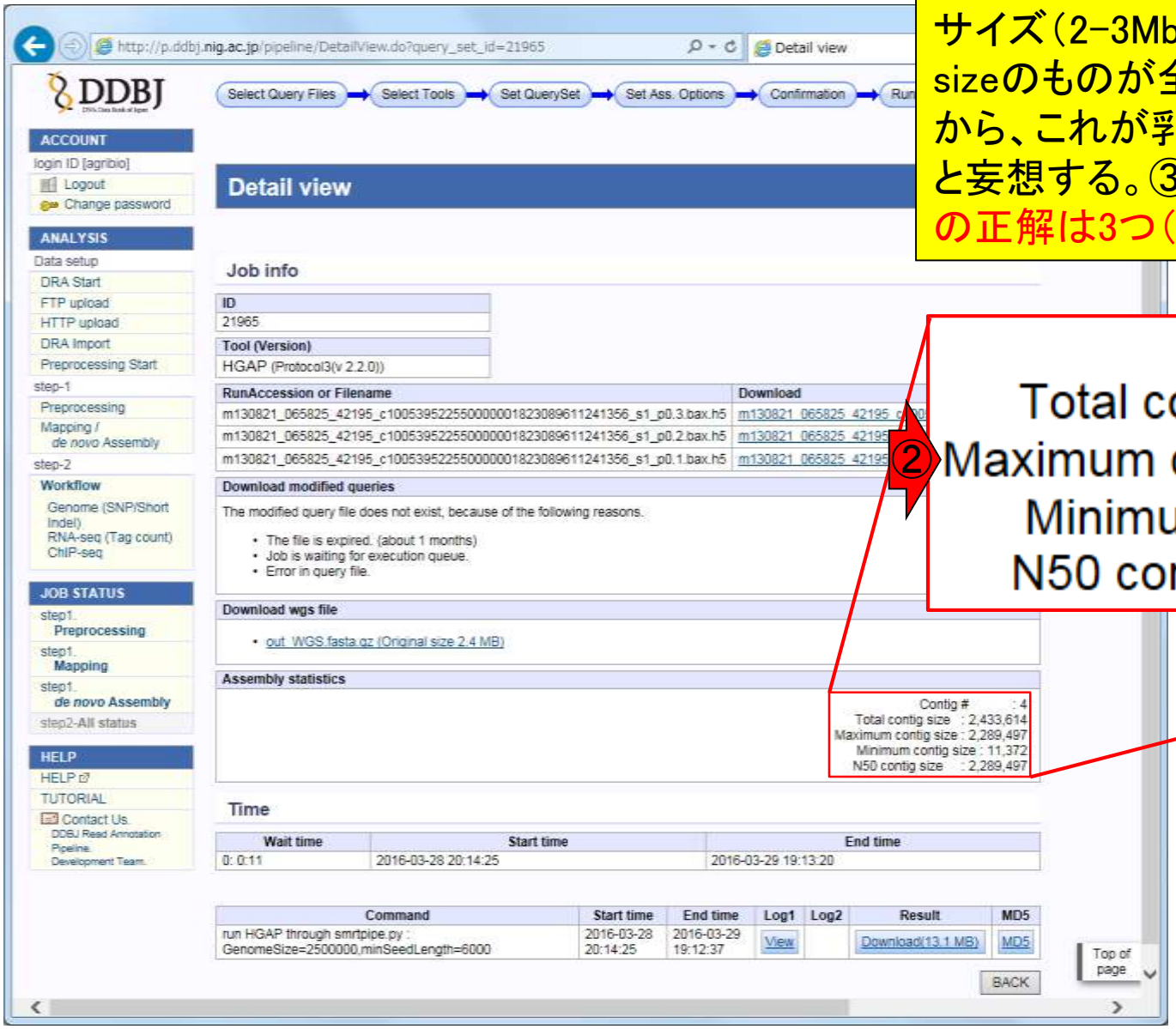
- 原稿PDF
- ウェブ資料PDF
  - Windows用(2016.06.20版; 約15MB)
  - Macintosh用

Linuxコマンド

- apt-cache (パッケージ調査)
- apt-get (パッケージのインストールやアップデート)

W9-2：結果を眺める

第7回W9-2で、DDBJ Pipeline上で実行したHGAPアセンブリ結果のページを眺めている。①Total contig sizeは、乳酸菌の一般的なゲノムサイズ（2-3Mb）と近く妥当。②Maximum contig sizeのものが全体の9割以上を占めていることから、これが乳酸菌の染色体ゲノムなのだろうと妄想する。③コンティグ数は4つ。このデータの正解は3つ（1 chromosome and 2 plasmids）



Contig # : 4
Total contig size : 2,433,614 ①
② Maximum contig size : 2,289,497
Minimum contig size : 11,372
N50 contig size : 2,289,497
③

2016年8月3日のNGS講習会資料の最終スライド。平成29年度講習会では、この中の一部を講習会用にアレンジして解説します

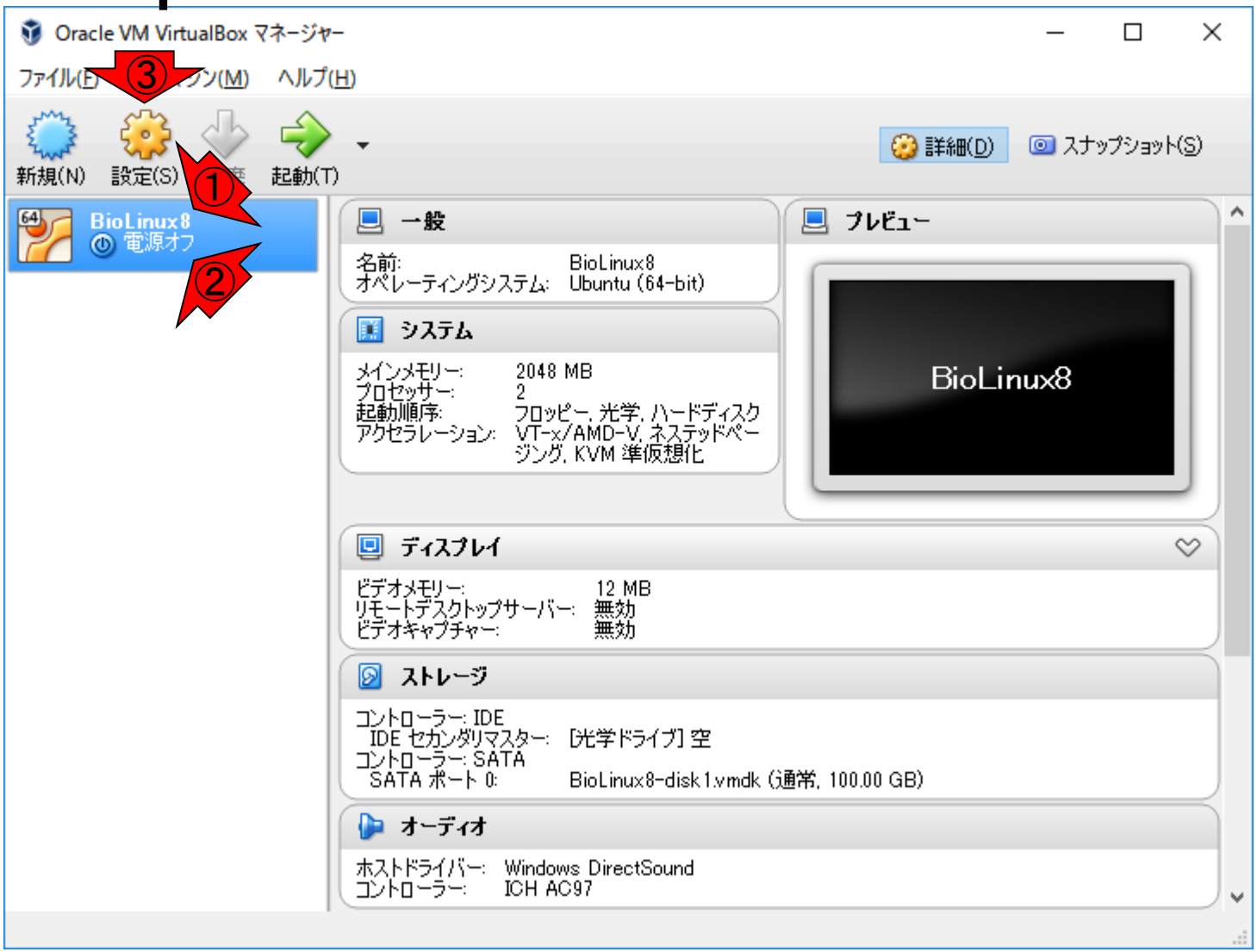
この後の展開は…

- W10：multi-FASTAファイルの分割
  - プログラムによっては、single-FASTAのほうが取扱いやすい場合もある
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
  - FASTAファイル用がうまく動かなくても、4行で1リードだということが分かっていれば、Linuxコマンドでどうにかなる、という話
  - PacBioはFASTQファイルも出力する。Rで(single-)FASTQファイルを読み込んでクオリティスコア分布を描画し、PacBioデータは両末端のクオリティが低い傾向にあることを確認
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認
  - W18：NCBI blastのやり方も示し、様々な解析手段を伝授

参考

Tips:名前の変更

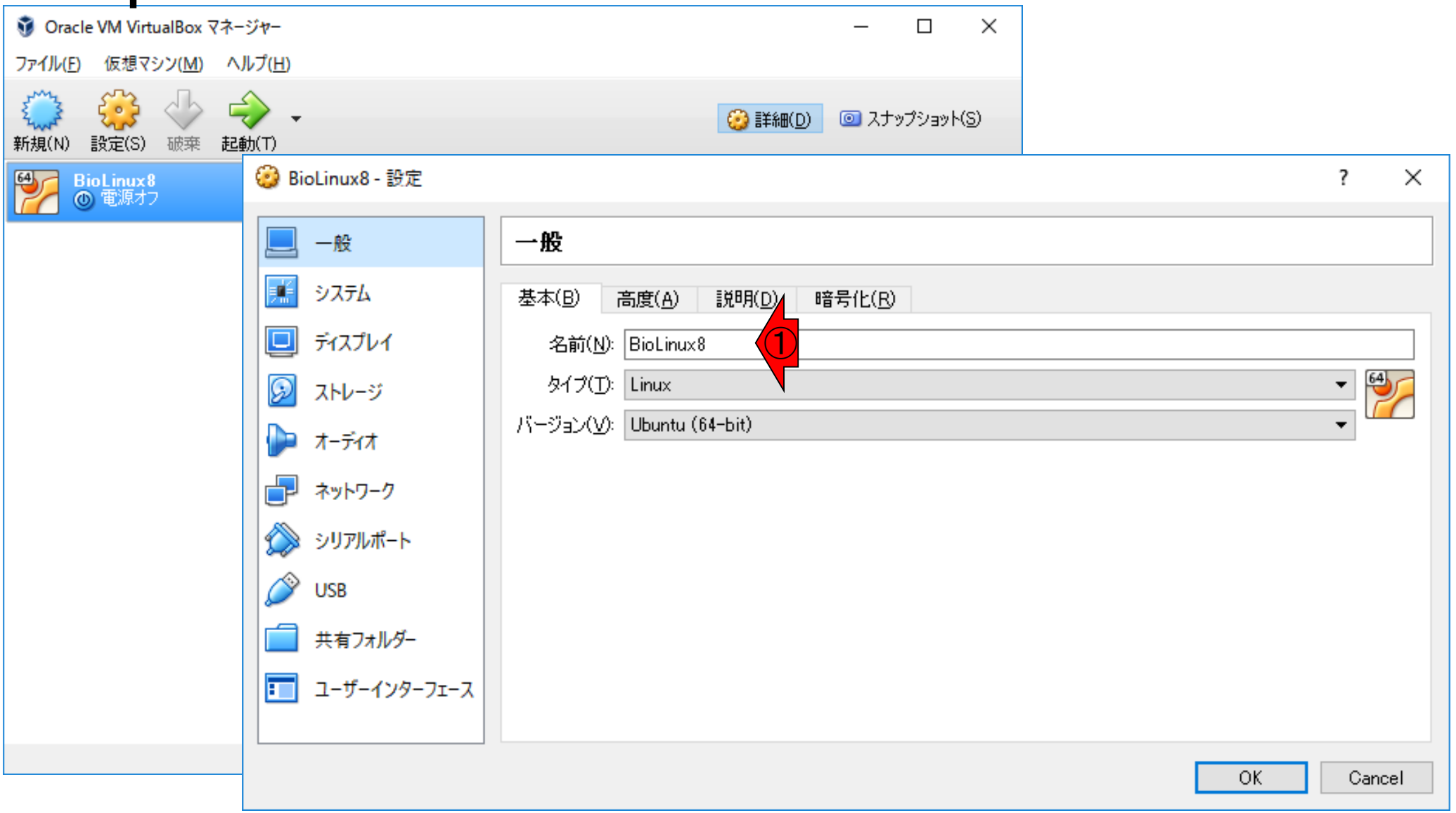
①のBioLinux8という名前をNGS20170829に変更する。②電源オフになっている状態で、③設定



http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/bioinfo_ngs_sokushu_2016/20160719_tips_20160704.pdf

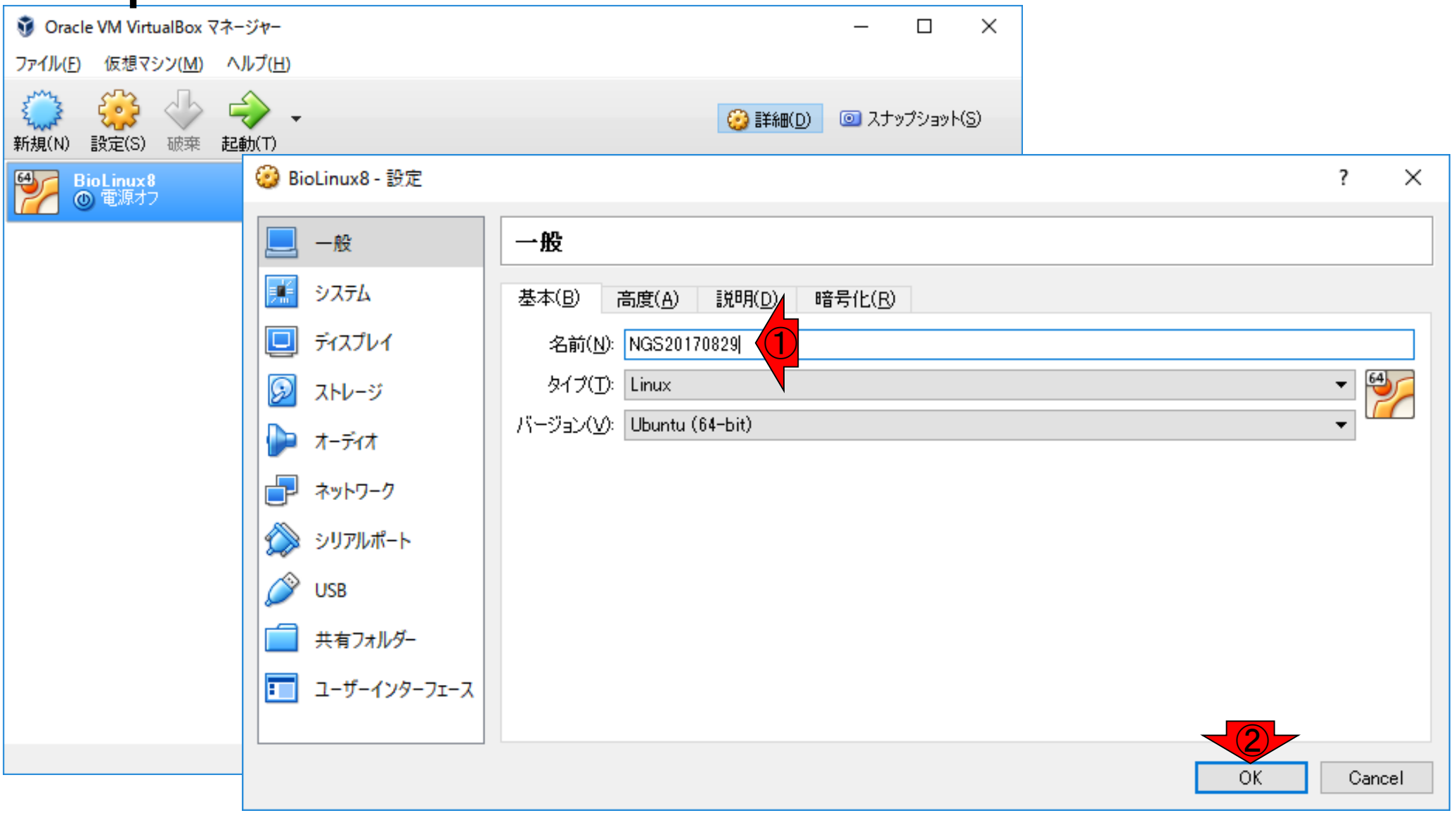
Tips：名前の変更

①の部分を編集して、
BioLinux8という名前を



Tips：名前の変更

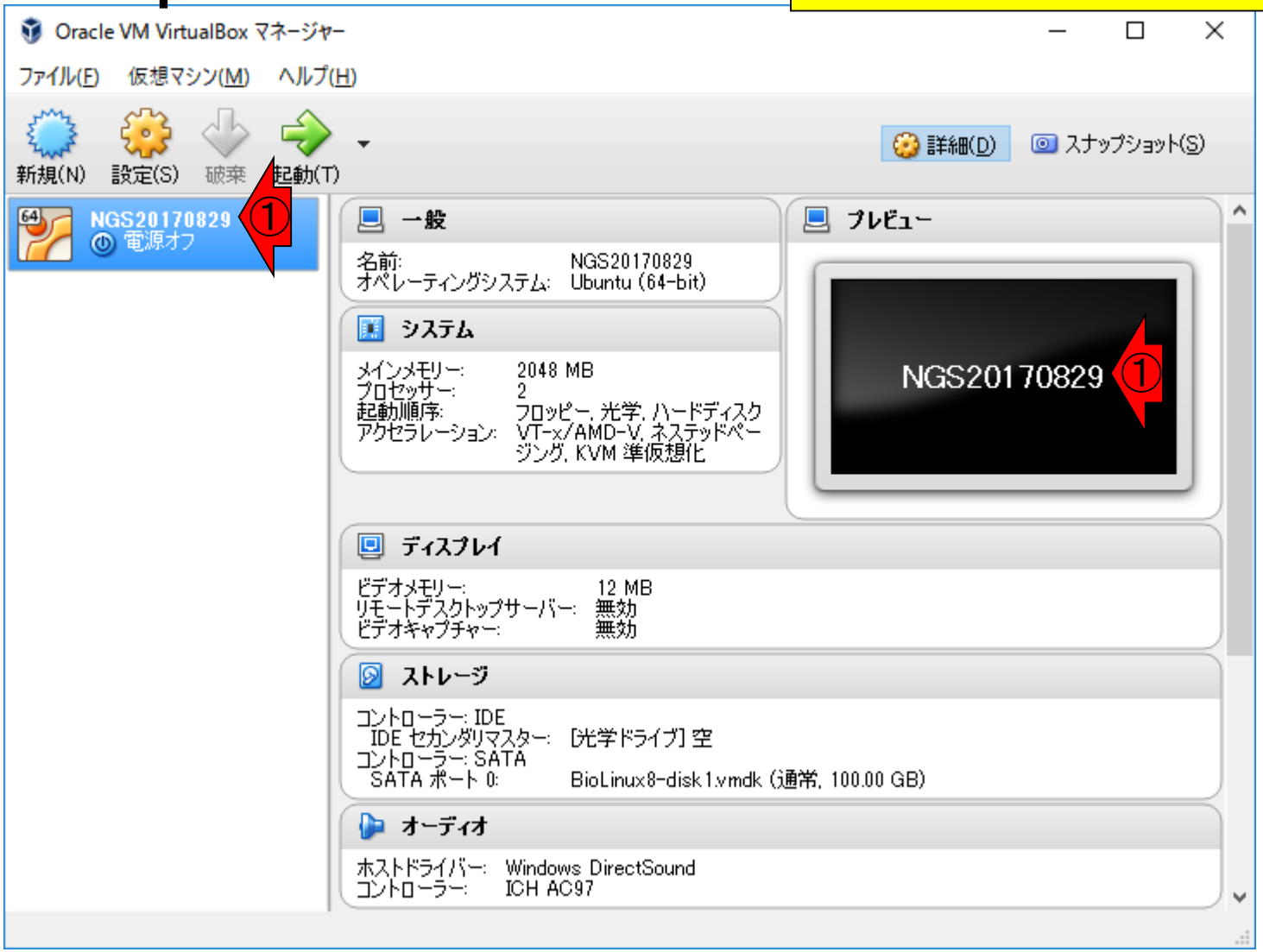
①NGS20170829
に変更して、②OK



参考

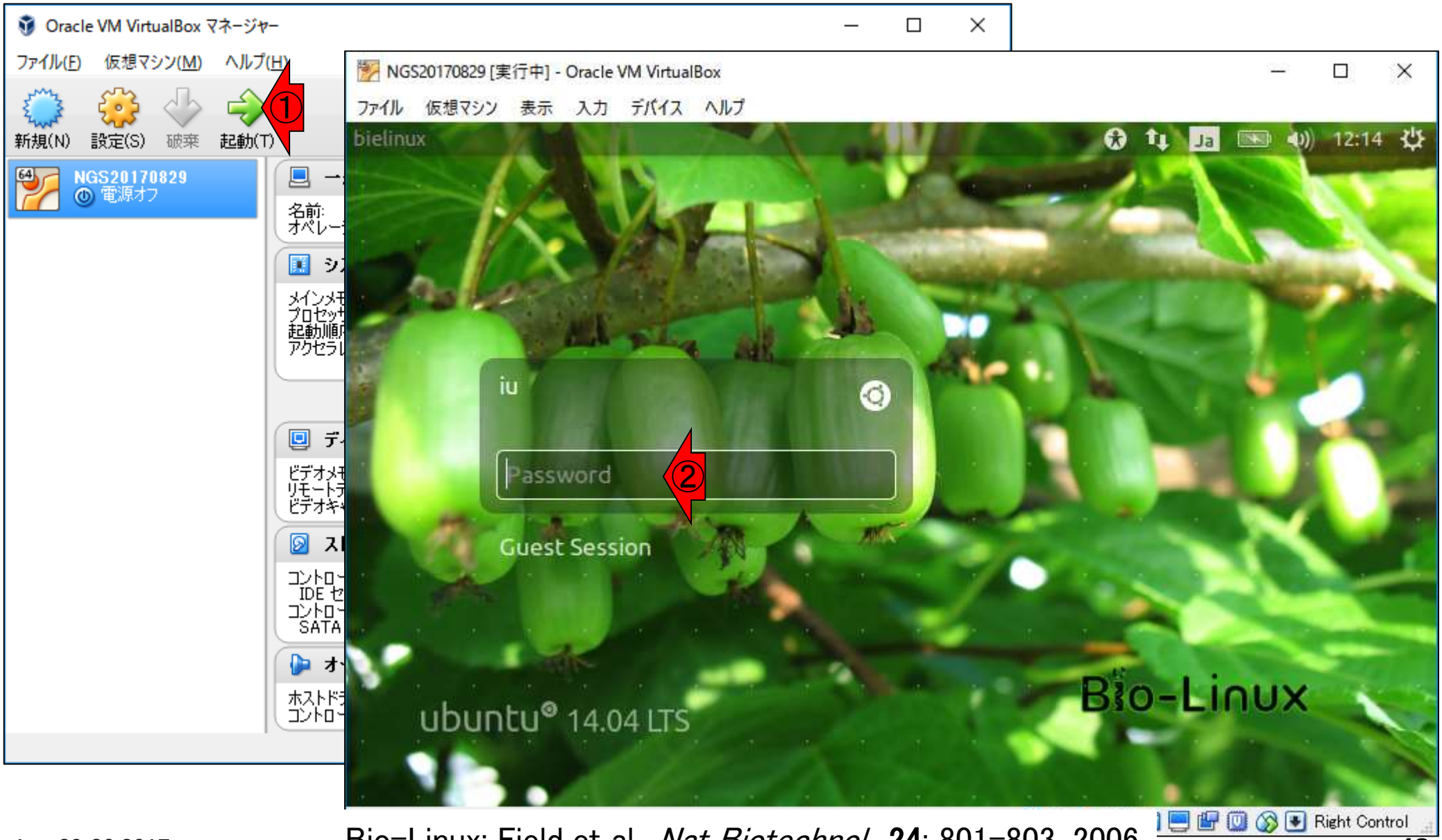
Tips：名前の変更

①無事NGS20170829になりました。この部分はただの識別用。8/31、および9/1のovaファイルの名前と被るときや自分好みの名前に変えたいときにご利用ください



起動

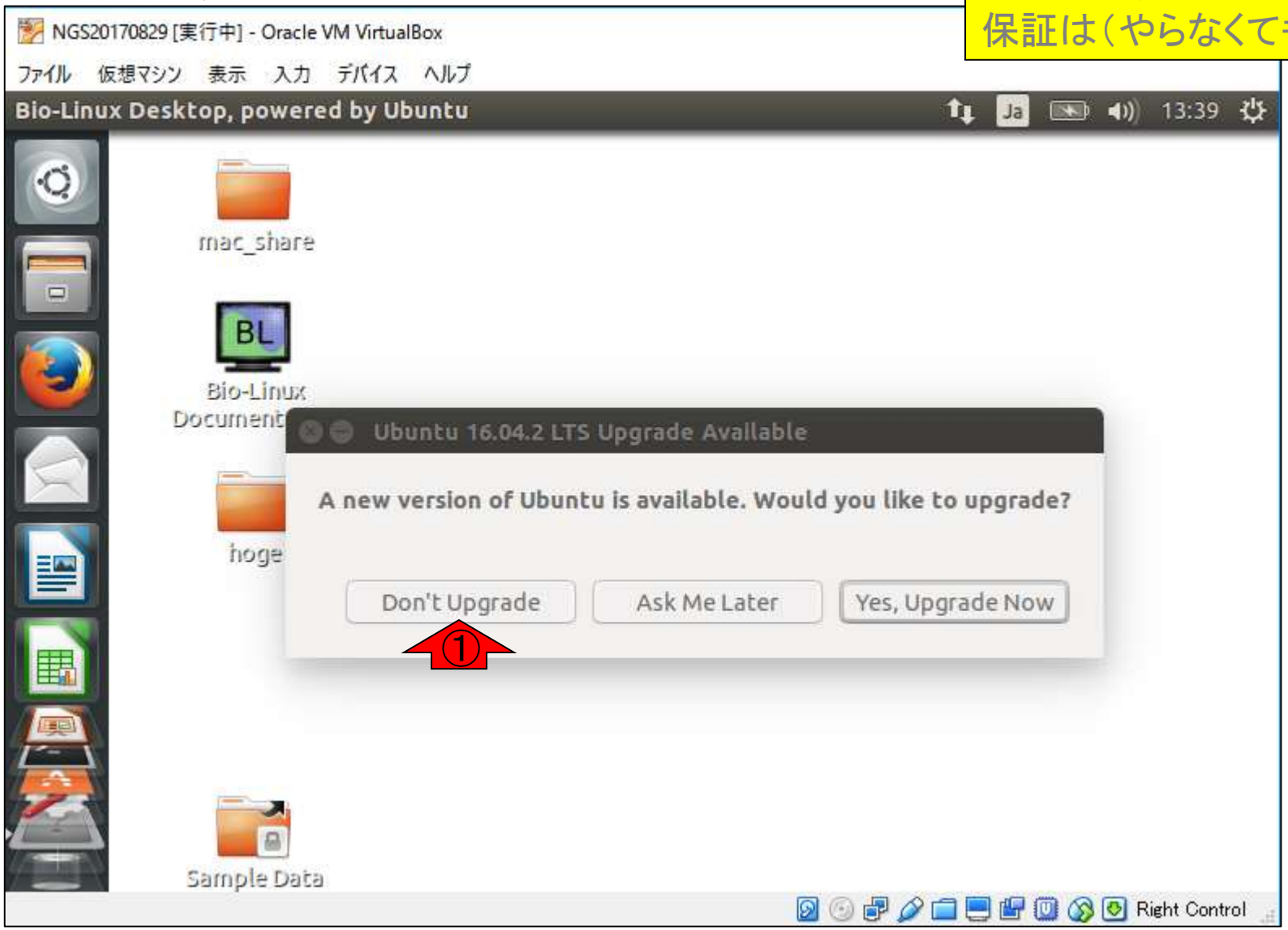
①でBio-Linuxを起動。②パスワードは
pass1409です（連載第3回W2あたり）



Bio-Linux: Field et al., *Nat Biotechnol.*, **24**: 801-803, 2006

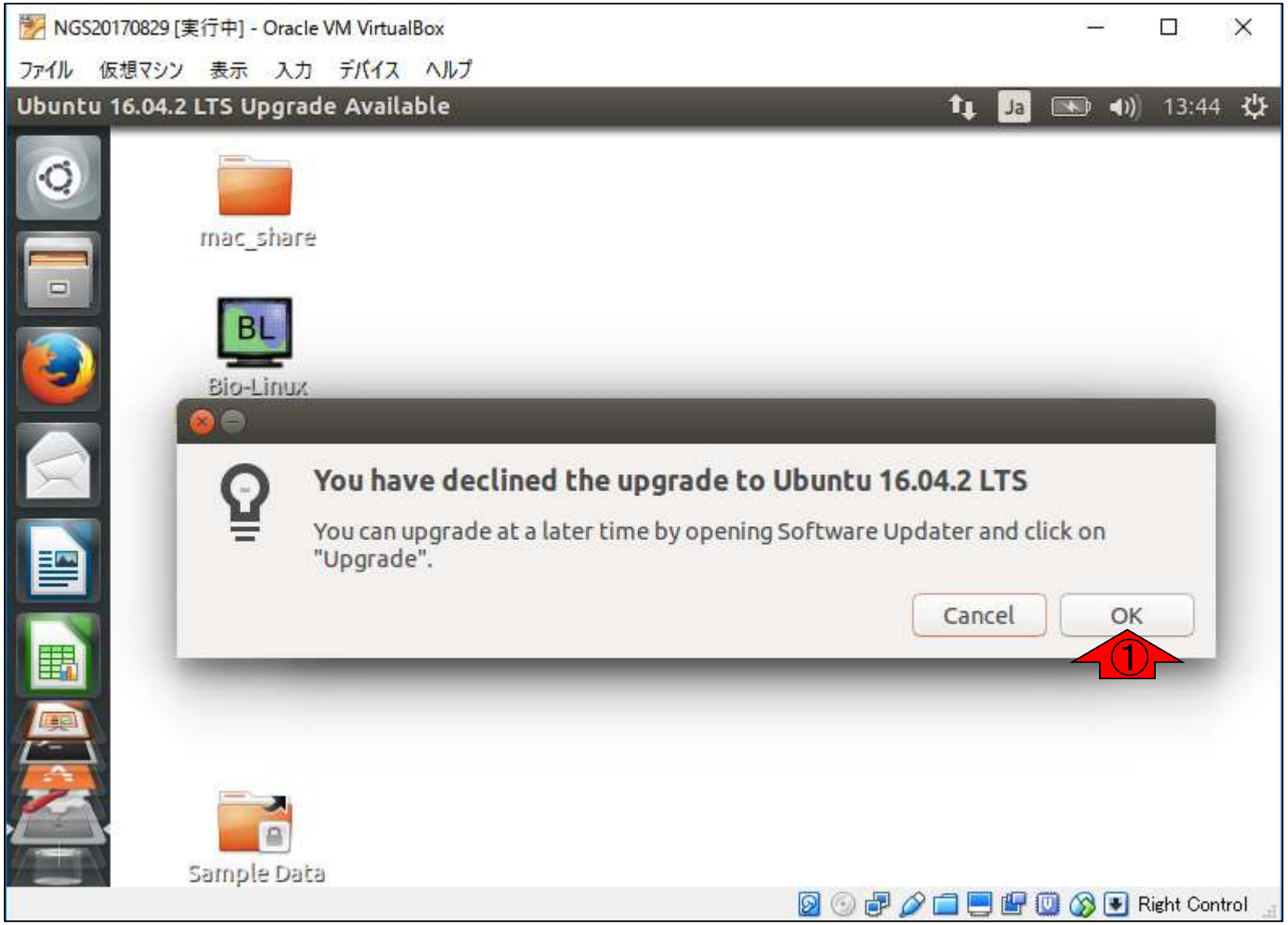
起動後

（もしこのようなポップアップが出たとしたら）①Don’t Upgrade。やってもいいとは思いますが、やったことがないのでその後の保証は（やらなくてもですがw）できません

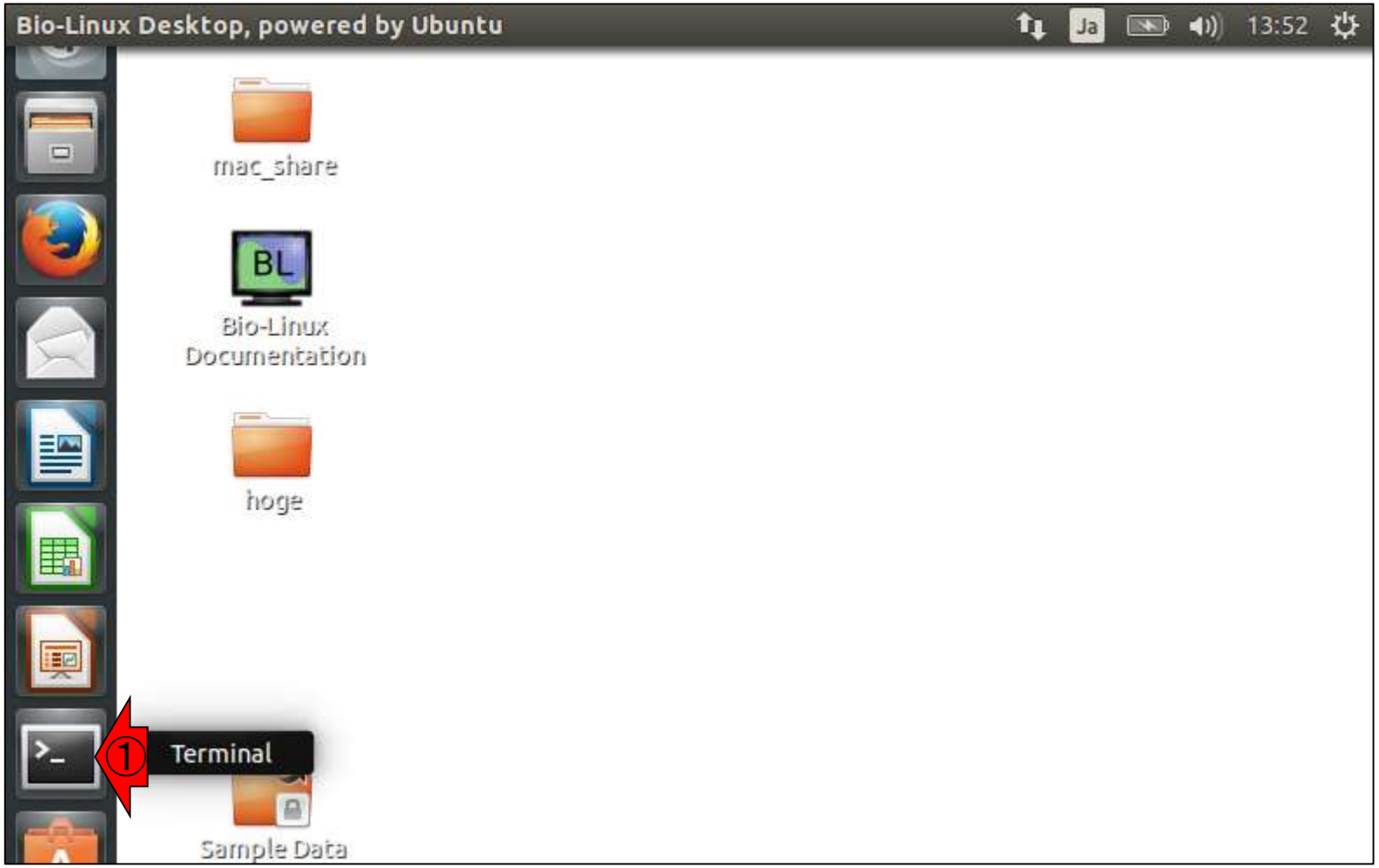


①OK

起動後

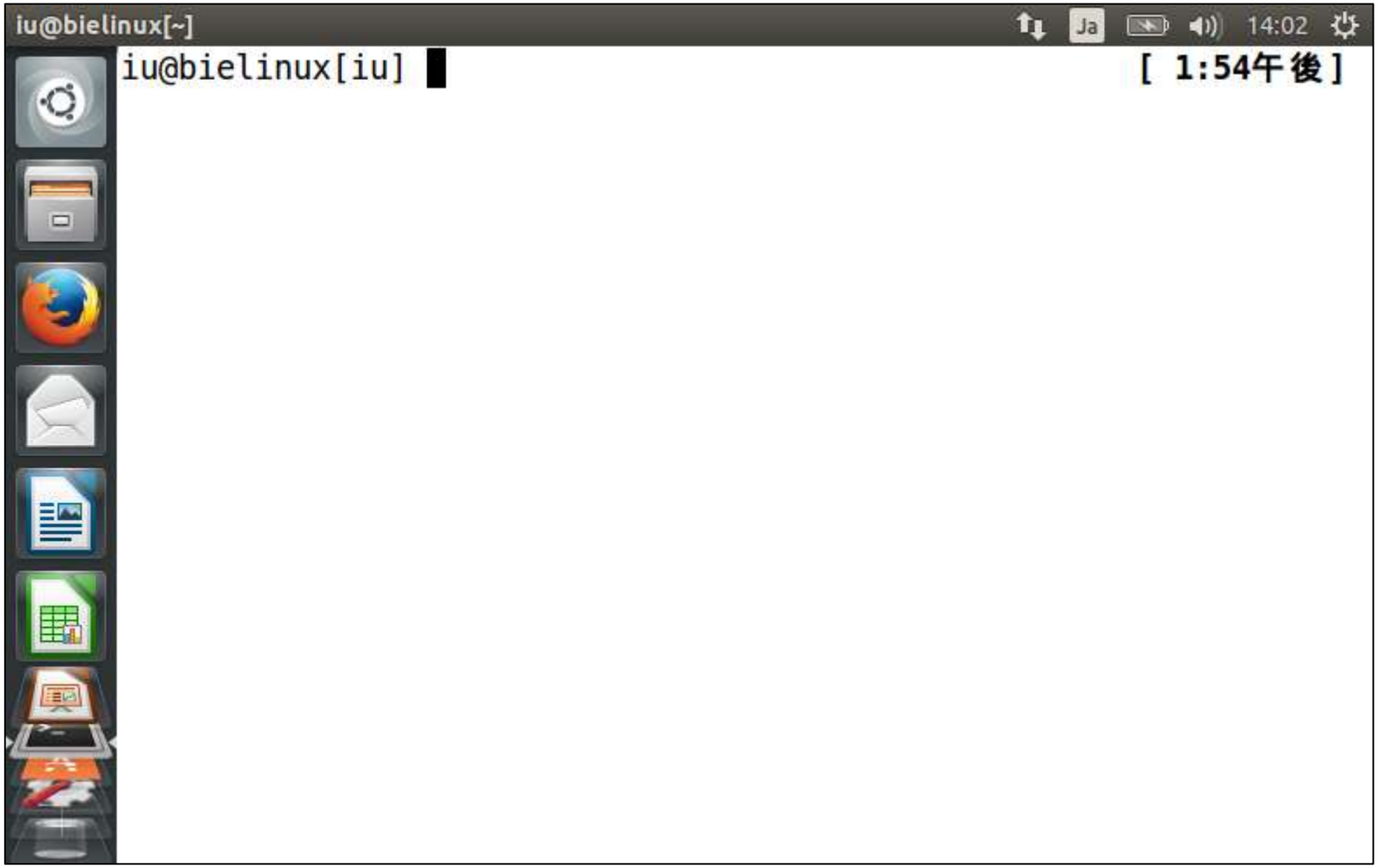

NGS20170829 [実行中] - Oracle VM VirtualBox
ファイル 仮想マシン 表示 入力 デバイス ヘルプ
Ubuntu 16.04.2 LTS Upgrade Available
Ja
13:44
mac_share
BL
Bio-Linux
You have declined the upgrade to Ubuntu 16.04.2 LTS
You can upgrade at a later time by opening Software Updater and click on "Upgrade".
Cancel
OK
①
Sample Data
Right Control

ターミナルを起動


Bio-Linux Desktop, powered by Ubuntu
Ja
13:52
mac_share
Bio-Linux
Documentation
hoge
①
Terminal
Sample Data

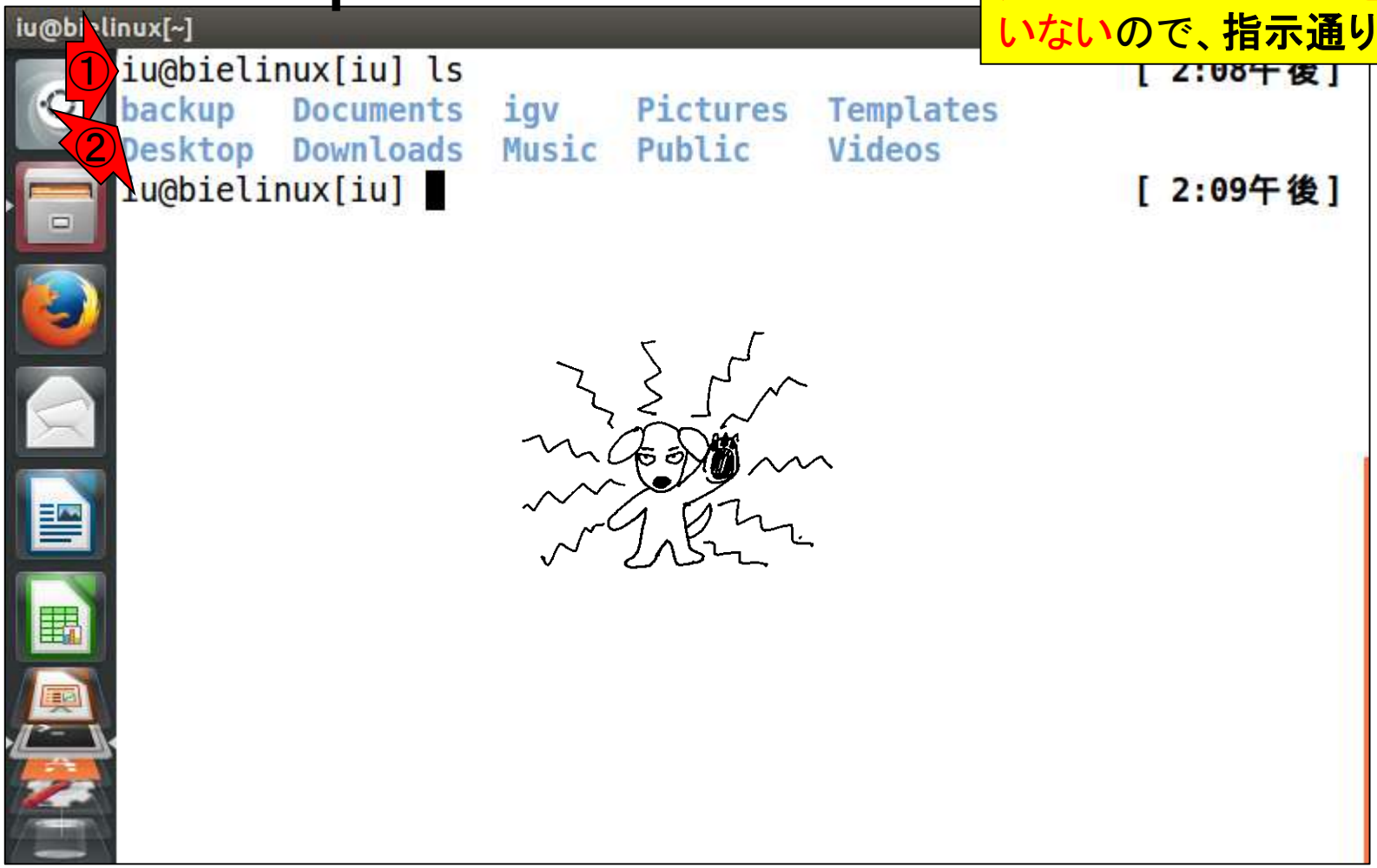
こんな感じになります

ターミナル起動後



backupがないのはダメ

①lsで確認。②backupという名前のディレクトリがないヒトは平成29年度講習会用として指定されたovaファイルを正しくインポートできていないので、**指示通りにやり直してください**



参考URL

①ここにコピペ用コマンド集がありますので、できるかぎりこれを有効活用してください。次のスライドで見えているresult.zipファイルは、②からダウンロード可能です

(Rで)塩基配列解析

(last modified 2017/06/04, since 2010)

このウェブページのR関連部分は、インストール | について の 推奨手順 (Windows2015.04.0
Macintosh
います。
ウェブペー

What's n

- 解析 |
- 平成29
(月)14
- 平成28
- Galaxy
- 日本乳

- インストール | Rパッケージ | 個別 (last modified 2015/06/10)
- (削除予定)Rのインストールと起動 (last modified 2016/02/21)
- (削除予定)個別パッケージのインストール (last modified 2015/02/20)
- 基本的な利用法 (last modified 2015/04/03)
- サンプルデータ (last modified 2016/10/05)
- バイオインフォマティクス人材育成カリキュラム(次世代シークエンサ) | NGSハンズオン講習会2017 (last modified 2017/06/11) NEW
- バイオインフォマティクス人材育成カリキュラム(次世代シークエンサ) | NGSハンズオン講習会2016 (last modified 2016/08/22)
- バイオインフォマティクス人材育成カリキュラム(次世代シークエンサ) | NGSハンズオン講習会2015 (last modified 2016/08/19)
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍
- 書籍

① ←

バイオインフォマティクス人材育成カリキュラム(次世代シークエンサ) | NGSハンズオン講習会2017 NE

平成29年度NGSハンズオン講習会の門田担当分のコピペ用コード集はここで示します。

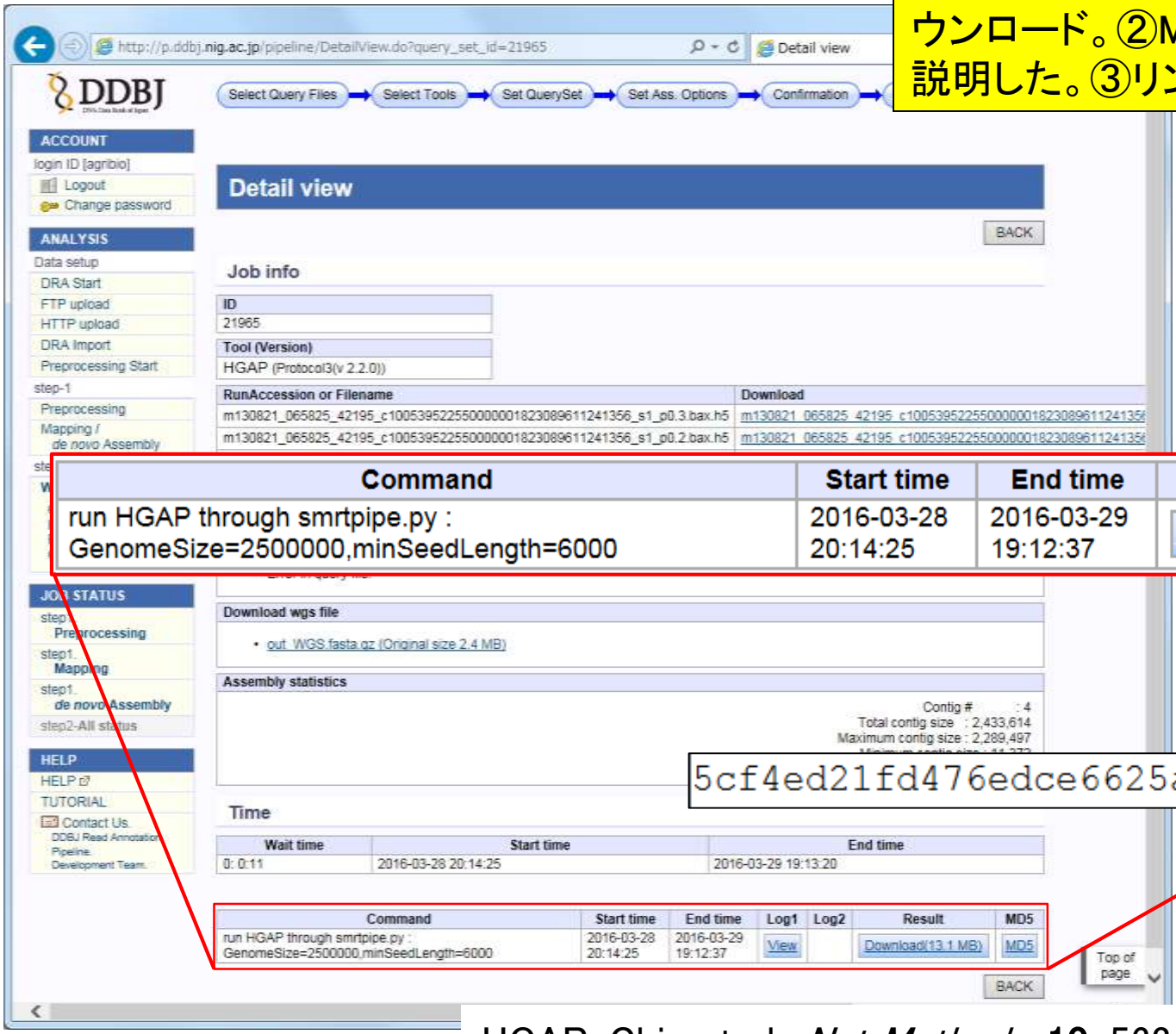
- スライドPDF(2017.06.xx版; 約xMB)
- W9-2: 結果を眺める (スライド6)
  DDBJ Read Annotation Pipeline (DDBJ Pipeline; Nagasaki et al., DNA Res., 2013)実行結果ですが、スライドの画面そのものには行けません。
- Tips: 名前の変更 (スライド8-11)
  平成26年度NGSハンズオン講習会の「事前準備 | Bio-Linux 8とRのインストール状況確認(2016.07.19)」の一番下にある「8.VirtualBox関連Tips (2016.07.04版)」とほぼ同じ内容です。
- Bio-Linux: Field et al., Nat Biotechnol., 2006 (スライド12)
- W9-3: HGAP (Chin et al., Nat Methods, 2013)実行結果ファイルのダウンロード (スライド19)
  result.zip (約13MB)

② ←

```
cd ~/Desktop/mac_share
```

W9-3：ダウンロード1

PacBio用*de novo*アセンブリプログラムHGAP実行結果である、①result.zipというzip圧縮ファイルを共有フォルダ（ホストOS側はDesktop/share）にダウンロード。②MD5については、連載第3回W12で説明した。③リンク先のMD5チェックサム値



Command	Start time	End time	Log1	Log2	Result	MD5
run HGAP through smrtpipe.py : GenomeSize=2500000,minSeedLength=6000	2016-03-28 20:14:25	2016-03-29 19:12:37	View		Download(13.1 MB)	MD5

①　②

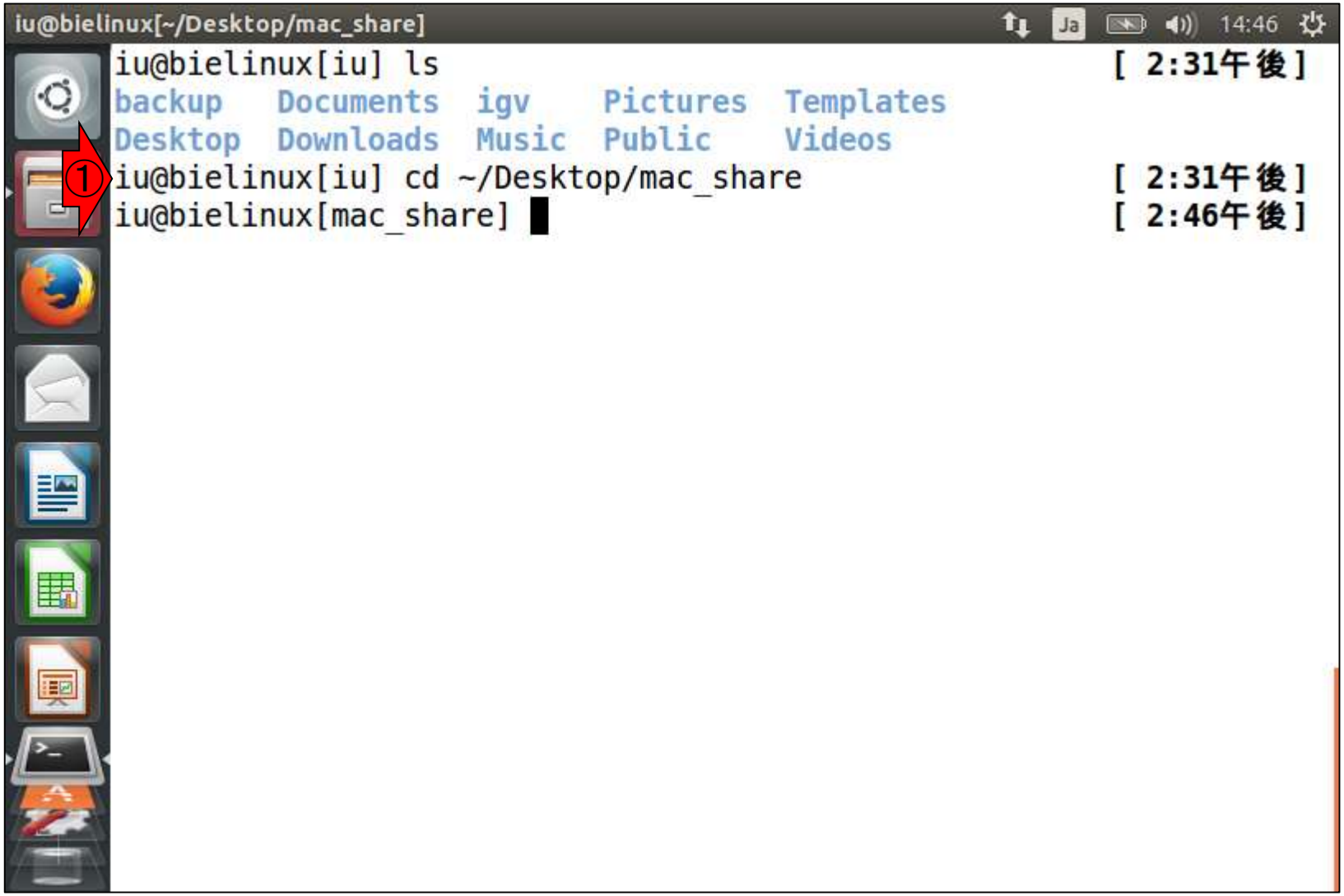
```
5cf4ed21fd476edce6625afaec577815  result.zip
```

③

HGAP: Chin et al., *Nat Methods*, **10**: 563–569, 2013

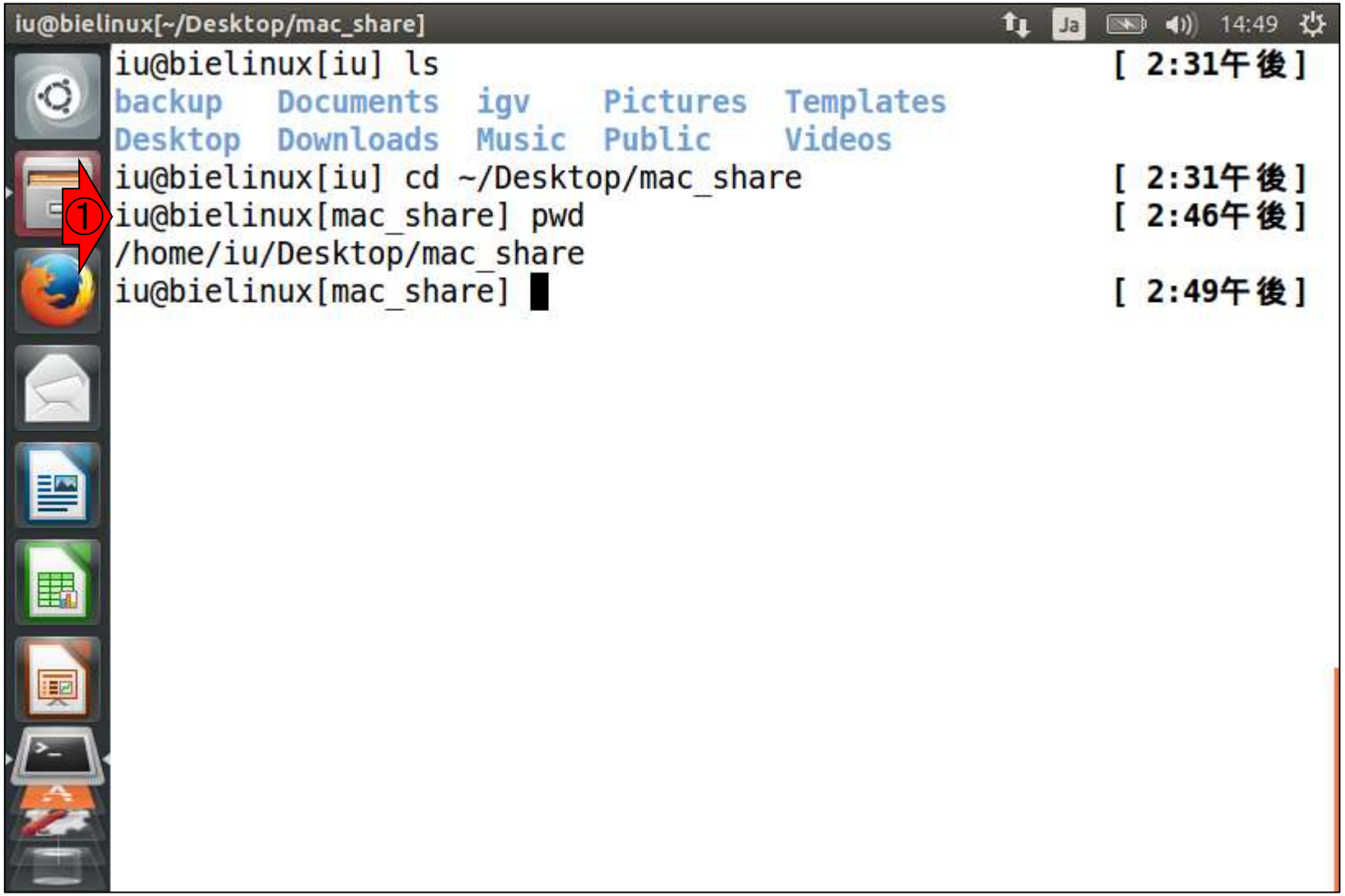
①cdコマンドで共有フォルダに移動

W9-3：ダウンロード2



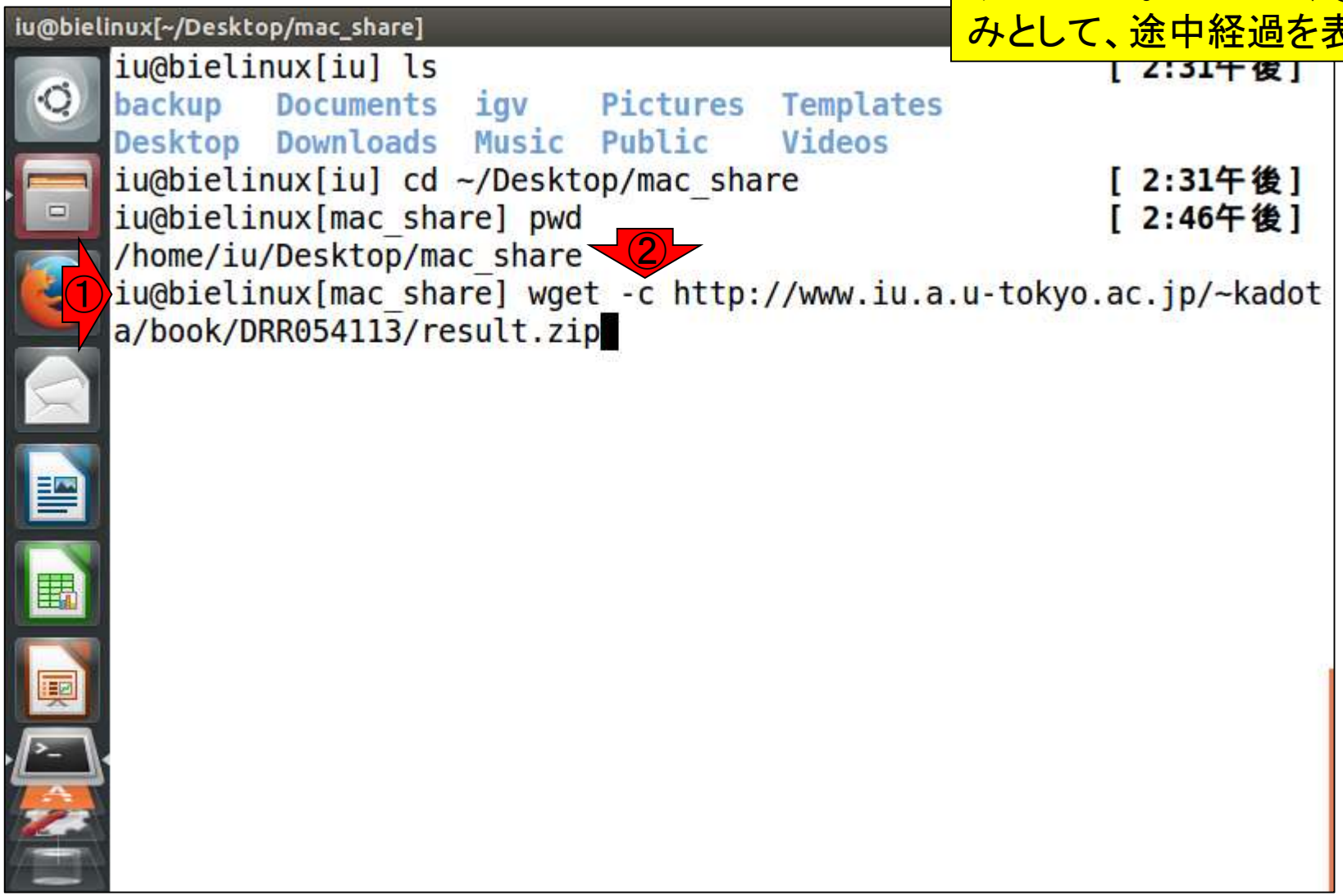
①pwdで作業ディレクトリをフルパスで表示

W9-3：ダウンロード3



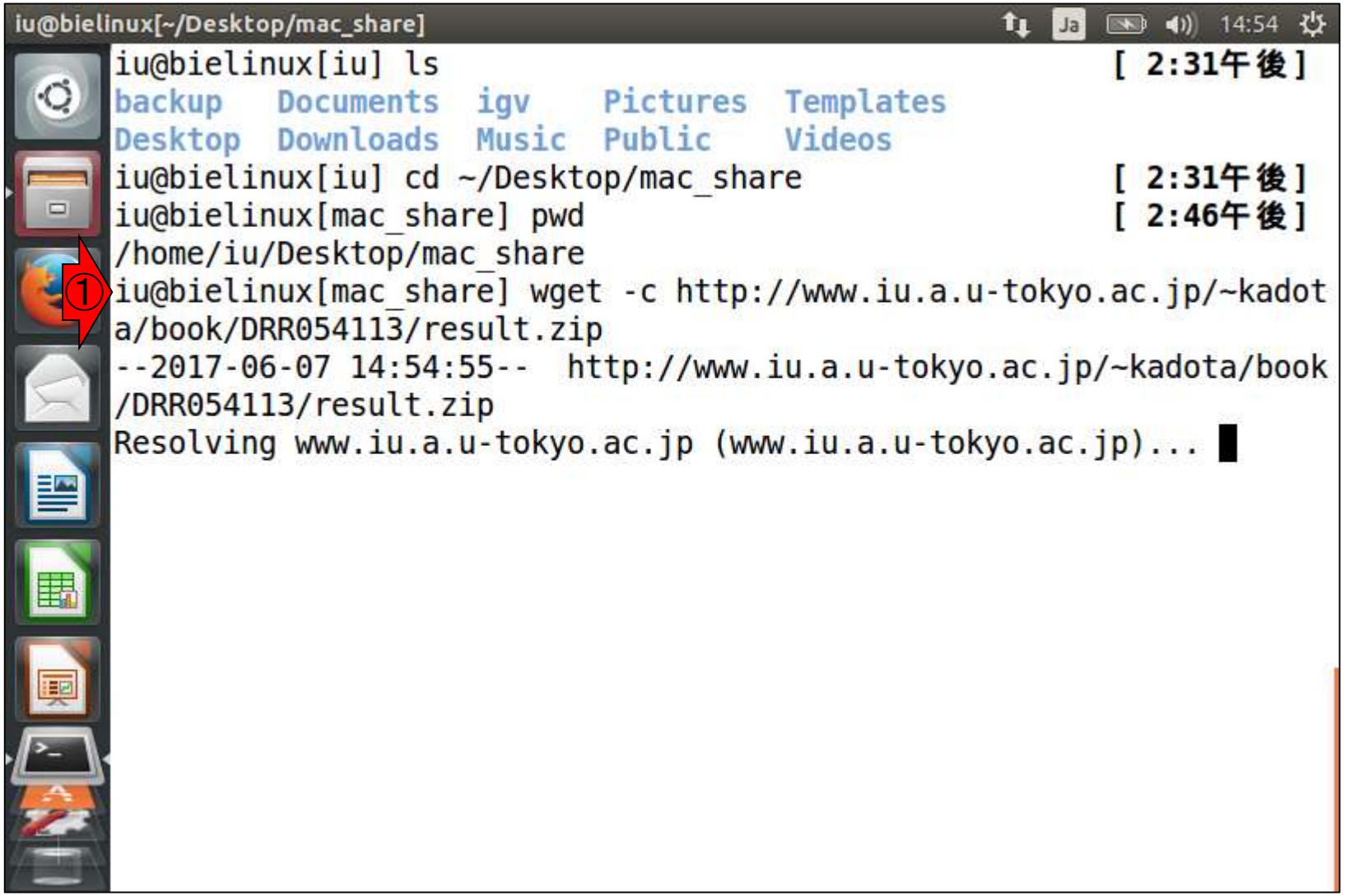
W9-3：ダウンロード4

①wgetコマンド（初出はたしか第3回W11-1）でアセンブリ結果ファイル(result.zip)をダウンロード。ここでは、②オプションを-cのみとして、途中経過を表示させている



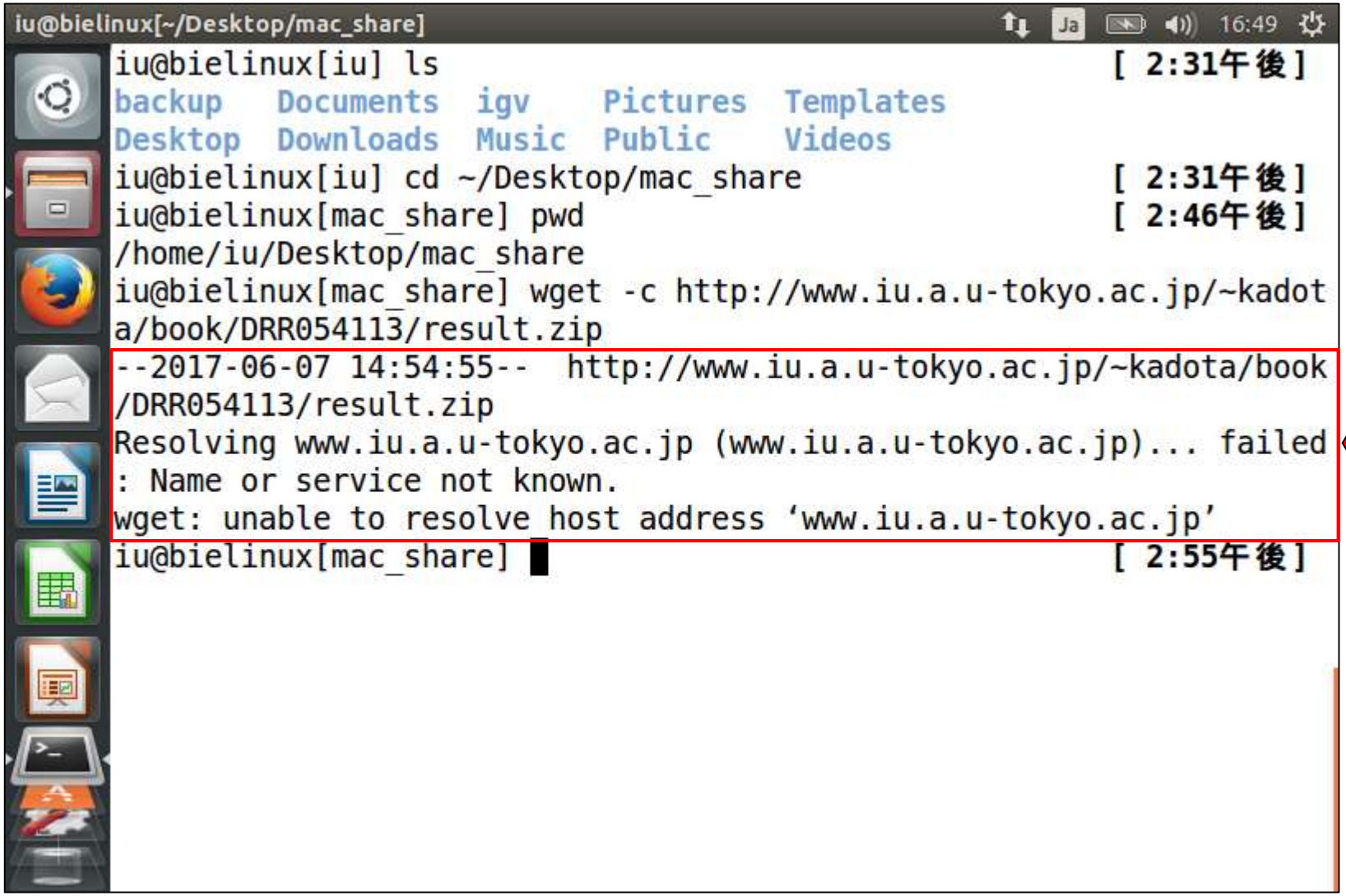
①リターンキーを押した直後

W9-3：ダウンロード5



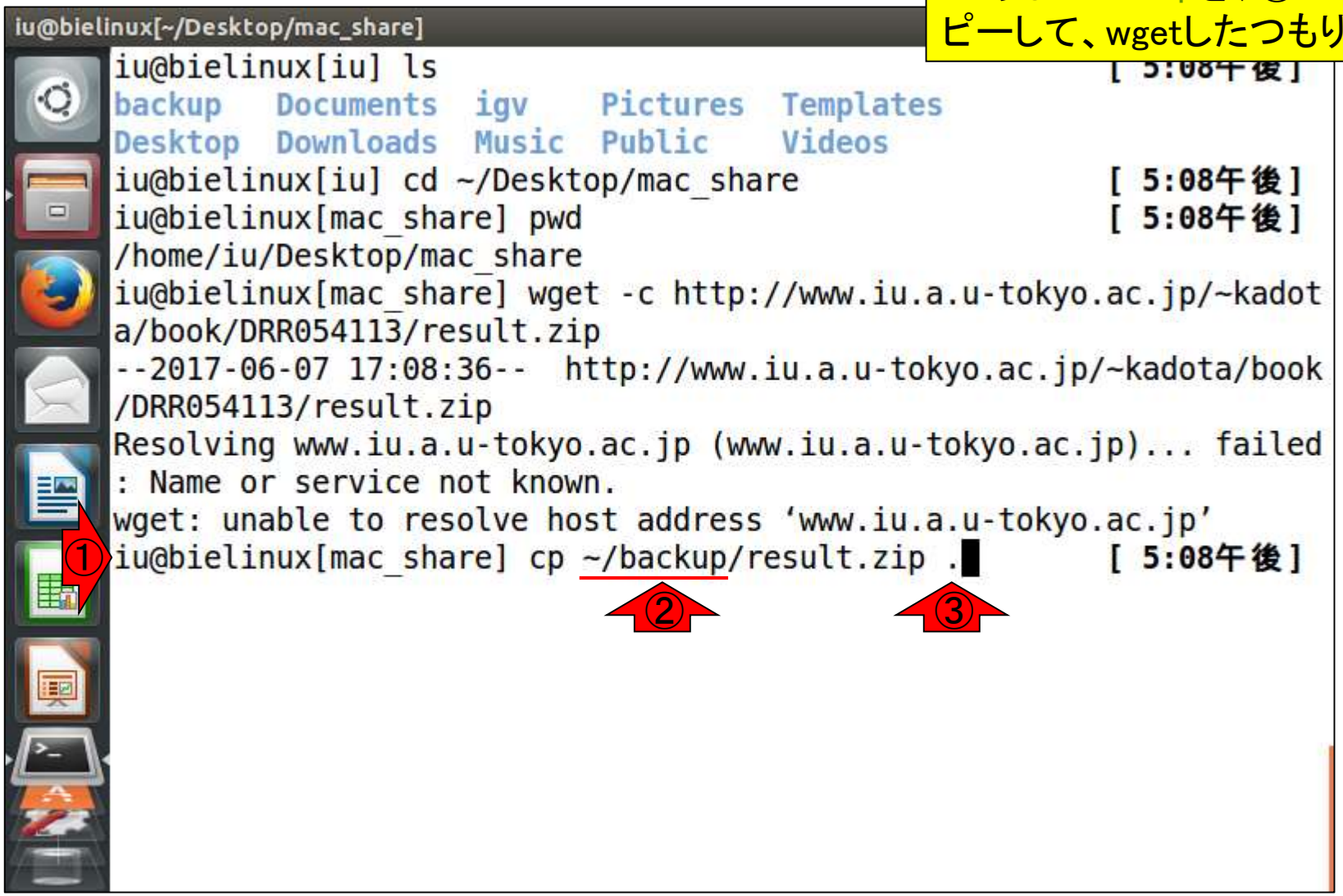
W9-3：ダウンロード6

①ときどきネットワークの不調で、こんな感じで失敗することがあります。そんなときは…



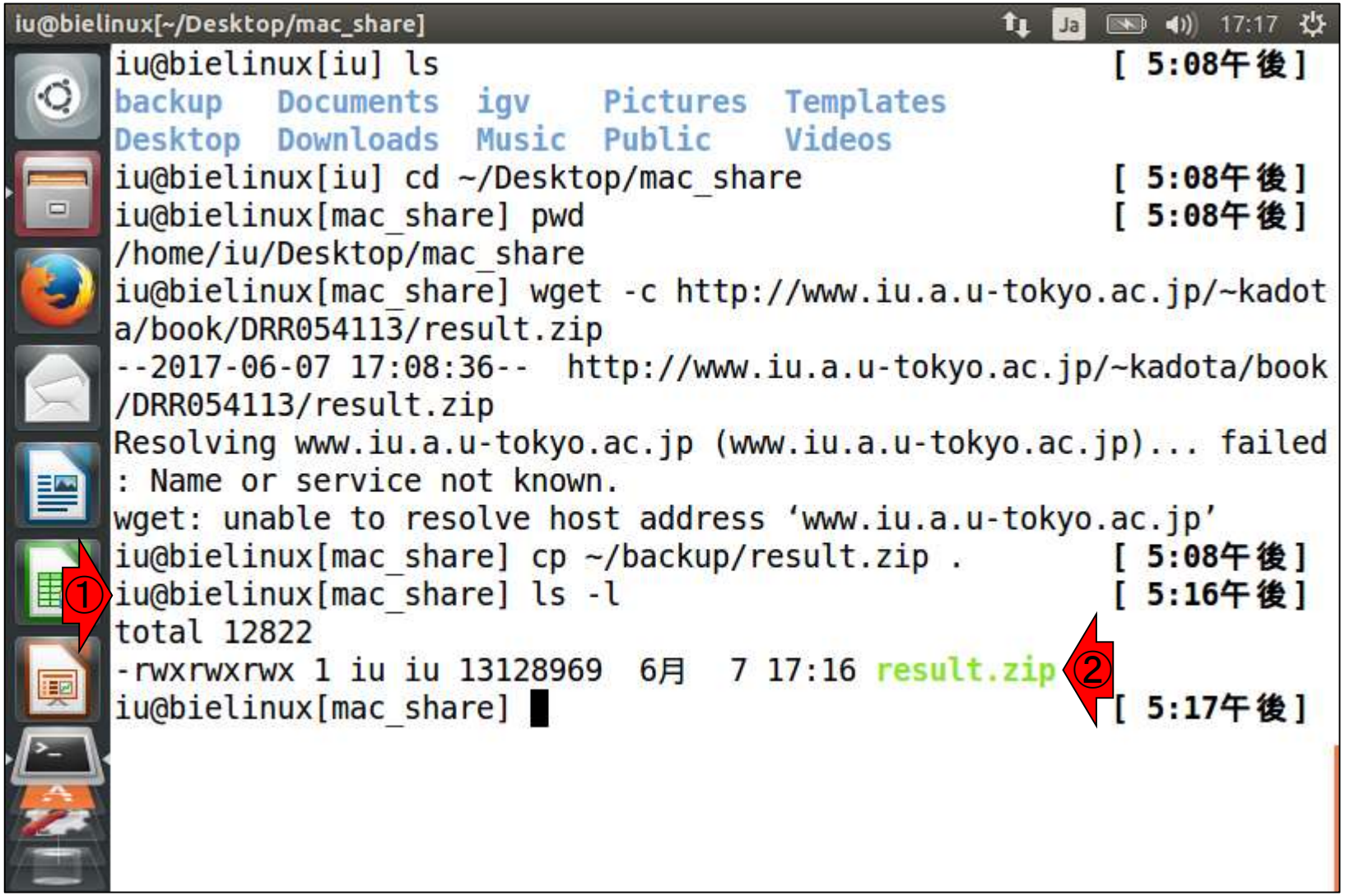
W9-3：ダウンロード7

数分後にwgetをリトライするのもアリですが、①のような感じで、②~/backupディレクトリ内にあるresult.zipを、③カレントディレクトリにコピーして、wgetしたつもりになってください



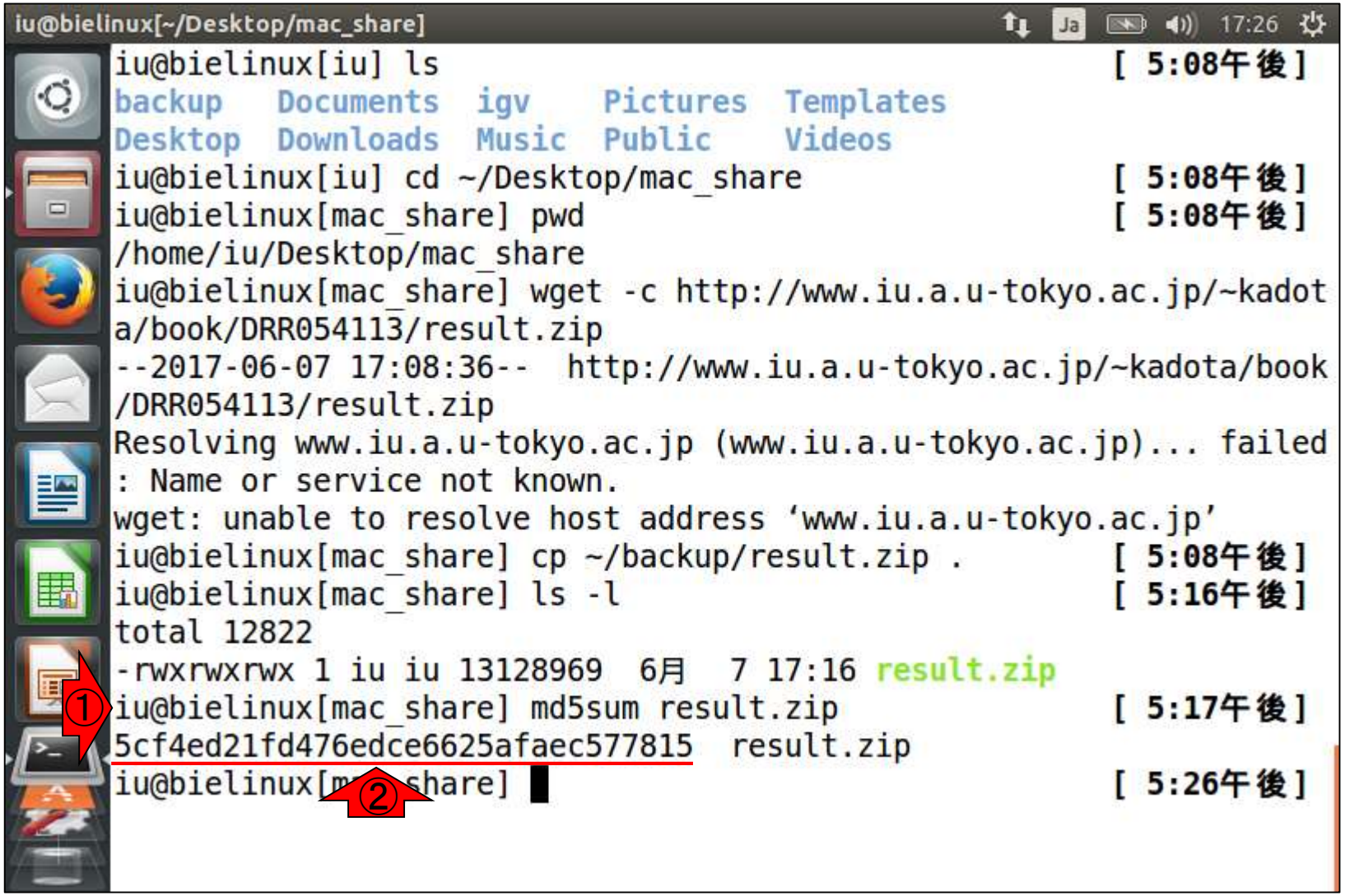
W9-3：ダウンロード8

①ls -lで確認。②約13MBのresult.zipが確かに存在します



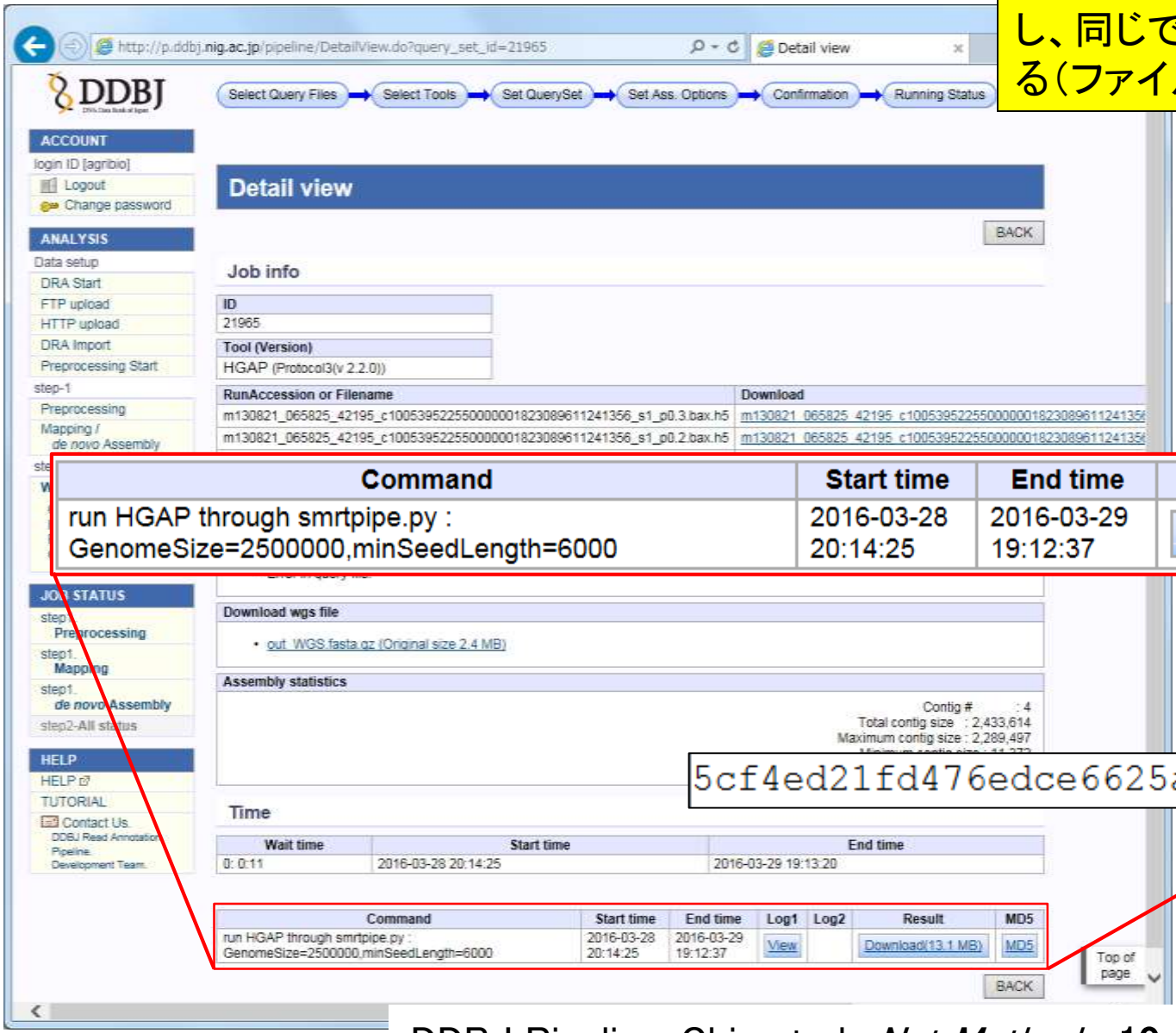
W9-3：ダウンロード9

①md5sumでresult.zipの②MD5チェックサム値（第3回W12）を表示。この値と…



W9-3：ダウンロード9

（今回はダウンロード元がDDBJ Pipelineではなかったが、そうだったとして）①をクリックして見られる②MD5チェックサム値と比較し、同じであればファイルの中身は同じである（ファイルが壊れていない）と判断する



Command	Start time	End time	Log1	Log2	Result	MD5
run HGAP through smrtpipe.py : GenomeSize=2500000,minSeedLength=6000	2016-03-28 20:14:25	2016-03-29 19:12:37	View		Download(13.1 MB)	MD5

①

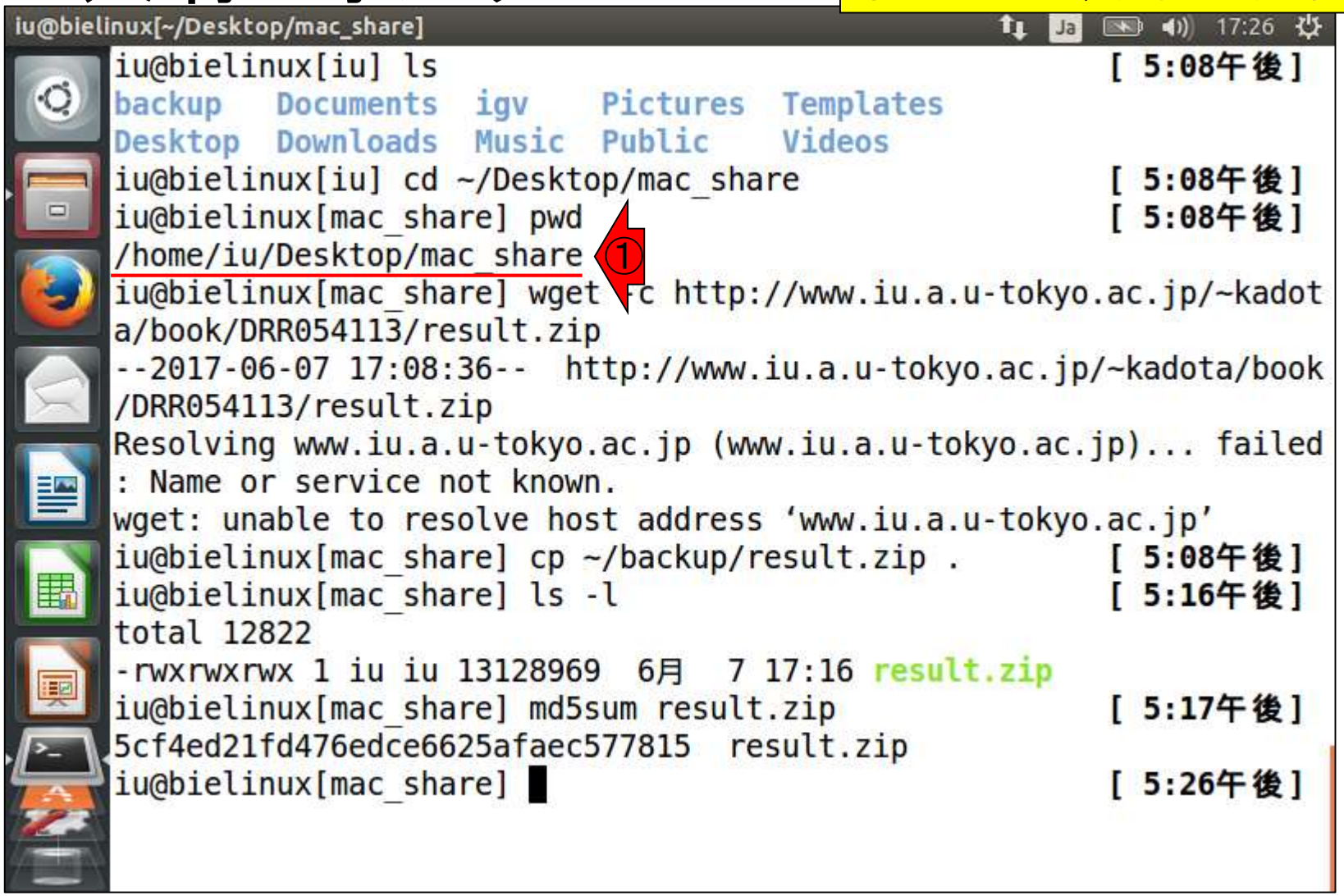
```
5cf4ed21fd476edce6625afaec577815  result.zip
```

②

DDBJ Pipeline: Chin et al., *Nat Methods*, **10**: 563–569, 2013

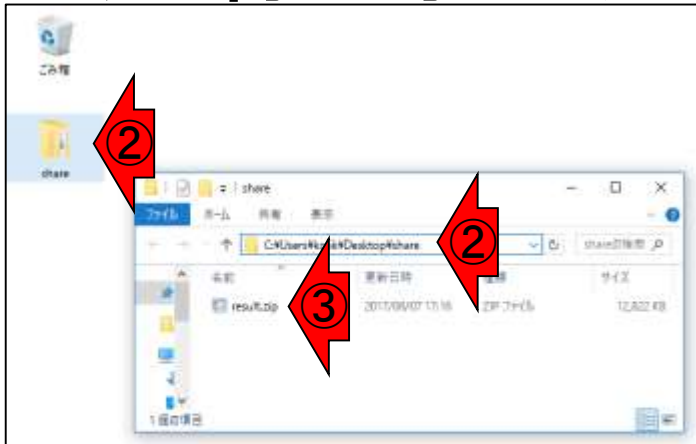
共有フォルダ

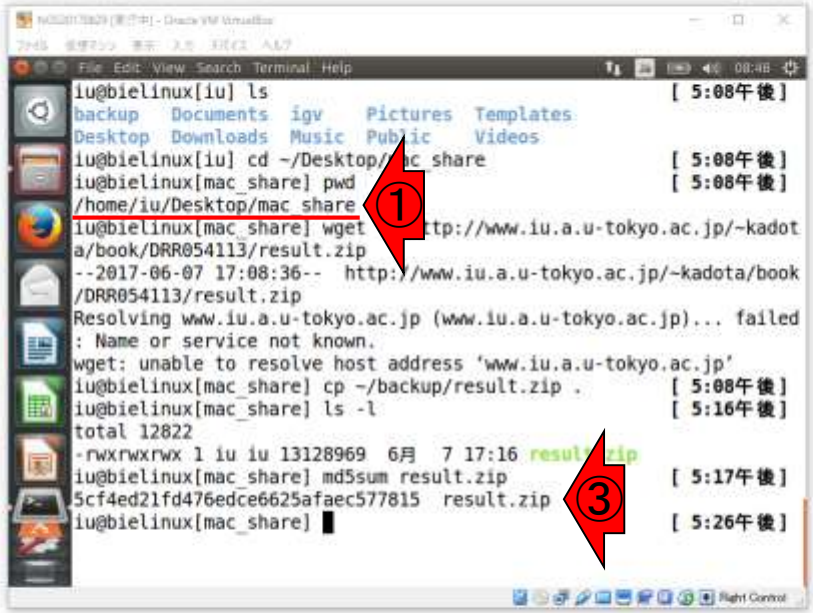
ゲストOS（Bio-Linux）上の①のディレクトリは、ホストOSのデスクトップ上にあるshareフォルダとつながっています。そのような設定を行ったからです



共有フォルダ

ゲストOS（Bio-Linux）上の①のディレクトリは、②ホストOS（この場合Windows 10）のデスクトップ上にあるshareフォルダとつながっています。つまり共有フォルダです。③確かに同じresult.zipファイルが見えていますね。この（程度の）話についてこれるヒトが予習をやったと言えるヒト



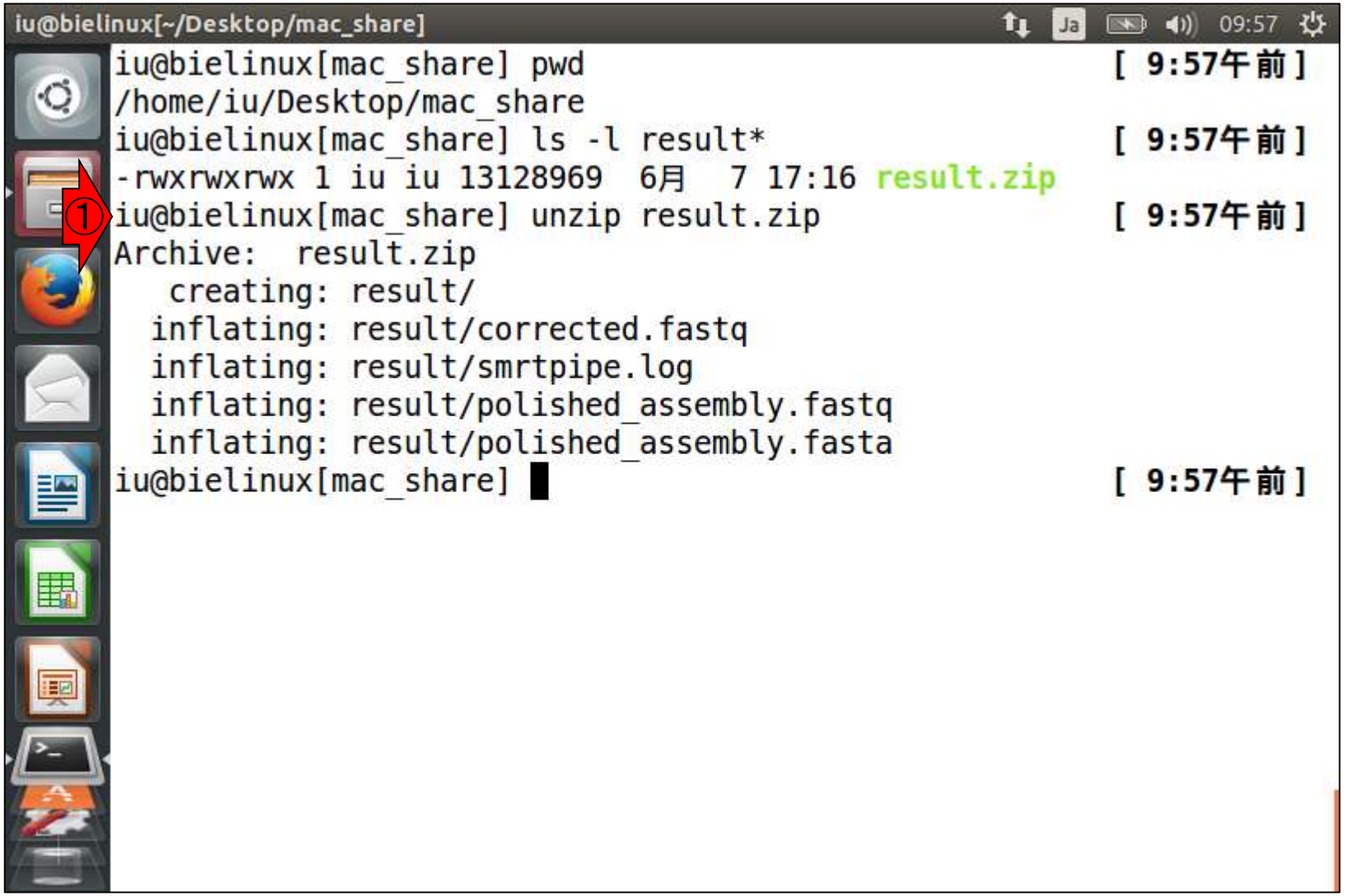


Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

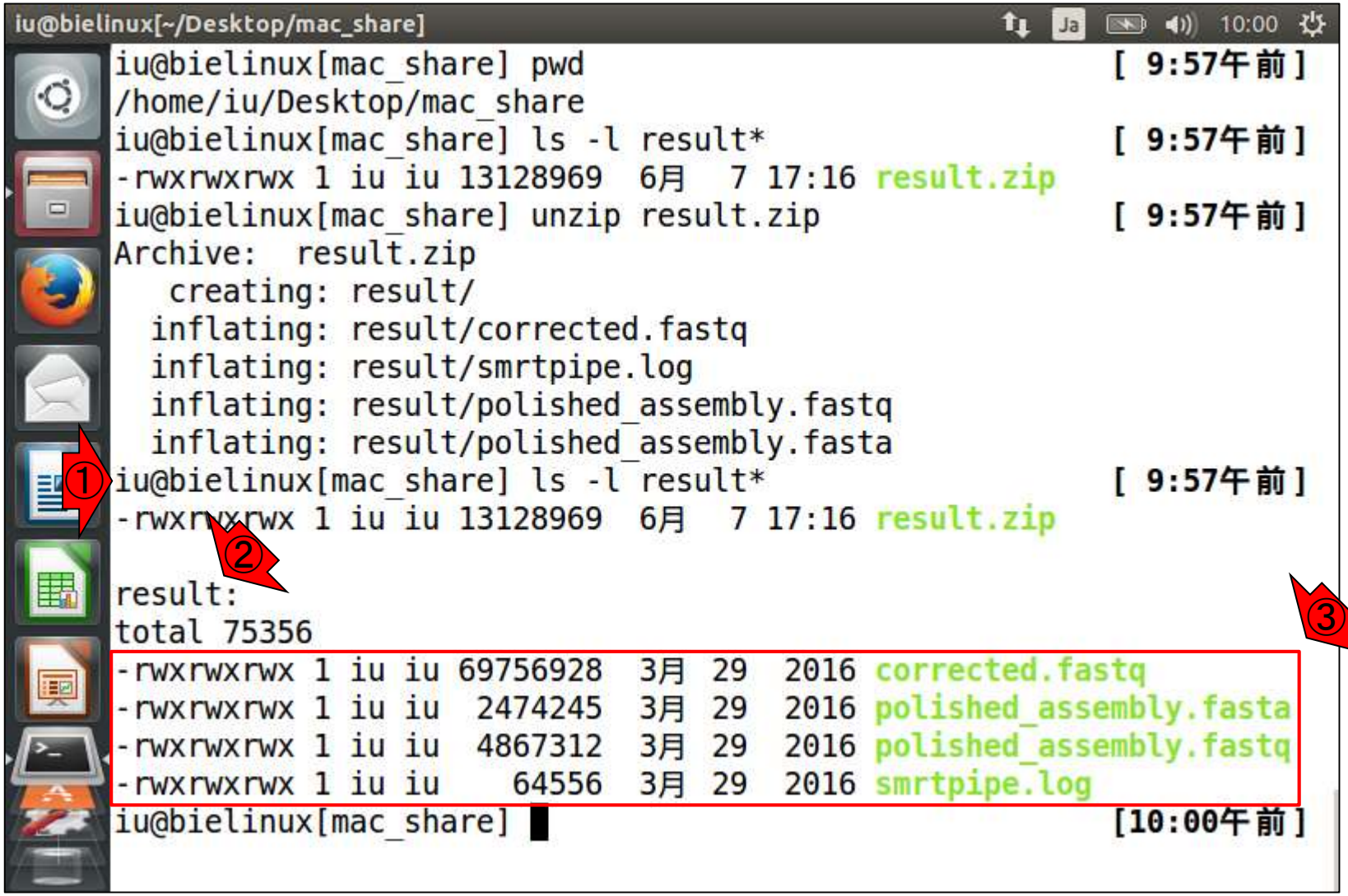
W9-4：解凍して概観

①result.zipを解凍。zip圧縮ファイルの解凍コマンドはunzip



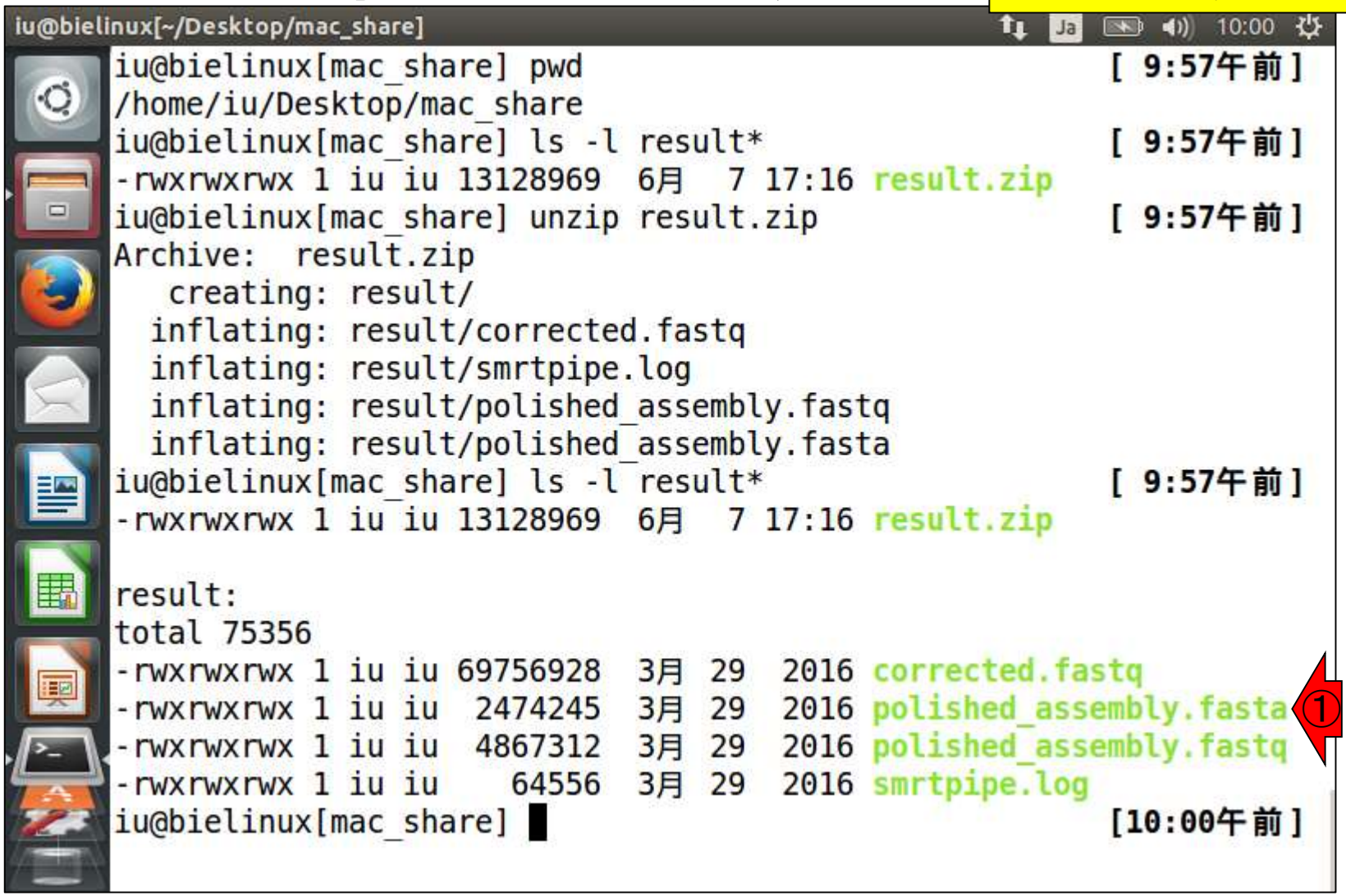
W9-4：解凍して概観

①lsで中身を確認。②resultディレクトリの中には、③赤枠で示す計4つのファイルが存在する



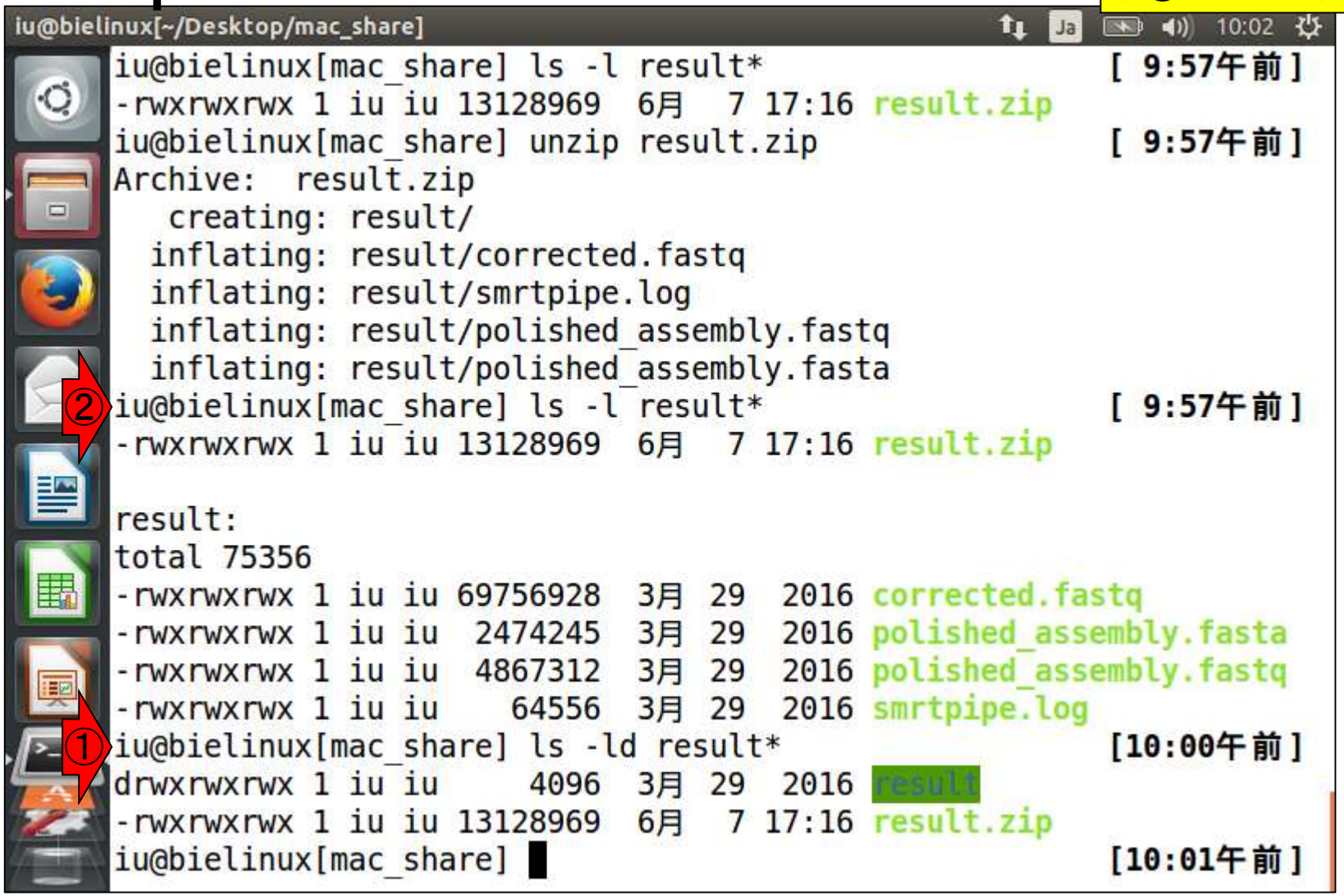
W9-4：解凍して概観

①がPacBio用の*de novo*アセンブリプログラムHGAPの主な実行結果。拡張子が.fastaなので、multi-FASTA形式ファイル



Tips：ls -ld

①ls -ldとすれば、ディレクトリの中身を非表示にできる(第6回W11-2)。②ls -lとの違いは③一目瞭然



今は①赤枠あたりです。このあと②赤下線部分あたりの話をしていきます

第7回原稿p104右下

ノムサイズ（2.5MB; 2,500,000 bp）を与えたが、Illumina MiSeq データから得られた推定ゲノムサイズ（約 2.4MB; 2,400,000 bp）を与えてみてもいいだろう[3] [W8-3]。PacBio データは、ランダムな位置でシークエンスエラーが起こる。そのため、②で短いリードをマップして、ポジションごとに出現する塩基の多数決ルールを適用することでエラー補正ができる。X に相当する推定ゲノムサイズを与えることで、coverage の計算を行うことができる。

2つめのパラメータである Minimum Seed Length は、基本的にデフォルトの 6,000 bp、および Automatic Estimation でよい。PacBio の真骨頂は、リピート配列を超えうる長さのリードを得られる点にある。それゆえ、①で選択するシードは、安定的にアセンブルできる 25X を超える範囲で、できるだけ長いサブリードに限定するほうがよい。それを自動的に算出するのが Automatic Estimation である。6,000 bp という値は、25X という条件を満たす最短サブリード長が 6,000 bp 未満だった場合に

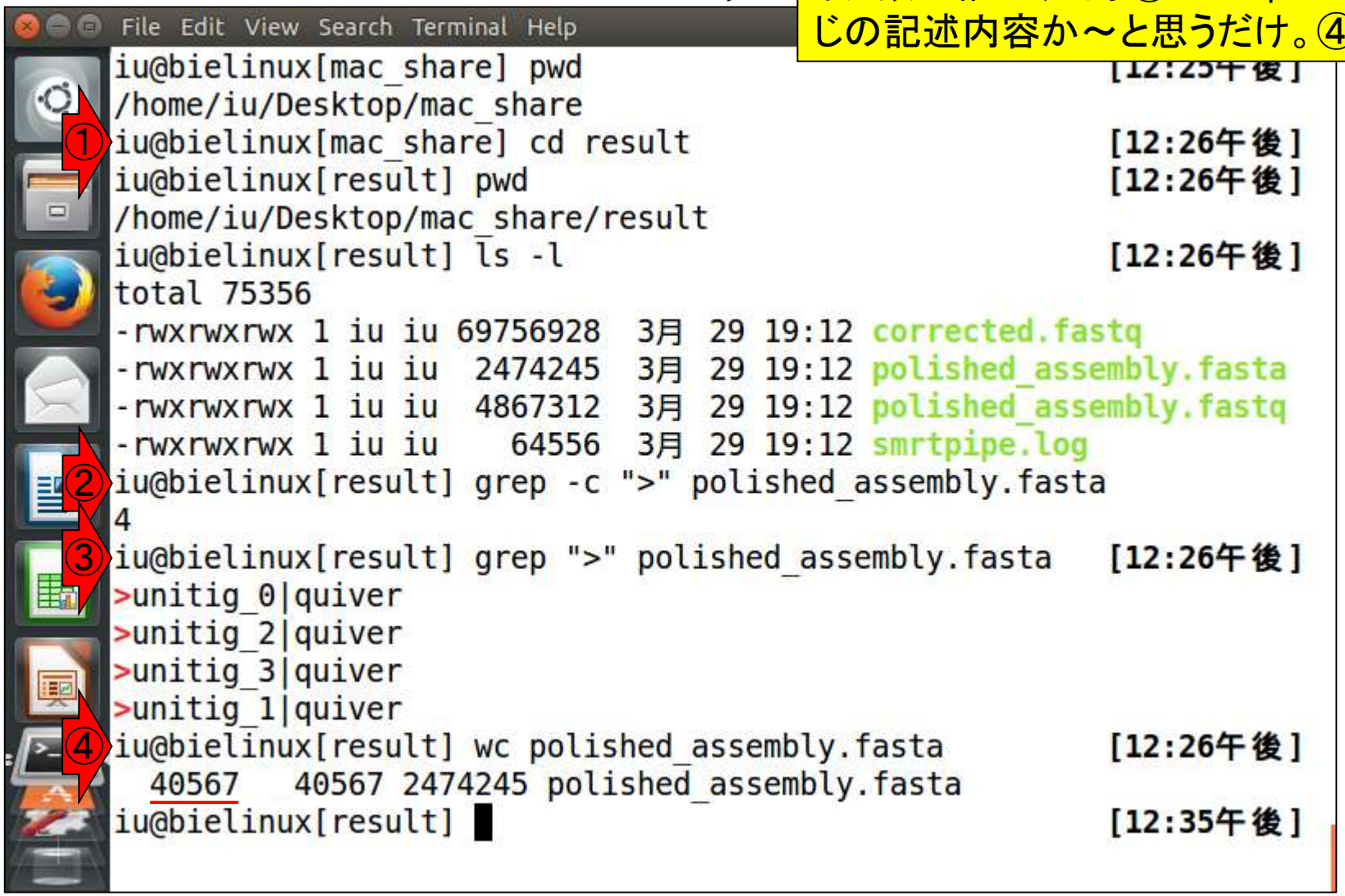
HGAP 実行結果の概観と前処理

DDBJ Pipeline で HGAP（Protocol3; ver. 2.2.0）を実行した結果（result.zip）には、計4つのファイルが含まれる［W9-4］。エンドユーザが欲しい最終結果ファイルは、polished_assembly.fasta である。Linux の基本コマンド［W9-5］や R［W9-6］を駆使して、このファイルの全体像を大まかに把握し、ある程度予想を立てる。具体的には、最も長い 2,289,497 bp のコンティグは、乳酸菌の平均ゲノムサイズ（約 2.5MB）に近いことから、染色体（chromosome）だろうと予想した。それ以外の3つのコンティグ（86,892 bp, 45,853 bp, and 11,372 bp）は、染色体の一部、プラスミド、ミスアセンブルのいずれかであろう。もしコンティグが環状であれば、プラスミドである可能性が高い。そこでまずは、コンティグごとに環状かどうかのチェックを行う。

谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

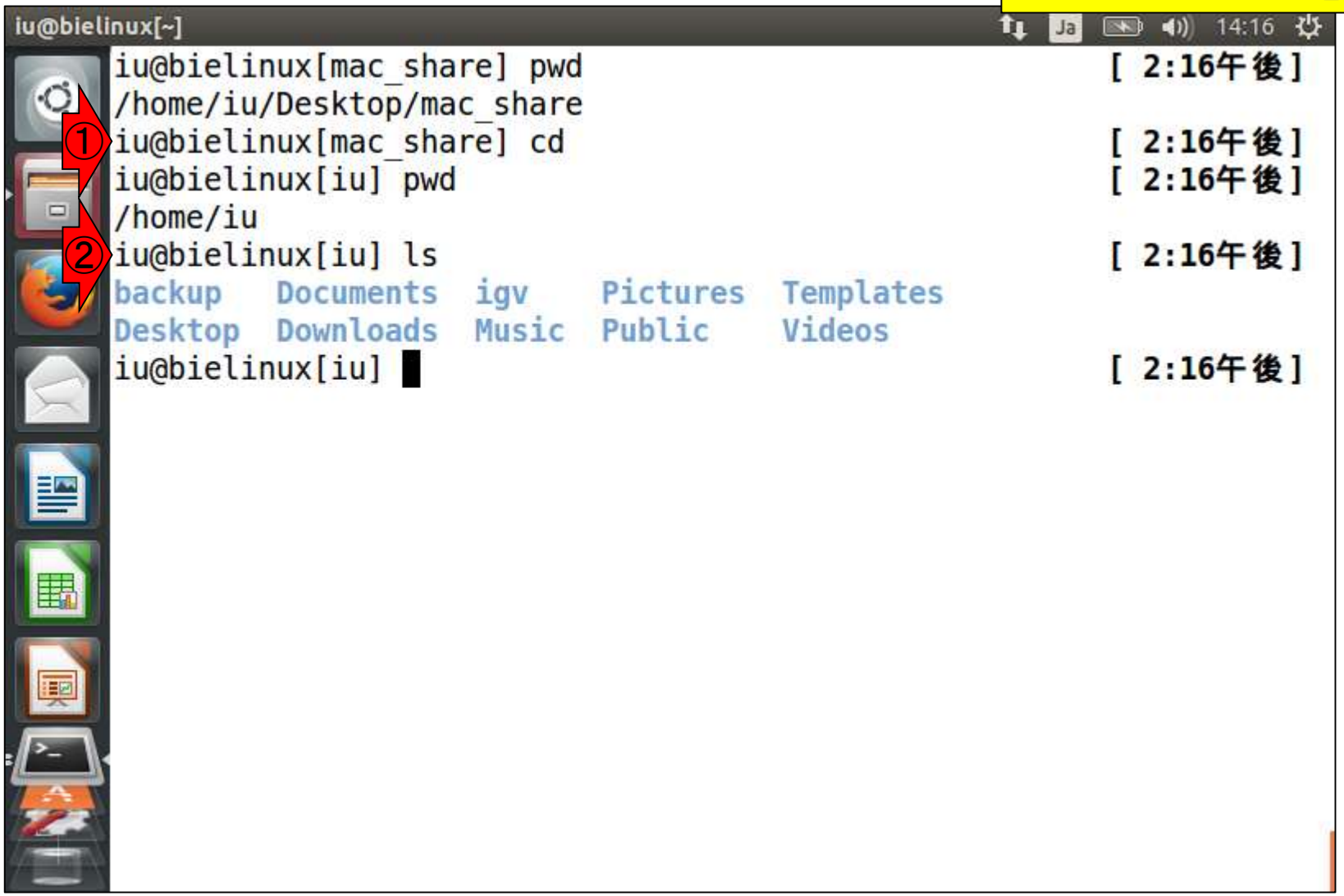
W9-5：コンティグ数

①resultディレクトリに移動し、②コンティグ数を表示。FASTA形式ファイルなので”>”を含む行数がコンティグ数に相当する。③description行を表示。こんな感じの記述内容か～と思うだけ。④行数は、40,567行



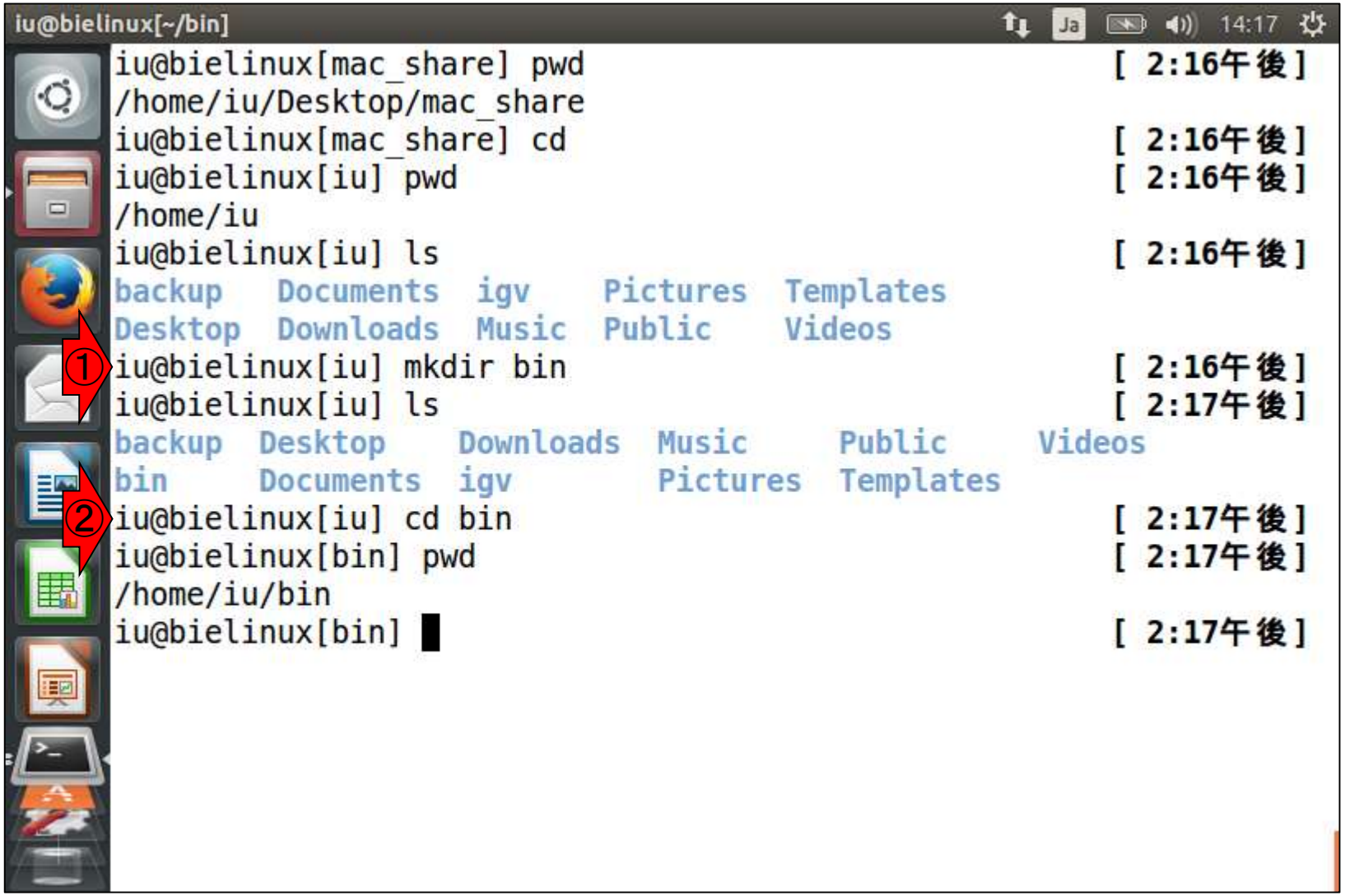
W10-2のイントロ1

①cdでホームディレクトリに移動。②lsで確認。これから作成予定のbinというディレクトリがないことを確認しているだけ



①binというディレクトリを作成して、②そこに移動

W10-2のイントロ2

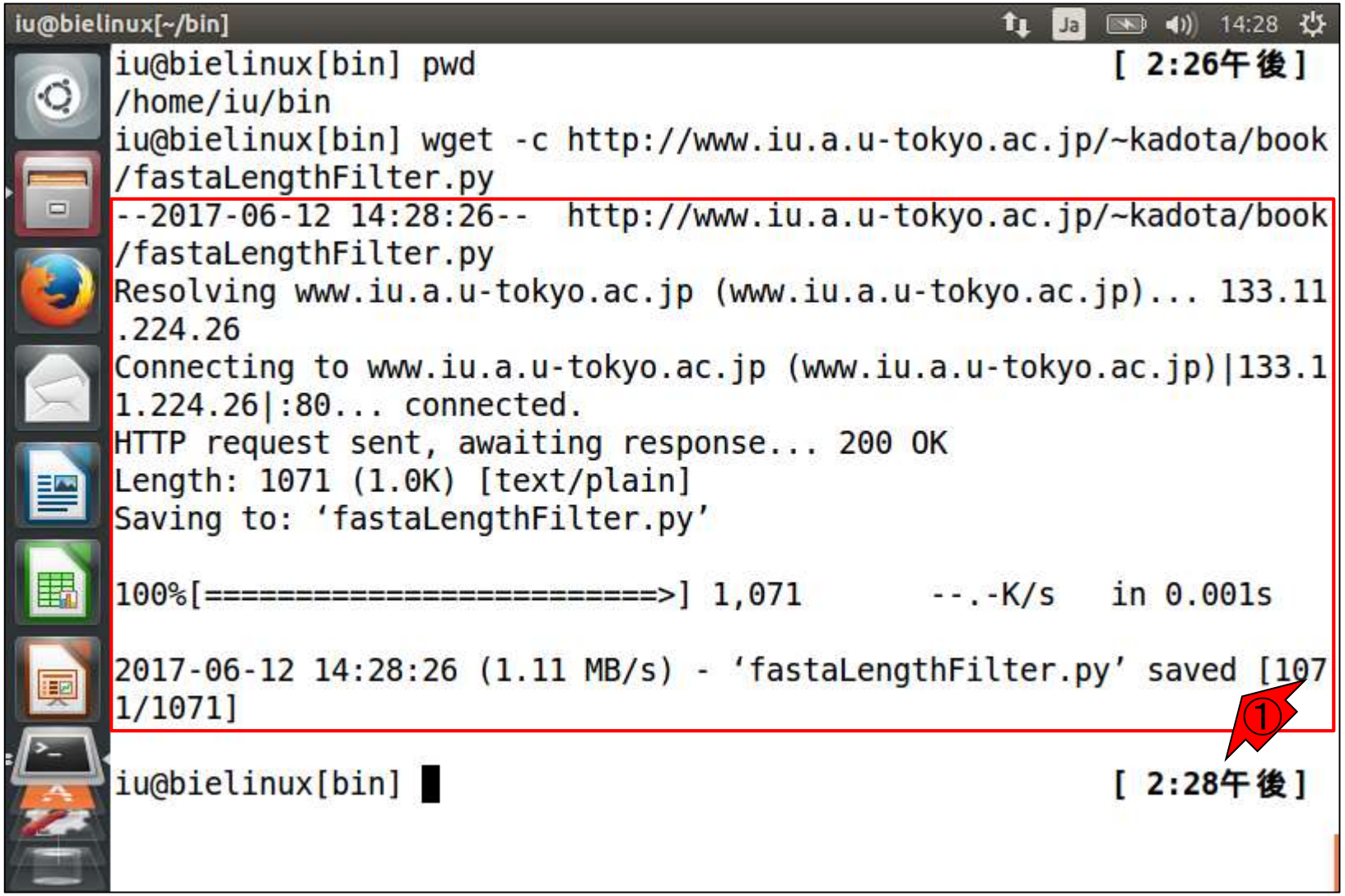


W10-2のイントロ3

multi-FASTA形式ファイルを入力として、指定した配列長未満の配列を除くPythonプログラム(fastaLengthFilter.py)を①wgetでダウンロード。このプログラムは配列長順にソートした結果を返す

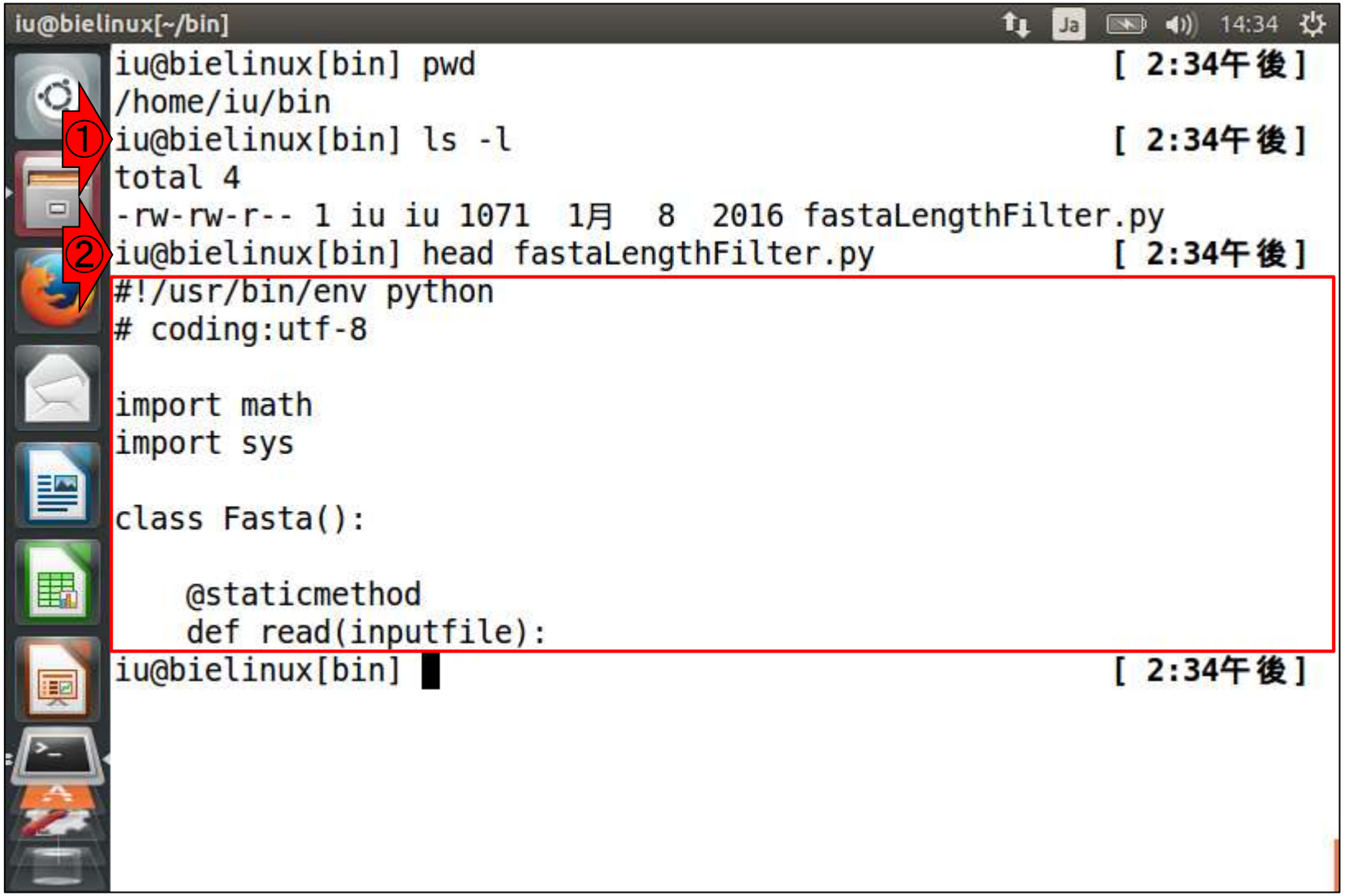
①ダウンロードが無事成功したときの典型的な画面

W10-2のイントロ3



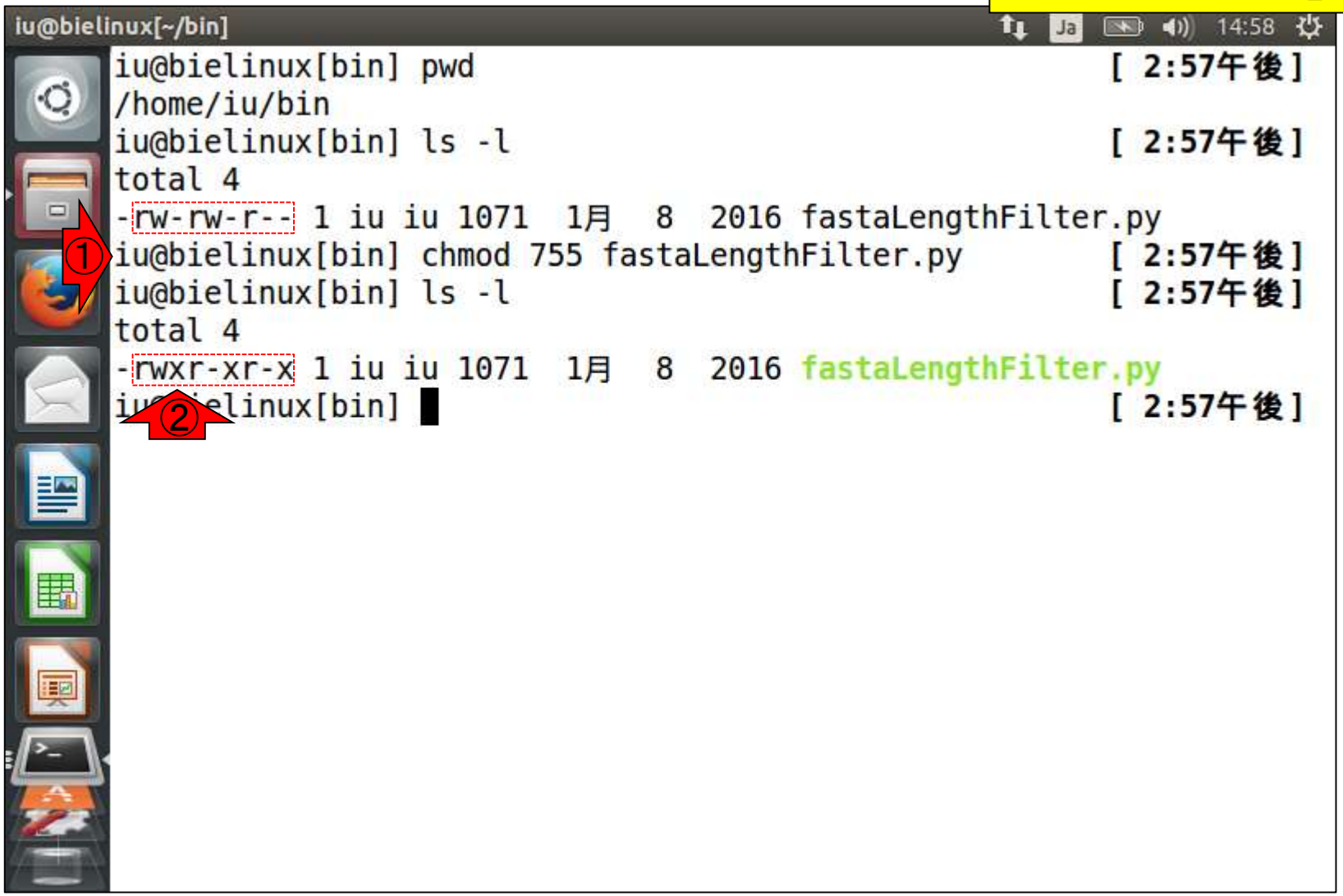
①lsで確認。②headで最初の10行分を表示

W10-2のイントロ4



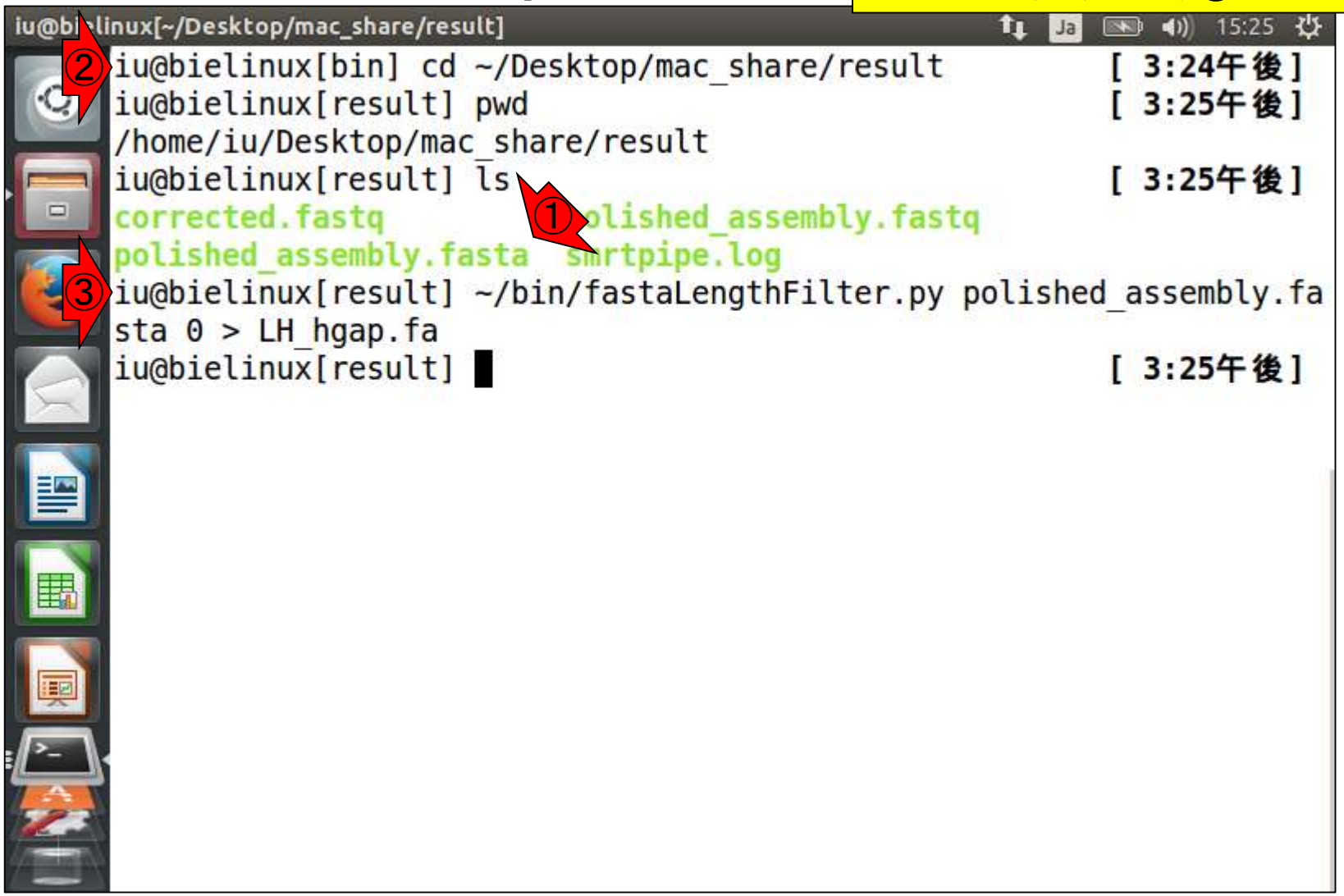
W10-2のイントロ5

①chmod 755として、fastaLengthFilter.pyプログラムの実行権限を付与。②ここがXとなっていることを確認。第4回W3-1



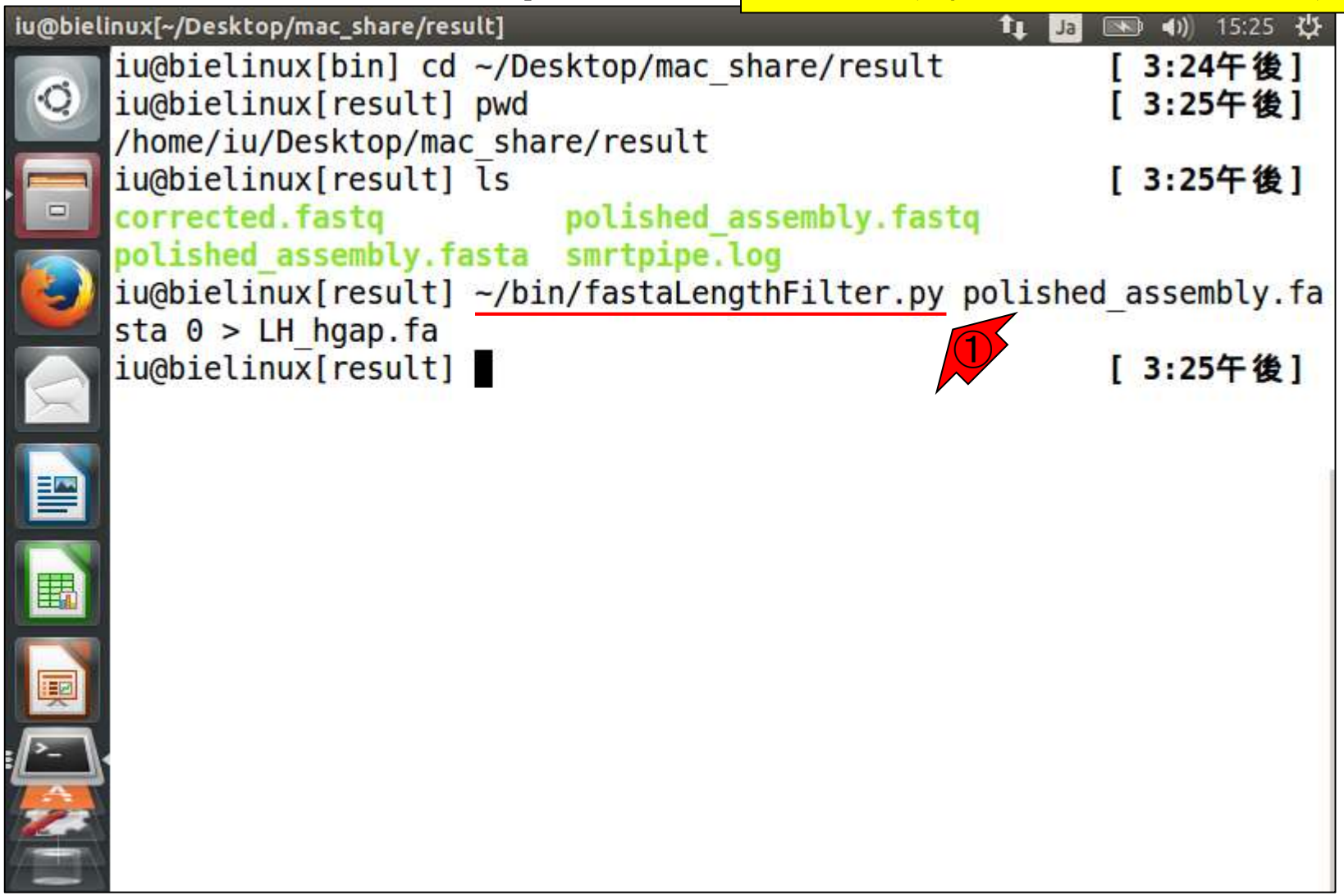
W10-2の本番1

①取り扱いたいアセンブリ結果ファイル(polished_assembly.fasta；スライド34)のある②ディレクトリに移動して、③fastaLengthFilter.pyを実行



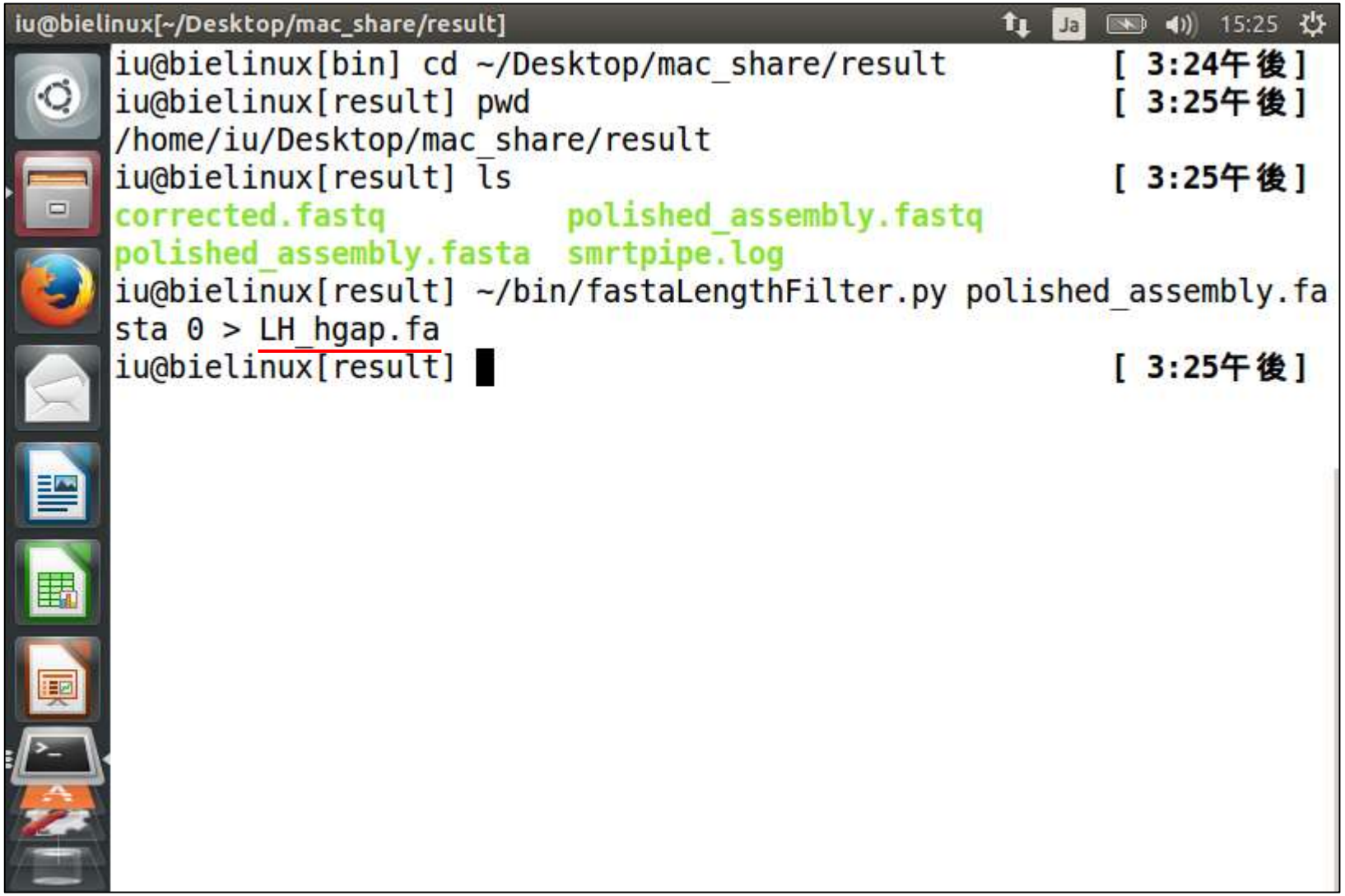
W10-2の本番1

①~/bin/fastaLengthFilter.pyのように書くことで、~/binに「パスを通す」作業をしていなくても実行できる。パスについては、第4回のW9-5やW15-5、第6回のW12-3など



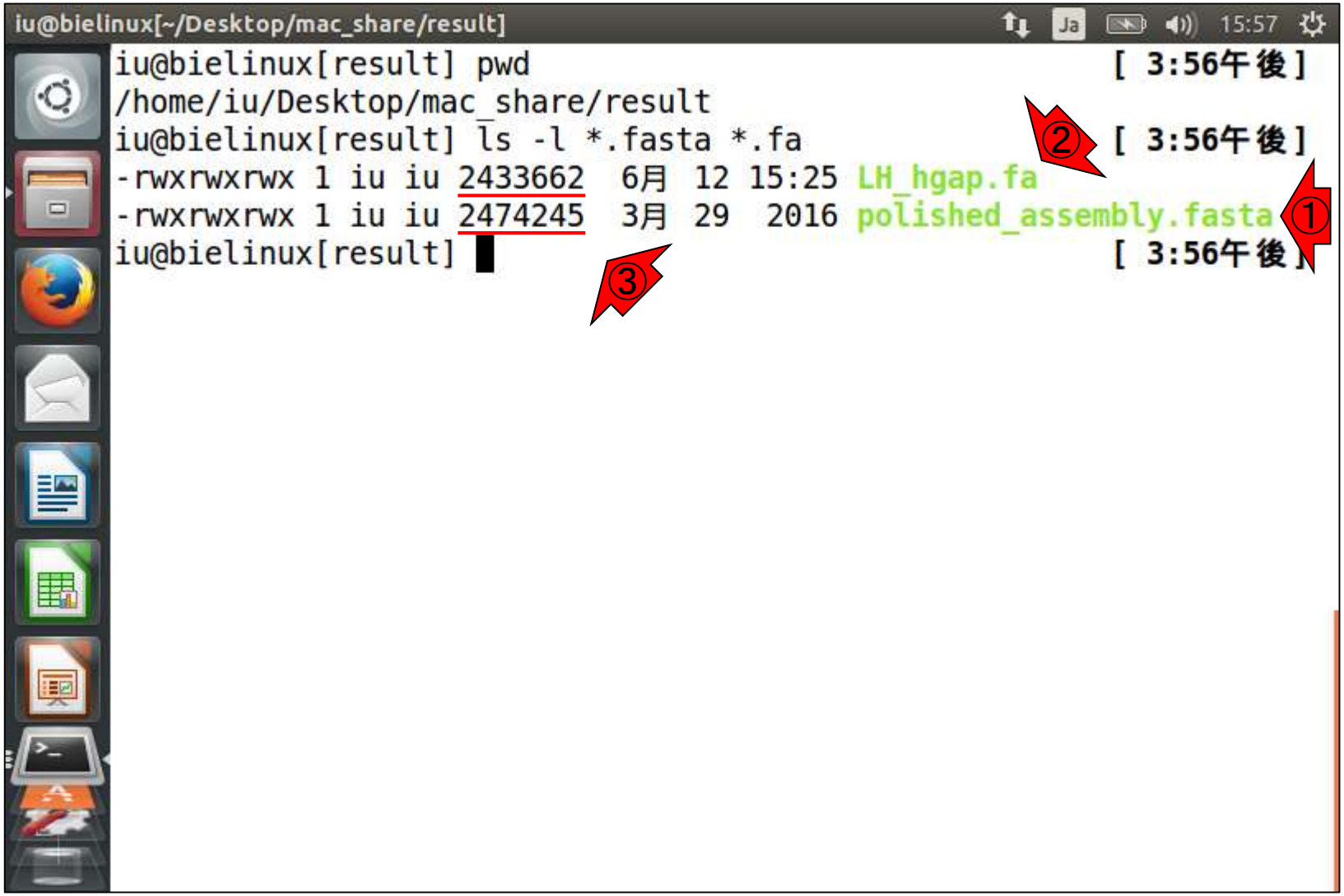
W10-2の本番1

fastaLengthFilter.pyの実行結果ファイルをLH_hgap.faという名前で保存



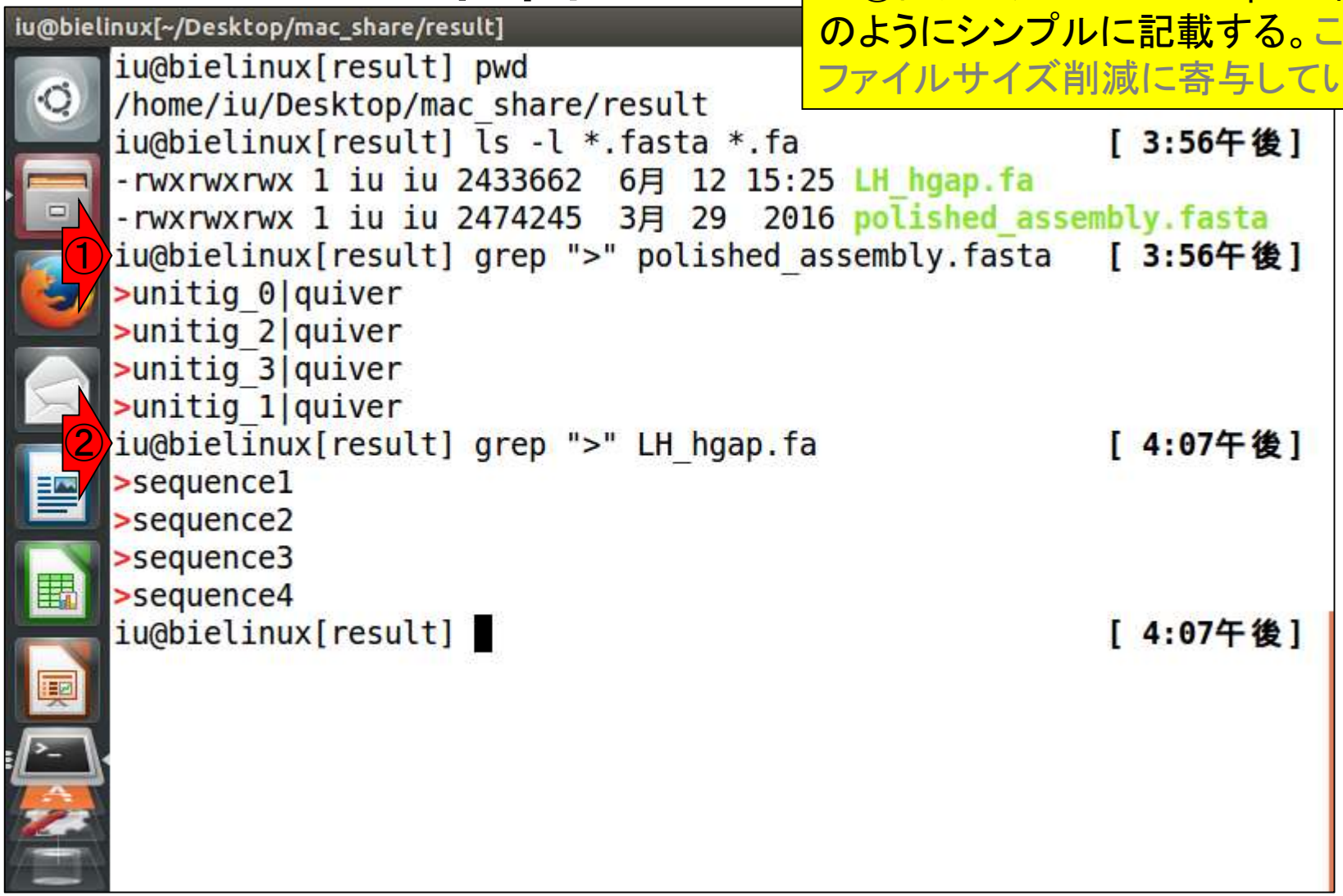
W10-2の本番2

fastaLengthFilter.pyの①入力と②出力。③出力ファイルのほうが若干サイズが小さくなっている



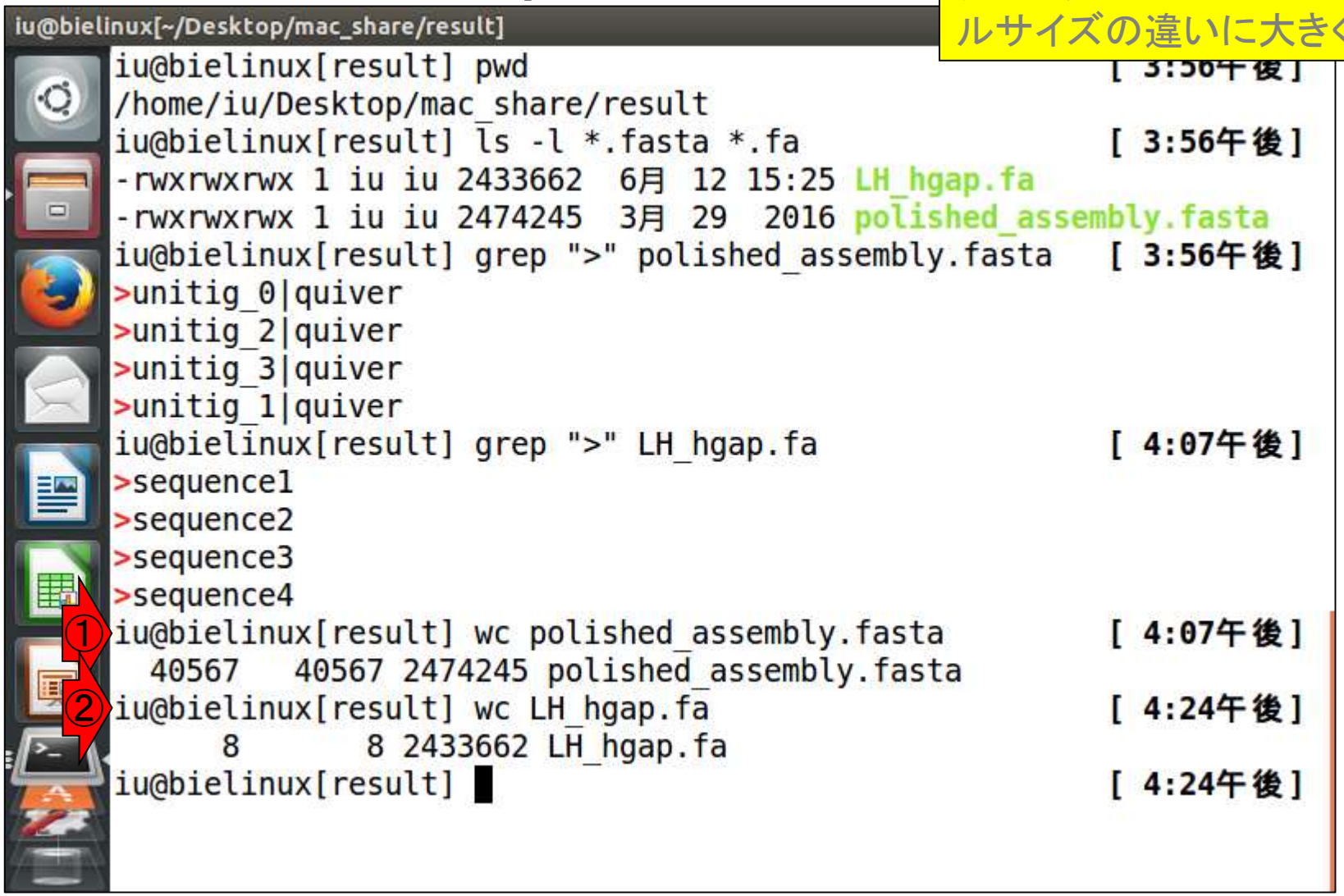
W10-2の本番3

multi-FASTA形式の①入力ファイルと②出力ファイルのdescription行部分を表示。fastaLengthFilter.pyは②出力ファイルのdescription行部分をsequence…のようにシンプルに記載する。この文字数の違いもファイルサイズ削減に寄与している



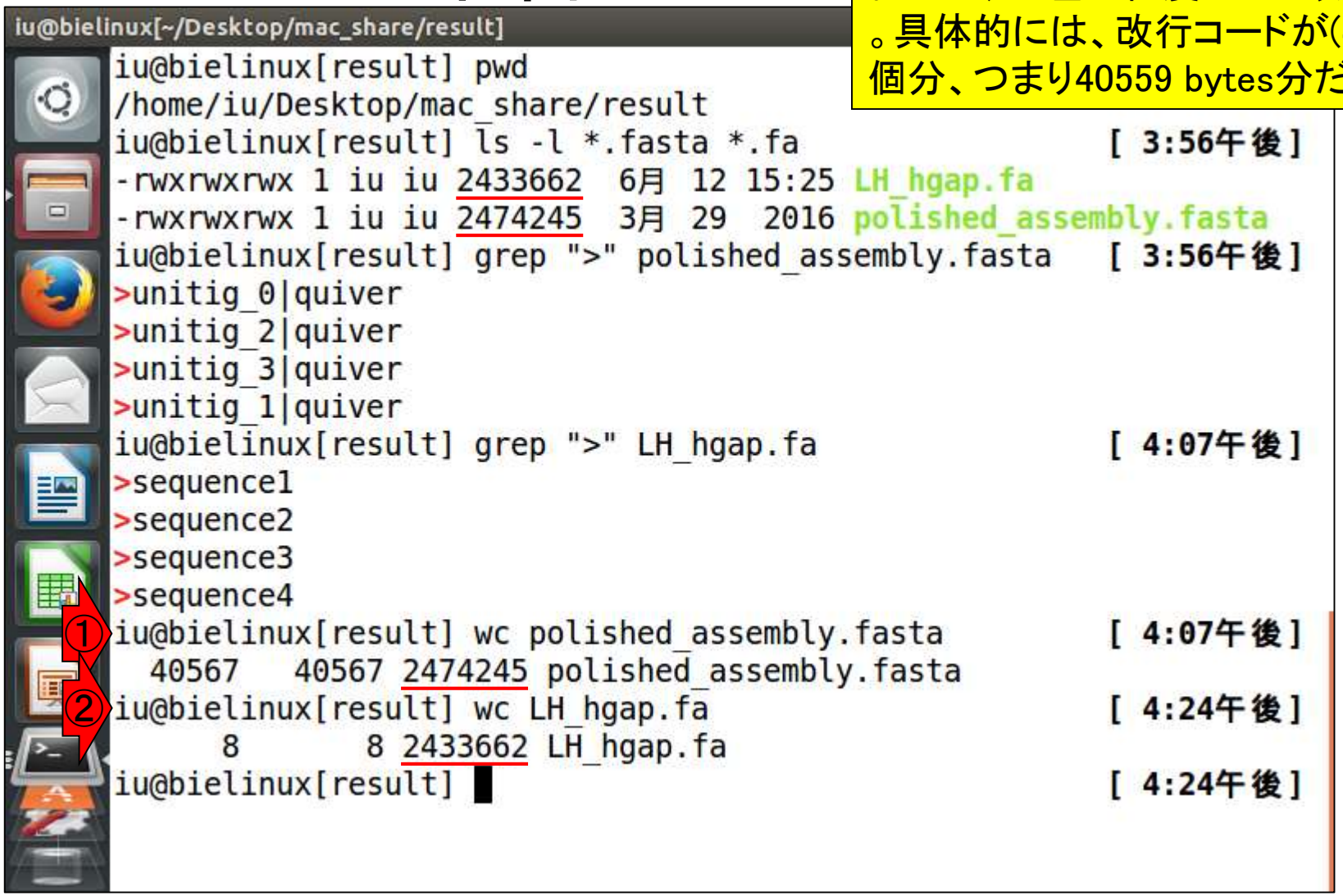
W10-2の本番4

①入力ファイル(polished_assembly.fasta)は40,567行。②出力ファイル(LH_hgap.fa)は8行。この改行コードのバイト数の違いがファイルサイズの違いに大きく寄与している



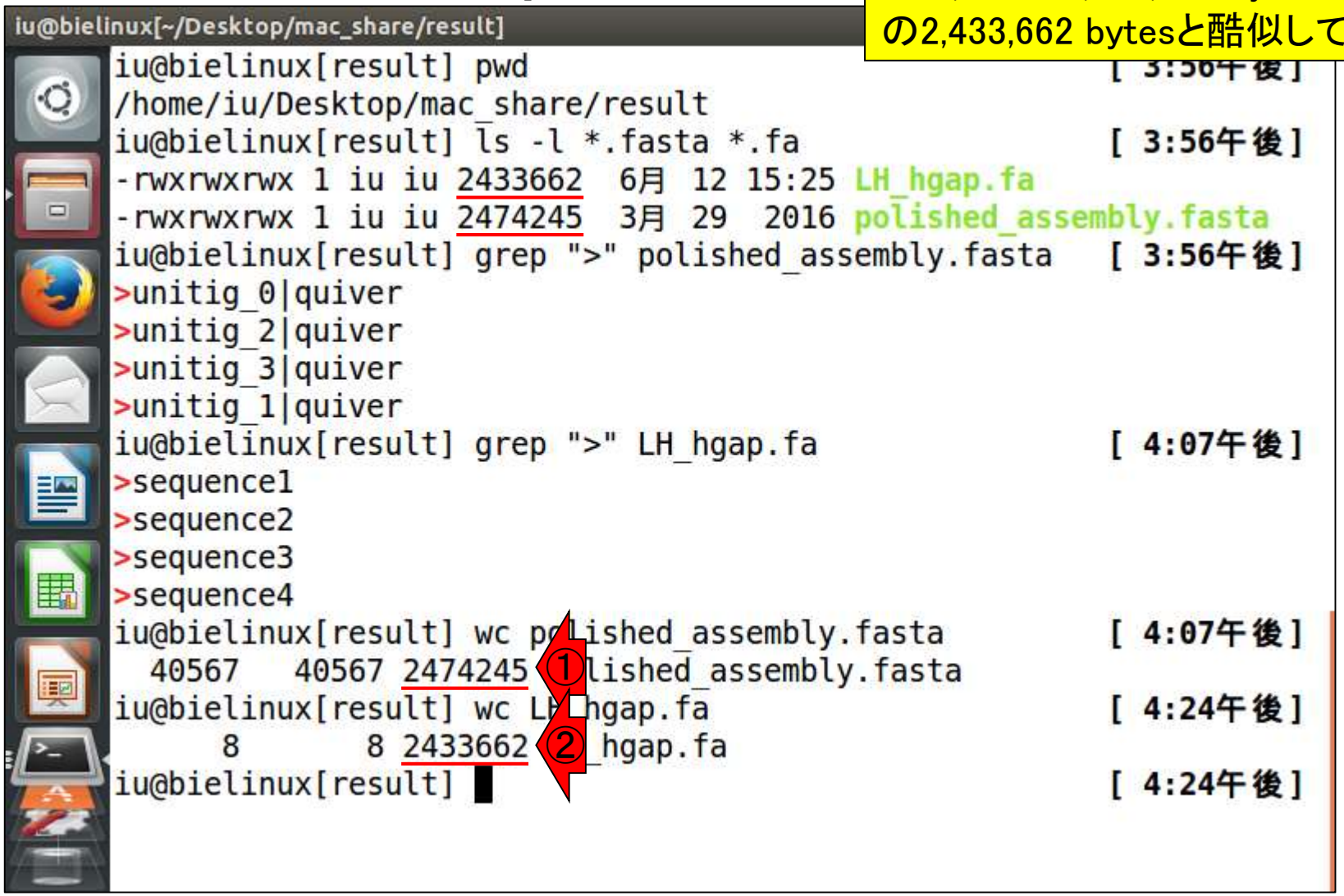
W10-2の本番4

赤下線部分のファイルサイズの違いは、主に①polished_assembly.fastaの塩基配列情報部分において、60塩基程度ごとに改行が入っているから。具体的には、改行コードが(40567 − 8) = 40559個分、つまり40559 bytes分だけ大きくなっている



W10-2の本番4

①polished_assembly.fastaの2,474,245 bytesから、(40,567 − 8) = 40,559 bytesを引くと、2,474,245 − 40,559 = 2,433,686 bytesとなる。②LH_hgap.faの2,433,662 bytesと酷似しており妥当



W10-2の本番4

①polished_assembly.fastaの2,474,245 bytesから、(40,567 − 8) = 40,559 bytesを引くと、2,474,245 − 40,559 = 2,433,686 bytesとなる。②LH_hgap.faの2,433,662 bytesと酷似しており妥当。2,433,686 − ②2,433,662 = 24 bytesの違いは、赤枠部分の文字数の違いに起因。③6文字×4で24 bytes

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l *.fasta *.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2433662  6月 12 15:25 LH_hgap.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2474245  3月 29  2016 polished_assembly.fasta
iu@bielinux[result] grep ">" polished_assembly.fasta    [ 3:56午後]
>unitig_0|quiver
>unitig_2|quiver
>unitig_3|quiver
>unitig_1|quiver
iu@bielinux[result] grep ">" LH_hgap.fa                 [ 4:07午後]
>sequence1
>sequence2
>sequence3
>sequence4
iu@bielinux[result] wc polished_assembly.fasta          [ 4:07午後]
  40567   40567 2474245 polished_assembly.fasta
iu@bielinux[result] wc LH_hgap.fa                       [ 4:24午後]
       8       8 2433662 LH_hgap.fa
iu@bielinux[result]                                     [ 4:24午後]
```

ここまでの話は…

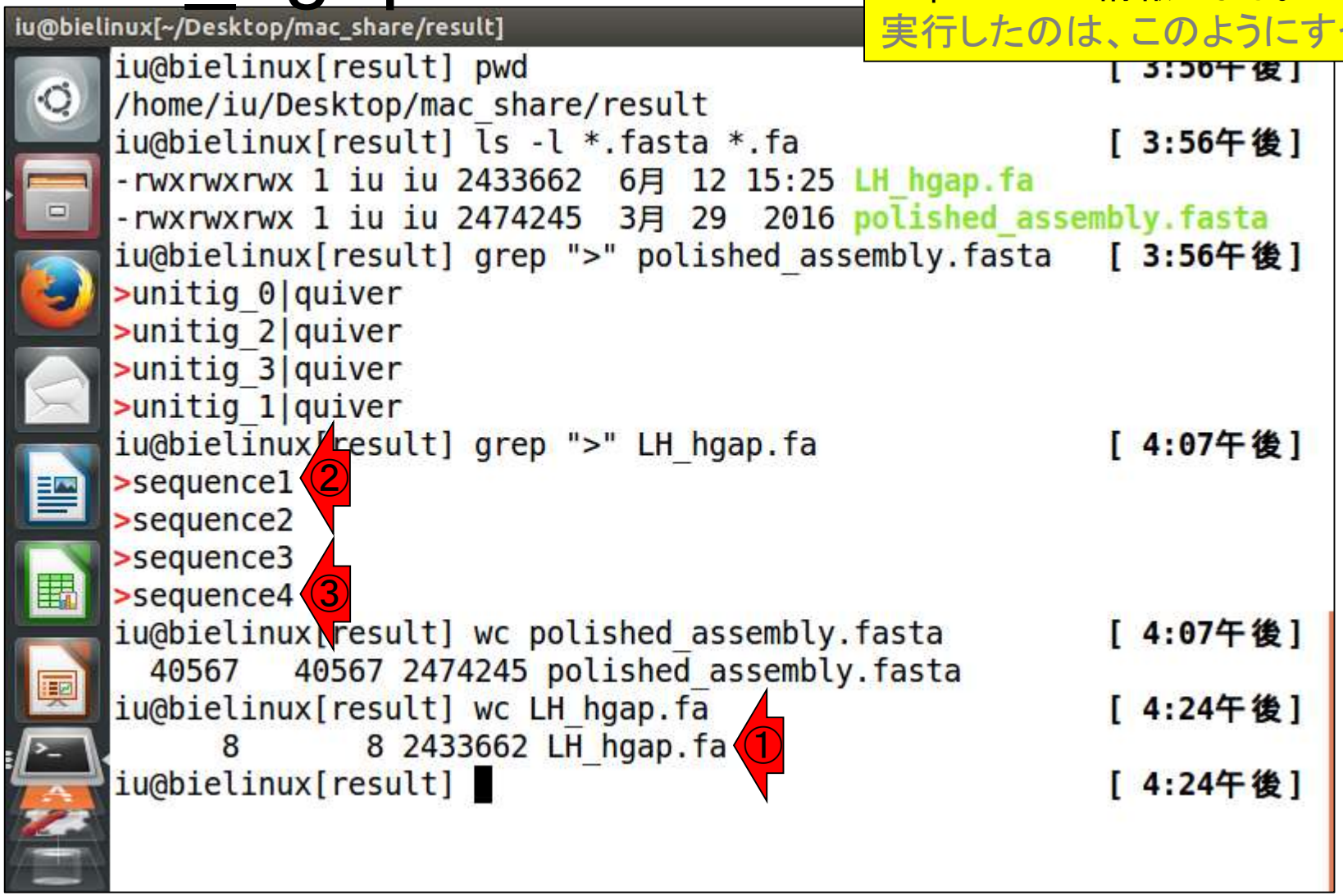
あくまでもこの後の処理をやりやすくするための**前処理**の話。（何をもってやりやすいと思うかはヒトそれぞれだが）Linuxコマンドを駆使して解析を行う場合は、①LH_hgap.faのように「コンティグ1個あたり2行」で表すほうが取り扱いやすい

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l *.fasta *.fa                          [ 3:56午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2433662  6月 12 15:25 LH_hgap.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2474245  3月 29  2016 polished_assembly.fasta
iu@bielinux[result] grep ">" polished_assembly.fasta            [ 3:56午後]
>unitig_0|quiver
>unitig_2|quiver
>unitig_3|quiver
>unitig_1|quiver
iu@bielinux[result] grep ">" LH_hgap.fa                         [ 4:07午後]
>sequence1
>sequence2
>sequence3
>sequence4
iu@bielinux[result] wc polished_assembly.fasta                  [ 4:07午後]
  40567   40567 2474245 polished_assembly.fasta
iu@bielinux[result] wc LH_hgap.fa                               [ 4:24午後]
       8       8 2433662 LH_hgap.fa
iu@bielinux[result]                                             [ 4:24午後]
```

①

LH_hgap.fa

①LH_hgap.faは全部で8行からなる。②最初の2行分がsequence1、③最後の2行分（7-8行目）がsequence4の情報となる。fastaLengthFilter.pyを実行したのは、このようにすっきりさせるため

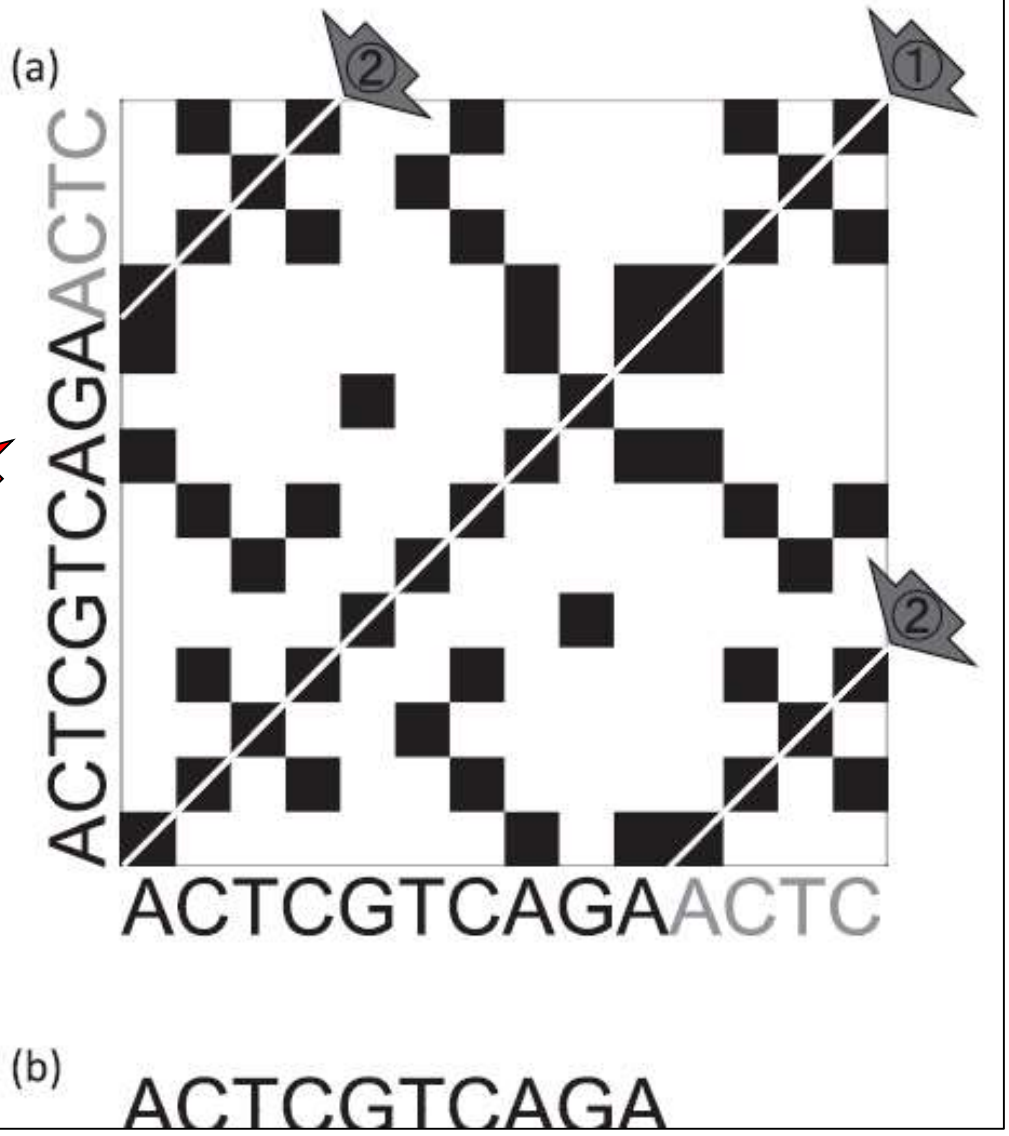


第7回原稿p106左上

今は①赤枠のファイル分割の前処理部分の話。前処理が終わったので、②Linuxコマンドを組み合わせたファイル分割を行っていきます

コンティグ数が少なくコンティグごとに作業を行う場合は、multi-FASTA ファイルを分割し、コンティグ数分だけ single-FASTA ファイルを作成しておいたほうが効率的な場合もある。ここでは、ファイル分割手段として R を用いるやり方、および自作プログラム（fastaLengthFilter.py；第 6 回の W12）と Linux コマンドを組み合わせたやり方を示した［W10］。どちらが正解ということはなく、自分の感性に合う手段を用いればよい。

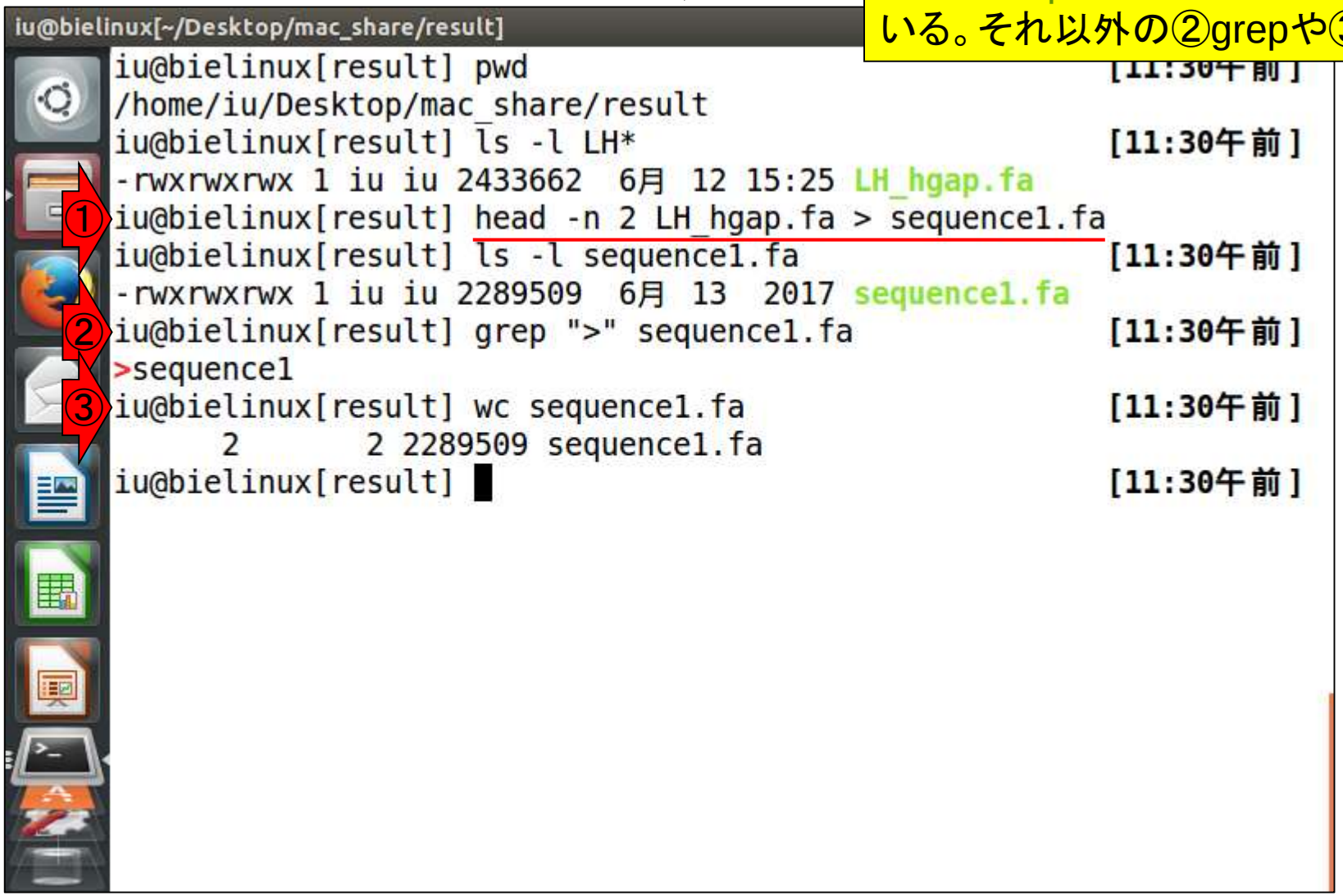
一般に、HGAP アセンブリ結果として得られるコンティグの末端部分のクオリティは、中央部分に比べて低い。HGAP 実行結果には、FASTA ファイル（polished_assembly.fasta）だけでなく FASTQ ファイル（polished_assembly.fastq）も含まれる。ここでは、FASTQ ファイルを入力として、コンティグごとのクオリティスコア分布を眺めておく。例えば 2 番目に短いコンティグ（45,853 bp; sequence3.fq）のスコア分布の場合（図 1a; W11-9）、最初の 1,223 bp までと最後の 1,335 bp が連続してスコア 0 になっており、中央の 1,224 bp から 44,518 bp までの計 43,295 bp（＝44,518－1,224＋1）がスコア 1 以上になっていると判断できる［W11-12］。これは、コンティグが環状



谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

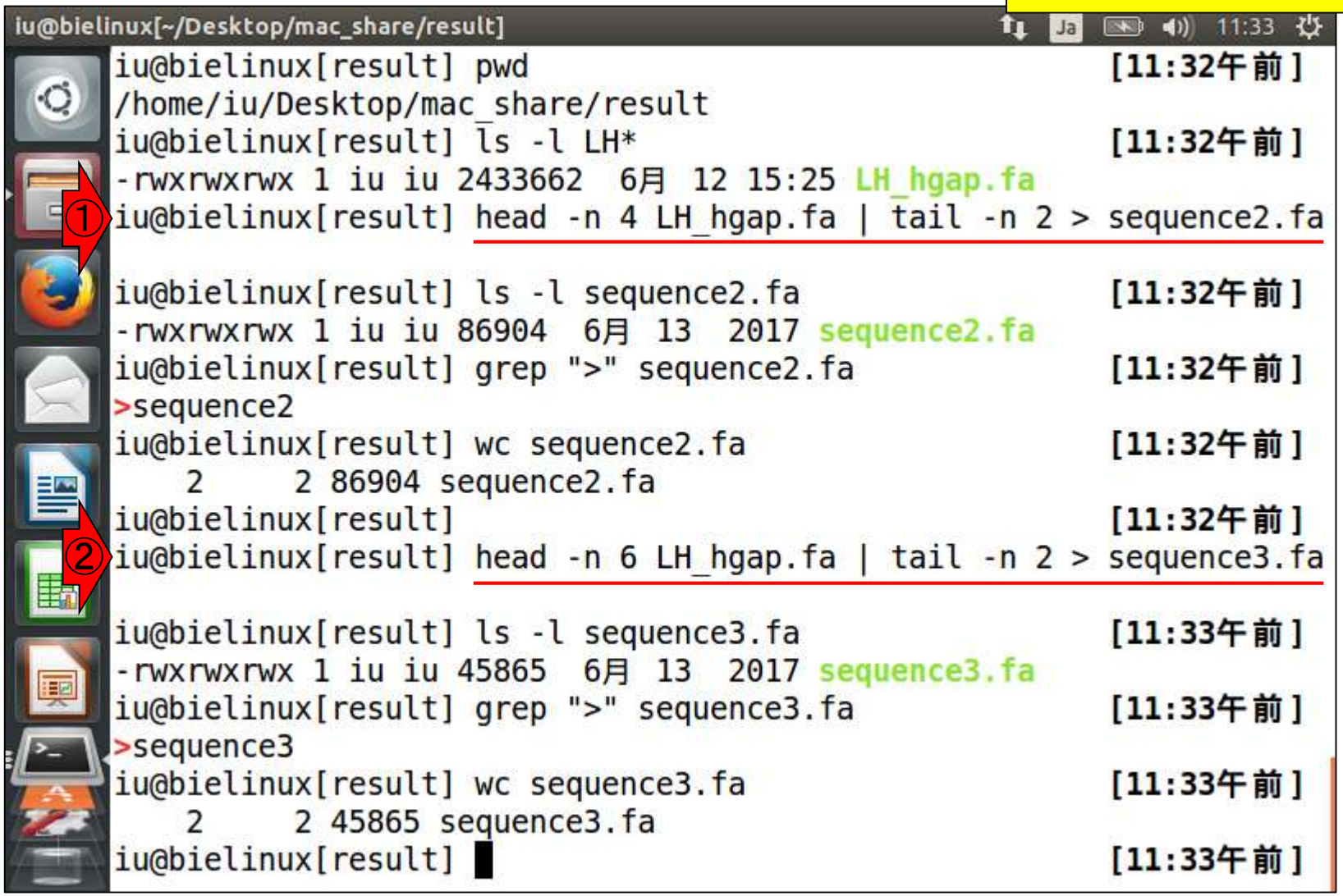
W10-3：ファイル分割2

sequence1は、最初の2行分に相当する。それゆえ、①headコマンドで最初の2行のみ抽出した結果をsequence1.faというファイル名で保存している。それ以外の②grepや③wcはただの確認



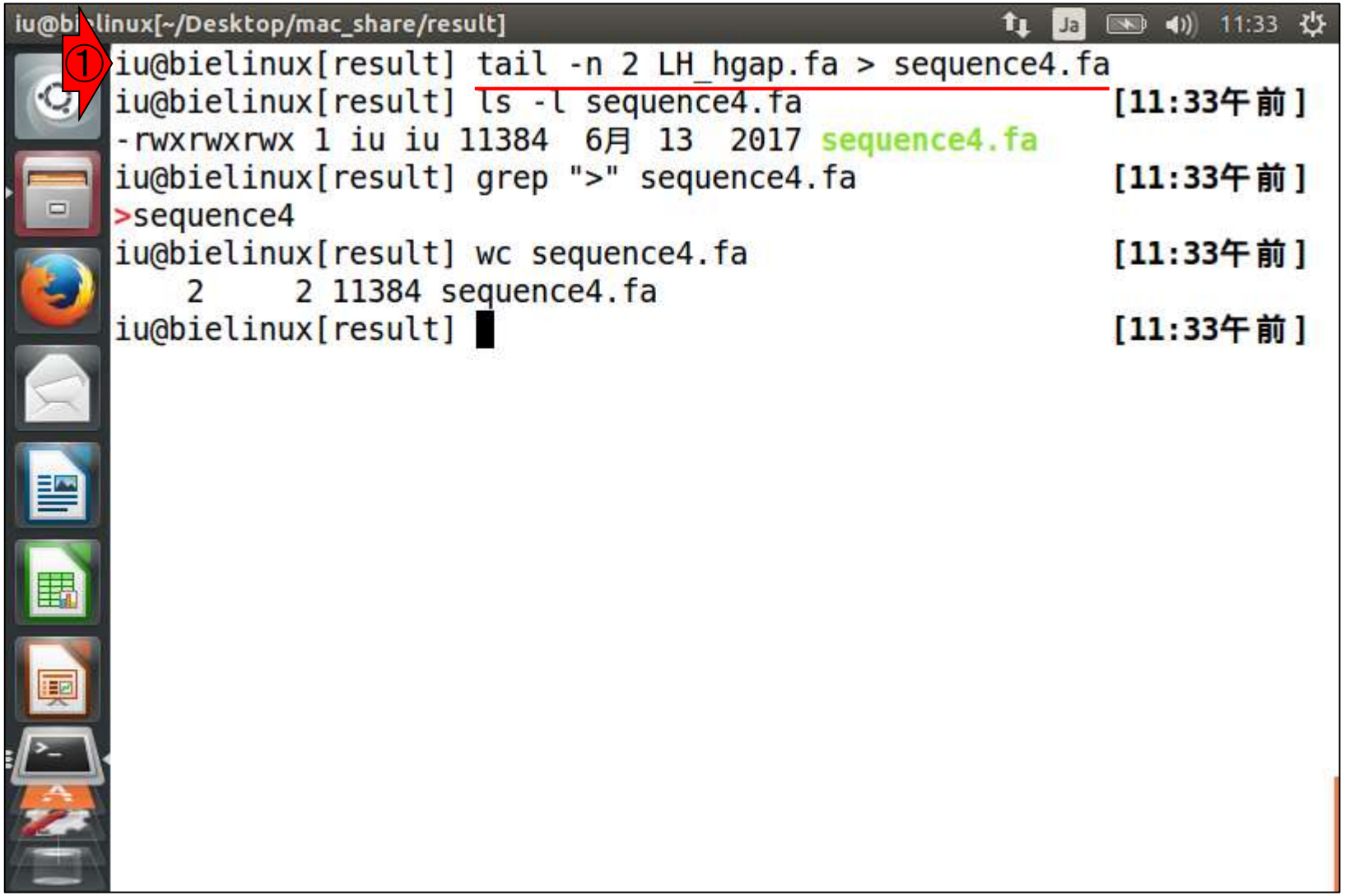
W10-4：ファイル分割2

①sequence2と②sequence3は、headとtailを組み合わせて目的の配列のみ抽出。連載第3回のW19-3にもあり



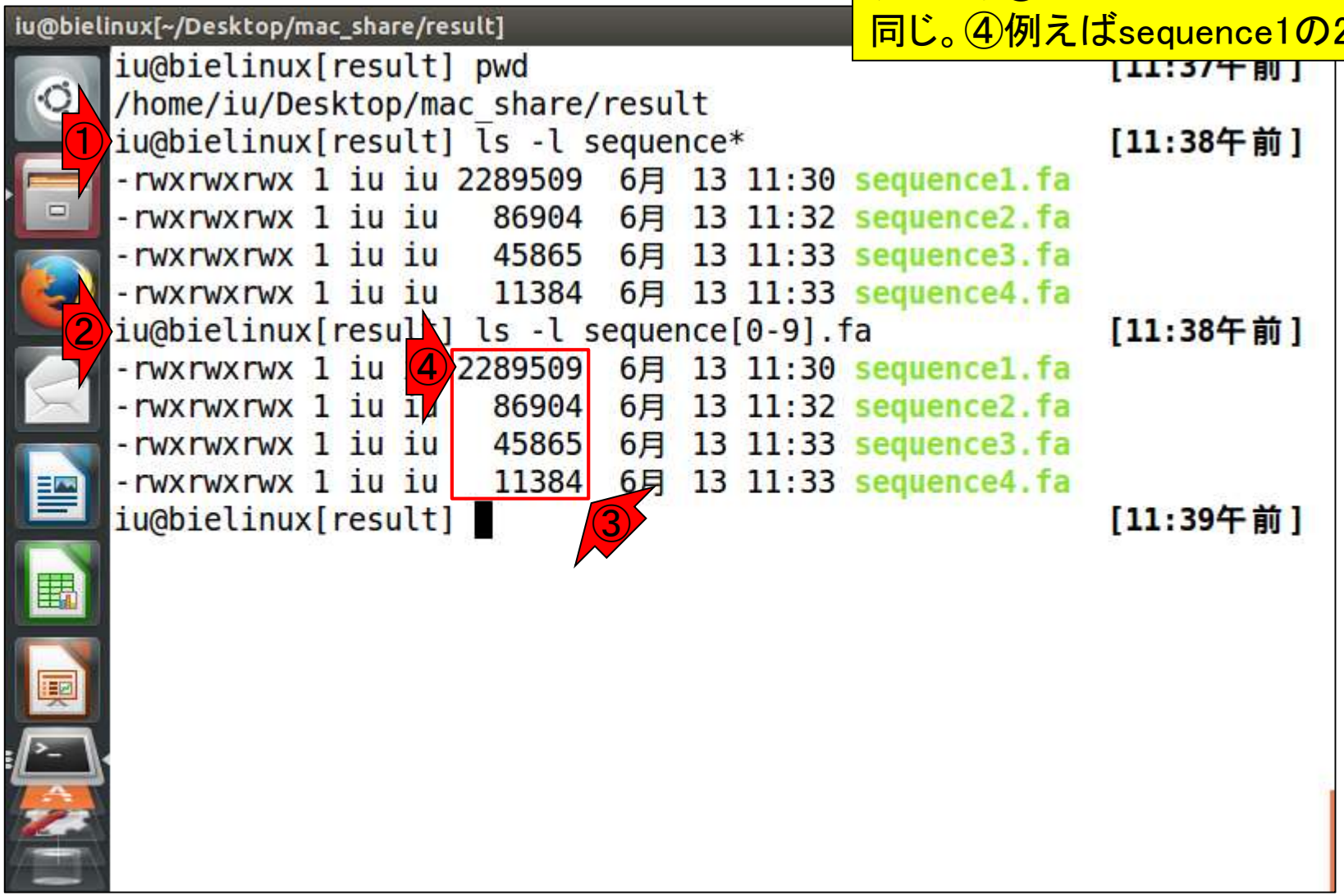
①sequence4は、tailだけでよい

W10-4：ファイル分割2



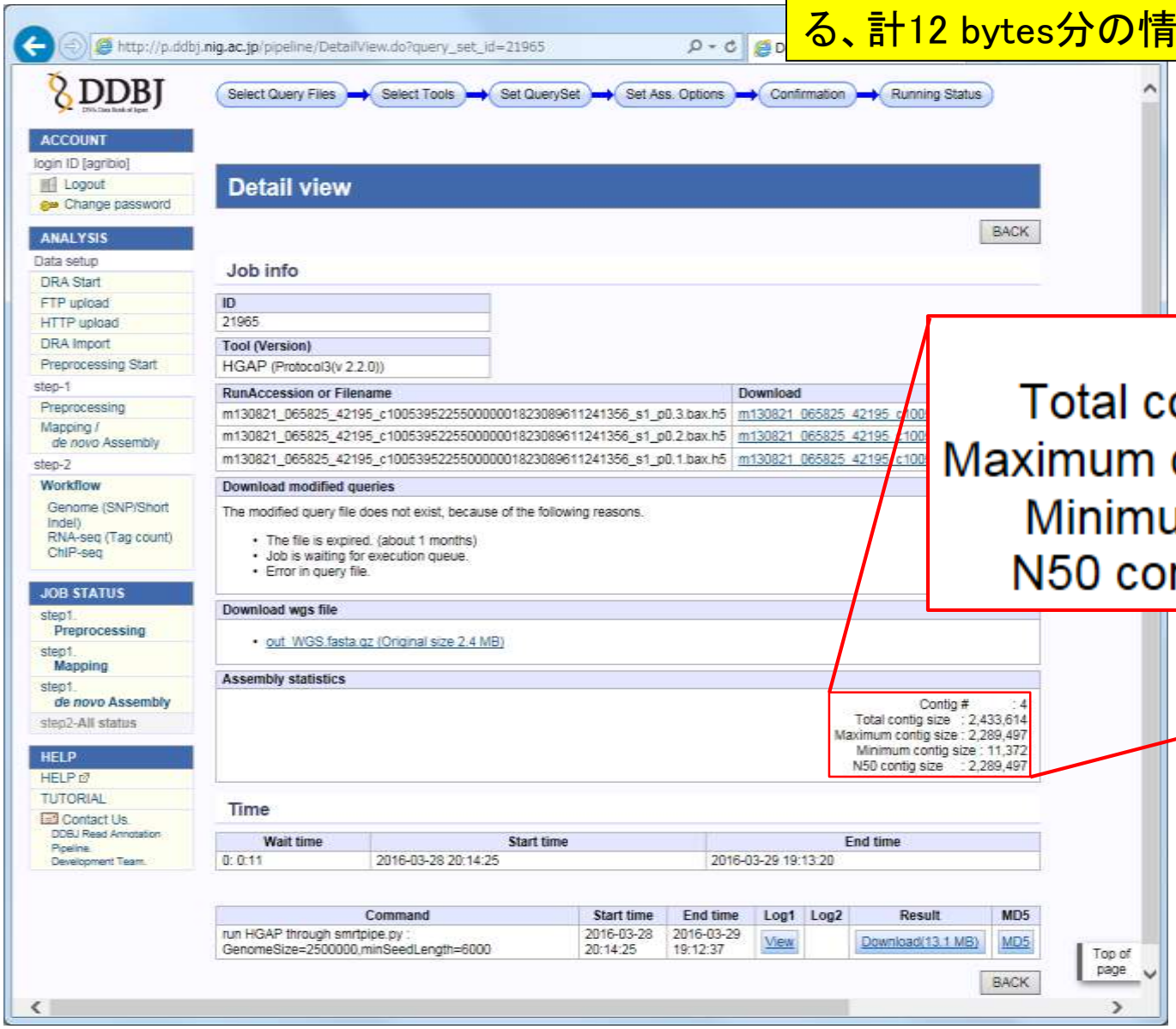
W10-5：lsで確認

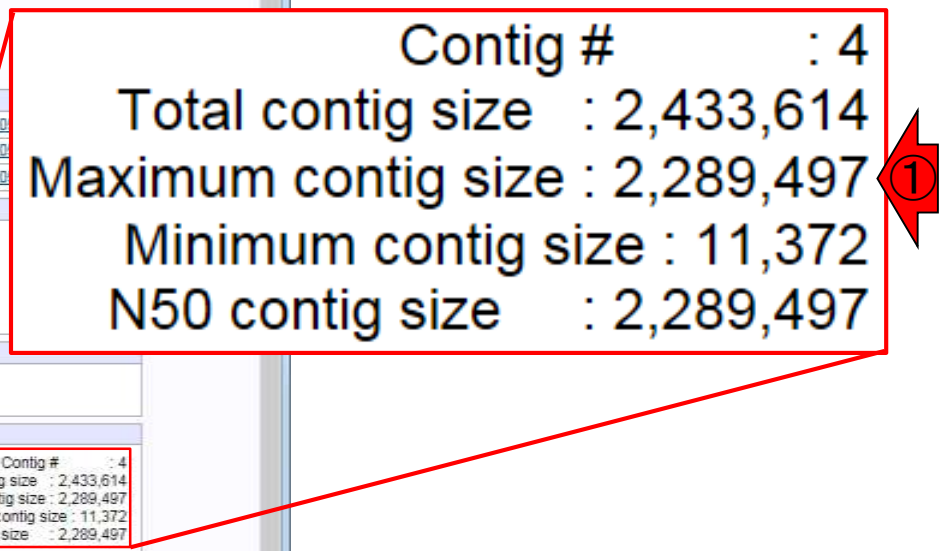
①ls -lで配列ごとのファイルサイズを確認。②のように書いてもよい。[0-9]は任意の数字1字という意味。③ここのファイルサイズは、配列長とほぼ同じ。④例えばsequence1の2,289,509 bytesは



W9-2：結果を眺め

スライド6の①Maximum contig sizeの2,289,497 bpとほぼ同じということです。sequence1の2,289,509 bytesは、「>sequence1」の計10文字と改行コード2文字分からなる、計12 bytes分の情報を余分に含むためと解釈





Contents（第7回後半分）

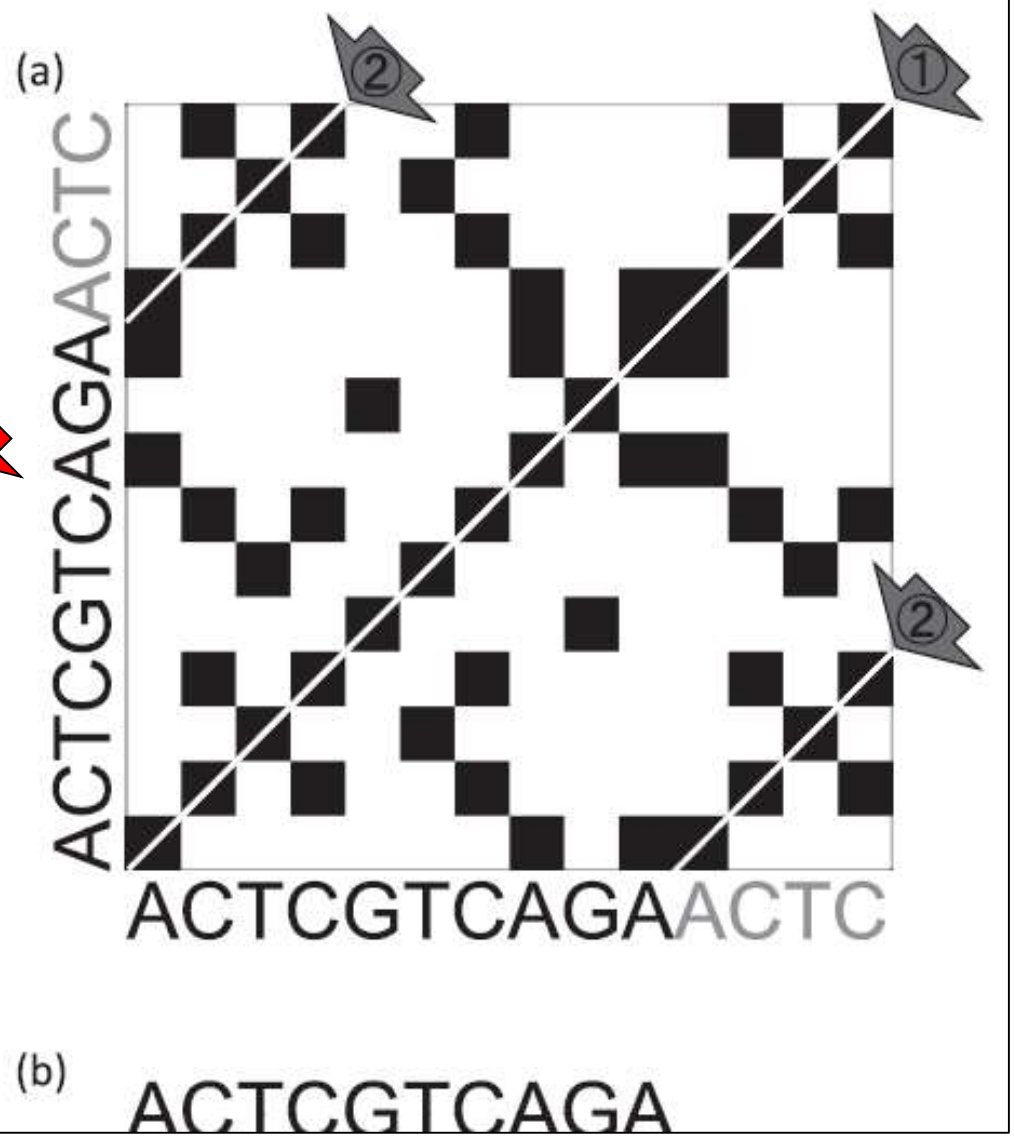
- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

第7回原稿p106左上

①のあたりの話に移行。HGAP実行結果のFASTQファイルを眺めるところからです

コンティグ数が少なくコンティグごとに作業を行う場合は、multi-FASTA ファイルを分割し、コンティグ数分だけ single-FASTA ファイルを作成しておいたほうが効率的な場合もある。ここでは、ファイル分割手段として R を用いるやり方、および自作プログラム（fastaLengthFilter.py；第 6 回の W12）と Linux コマンドを組み合わせたやり方を示した［W10］。どちらが正解ということはなく、自分の感性に合う手段を用いればよい。

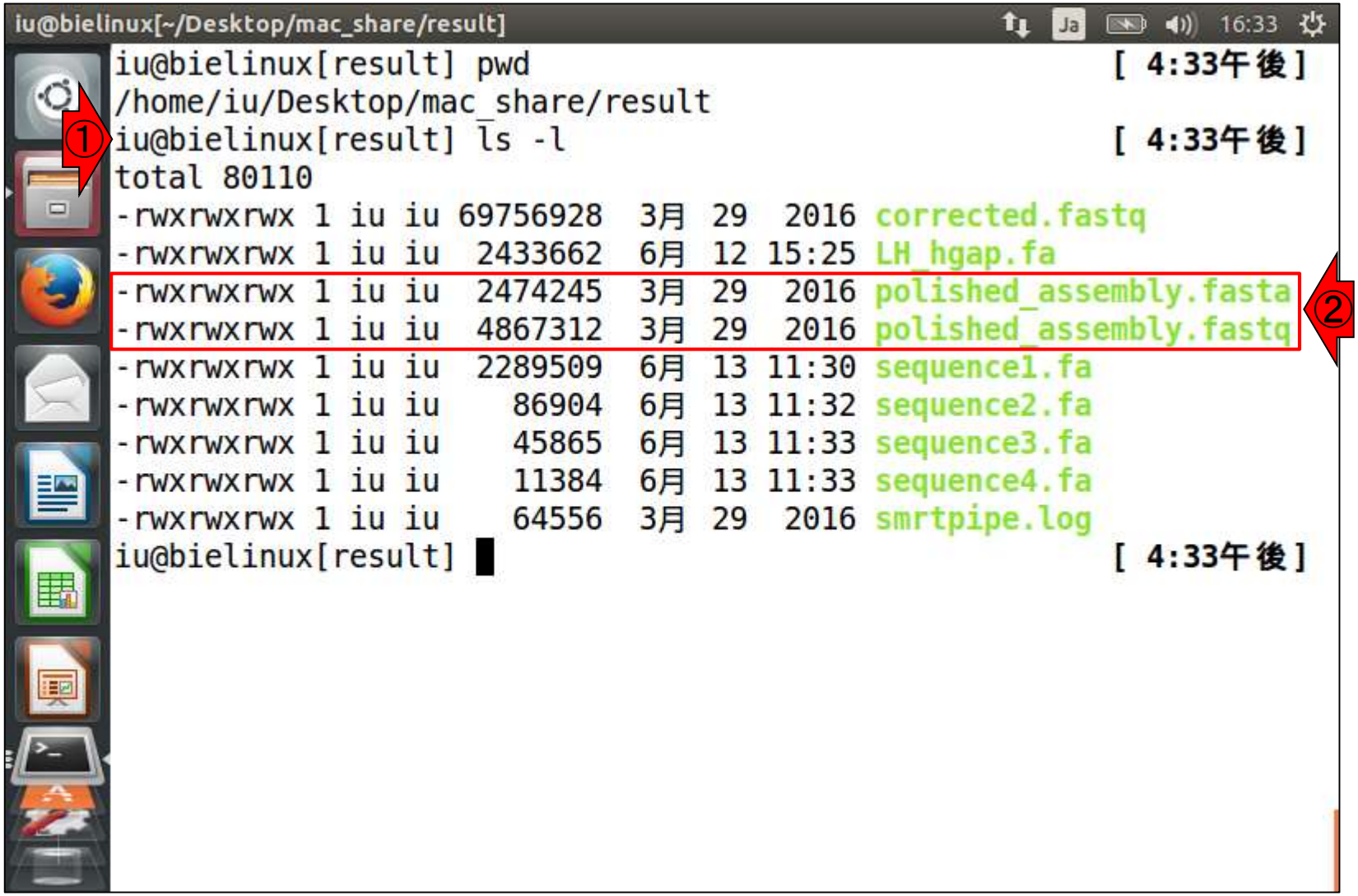
一般に、HGAP アセンブリ結果として得られるコンティグの末端部分のクオリティは、中央部分に比べて低い。HGAP 実行結果には、FASTA ファイル（polished_assembly.fasta）だけでなく FASTQ ファイル（polished_assembly.fastq）も含まれる。ここでは、FASTQ ファイルを入力として、コンティグごとのクオリティスコア分布を眺めておく。例えば 2 番目に短いコンティグ（45,853 bp; sequence3.fq）のスコア分布の場合（図 1a; W11-9）、最初の 1,223 bp までと最後の 1,335 bp が連続してスコア 0 になっており、中央の 1,224 bp から 44,518 bp までの計 43,295 bp（＝44,518－1,224＋1）がスコア 1 以上になっていると判断できる［W11-12］。これは、コンティグが環状



谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

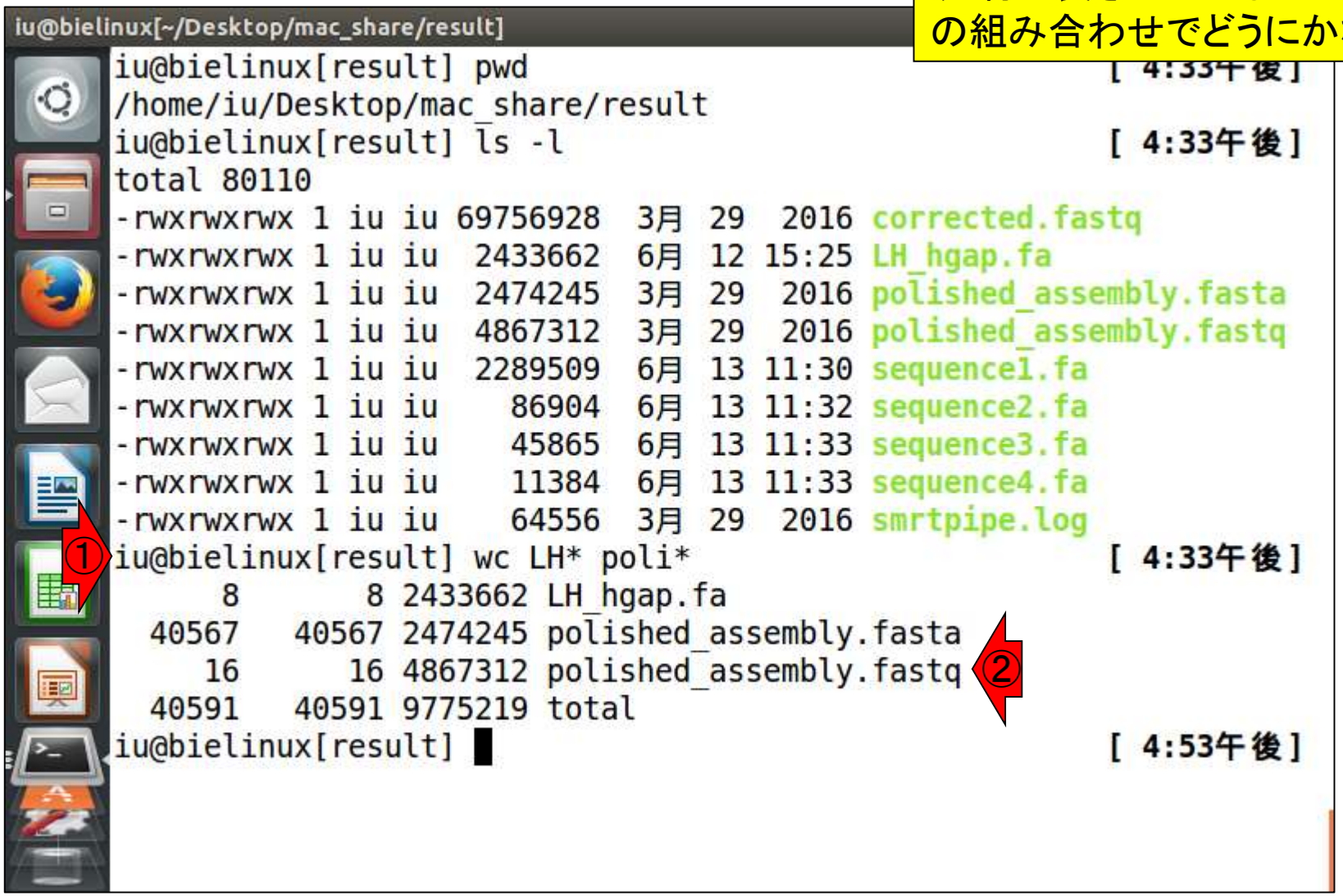
W11-3のイントロ1

①lsで、②FASTAとFASTQのサイズ比が1:2になっているので妥当



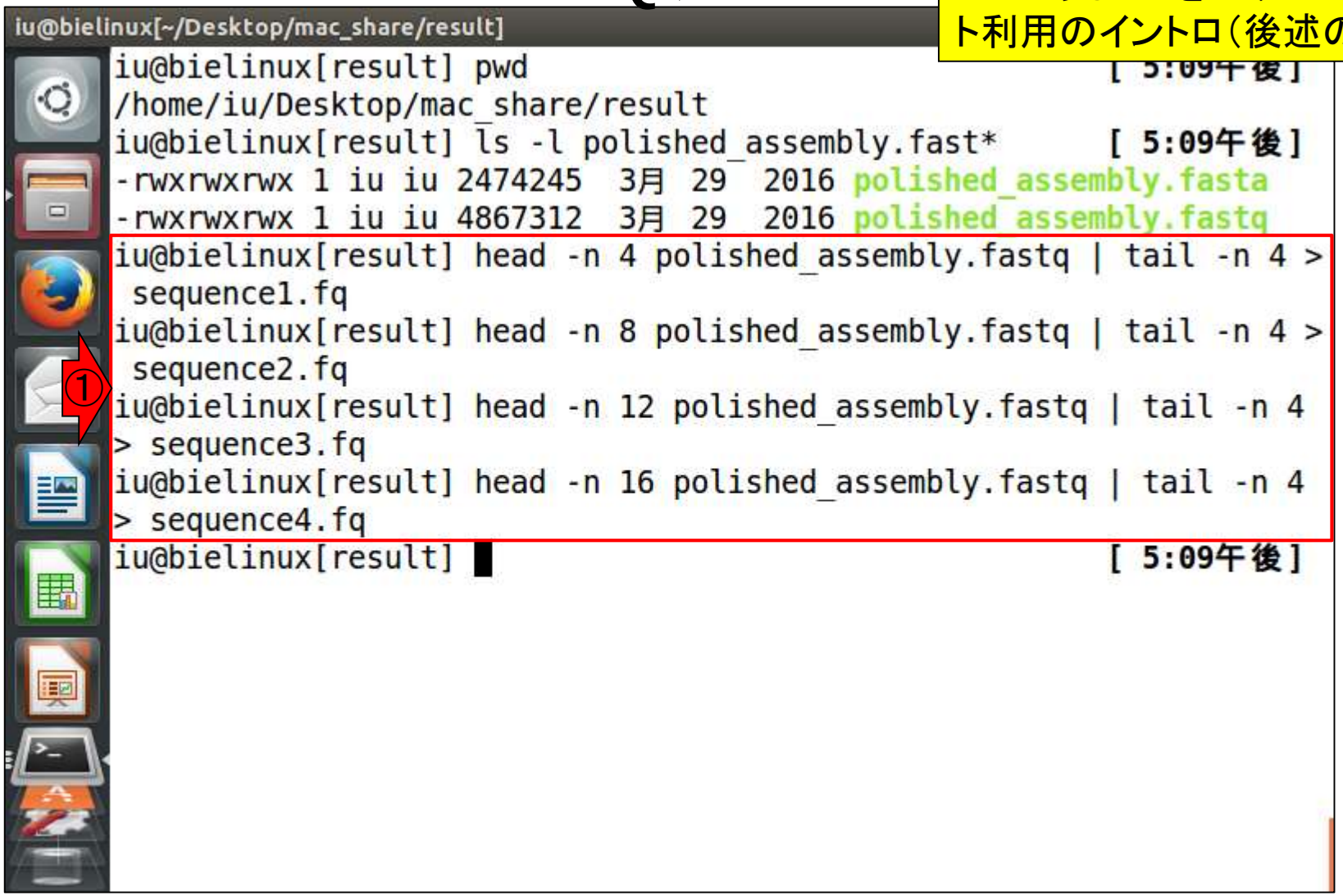
W11-3のイントロ2

主に①FASTQファイルの行数を確認。②16行。4コンティグというのは既知。1コンティグあたり4行で表されているので、headとtailコマンドの組み合わせでどうにかなるのではと閃く



W11-3：FASTQ分割1

①W10-3やW10-4のファイル分割のやり方と若干違うのは、このような記述の仕方でもOKであることを示すとともに、シェルスクリプト利用のイントロ（後述のスライド280～）



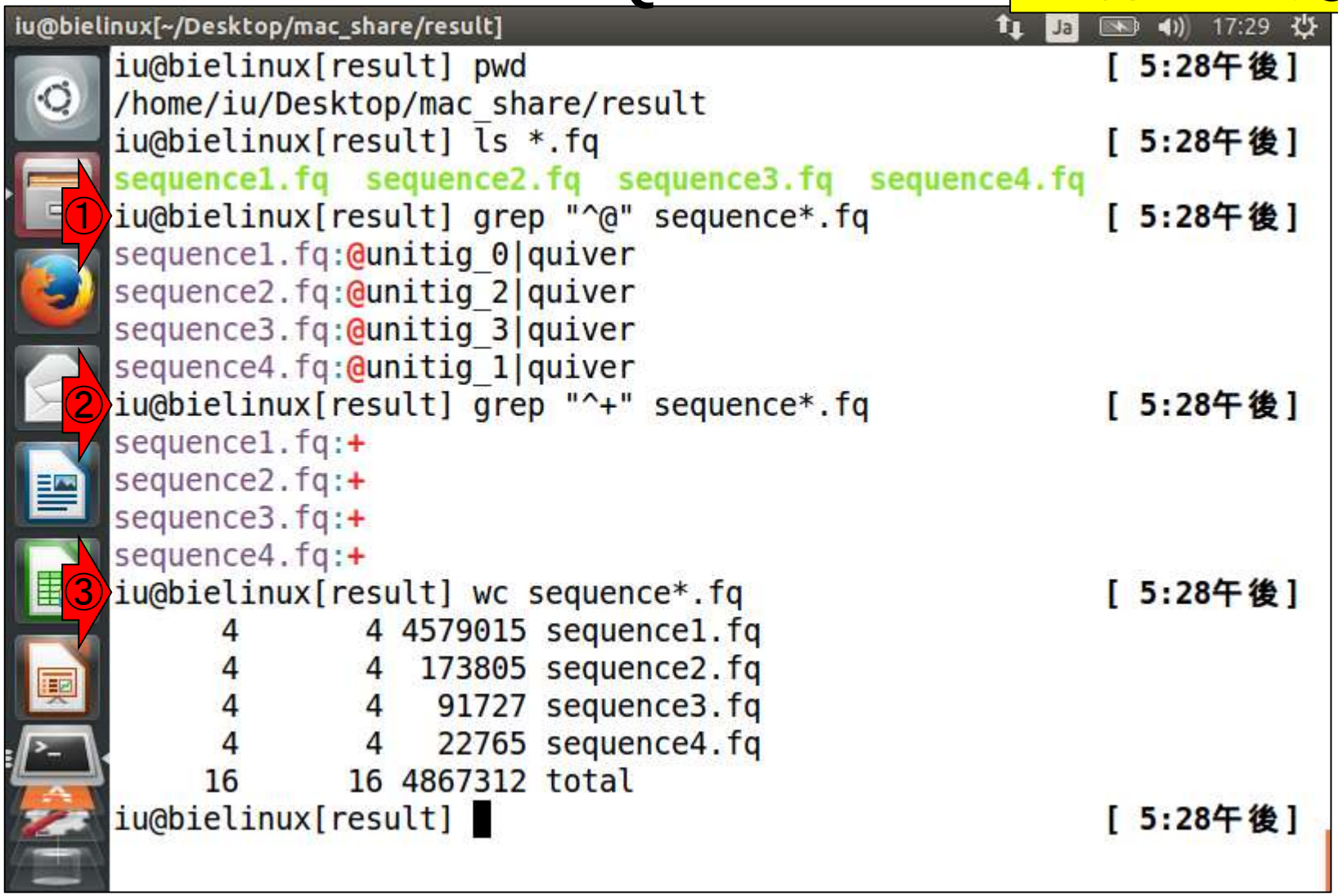
W11-3：FASTQ分割

①ファイル分割前は、分割後のFASTQファイルが配列長順になっているかどうかは不明であった。②lsでsequence*のfaとfqのサイズが、③約1:2になっていることを確認して配列長順になっていると確信

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd                                          [ 5:09午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l polished_assembly.fast*                [ 5:09午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2474245  3月 29  2016 polished_assembly.fasta
-rwxrwxrwx 1 iu iu 4867312  3月 29  2016 polished_assembly.fastq
iu@bielinux[result] head -n 4 polished_assembly.fastq | tail -n 4 >
 sequence1.fq
iu@bielinux[result] head -n 8 polished_assembly.fastq | tail -n 4 >
 sequence2.fq
iu@bielinux[result] head -n 12 polished_assembly.fastq | tail -n 4
> sequence3.fq
iu@bielinux[result] head -n 16 polished_assembly.fastq | tail -n 4
> sequence4.fq
iu@bielinux[result] ls -l sequence*                              [ 5:09午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2289509  6月 13 11:30 sequence1.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 4579015  6月 13 17:09 sequence1.fq
-rwxrwxrwx 1 iu iu   86904  6月 13 11:32 sequence2.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu  173805  6月 13 17:09 sequence2.fq
-rwxrwxrwx 1 iu iu   45865  6月 13 11:33 sequence3.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu   91727  6月 13 17:09 sequence3.fq
-rwxrwxrwx 1 iu iu   11384  6月 13 11:33 sequence4.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu   22765  6月 13 17:09 sequence4.fq
iu@bielinux[result]                                              [ 5:12午後]
```

W11-3：FASTQ分割2

FASTQファイルのdescription部分の行頭は①@および②+なので、念のため両方で調べている。③行数は全部4行



Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

Tips：LinuxでR

Linux環境でのRの基本的な利用方法は、①H28年度講習会の②8/1の③講義資料（スライド100～）

NBDC National Bioscience Database Center
－散在するデータベースを、まとめて、使い易く－
バイオサイエンスデータベースセンター
国立研究開発法人 科学技術振興機構
文字サイズ変更 大 中 小
English サイトマップ
Search for... Search

ホーム | NBDCについて | 研究開発 | 公募情報 | 採用情報 | イベント | 人材支援 | アクセス | リンク

Home ▸ 人材支援 ▸ 支援 ▸ 講習会 ▸ 平成28年度NGSハンズオン講習会カリキュラム

①

H28年度 NGSハンズオン講習会カリキュラム

H28年度日程・講義資料・動画等

カリキュラム（PDF：72KB）

②

実施日							③
7月19日（火）	8月1日（月）	10:30-18:15	第3部 NGS解析（中～上級）（農学生命情報科学特論II）	Linux環境でのデータ解析：JavaやRの利用法	・日本乳酸菌学会誌のNGS連載第4回の復習（特にFastQCとFaQCs） ・乳酸菌連載第5回（W13-2まで） ・paired-endファイルのアダプター除去(FaQCs) ・Javaプログラムの設定と実行(Rockhopper2) ・Linux環境でのRの利用法（対話モードとバッチモード）	門田 幸二（東京大学）	講義資料 (PDF:11.7MB) 統合TV
	8月2日（火）	10:30-18:15		Linux環境でのデータ解析：マッピング、トリミング、アセンブリ	・NGS連載第5回（残り）、第6回（W10-6まで） ・RパッケージQuasRを用いたRNA-seqデータのマッピング ・末端塩基のトリミング（Biostringsとfastx_trimmer） ・トリミング前後のde novoアセンブルとマッピ		講義資料 (PDF:11.9MB) 統合TV

W11-4：スコア分布

赤枠部分がFASTQファイル中の1文字表記のクオリティスコアを数値化（PHREDスコアに変換）して保存するRコード。講習会用に①ShortReadパッケージをインストール済み

- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外を0行分だけ開けるように指定しています。pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=20はプロット時のマーカーを「小さい黒丸」にせよ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット(デフォルト)」にせよ、という意味です。

```
R -q
in_f <- "sequence4.fq"                    #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence4.png"                 #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence4.txt"                 #出力ファイル名を指定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                  #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)                        #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)                  #in_fで指定したファイルの読み込み
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "matrix")       #ASCIIコードのquality scoreをPHRED scoreに変換し
colnames(out) <- 1:ncol(out)              #列名を付与
rownames(out) <- as.character(id(fastq))#行名を付与
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])#出力ファイルの各種パ
par(mar=c(4, 4, 0, 0))                    #下、左、上、右の順で余白（行）を指定
plot(x=1:ncol(out), y=out, pch=20, cex=0.5,#プロット
     type="p", xlab="position", ylab="PHRED score")#プロット
dev.off()                                 #おまじない
#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに格納
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F, col.names=F)#tmpの
```

W11-5: 入出力の関係

これは、①sequence4.fq（一番短い11,372 bpのコンティグ）を入力ファイルとして、②2つのファイルを出力するコード

- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外を0行分だけ開けるように指定しています。pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=20はプロット時のマーカーを「小さい黒丸」にせよ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット(デフォルト)」にせよ、という意味です。

①

②

```
R -q
in_f <- "sequence4.fq"                  #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence4.png"               #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence4.txt"               #出力ファイル名を指定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)                      #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)                #in_fで指定したファイルの読み込み
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "matrix")     #ASCIIコードのquality scoreをPHRED scoreに変換し
colnames(out) <- 1:ncol(out)            #列名を付与
rownames(out) <- as.character(id(fastq))#行名を付与
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])#出力ファイルの各種パ
par(mar=c(4, 4, 0, 0))                  #下、左、上、右の順で余白（行）を指定
plot(x=1:ncol(out), y=out, pch=20, cex=0.5,#プロット
     type="p", xlab="position", ylab="PHRED score")#プロット
dev.off()                               #おまじない
#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに格納
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F, col.names=F)#tmpの
```

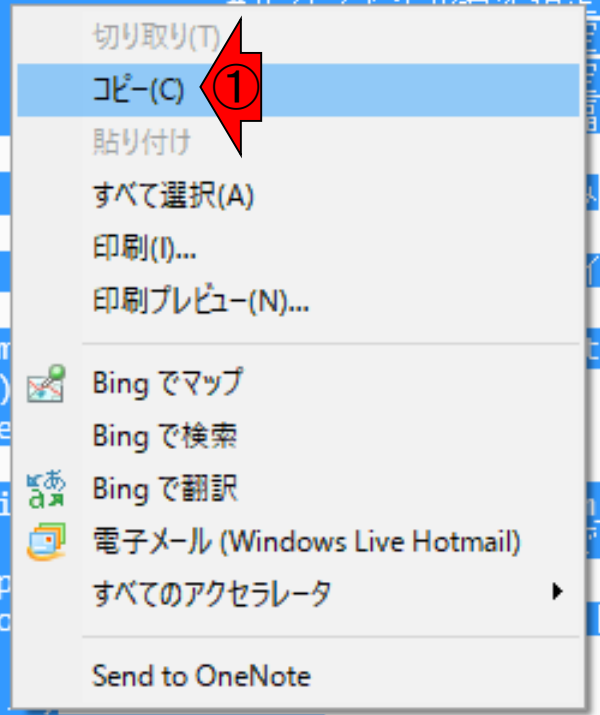
コピペ

コードの枠内を全選択（Windowsのヒトはトリプルクリックで全選択できます。CTRLキーを押しながらワンクリックでもOK）して、右クリックで①コピー

- W11-4:スコア分布 (スライド 70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外を0行分だけ開けるように指定しています。pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=20はプロット時のマーカーを「小さい黒丸」にせよ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット(デフォルト)」にせよ、という意味です。

```
R -q
in_f <- "sequence4.fq"                    #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence4.png"                 定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence4.txt"                 定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                  幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)                  イルの読み込み
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "m              ty scoreをPHRED scoreに変換し
colnames(out) <- 1:ncol(out)
rownames(out) <- as.characte
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, wi              _fig[2])#出力ファイルの各種パ
par(mar=c(4, 4, 0, 0))                    余白（行）を指定
plot(x=1:ncol(out), y=out, p
     type="p", xlab="positic              ト
dev.off()
#ファイルに保存(テキストファイ
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに格納
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F, col.names=F)#tmpの
```



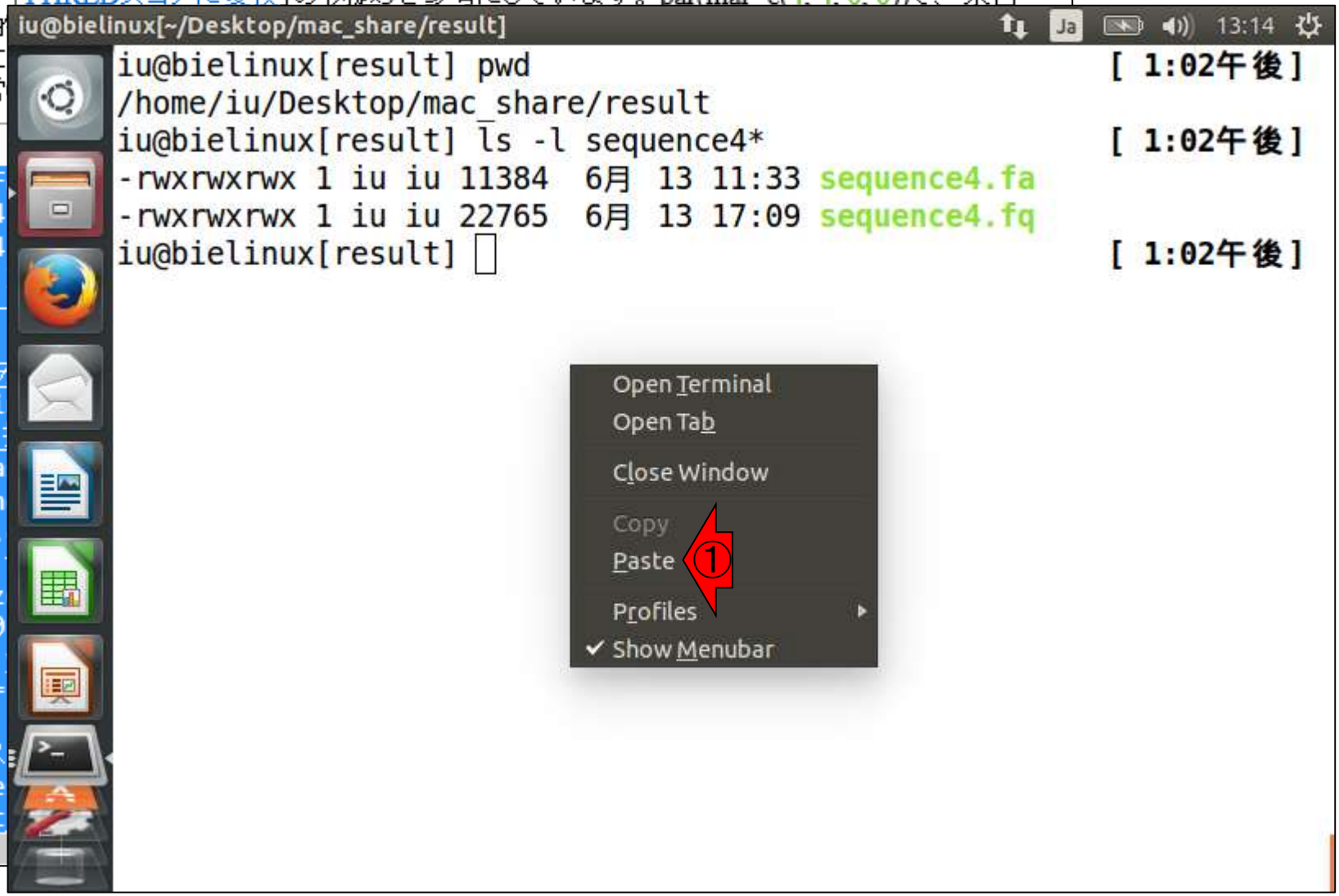
（Bio-Linuxのターミナル上で）①ペースト

コピペ

- W11-4:スコア分布 (スライド 70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的
pngファイル作成(描画)時に
よ、cex=0.5は大きさを通常

```
R -q
in_f <- "sequence4.f
out_f1 <- "sequence4
out f2 <- "sequence4
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロ
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```



W11-6：実行結果

コピペ実行結果後に①lsで確認（自動でここまでなっているはず）。②確かに指定した名前の2つのファイルが作成されていることがわかる

- W11-4:スコア分布 (スライド 70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的

pngファイル作成(描画)時に

よ、cex=0.5は大きさを通常

```
R -q
in_f <- "sequence4.f
out_f1 <- "sequence4
out f2 <- "sequence4
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロ
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  13:50
)#出力ファイルの各種パラメータを指定
> par(mar=c(4, 4, 0, 0))                    #下、左、上、右の順で余白
（行）を指定
> plot(x=1:ncol(out), y=out, pch=20, cex=0.5,#プロット
+      type="p", xlab="position", ylab="PHRED score")#プロット
> dev.off()                                  #おまじない
null device
          1
> #ファイルに保存(テキストファイル)
> tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに
格納
> write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F
, col.names=F)#tmpの中身を指定したファイル名で保存
> q(save="no")
iu@bielinux[result] pwd                                  [ 1:49午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l sequence4*                     [ 1:49午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 11384  6月 13 11:33 sequence4.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 22765  6月 13 17:09 sequence4.fq
-rwxrwxrwx 1 iu iu 24763  6月 14  2017 sequence4.png
-rwxrwxrwx 1 iu iu 86006  6月 14  2017 sequence4.txt
iu@bielinux[result]                                      [ 1:49午後]
```

①

②

余談1

Rも自動で終了し、pwdや①ls -l sequence4*まで実行されたのは、①コピペしたコードの最後のほうに、②のような感じで書きこんでいるからです

- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外を0行分だけ開けるように指定しています。pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=20はプロット時のマーカーを「小さい黒丸」にせよ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット(デフォルト)」にせよ、という意味です。

```
param_fig <- c(700, 350)                    #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)                          #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)                    #in_fで指定したファイルの読み込み
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "matrix")         #ASCIIコードのquality scoreをPHRED scoreに変換し
colnames(out) <- 1:ncol(out)                #列名を付与
rownames(out) <- as.character(id(fastq))#行名を付与
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])#出力ファイルの各種パ
par(mar=c(4, 4, 0, 0))                      #下、左、上、右の順で余白（行）を指定
plot(x=1:ncol(out), y=out, pch=20, cex=0.5,#プロット
     type="p", xlab="position", ylab="PHRED score")#プロット
dev.off()                                   #おまじない
#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに格納
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F, col.names=F)#tmpの
q(save="no")
pwd
ls -l sequence4*
```

①

②

余談2

もちろんペーストは、①ShortReadパッケージがインストールされていれば、ホストOS（この場合はWindows10）上のRでやっても構いません。これが共有フォルダの便利なところ

- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外を0行分だけ開けるように指定しています。pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=20はプロット時のマーカーを「小さい黒丸」にせよ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット(デフォルト)」にせよ、という意味です。

```
R -q
in_f <- "sequence4.fq"                    #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence4.png"                 定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence4.txt"                 定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                  幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "m
colnames(out) <- 1:ncol(out)
rownames(out) <- as.characte
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, wi
par(mar=c(4, 4, 0, 0))
plot(x=1:ncol(out), y=out, p
     type="p", xlab="positic
dev.off()
#ファイルに保存(テキストファイ
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存し
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quot
```

①

切り取り(T)
コピー(C)
貼り付け
すべて選択(A)
印刷(I)...
印刷プレビュー(N)...
Bing でマップ
Bing で検索
Bing で翻訳
電子メール (Windows Live H
すべてのアクセラレータ
Send to OneNote

RGui (64-bit)

ファイル 編集 閲覧 その他 パッケージ ウインドウ ヘルプ

R Console

```
'help.start()' で HTML ブラウザによるヘルプ
'q()' と入力すれば R を終了します。

> getwd()
[1] "C:/Users/kojik/Desktop/share/result"
> list.files(pattern="sequence4")
[1] "sequence4.fa" "sequence4.fq"
>
```

W11-7：pngファイル

①pngファイルのほうは、②で横幅700 pixelと縦幅350 pixelにサイズ指定しているので横長になっている。横軸はコンティグのposition、縦軸はPHREDスコア。数値が大きいほどクオリティが高い。尚、Linux上で出力ファイル（sequence4.png）を開く場合は、左側の引き出しアイコンから辿っていくのでもよいし、「eog sequence4.png」と打つのでもよい

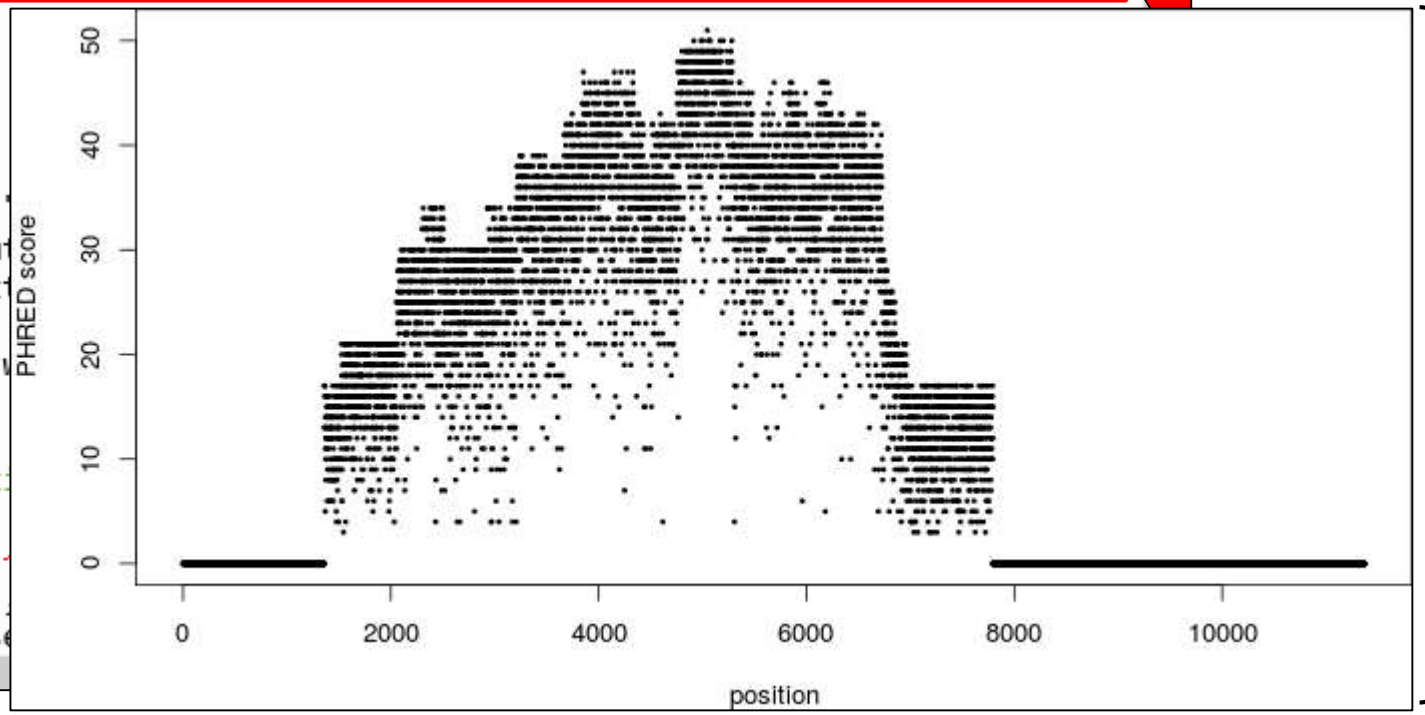
- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考に
の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外
pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=2
よ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット

```
R -q
in_f <- "sequence4.fq"                    #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence4.png"                 #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence4.txt"                 #出力ファイル名を指定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                  #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq),
colnames(out) <- 1:ncol(ou
rownames(out) <- as.charac
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13,
par(mar=c(4, 4, 0, 0))
plot(x=1:ncol(out), y=out,
     type="p", xlab="posit
dev.off()
#ファイルに保存(テキストファ
tmp <- cbind(colnames(out)
write.table(tmp, out_f2, s
```

①

②



一番短い11,372 bpのコンティグなので、
①sequence4.txtは11,372行×2列になる

W11-8：テキストファイル

- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的には、図の下と左側を4行分、それ以外を0行分だけ開けるように指定しています。pngファイル作成(描画)時にいろいろオプション指定している。pch=20はプロット時のマーカーを「小さい黒丸」にせよ、cex=0.5は大きさを通常の0.5倍にせよ、type="p"は、「点プロット(デフォルト)」にせよ、という意味です。

```
R -q
in_f <- "sequence4.fq"                  #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence4.png"               #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence4.txt"               #出力ファイル名を指定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)                      #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)                #in_fで指定したファイルの読み込み
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "matrix")     #ASCIIコードのquality scoreをPHRED scoreに変換し
colnames(out) <- 1:ncol(out)            #列名を付与
rownames(out) <- as.character(id(fastq))#行名を付与
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])#出力ファイルの各種パ
par(mar=c(4, 4, 0, 0))                  #下、左、上、右の順で余白（行）を指定
plot(x=1:ncol(out), y=out, pch=20, cex=0.5,#プロット
     type="p", xlab="position", ylab="PHRED score")#プロット
dev.off()                               #おまじない
#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに格納
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F, col.names=F)#tmpの
```

W11-8:テキストファイル

①最初の5行分と②最後の4行分を表示。③1列目はposition番号、④2列目がPHREDスコア

- W11-4:スコア分布 (スライド70)

「前処理 | クオリティチェック | PHREDスコアに変換」の例題3を参考にしています。par(mar=c(4, 4, 0, 0))で、余白の調整もしています。具体的

pngファイル作成(描画)時に

よ、cex=0.5は大きさを通常

```
R -q
in_f <- "sequence4.f
out_f1 <- "sequence4
out_f2 <- "sequence4
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  15:59
iu@bielinux[result] pwd                                    [ 3:58午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l sequence4*                       [ 3:58午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 11384  6月 13 11:33 sequence4.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 22765  6月 13 17:09 sequence4.fq
-rwxrwxrwx 1 iu iu 24763  6月 14 13:49 sequence4.png
-rwxrwxrwx 1 iu iu 86006  6月 14 13:49 sequence4.txt
iu@bielinux[result] head -n 5 sequence4.txt                [ 3:58午後]
1       0
2       0
3       0
4       0
5       0
iu@bielinux[result] tail -n 4 sequence4.txt                [ 3:58午後]
11369   0
11370   0
11371   0
11372   0
iu@bielinux[result]                                        [ 3:58午後]
```

①

②

③

④

W11-9：sequence3.fq

①2番目に短い45,853 bpのファイル(sequence3.fq)に対しても同様な作業を実行。
②pngファイルを眺めると、確かに③コンティグ両末端部分のクオリティが低いことがわかる

- W11-9：sequence3.fq (スライド80)

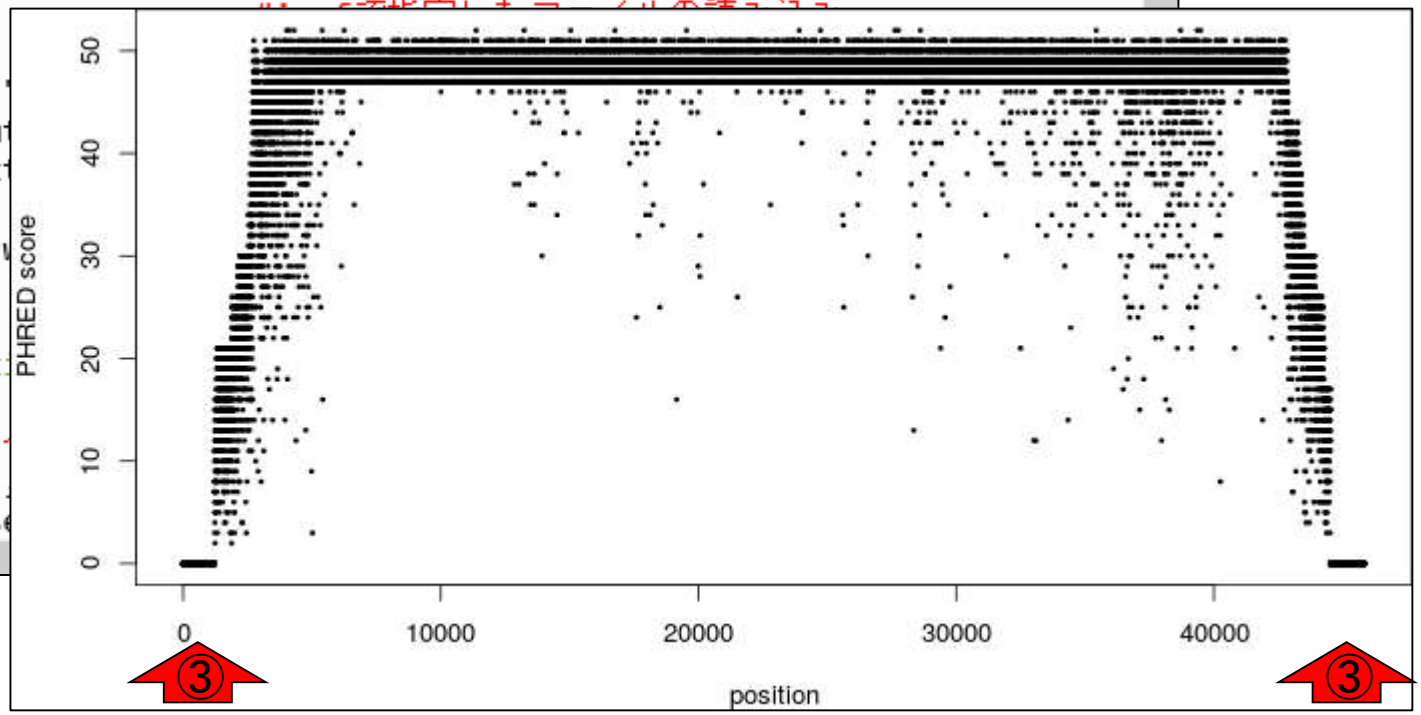
  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

①

②

```
R -q
in_f <- "sequence3.fq"
out_f1 <- "sequence3.png"
out_f2 <- "sequence3.txt"
param_fig <- c(700, 350)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq),
colnames(out) <- 1:ncol(ou
rownames(out) <- as.charac
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13,
par(mar=c(4, 4, 0, 0))
plot(x=1:ncol(out), y=out,
     type="p", xlab="posit
dev.off()
#ファイルに保存(テキストファ
tmp <- cbind(colnames(out)
write.table(tmp, out_f2, s
```

```
#入力ファイル名を指定してin_fに格納
#出力ファイル名を指定してout_f1に格納
#出力ファイル名を指定してout_f2に格納
#ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)

#パッケージの読み込み
```



W11-9：sequence3

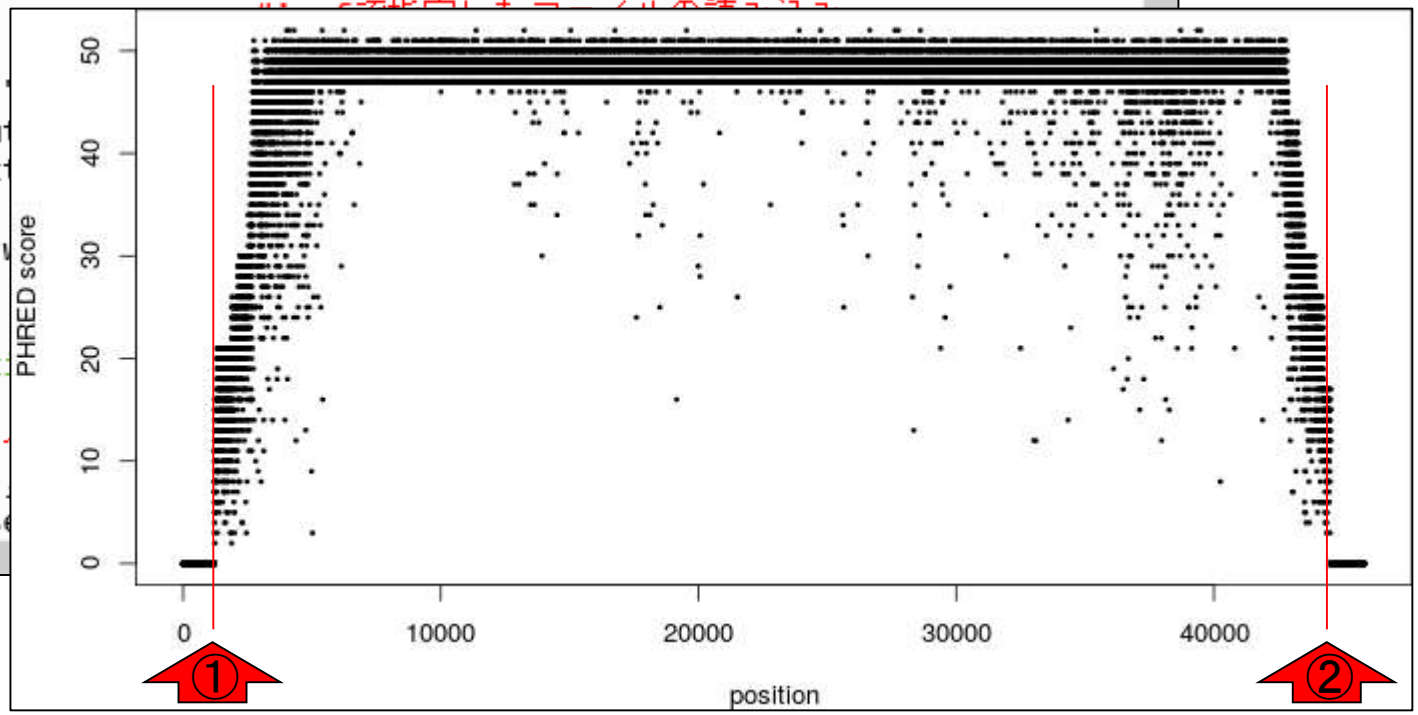
クオリティスコアが0なのは、最初から①1,000塩基目ちょっとと、②最後から1,500塩基ちょっと（44,000塩基目）くらいかな…とか妄想し、ある程度あたりをつけておいて、③sequence3.txtをlessで眺めたりしておく

- W11-9：sequence3.fq (スライド80)

  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

```
R -q
in_f <- "sequence3.fq"                    #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence3.png"                 #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence3.txt"                 #出力ファイル名を指定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                  #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)                        #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq),
colnames(out) <- 1:ncol(ou
rownames(out) <- as.charac
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13,
par(mar=c(4, 4, 0, 0))
plot(x=1:ncol(out), y=out,
     type="p", xlab="posit
dev.off()
#ファイルに保存(テキストファ
tmp <- cbind(colnames(out)
write.table(tmp, out_f2, s
```

③

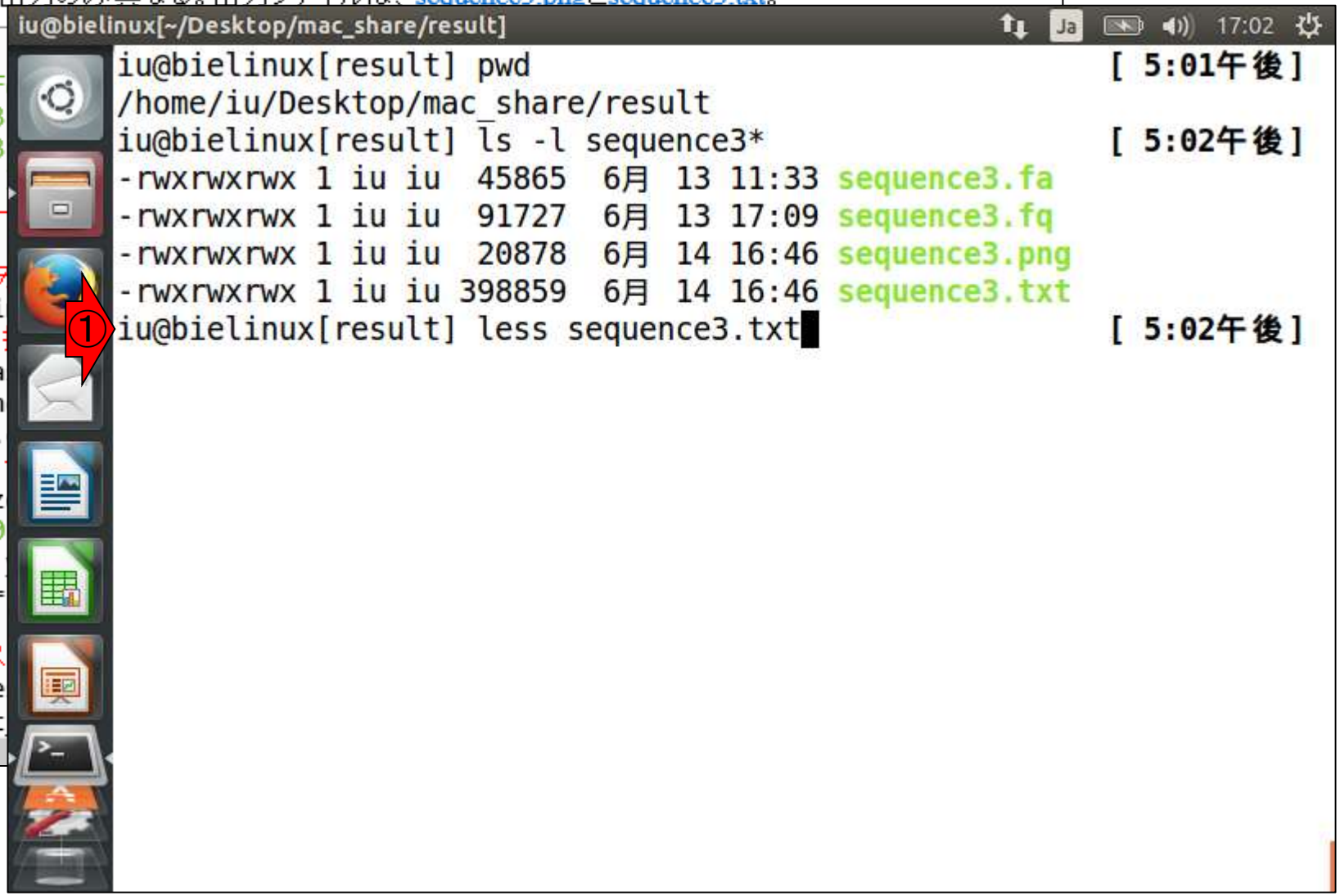


①sequence3.txtをlessで眺めようとしている

less sequence3.txt

- W11-9: sequence3.fq (スライド80)
  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

```
R -q
in_f <- "sequence3.f
out_f1 <- "sequence3
out_f2 <- "sequence3
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```



less sequence3.txt

less実行直後。①1列目がposition番号（塩基番号）なので、ここが1,000ちょっとくらいになるまで、ざばーっと「スペース」キーで進み、② PHREDスコアが0より大きくなるところを探索する。残りは上下矢印キーで微調整

- W11-9: sequence3.fq (スライド80)

W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.p

```
R -q
in_f <- "sequence3.f
out_f1 <- "sequence3
out_f2 <- "sequence3
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

①

②

```
iu@bie...[~/Desk.../mac_share/result]
1       0
2       0
3       0
4       0
5       0
6       0
7       0
8       0
9       0
10      0
11      0
12      0
13      0
14      0
15      0
16      0
17      0
18      0
19      0
20      0
21      0
sequence3.txt
```

less sequence3.txt

①1,224番目の塩基以降から0以上のPHREDスコアになっているようですね

- W11-9: sequence3.fq (スライド80)
  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

```
R -q
in_f <- "sequence3.f
out_f1 <- "sequence3
out_f2 <- "sequence3
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]

```
1214    0
1215    0
1216    0
1217    0
1218    0
1219    0
1220    0
1221    0
1222    0
1223    0
1224    3
1225    7
1226    11
1227    11
1228    7
1229    6
1230    7
1231    4
1232    12
1233    16
1234    15
:
```

①

less sequence3.txt

「G」と打って、最終行に移動したところ。この状態からキーボードのuを押して効率的にページ上部を探索する

- W11-9: sequence3.fq (スライド80)
  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

```
R -q
in_f <- "sequence3.f
out_f1 <- "sequence3
out_f2 <- "sequence3
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]   Ja  17:23
45833   0
45834   0
45835   0
45836   0
45837   0
45838   0
45839   0
45840   0
45841   0
45842   0
45843   0
45844   0
45845   0
45846   0
45847   0
45848   0
45849   0
45850   0
45851   0
45852   0
45853   0
(END)
```

less sequence3.txt

①44,518番目の塩基までが0以上のPHREDスコアになっているようですね

- W11-9: sequence3.fq (スライド80)
  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

```
R -q
in_f <- "sequence3.f
out_f1 <- "sequence3
out_f2 <- "sequence3
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]

```
44509   3
44510   8
44511   11
44512   15
44513   17
44514   15
44515   17
44516   16
44517   15
44518   13
44519   0
44520   0
44521   0
44522   0
44523   0
44524   0
44525   0
44526   0
44527   0
44528   0
44529   0
:
```

qと打って、lessから抜けたところ

less sequence3.txt

- W11-9: sequence3.fq (スライド80)
  W11-4と基本的に同じで入出力のみ異なる。出力ファイルは、sequence3.pngとsequence3.txt。

```
R -q
in_f <- "sequence3.f
out_f1 <- "sequence3
out_f2 <- "sequence3
param_fig <- c(700,
#必要なパッケージをロー
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(i
#本番(PHREDスコアに変
out <- as(quality(fa
colnames(out) <- 1:n
rownames(out) <- as.
#ファイルに保存(pngフ
png(out_f1, pointsiz
par(mar=c(4, 4, 0, 0
plot(x=1:ncol(out),
     type="p", xlab=
dev.off()
#ファイルに保存(テキス
tmp <- cbind(colname
write.table(tmp, out
```

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  17:34
iu@bielinux[result] pwd                                        [ 5:01午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l sequence3*                           [ 5:02午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu  45865  6月 13 11:33 sequence3.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu  91727  6月 13 17:09 sequence3.fq
-rwxrwxrwx 1 iu iu  20878  6月 14 16:46 sequence3.png
-rwxrwxrwx 1 iu iu 398859  6月 14 16:46 sequence3.txt
iu@bielinux[result] less sequence3.txt                         [ 5:02午後]
iu@bielinux[result]                                            [ 5:34午後]
```

①の話までが終了しました。赤下線部分が重要

第7回原稿p106左中

assembly.fastq）も含まれる。ここでは、FASTQ ファイルを入力として、コンティグごとのクオリティスコア分布を眺めておく。例えば 2 番目に短いコンティグ（45,853 bp; sequence3.fq）のスコア分布の場合（図 1a; W11-9）、最初の 1,223 bp までと最後の 1,335 bp が連続してスコア 0 になっており、中央の 1,224 bp から 44,518 bp までの計 43,295 bp（＝44,518－1,224＋1）がスコア 1 以上になっていると判断できる［W11-12］。これは、コンティグが環状であることを確認したあとに、どの部分をトリミングするかについての合理的な指針を与えるものでもある。

配列のドットプロット

ドットプロット（dot plot）は、比較したい 2 つの配列の類似度を視覚的に評価するために古くから用いられている描画手段である[16]。基本的には、比較する 2 つの配列を x 軸 y 軸にそれぞれ並べて、同一塩基部分をハイライトさせるだけである。ここでは、単純な塩基配列を用いたドットプロットの解釈の基礎を述べ、実際の環状コンティグ（またはゲノム）の実例を sequence3 で示す。Bio-

(b)

ACTCGTCAGA
CTCGTCAGAA
TCGTCAGAAC*
CGTCAGAACT
GTCAGAACTC

図 2.（a）仮想環状コンティグ配列 ACTCGTCAGAACTC のドットプロット。灰色で示した最後の 4 塩基が最初の 4 塩基と同じで、重複領域に相当する。（b）環状なので重複除去手段は計 5 通り。＊のついた前後 2 塩基づつトリムするやり方が推奨。

グの選択肢として、4 塩基重複の場合は計 5 通り存在する

谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

第7回原稿p106左下

①コンティグが環状になっているかどうかを調べる基本的な戦略が②ドットプロット。③単純な塩基配列のFASTAファイルをLinux上で作成するところ（W12-4）から解説します

assembly.fastq）も含まれる。ここでは、FASTQ ファイルを入力として、コンティグごとのクオリティスコア分布を眺めておく。例えば 2 番目に短いコンティグ（45,853 bp; sequence3.fq）のスコア分布の場合（図 1a; W11-9）、最初の 1,223 bp までと最後の 1,335 bp が連続してスコア 0 になっており、中央の 1,224 bp から 44,518 bp までの計 43,295 bp（＝44,518－1,224＋1）がスコア 1 以上になっていると判断できる［W11-12］。これは、コンティグが環状であることを確認したあとに、どの部分をトリミングするかについての合理的な指針を与えるものでもある。

①

(b)

ACTCGTCAGA
CTCGTCAGAA
TCGTCAGAAC*
CGTCAGAACT
GTCAGAACTC

②

配列のドットプロット

ドットプロット（dot plot）は、比較したい 2 つの配列の類似度を視覚的に評価するために古くから用いられている描画手段である[16]。基本的には、比較する 2 つの配列を x 軸 y 軸にそれぞれ並べて、同一塩基部分をスライトさせるだけである。ここでは、単純な塩基配列を用いたドットプロットの解釈の基礎を述べ、実際の環状コンティグ（またはゲノム）の実例を sequence3 で示す。Bio-

③

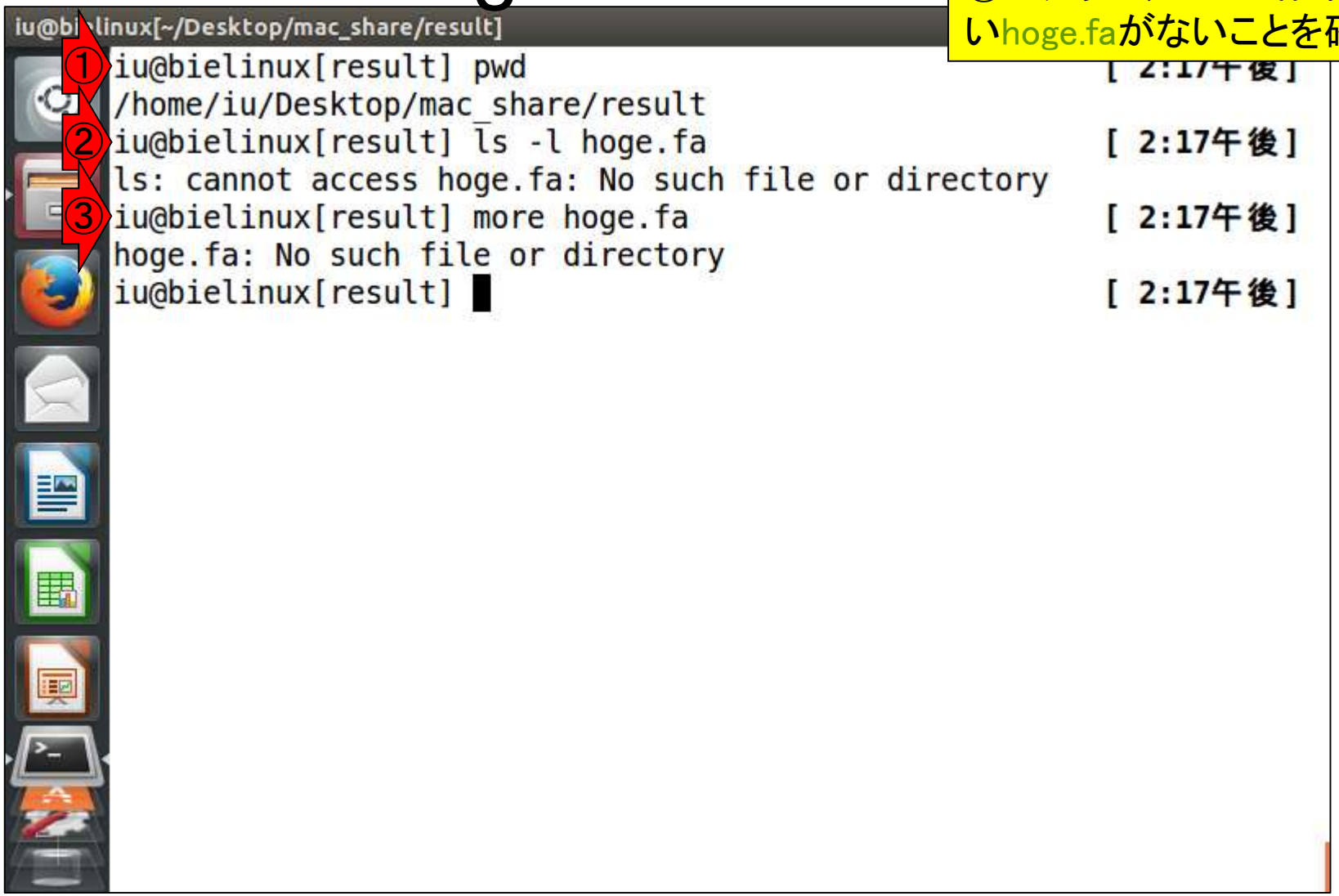
図 2.（a）仮想環状コンティグ配列 ACTCGTCAGAACTC のドットプロット。灰色で示した最後の 4 塩基が最初の 4 塩基と同じで、重複領域に相当する。（b）環状なので重複除去手段は計 5 通り。＊のついた前後 2 塩基づつトリムするやり方が推奨。

グの選択肢として、4 塩基重複の場合は計 5 通り存在する

谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

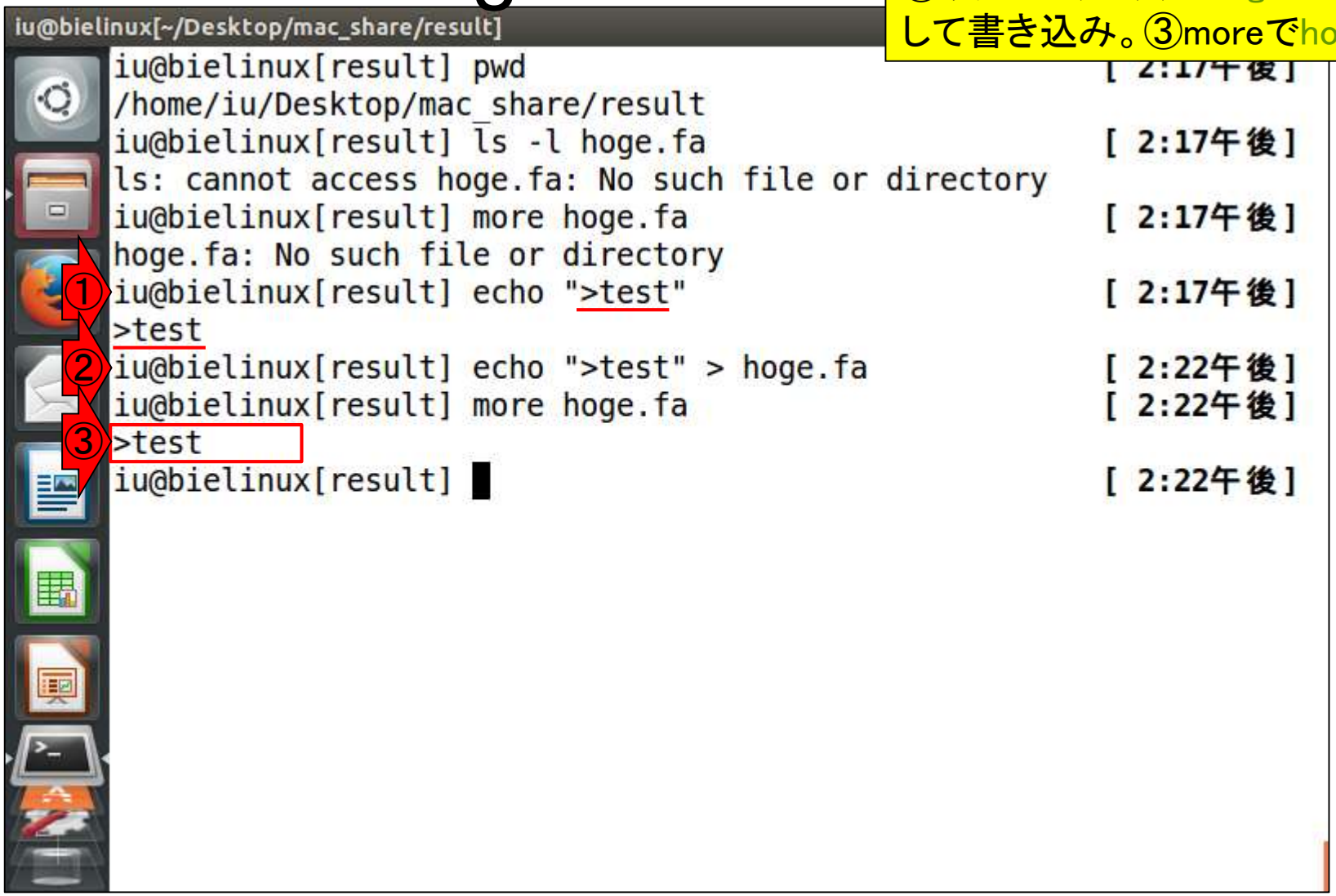
W12-4：hoge.fa

seqinrパッケージのdotPlot関数実行時に入力として用いるファイルhoge.faを作成する。
①とりあえずここで作業。②と③は作成したいhoge.faがないことを確認しているだけ



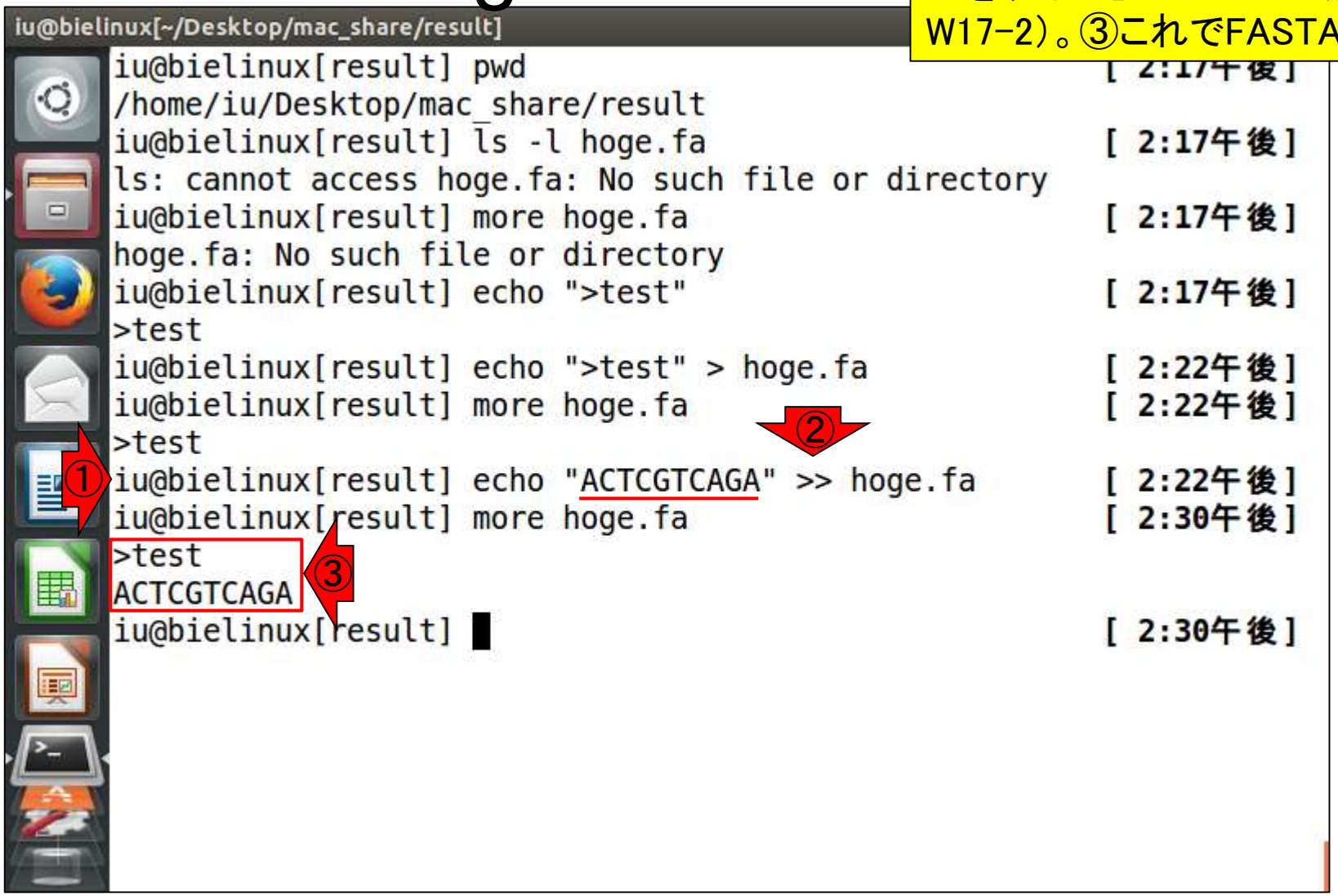
W12-4：hoge.fa

①echoコマンドは、第4回W9でも利用。ここでは任意の文字列「>test」を表示させているだけ。
②リダイレクト(>)でhoge.faファイルを新規作成して書き込み。③moreでhoge.faの中身を表示



W12-4：hoge.fa

①ACTCGTCAGAという文字列をhoge.faに追加書き込み。②既存のファイルに追加書き込みをするときは>>でした（第4回W12-2；第5回W17-2）。③これでFASTA形式ファイルの完成



W12-5：dotPlot実行

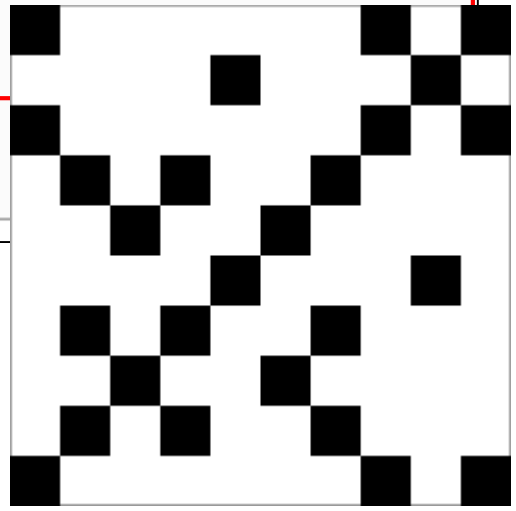
①赤枠内がドットプロット（300×300ピクセルのhoge1.pngファイル）を作成するコード

• W12-5：dotPlot実行 (スライド94)

seqinrパッケージ中のdotPlot関数を用いてドットプロットを作成。

```
cd ~/Desktop/mac_share/result

R -q

in_f <- "hoge.fa"                          #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f <- "hoge1.png"                       #出力ファイル名を指定してout_fに格納
param_fig <- c(300, 300)                   #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(seqinr)                            #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
hoge <- read.fasta(in_f, seqtype="DNA")#in_fで指定したファイルの読み込み
hoge                                       #確認してるだけです
hoge[[1]]                                  #確認してるだけです
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])#出力ファイルの各種パラメータを指定
par(mar=c(0, 0, 0, 0))                     #下、左、上、右の順で余白（行）を指定
dotPlot(hoge[[1]], hoge[[1]], xlab="", ylab="")#プロット
dev.off()                                  #おまじない

q(save="no")
```

①

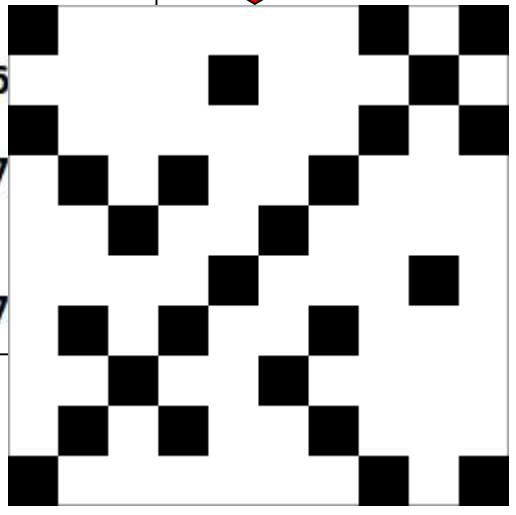


W12-5：dotPlot実行

コピペ実行後に①lsで確認。②hoge1.pngが確かに作成されている。③中身はこれ。「eog hoge1.png&」で開くことができます（スライド77）

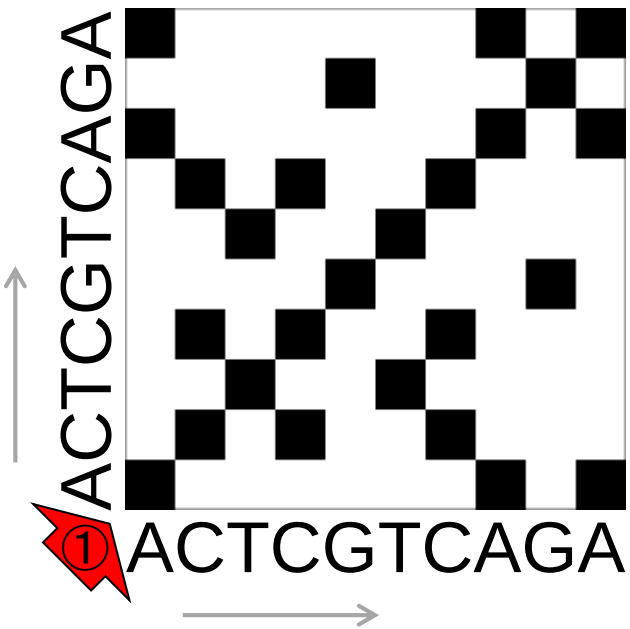
```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  14:57
[1] "test"
attr(,"Annot")
[1] ">test"
attr(,"class")
[1] "SeqFastadna"
> #ファイルに保存(pngファイル)
> png(out_f, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])
#出力ファイルの各種パラメータを指定
> par(mar=c(0, 0, 0, 0))                    #下、左、上、右の順で余白
（行）を指定
> dotPlot(hoge[[1]], hoge[[1]], xlab="", ylab="")#プロット
> dev.off()                                 #おまじない
null device
          1
>
> q(save="no")
iu@bielinux[result] pwd                                    [ 2:56
/home/iu/Desktop/mac_share/result
①iu@bielinux[result] ls -l hoge*                           [ 2:57
-rwxrwxrwx 1 iu iu 837  6月  15 14:57 hoge1.png ②
-rwxrwxrwx 1 iu iu  17  6月  15 14:30 hoge.fa
iu@bielinux[result]                                        [ 2:57
```

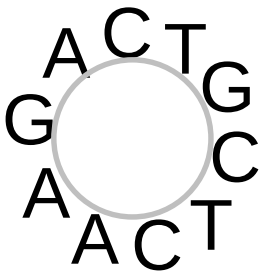
③



W12-6：解説

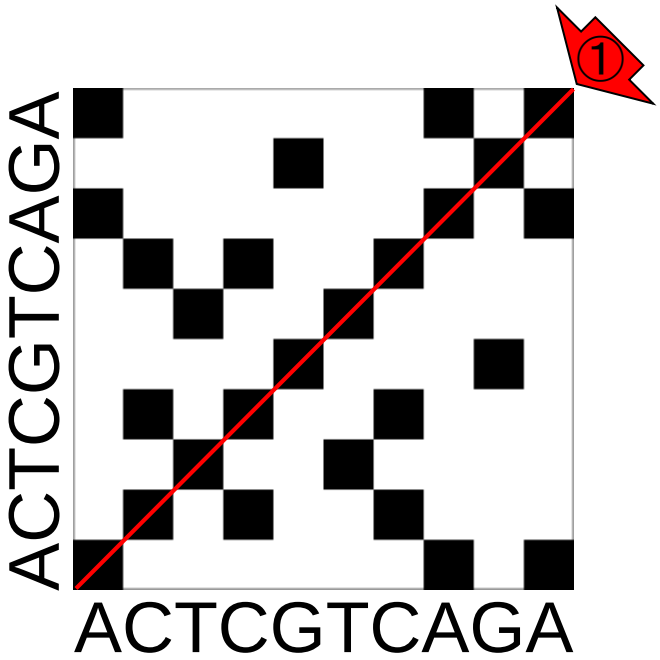
ドットプロットの解説。Rのseqinrパッケージ中のdotPlot関数実行結果ファイルは、①左下を原点として比較する2つの配列を並べている。一致が黒、不一致が白

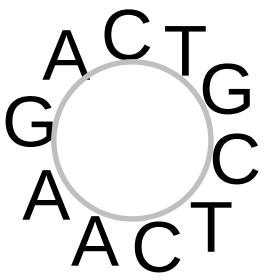




W12-6：解説

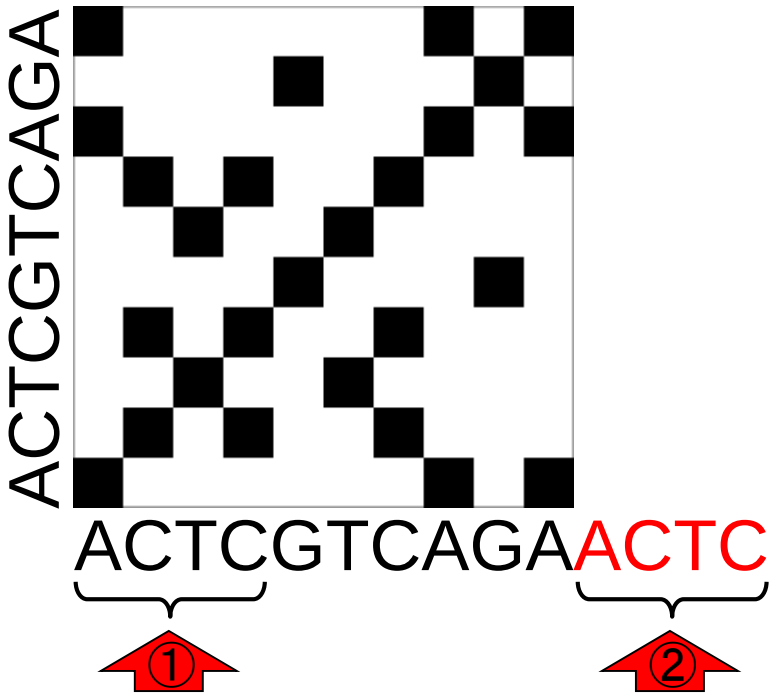
同一の配列を比較するときは、①必ず対角線上の塩基が一致（つまり黒）する

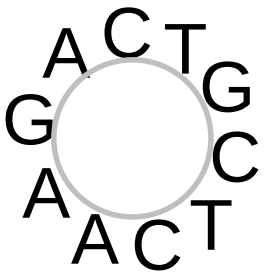




W12-7 : 環状コンティグ例

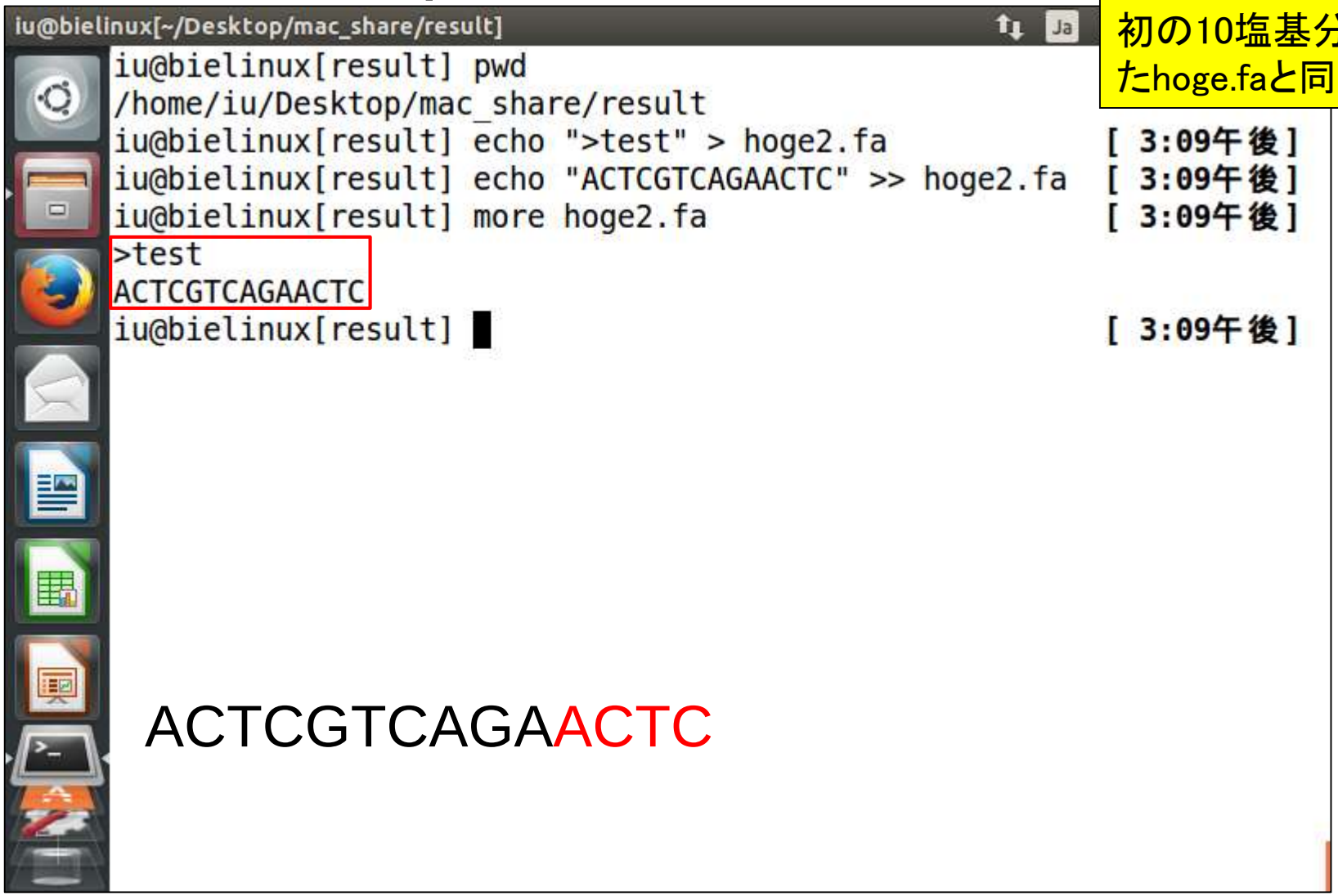
アセンブリ結果として、①最初と②最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断





W12-7：環状コンティグ作成

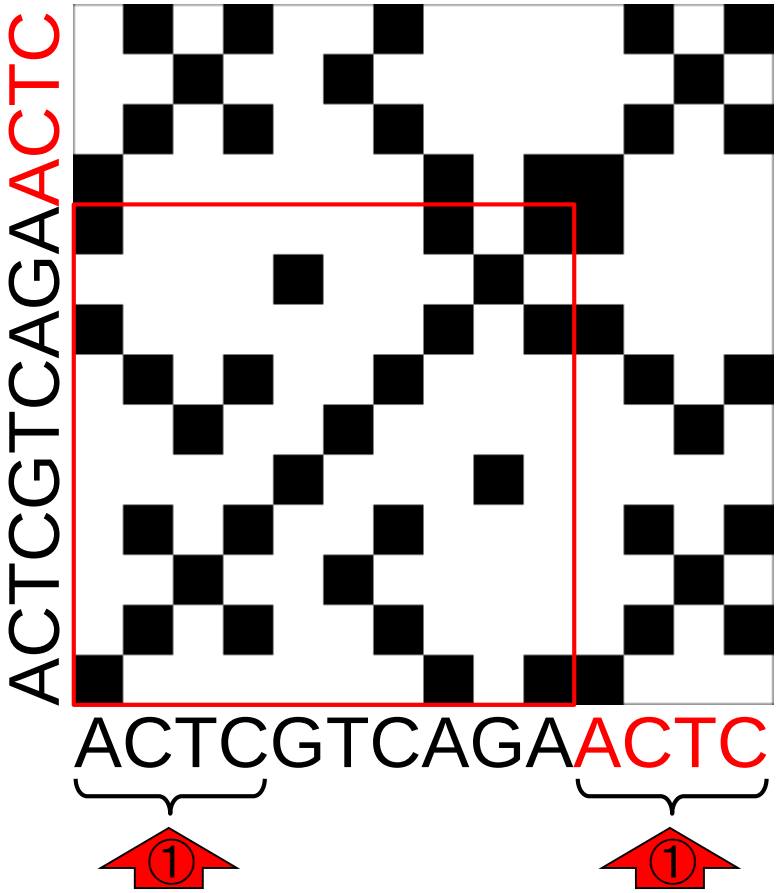
両末端の4塩基がACTCで同じ、計14塩基からなるミニ環状コンティグファイル(hoge2.fa)を作成。最初の10塩基分は、W12-4で作成したhoge.faと同じ

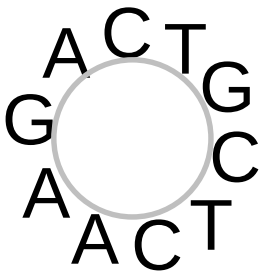


ACTCGTCAGAACTC

W12-8：ドットプロット

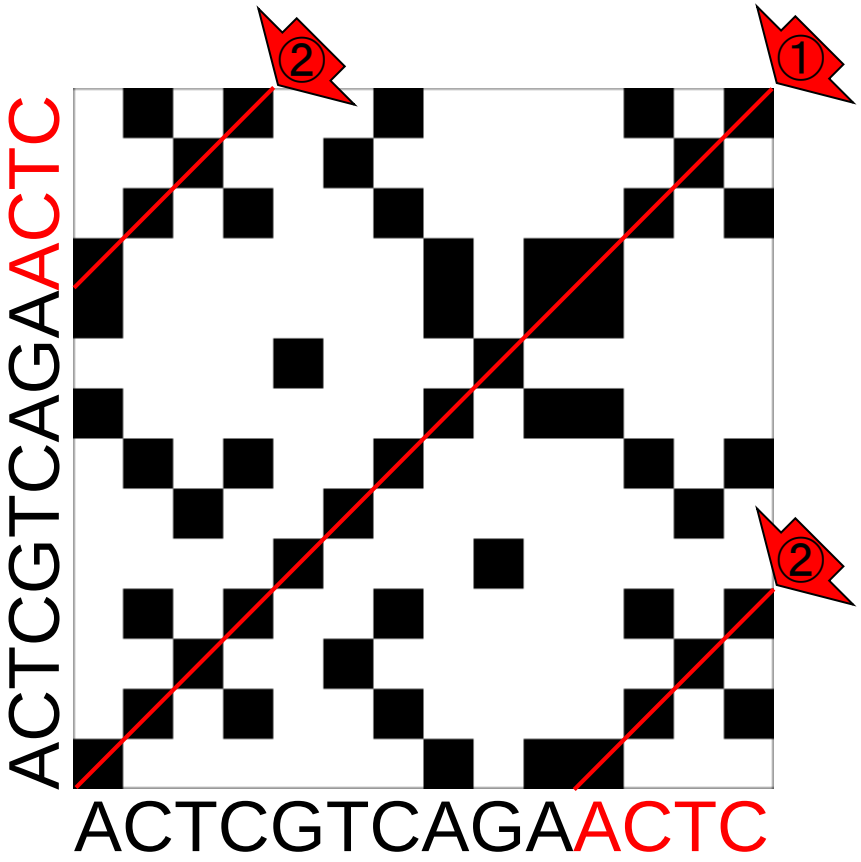
①両末端の4塩基がACTCで同じ、計14塩基からなるミニ環状コンティグファイル(hoge2.fa)を入力として、再度ドットプロットを実行した結果。赤枠以外がACTC追加部分

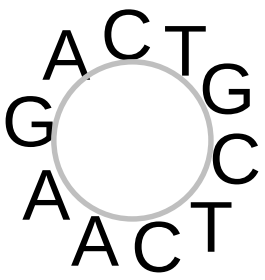




W12-8：環状の場合

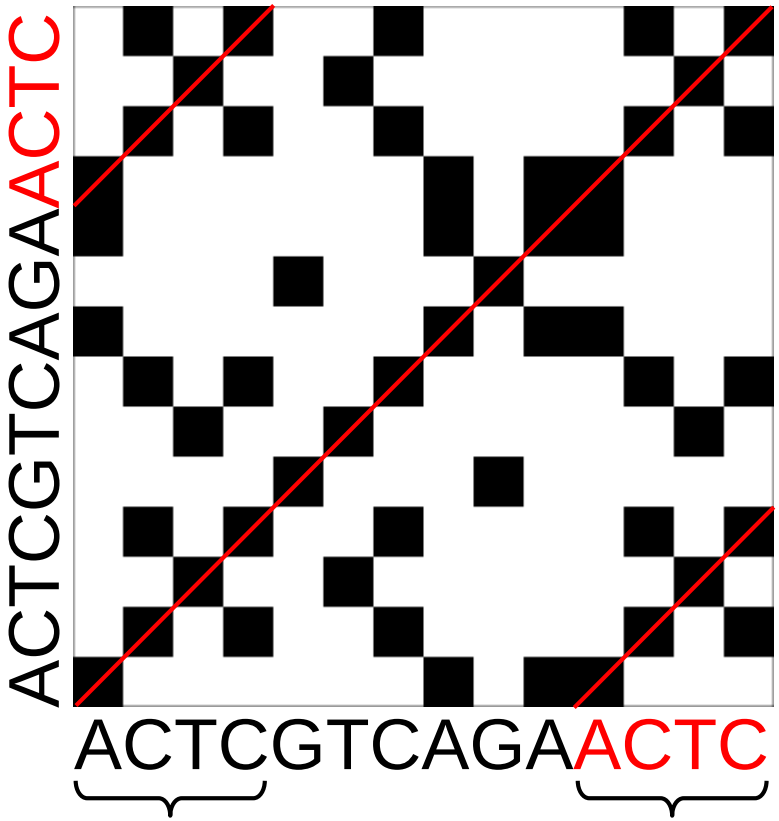
こんな感じに見えます。①対角線上にプロットされるのは同じですが、②対角線と平行に末端部分もプロットされるのが環状の特徴

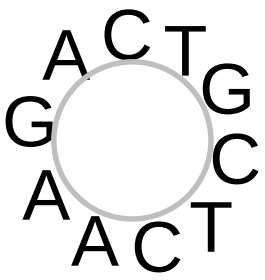




W12-8：環状の場合

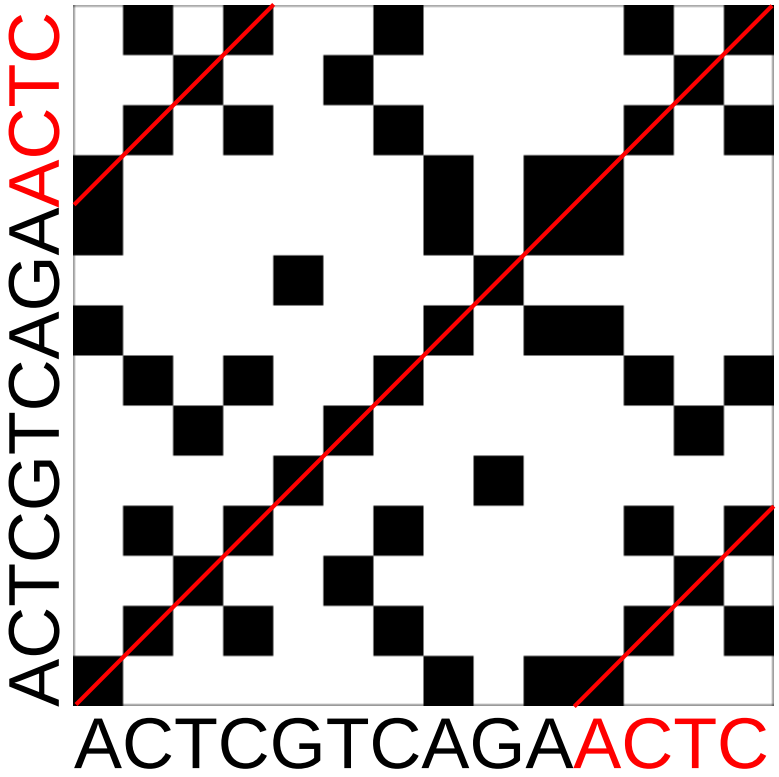
これは、コンティグの両末端が同じ配列であることを意味する。「重複する部分の除去」は、「complete genomeにする操作(finishing)」の一部に相当する

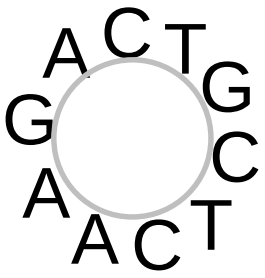




W13-1：重複除去

重複除去（トリミング）の選択肢は、（この場合は結果的に同じになるが）①5通り存在する。通常（推奨）は、両末端はクオリティが低いので、②中央部分を残して両端をトリムする選択肢（*のついたもの）を採用する





ACTCGTCAGAACTC
ACTCGTCAGA
CTCGTCAGAA
TCGTCAGAAC*
CGTCAGAACT
GTCAGAACTC

②

①

Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - **W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）**
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

第7回原稿p106右中

①簡単な例でLinuxコマンドを用いた実際の重複除去の例を示します

グ（またはゲノム）の実例を sequence3 で示す。Bio-Linux には dotter[17] というドットプロット用プログラムがプレインストールされているが［W12-1］、これは環状チェックの本番で用いる。まず seqinr[18] という R パッケージ中の dotPlot 関数を用いて、ドットプロットの基本形を示す。環状かどうかのチェックの場合は、同一の配列を並べて比較する。同一配列間のドットプロットの主な特徴は、必ず対角線上に位置する塩基が同じになるという点である［W12-6］。環状の場合は、コンティグの両末端の配列がほぼ同じになる。これは、ドットプロット上で対角線と平行の位置に、重複塩基数分だけの長さの一致部分がハイライトされることで判別できる［W12-8］。

例えば、ランダムな塩基配列 "ACTCGTCAGA" が真の環状ゲノムだと仮定すると、*de novo* アセンブリによって得られるコンティグは "ACTCGTCAGAACTC" のような感じとなる。この場合、灰色の 4 塩基分の重複がドットプロット上でハイライトされ（図 2a）、重複除去（塩基のトリミング）が環状化作業に相当する。末端塩基のトリミングの選択肢として、4 塩基重複の場合は計 5 通り存在するが、アスタリスク（＊）のついた両末端から概ね同数の塩基をトリミングするのが推奨である（図 2b）。その理由は、図 1a で示すようなコンティグ末端部分のクオリティスコア分布を眺めれば納得できるであろう。この単純な例の場合は、結論としてはどの選択肢を採用しても同じ結果になるものの、数千塩基におよぶ実際のプラスミドコンティグの重複部分が完全一致となる可能性はほぼゼロという現実的な問題に当てはめるとよい。

数万～数百万塩基におよぶ配列のドットプロットの作成は、seqinr パッケージの dotPlot 関数では現実的に難しいため［W14-1］、Bio-Linux にプレインストールされている dotter プログラムを用いる［W12-1］。HGAP アセンブリ結果として得られた計 4 コンティグのうち、2 番目に短いコンティグ（45,853 bp; sequence3.fa）が環状かどうかを確認したい場合は、「dotter sequence3.fa sequence3.fa」と打てばよい［W14-2］。ドットプロット全体を眺めると、対角線と平行の直線が配列末端部分に現れていることがわ

W13-2：cutコマンド

特定の範囲の切り出しはcutコマンドを利用。①hoge2.faはsingle-FASTA形式。②「tail -n 1」で、最後の1行分のみ取り出している。③パイプで流してcutコマンドを実行し、3-12文字目を表示。これが④環状コンティグの重複除去後の塩基配列に相当する。これは1行1配列にしているからこそできるワザ！（60塩基程度ごとに改行が入っている通常のFASTA形式だとムリ！）

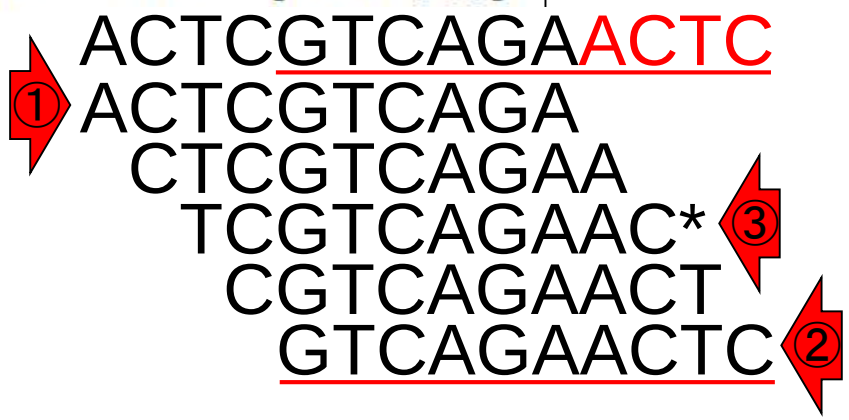
```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd
/home/iu/Desktop/mac_share/result
①iu@bielinux[result] more hoge2.fa
>test
ACTCGTCAGAACTC
②iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa                    [ 4:08午後]
ACTCGTCAGAACTC
③iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 3-12      [ 4:08午後]
TCGTCAGAAC
iu@bielinux[result]                                        [ 4:08午後]
```

```
ACTCGTCAGAACTC
ACTCGTCAGA
 CTCGTCAGAA
  TCGTCAGAAC*  ④
   CGTCAGAACT
    GTCAGAACTC
```

W13-3：続cutコマンド

①最初の10塩基分のみ取り出しても、②最後の10塩基分のみ取り出しても、このシンプルな環状ゲノムの場合は③アスタリスクのついたものと結果的には同じ

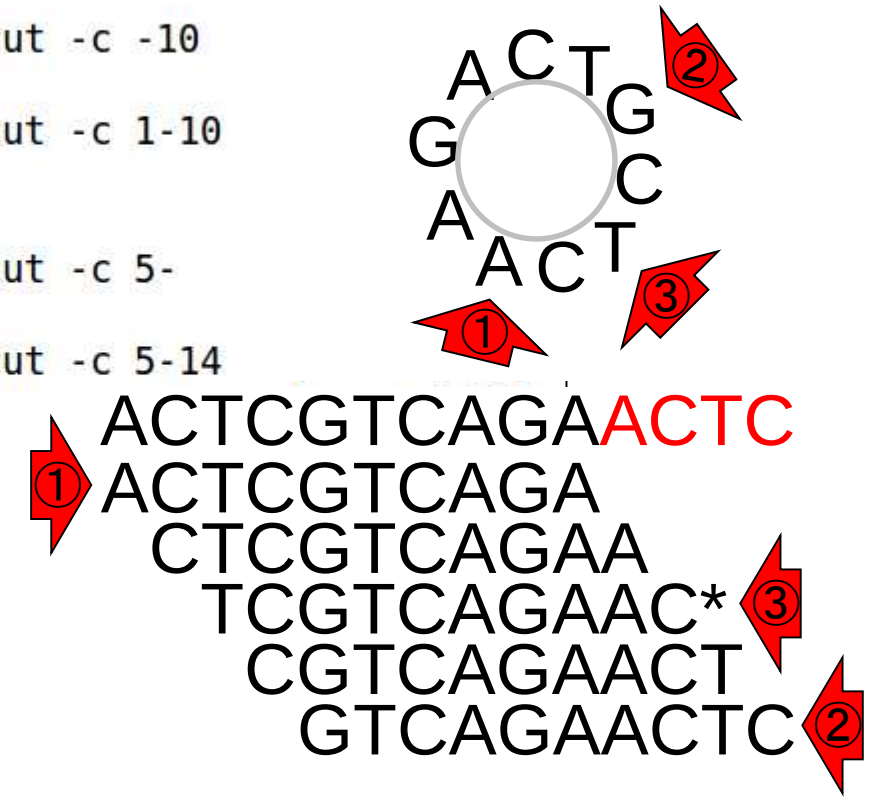
```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd                                    [ 4:13午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa                     [ 4:13午後]
ACTCGTCAGAACTC
①iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c -10       [ 4:13午後]
ACTCGTCAGA
①iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 1-10      [ 4:13午後]
ACTCGTCAGA
iu@bielinux[result]                                        [ 4:13午後]
②iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 5-        [ 4:13午後]
GTCAGAACTC
②iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 5-14      [ 4:13午後]
GTCAGAACTC
iu@bielinux[result]
```



W13-3：続cutコマンド

理由はスタート地点をどこにするかという違いのみだから。本物の環状染色体の場合は、特定の遺伝子配列が先頭になるように回転させる慣例がある

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd                                    [ 4:13午後 ]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa
ACTCGTCAGAACTC
iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c -10
ACTCGTCAGA
iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 1-10
ACTCGTCAGA
iu@bielinux[result]
iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 5-
GTCAGAACTC
iu@bielinux[result] tail -n 1 hoge2.fa | cut -c 5-14
GTCAGAACTC
iu@bielinux[result]
```



Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

第7回原稿p106右下

①このあたりの話に移行します。seqinrパッケージのdotPlot関数で行うのが難しいところはすっ飛ばします。気になる人は第7回W14-1を自分でやってみてください

グ（またはゲノム）の実例を sequence3 で示す。Bio-Linux には dotter [17] というドットプロット用プログラムがプレインストールされているが［W12-1］、これは環状チェックの本番で用いる。まず seqinr [18] という R パッケージ中の dotPlot 関数を用いて、ドットプロットの基本形を示す。環状かどうかのチェックの場合は、同一の配列を並べて比較する。同一配列間のドットプロットの主な特徴は、必ず対角線上に位置する塩基が同じになるという点である［W12-6］。環状の場合は、コンティグの両末端の配列がほぼ同じになる。これは、ドットプロット上で対角線と平行の位置に、重複塩基数分だけの長さの一致部分がハイライトされることで判別できる［W12-8］。

例えば、ランダムな塩基配列 "ACTCGTCAGA" が真の環状ゲノムだと仮定すると、*de novo* アセンブリによって得られるコンティグは "ACTCGTCAGAACTC" のような感じとなる。この場合、灰色の 4 塩基分の重複がドットプロット上でハイライトされ（図 2a）、重複除去（塩基のトリミング）が環状化作業に相当する。末端塩基のトリミン

グの選択

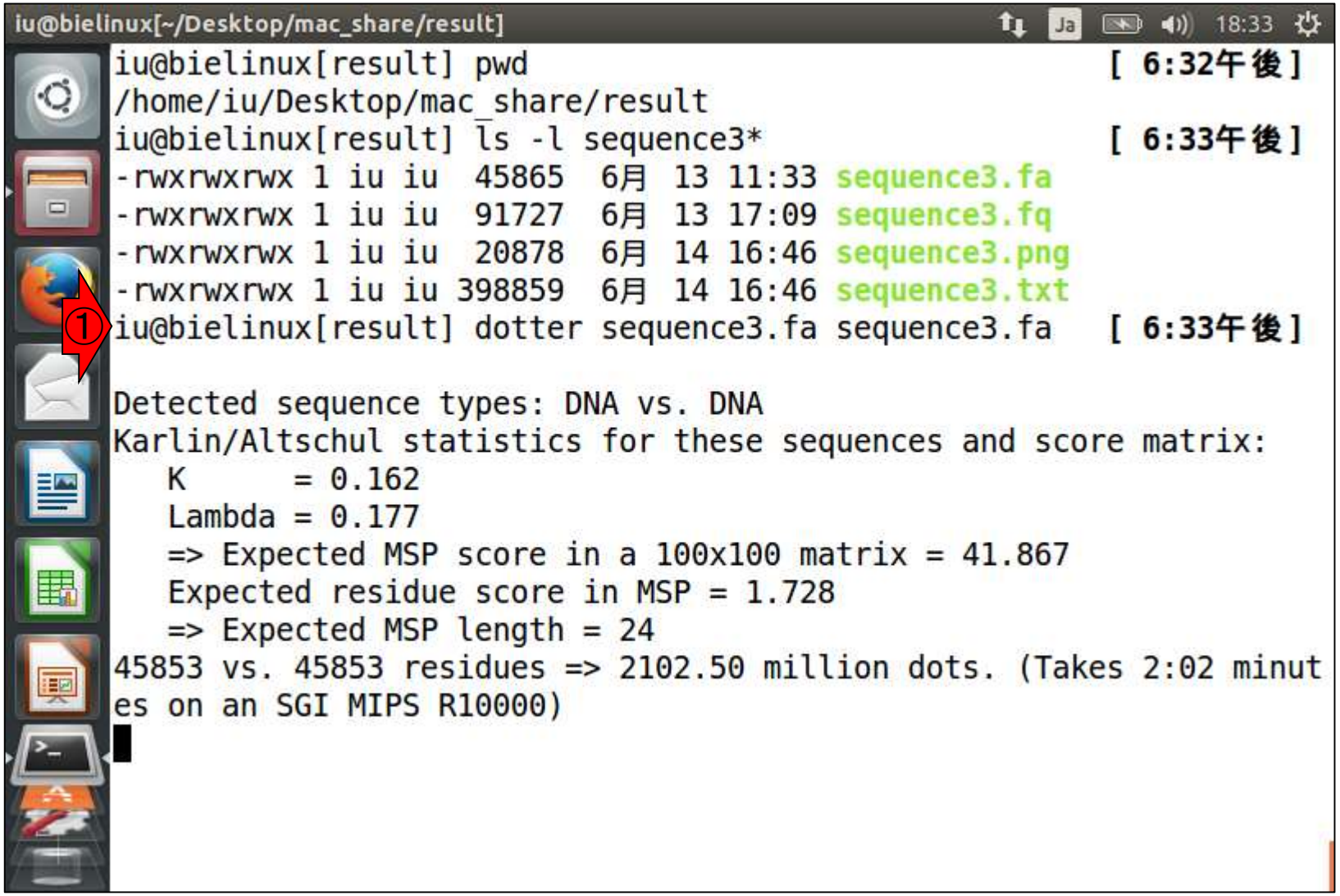
が、アスタリスク（＊）のついた両末端から概ね同数の塩基をトリミングするのが推奨である（図 2b）。その理由は、図 1a で示すようなコンティグ末端部分のクオリティスコア分布を眺めれば納得できるであろう。この単純な例の場合は、結論としてはどの選択肢を採用しても同じ結果になるものの、数千塩基におよぶ実際のプラスミドコンティグの重複部分が完全一致となる可能性はほぼゼロという現実的な問題に当てはめるとよい。

数万～数百万塩基におよぶ配列のドットプロットの作成は、seqinr パッケージの dotPlot 関数では現実的に難しいため［W14-1］、Bio-Linux にプレインストールされている dotter プログラムを用いる［W12-1］。HGAP アセンブリ結果として得られた計 4 コンティグのうち、2 番目に短いコンティグ（45,853 bp; sequence3.fa）が環状かどうかを確認したい場合は、「dotter sequence3.fa sequence3.fa」と打てばよい［W14-2］。ドットプロット全体を眺めると、対角線と平行の直線が配列末端部分に現れていることがわ

谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

W14-2：dotter

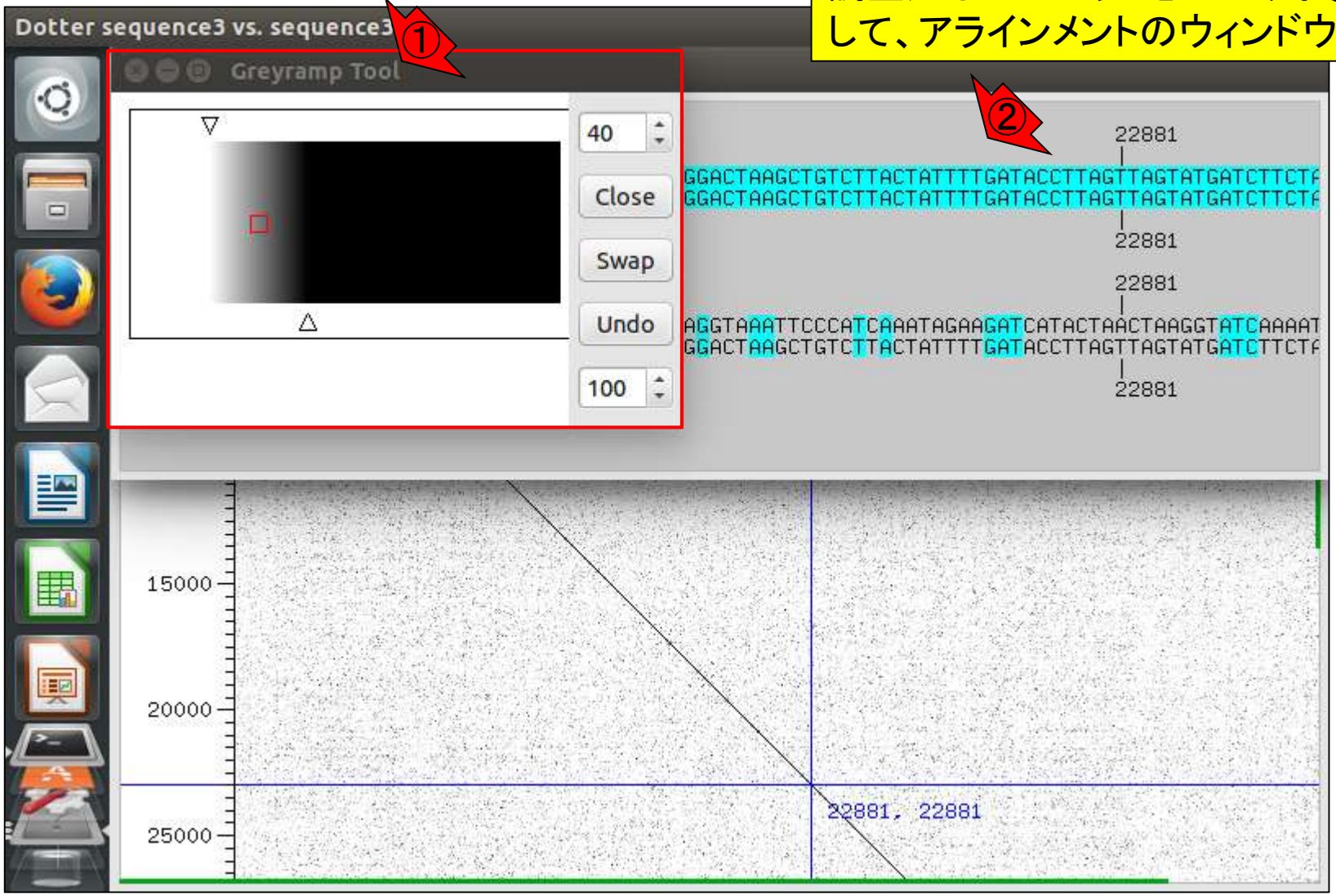
①sequence3.fa同士のドットプロットをdotterで実行。画面はリターンキーを押して数秒後の状態



Sonnhammer and Durbin, *Gene*, **167**: GC1-10, 1995

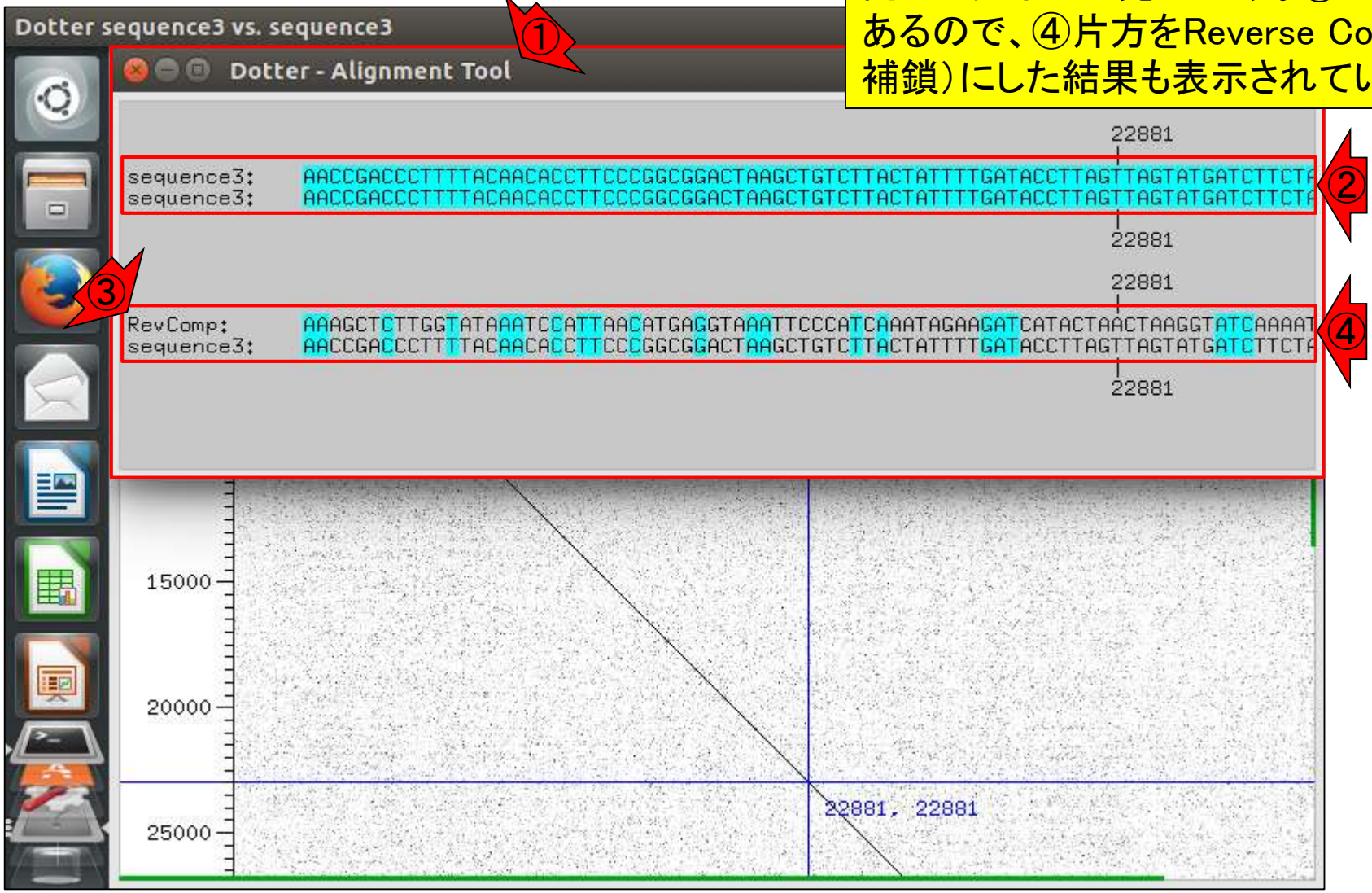
W14-2：dotter

計3つのウィンドウが立ち上がる。①Greyramp Toolはよくわかりませんが、ドットプロットのコントラスト調整用なのだろうと思います。②のあたりをクリックして、アラインメントのウィンドウをアクティブにする



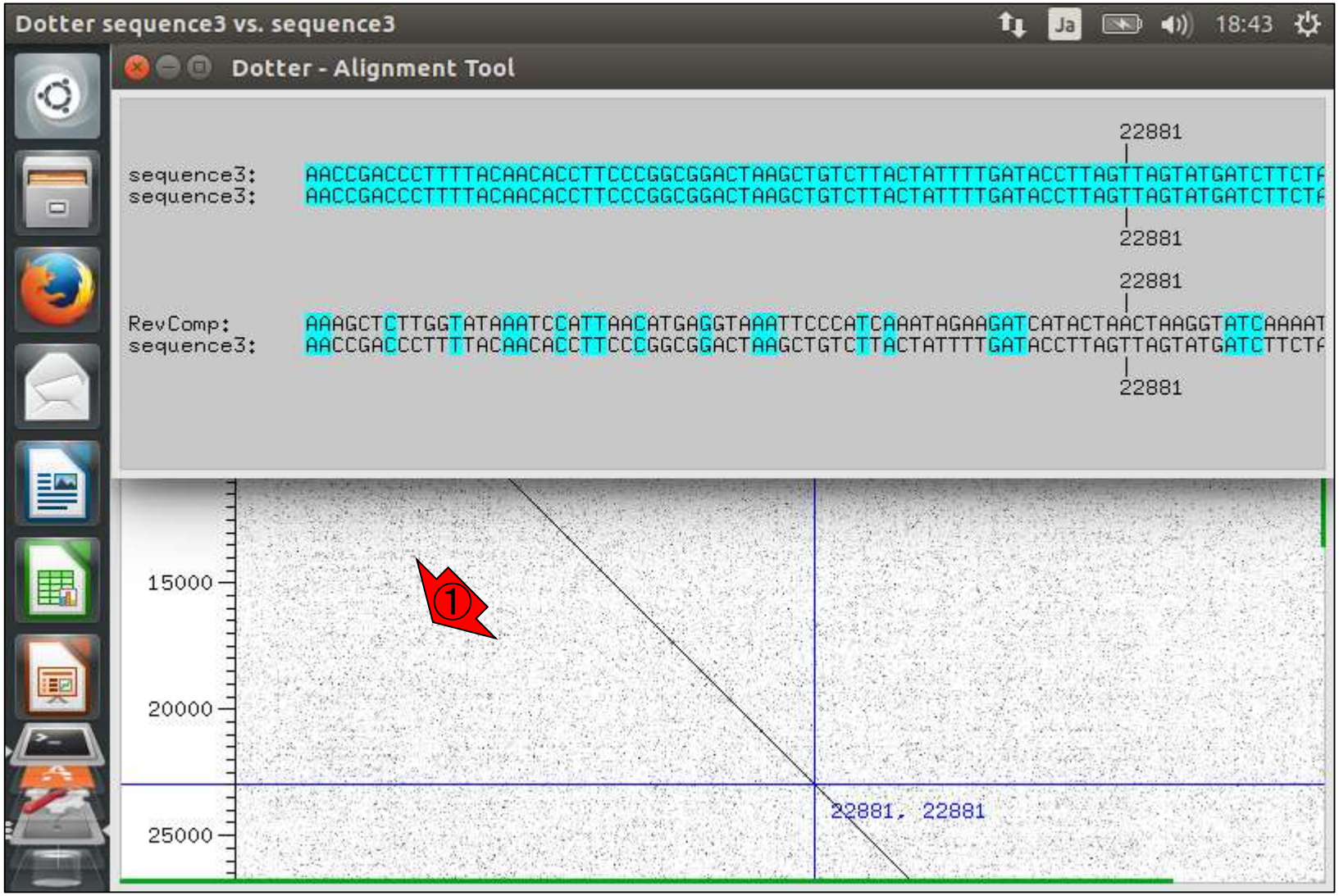
W14-2：dotter

①Alignment Toolは、比較している2つの配列のアラインメント結果を表示。②今比較しているのは同じ配列なので完全一致。③RevCompと書いてあるので、④片方をReverse Complement（逆相補鎖）にした結果も表示されていることがわかる



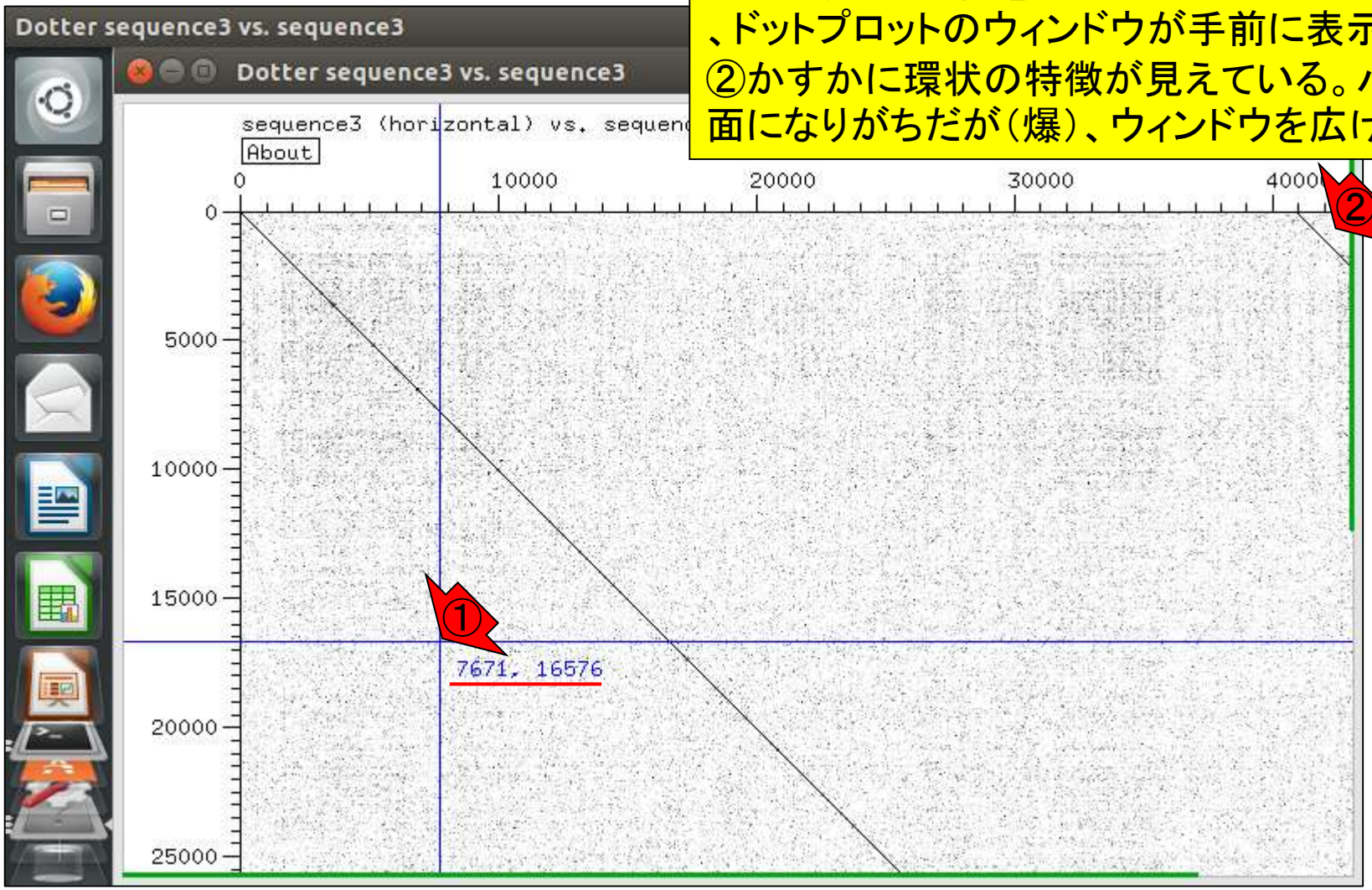
W14-2：dotter

裏側に見えているのが主目的のドットプロット。①このあたりでクリックして、ドットプロットのウィンドウを手前に表示



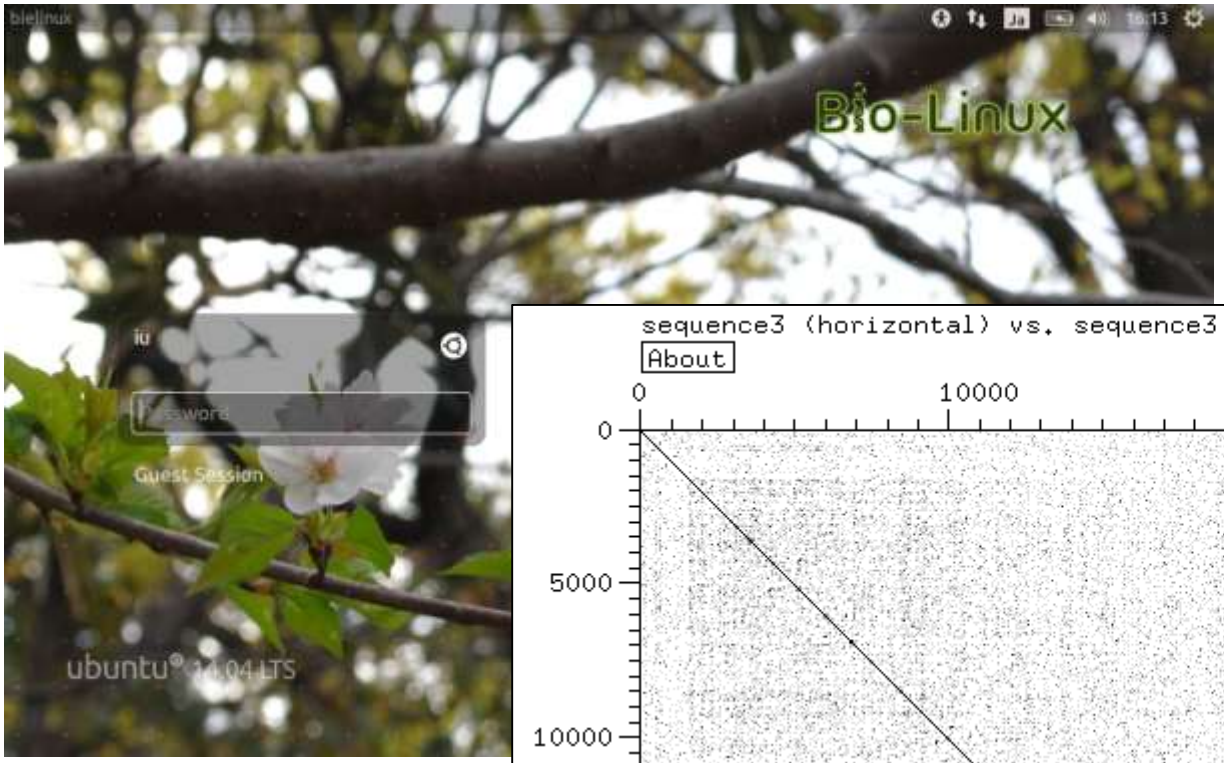
W14-2：dotter

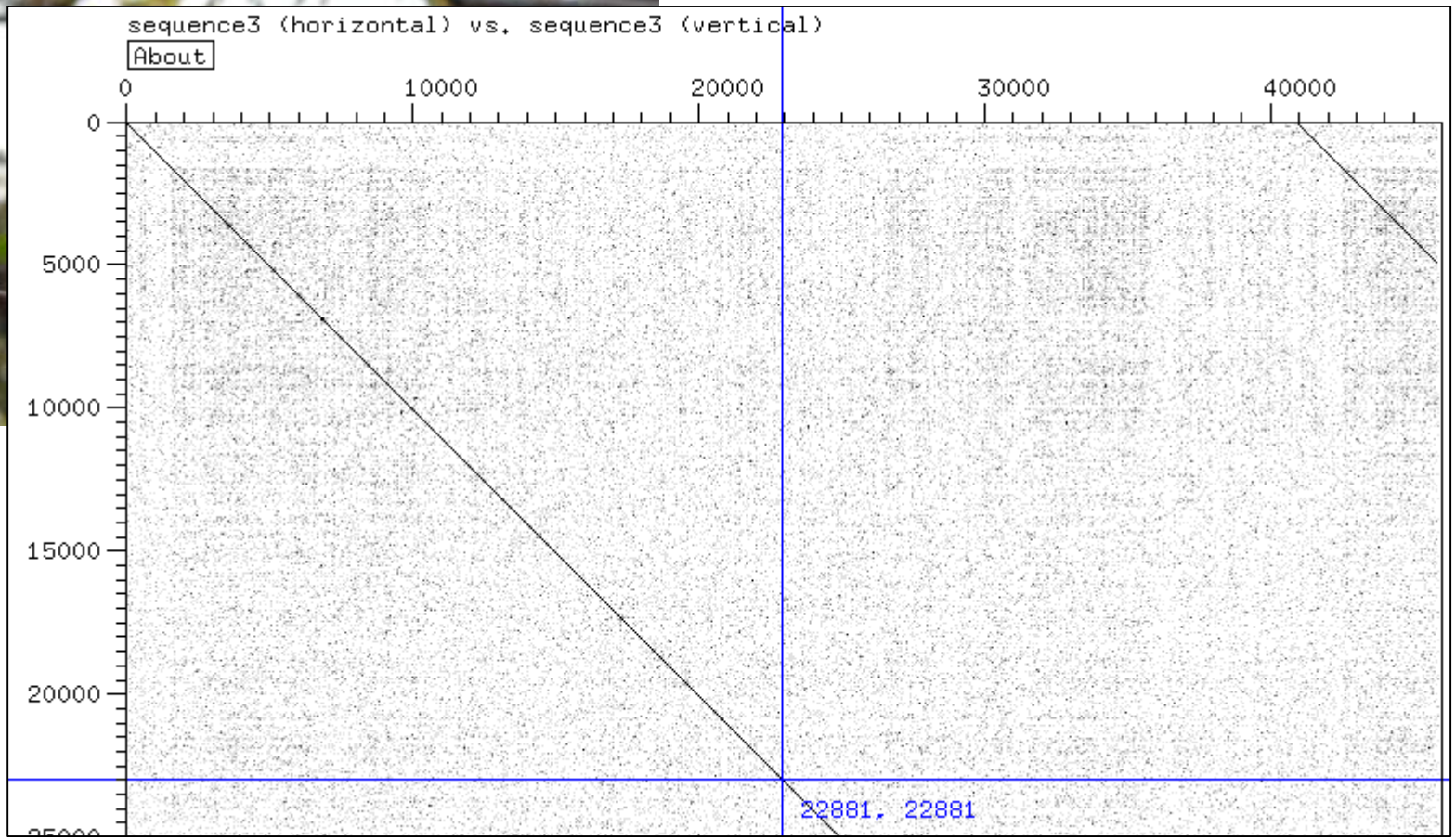
赤下線部分に7671, 16576という数字が見えている。これは今比較している2つの配列の塩基番号（①の座標情報）に相当する。同じ位置をクリックしなければいけないわけではなく、ドットプロットのウィンドウが手前に表示されていればOK。
②かすかに環状の特徴が見えている。バグってログイン画面になりがちだが（爆）、ウィンドウを広げて全体像を眺める



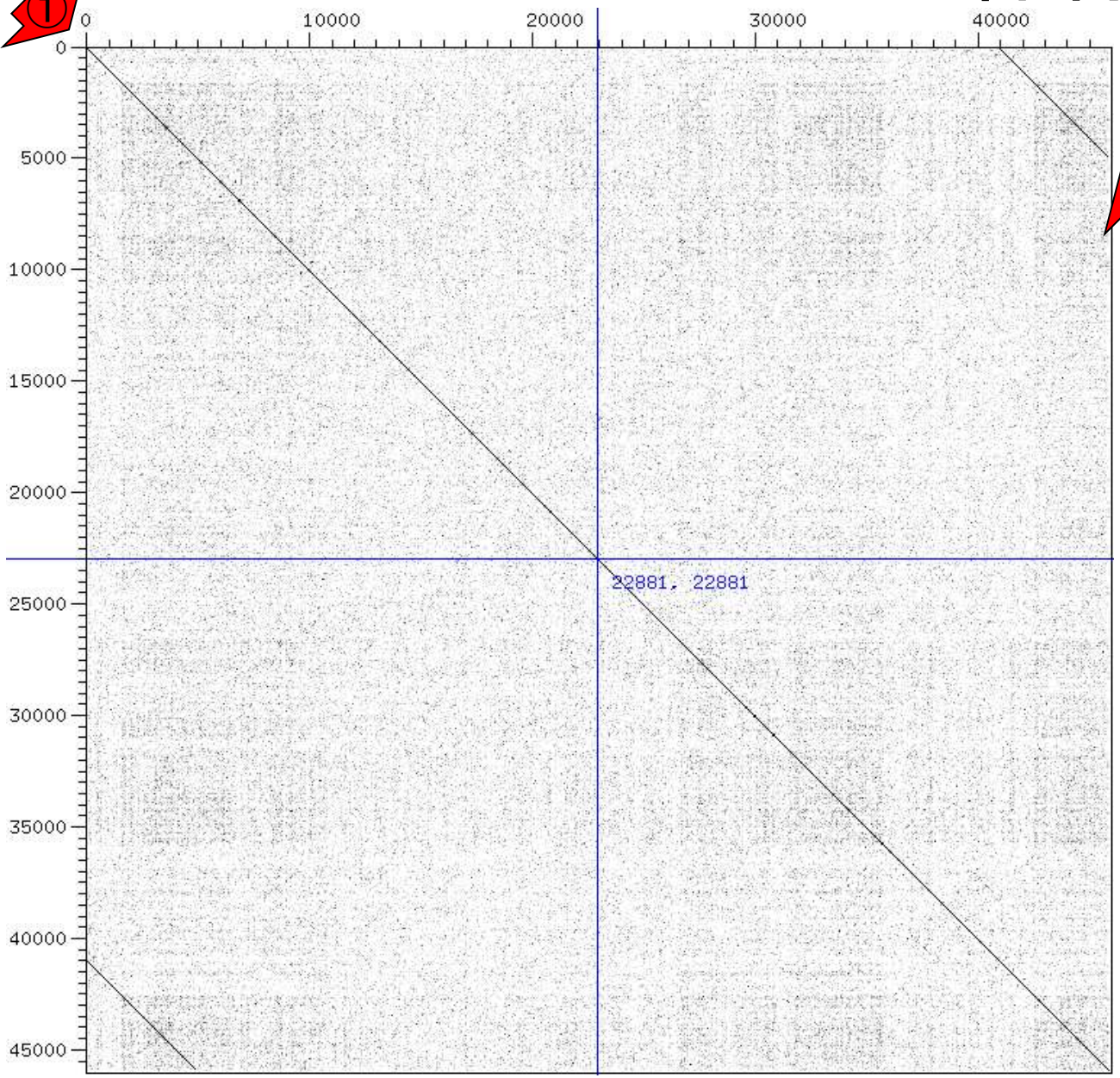
W14-3：バグった例

バグってログイン画面になっても、気を取り直して再挑戦しよう。右下のようなドットプロットが得られるはず



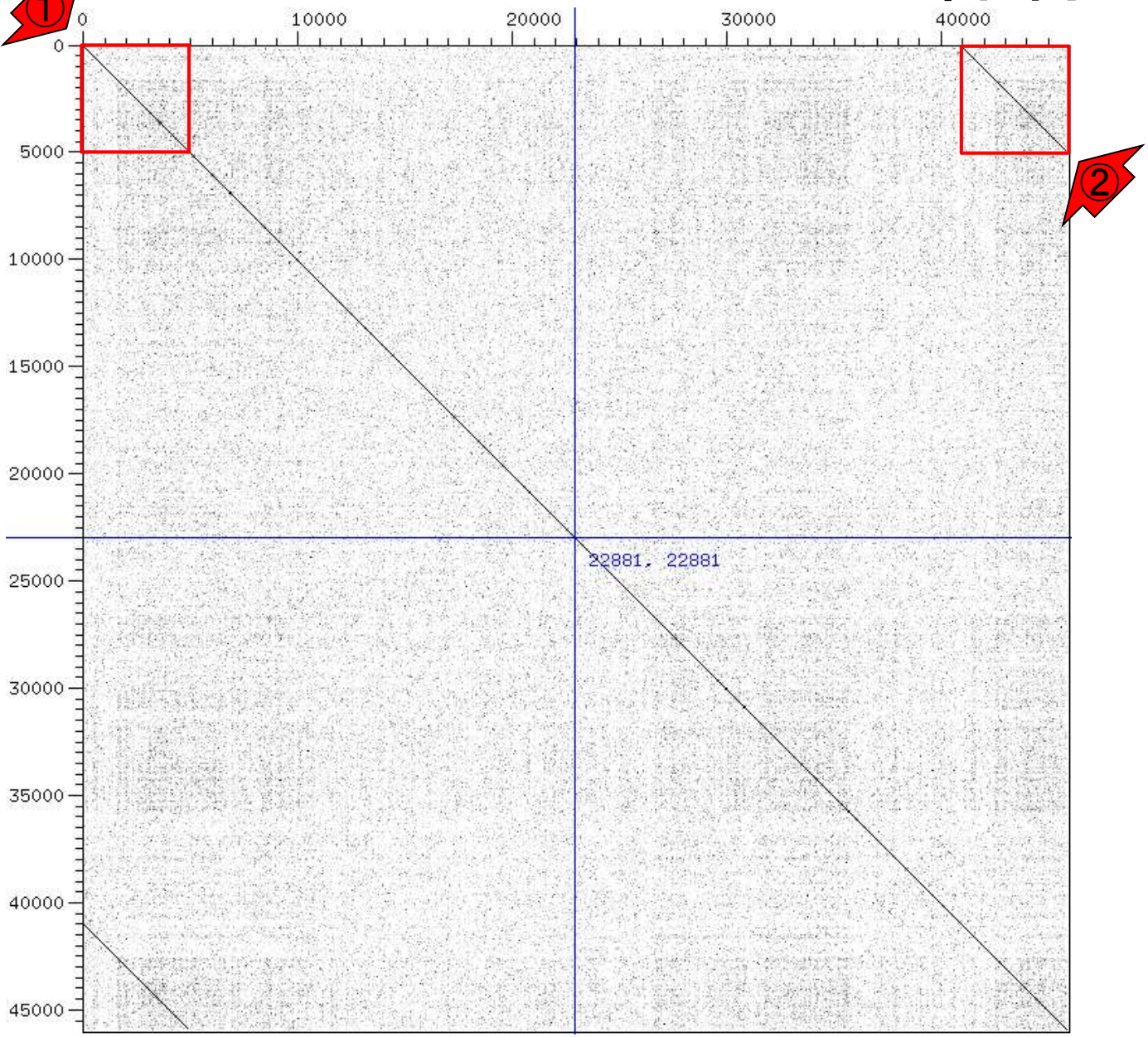


W14-4：ドットプロット全体像



dotterのドットプロットは①左上が原点のようだ。②右上（と左下）にもくっきりと「①の対角線」と並行のラインが見えているので、45,853 bpのsequence3は環状と判断

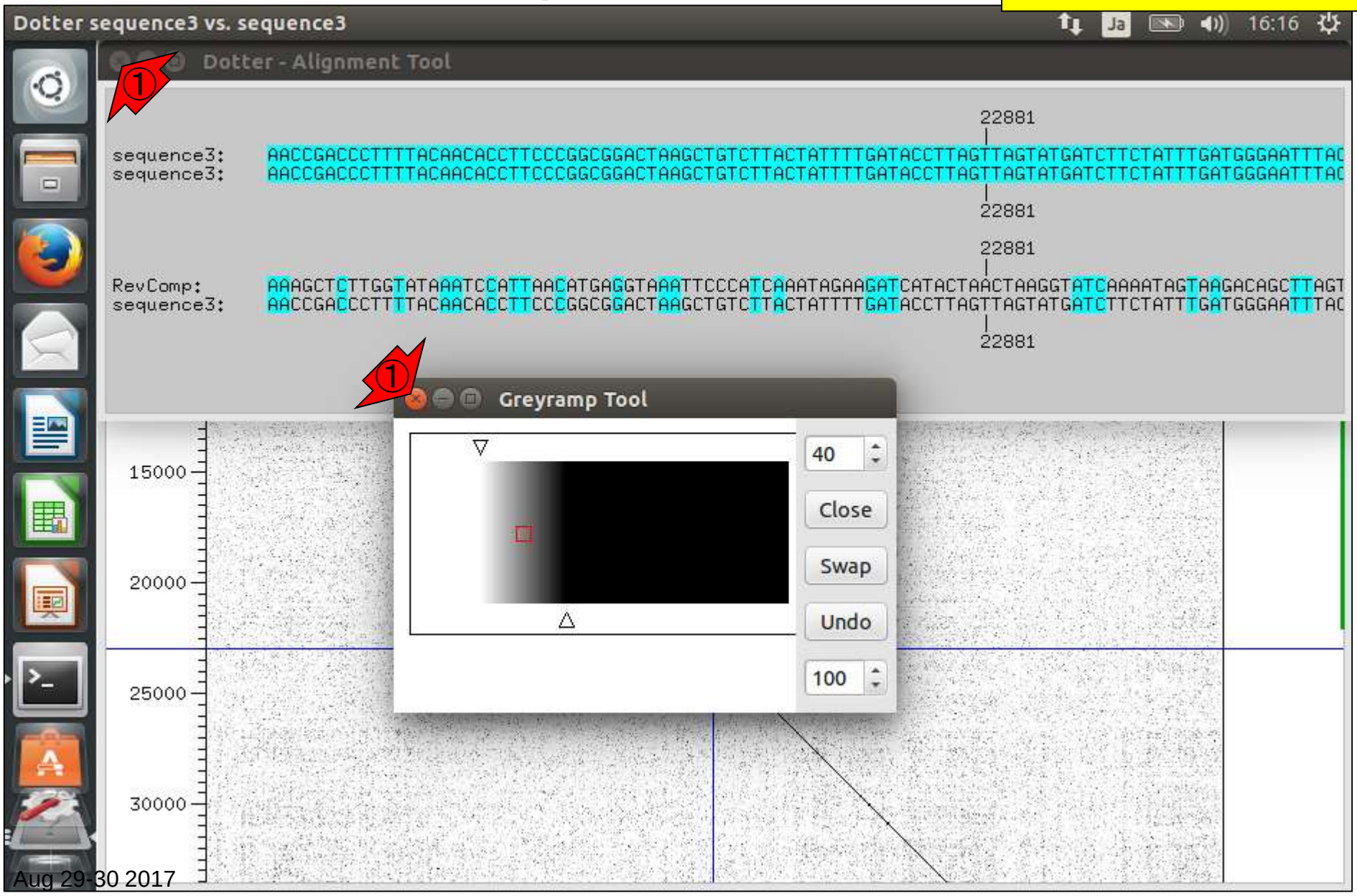
W14-4：ドットプロット全体像



大まかには、全部で45,853 bp のうち、①最初と②最後の約 5,000 bpが重複していると判断

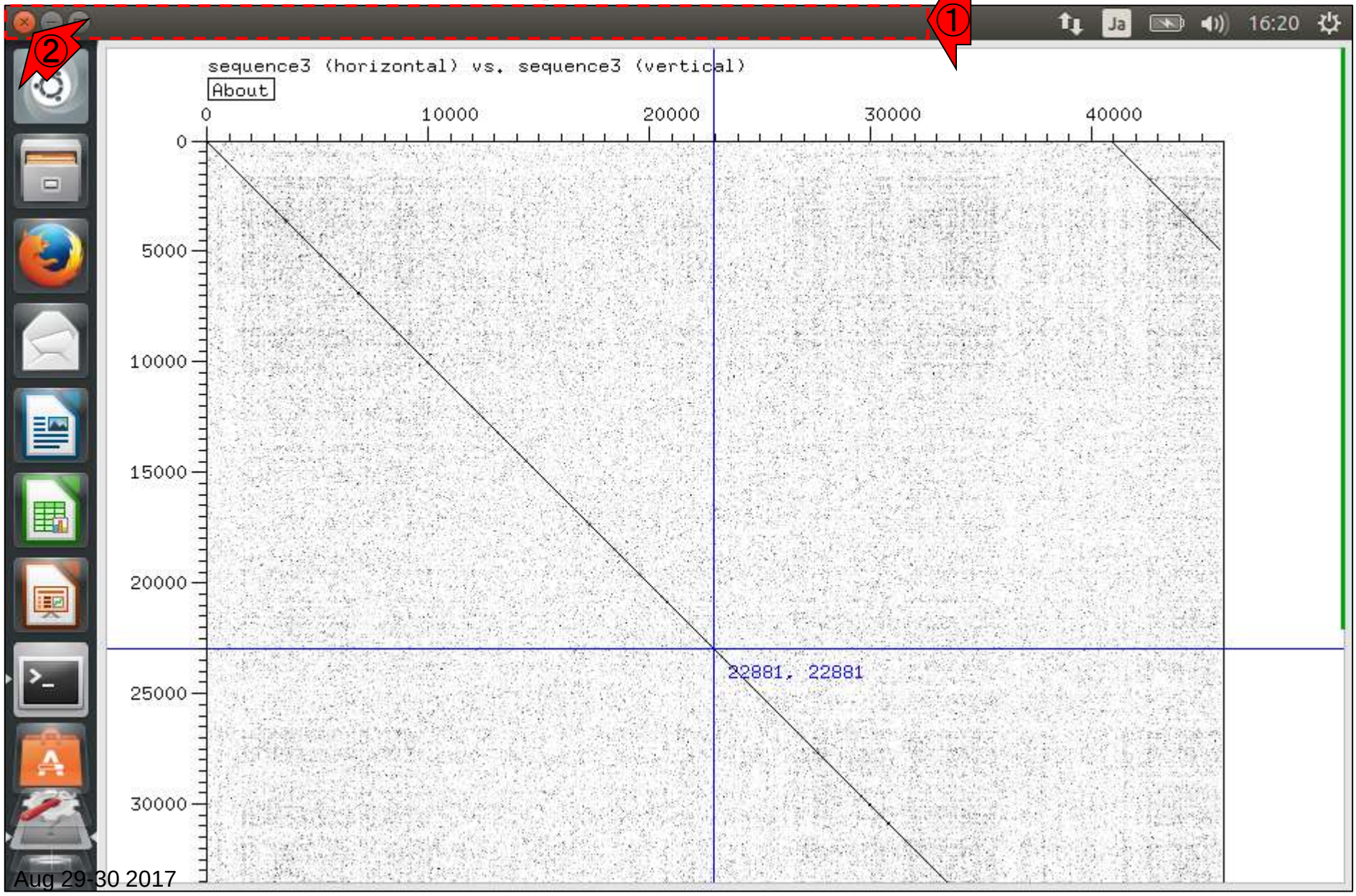
W14-5：dotter終了

Dotter実行結果を終了させるには、基本的に①該当するGUIの左上部分の×を押せばよい



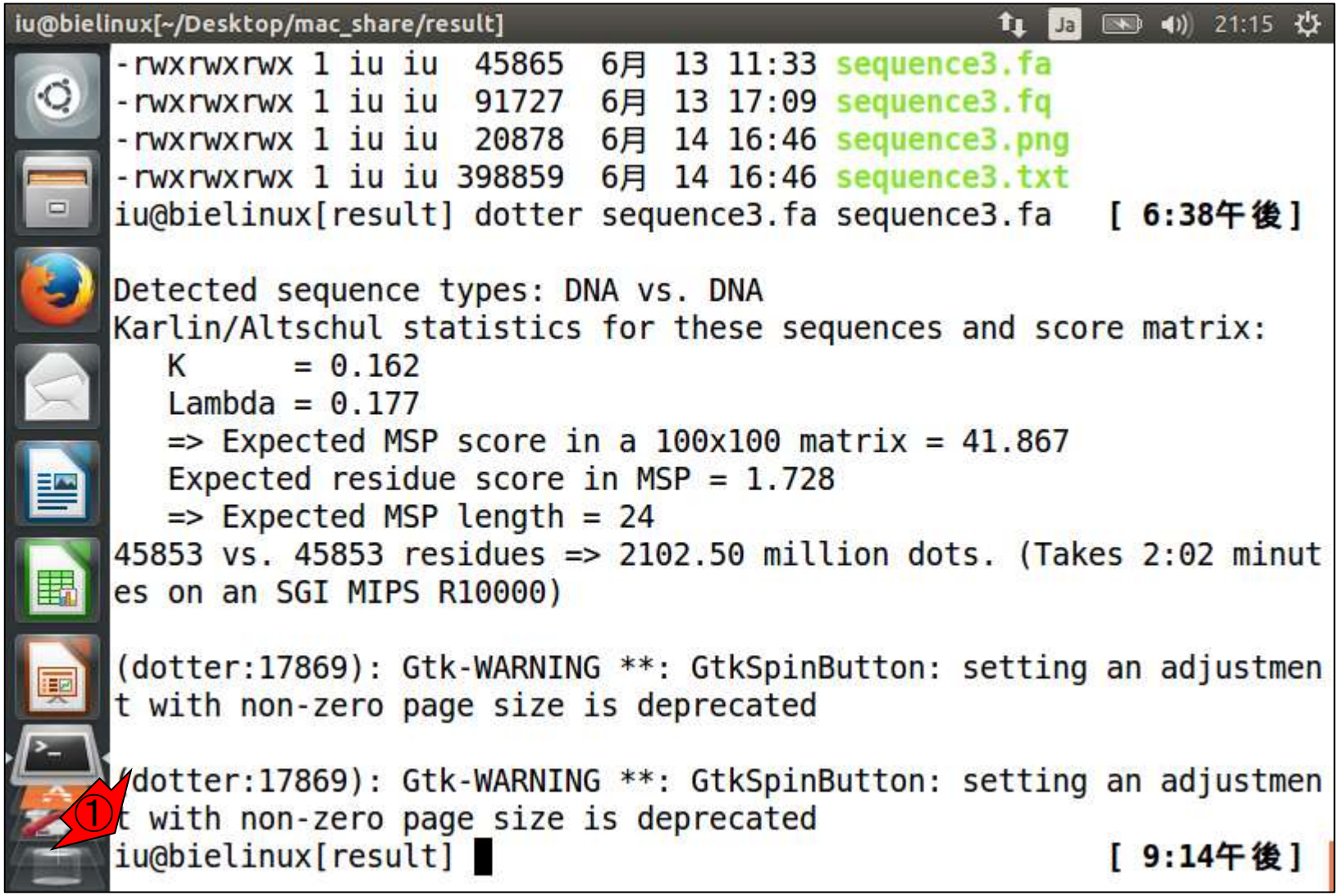
W14-5：dotter終了

①赤い点線の枠内にカーソルを移動させるとメニューバーが見られるようになるので、②×。第3回W6-3



W14-6：dotter終了後

①コマンド打ち込み可能状態になっていることがわかります



第7回原稿p106-107

①dotter出力結果のドットプロットを眺めて全体の傾向を把握する。次にBLASTを実行して正確なアラインメント情報を得る。クオリティスコア分布情報（W11-9）とアラインメント情報を用いて、重複除去の本番を行う

ロット上でハイライトされ（図 2a）、重複除去（塩基のトリミング）が環状化作業に相当する。末端塩基のトリミン

と打

対角

Jpn. J. Lactic Acid Bact.

Vol. 27, No. 2

①

かる（図 1b）。大まかには、最初と最後の約 5,000 bp が重複しており、この重複除去がアセンブル後の後処理に相当する［W14-4］。もちろんより正確な一致領域を調べる必要はあり、著者らはこの目的のために BLAST[19] を用いる。

と、45,853 bp からなる sequence3.fa の［1, 4884 bp］と［40967, 45853 bp］の範囲が 99% 一致となっていることがわかる［W15-9］。重複除去の選択肢は、以下に示すように概ね 4,884 通り存在する：

配列相同性検索（BLAST）

・［4885, 45853 bp］を残す

谷澤ら, *日本乳酸菌学会誌*, **27**: 101–110, 2016

Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

第7回原稿p107の左上

①BLASTを（トリッキーな使い方だが）sequence3.faの重複領域の正確な情報を得る目的で利用する

配列相同性検索（BLAST）

BLAST（Basic local alignment search tool）は、局所的なアラインメント（local alignment）を行うプログラムである。問い合わせ（query）配列と呼ばれる手元の塩基配列またはアミノ酸配列の特徴や性質を把握する目的で、GenBank などの公共塩基配列 DB に対して検索を行ったことがある人は多いだろう。プログラム内部では、query 配列と似たものがあるかどうかを DB 配列に対して検索し、指定した閾値を満たす query 側と DB 側の部分配列のアラインメント結果が出力される。ここでは、query 側および DB 側の配列を sequence3.fa として、（Bio-Linux にプレインストールされている）BLAST を実行する[20]。同一配列間の比較なので、トップヒット（top hit）は sequence3 の全長配列間で 100% 一致のアラインメントとなる。今詳細に調べたいアラインメント結果は、セカンドヒットの「最初と最後の約 5,000 bp の重複配列」である。

①

- ［4885, 45853 bp］を残す
  （最初の 4884 bp、および最後の 0 bp 分をトリム）
- ［4884, 45852 bp］を残す
  （最初の 4883 bp、および最後の 1 bp 分をトリム）
- ［4883, 45851 bp］を残す
  （最初の 4882 bp、および最後の 2 bp 分をトリム）

…

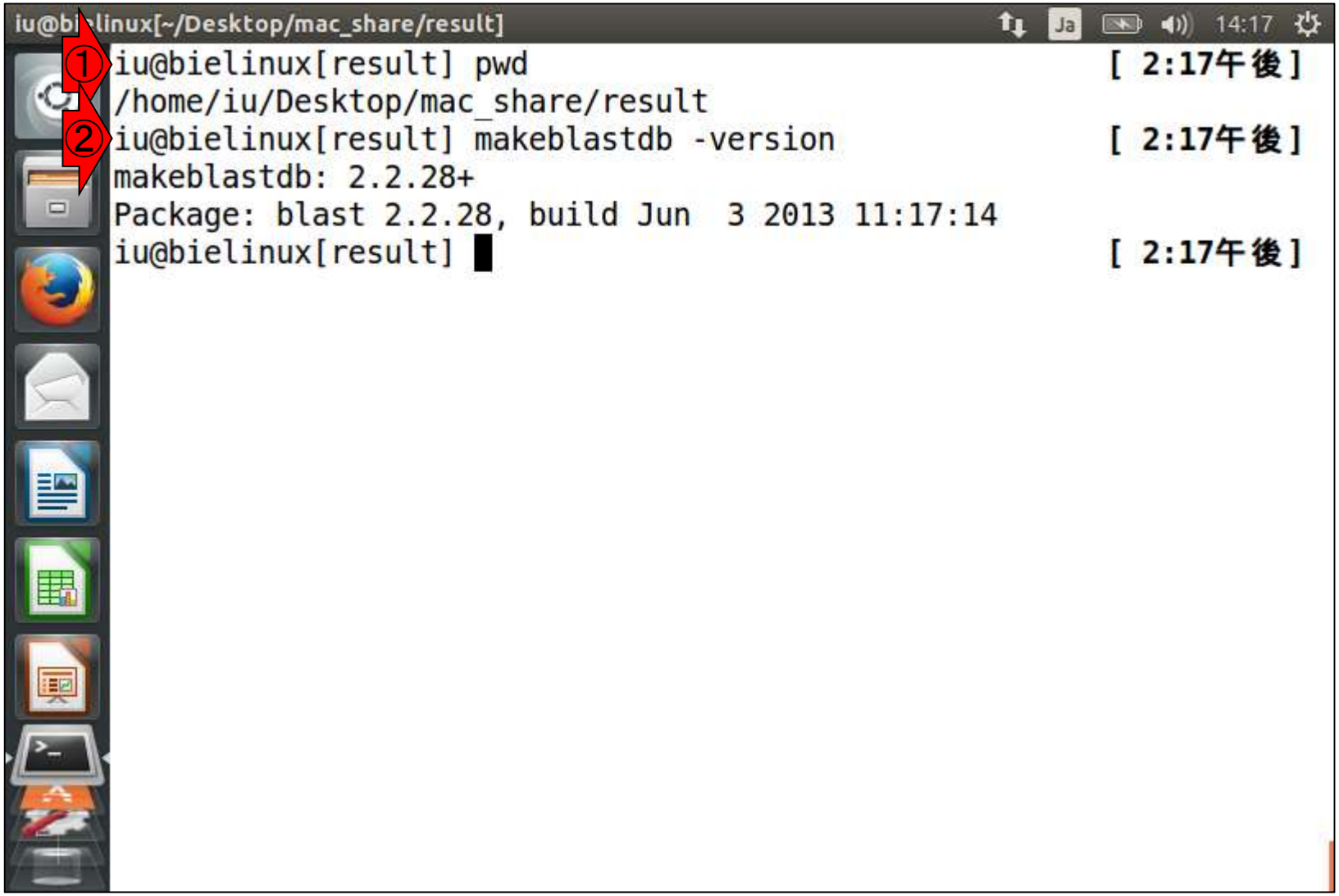
- ［3, 40968 bp］を残す
  （最初の 2 bp、および最後の 4885 bp 分をトリム）
- ［2, 40967 bp］を残す
  （最初の 1 bp、および最後の 4886 bp 分をトリム）
- ［1, 40966 bp］を残す
  （最初の 0 bp、および最後の 4887 bp 分をトリム）

概ねとした理由は、［1, 4884 bp］と［40967, 45853 bp］の範囲のアラインメント結果には Gap が含まれており、この Gap の取り扱いに関する不確定要素があるためで

Altschul et al., *J Mol Biol.*, **215**: 403–410, 1990

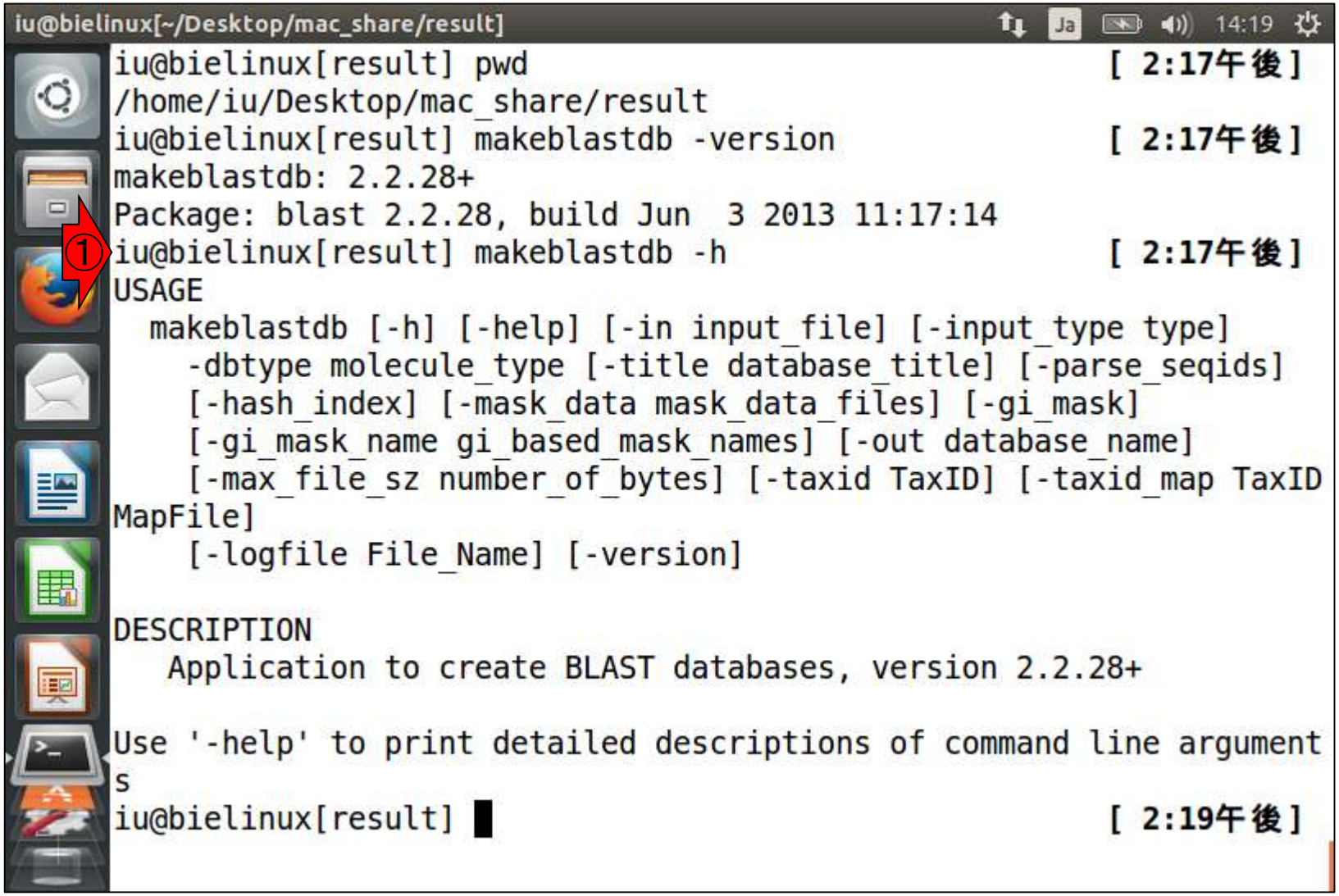
W15-1：makeblastdb

①作業ディレクトリはどこでもよい。②
makeblastdbのバージョンは2.2.28+



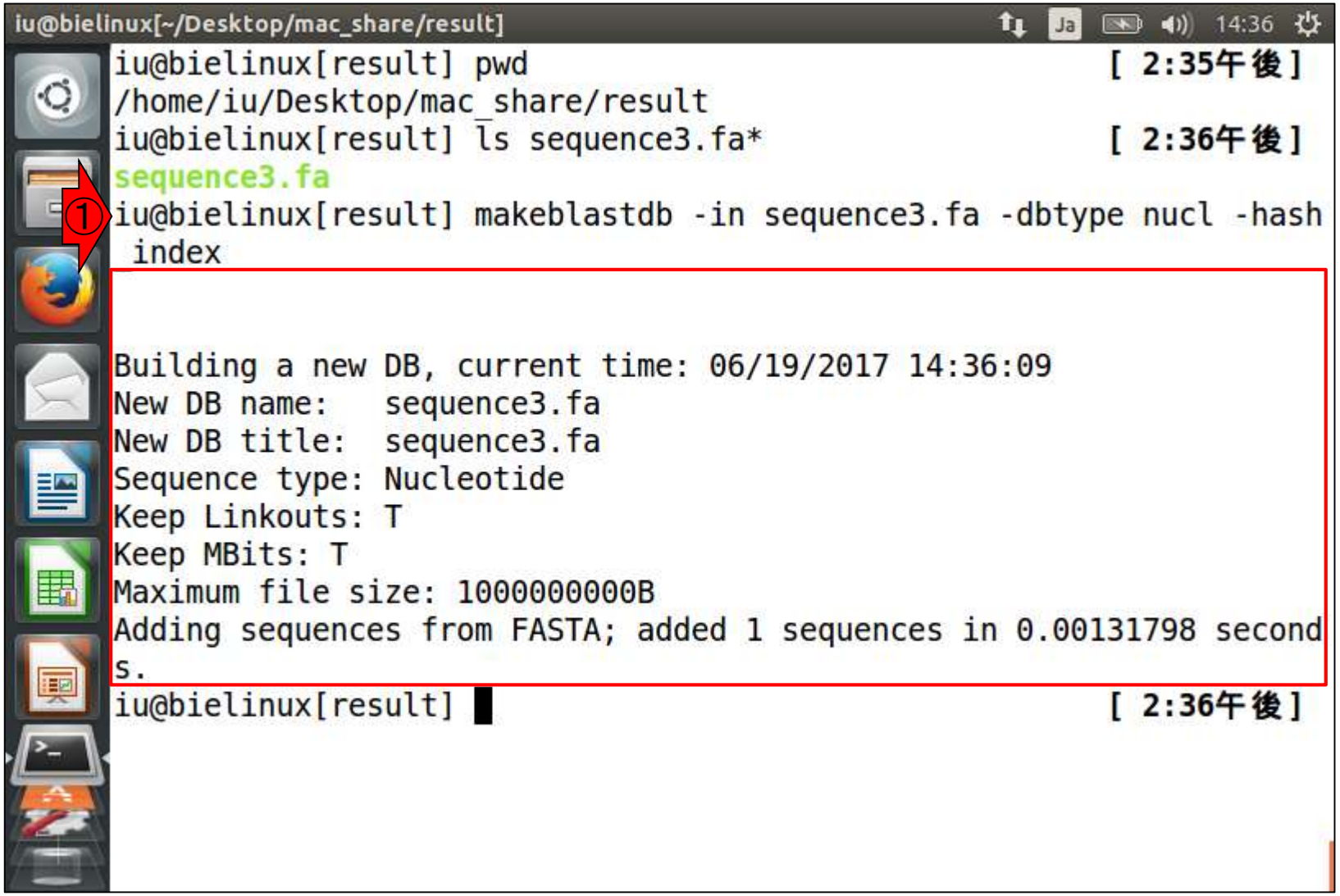
W15-1：makeblastdb

①「-h」で大まかな利用法(usage)を確認。
②より詳細な説明は「-help」で出るようだ



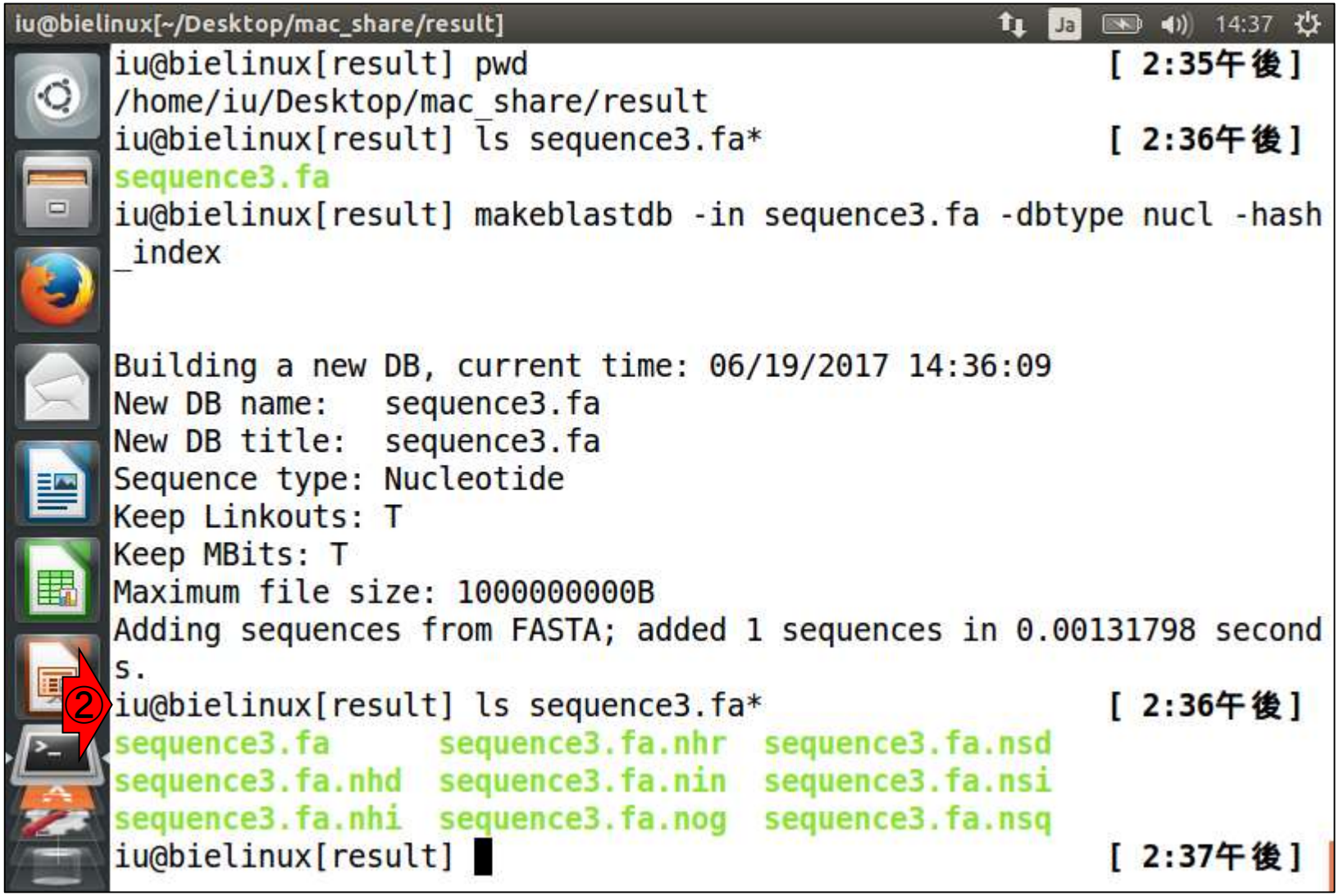
W15-1：makeblastdb

①makeblastdb本番。入力はsequence3.fa。塩基配列であることを示すnuclを-dbtypeオプションで指定



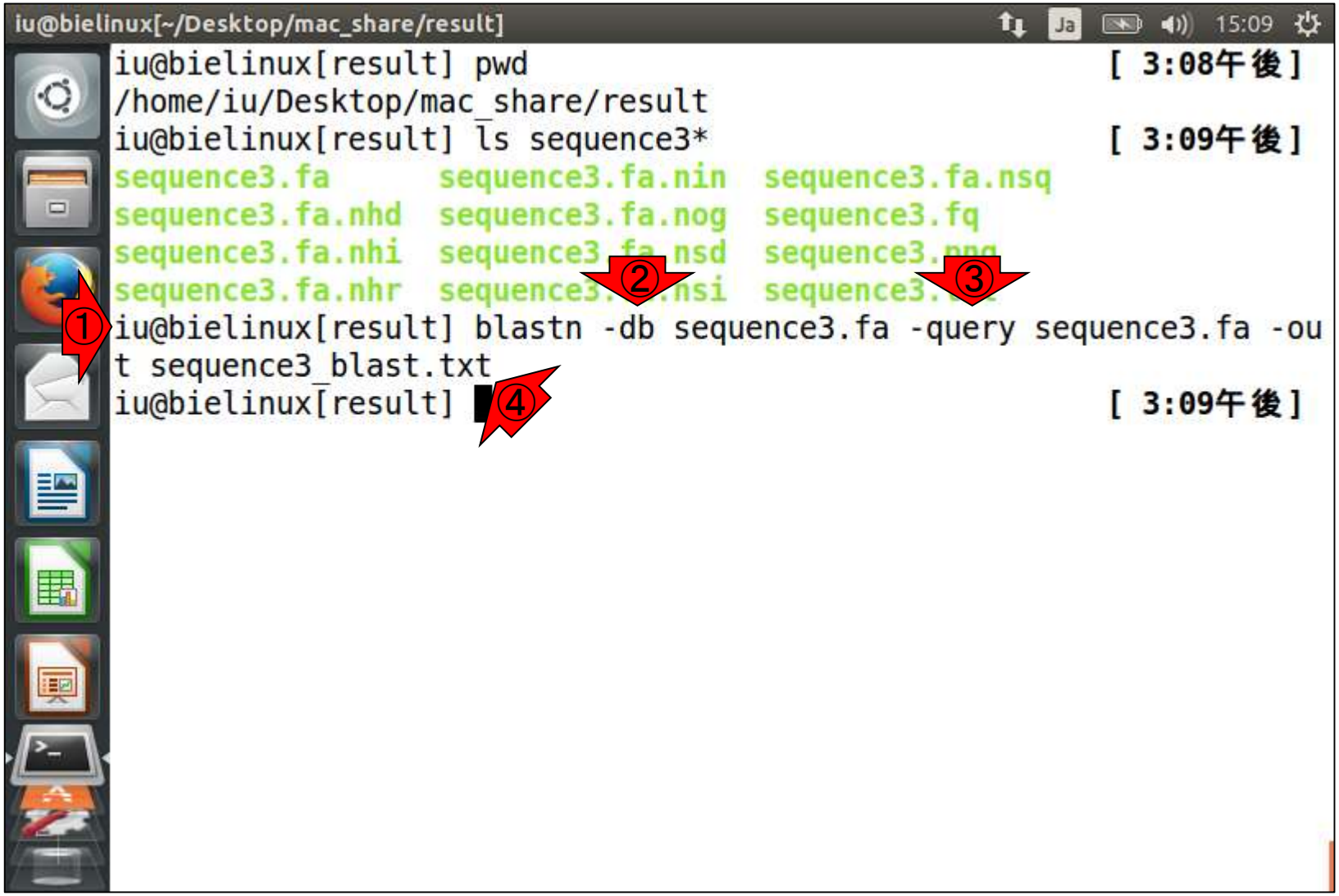
W15-1：makeblastdb

①実行後は、sequence3.fa.n*というファイルが8個作成されている



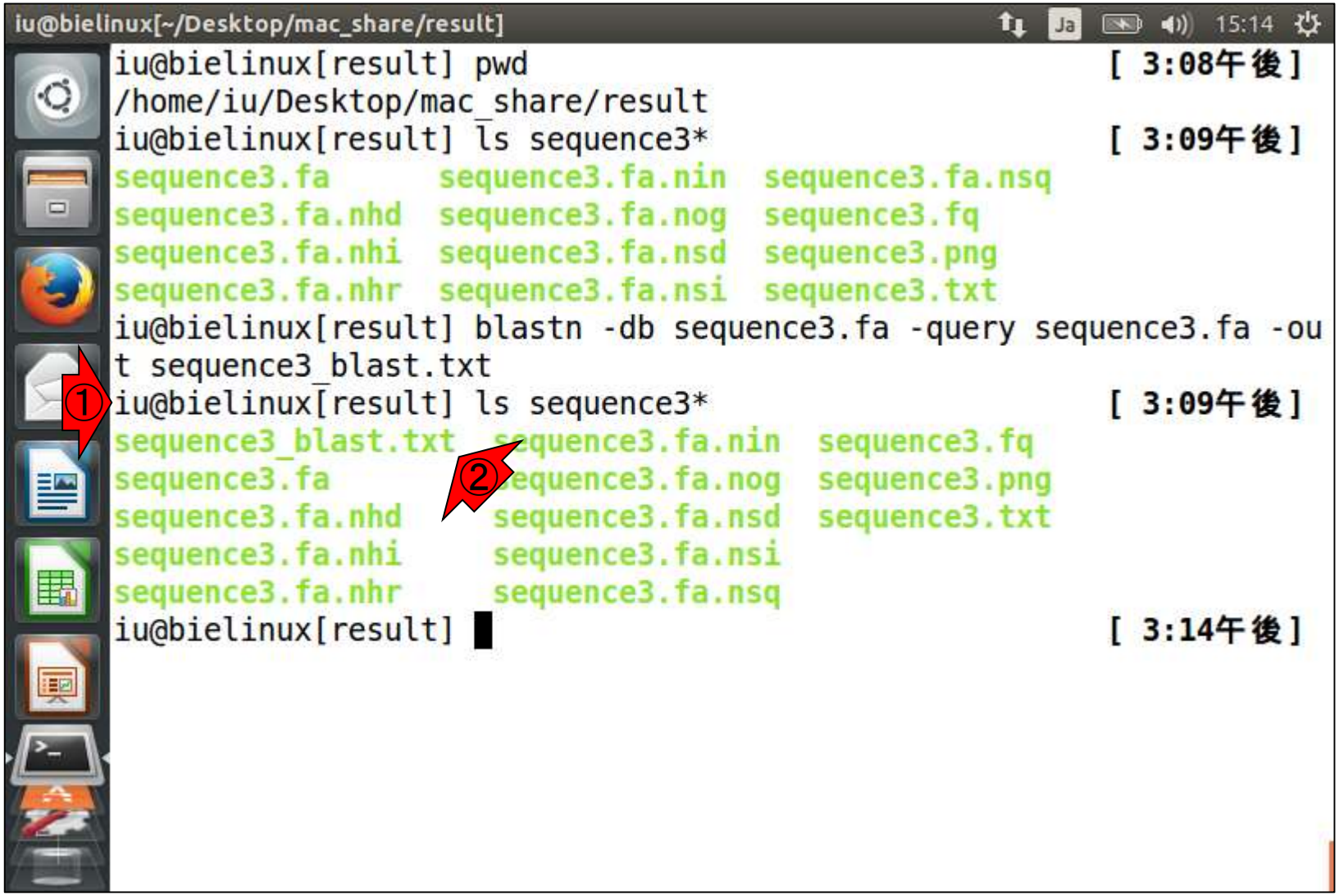
W15-2：blastn

①blastnを実行。②DB側、③query側はともにsequence3.fa。④出力ファイル名はsequence3_blast.txt。計算は一瞬



W15-2：blastn

①lsで確認。確かに②出力ファイル(sequence3_blast.txt)があります

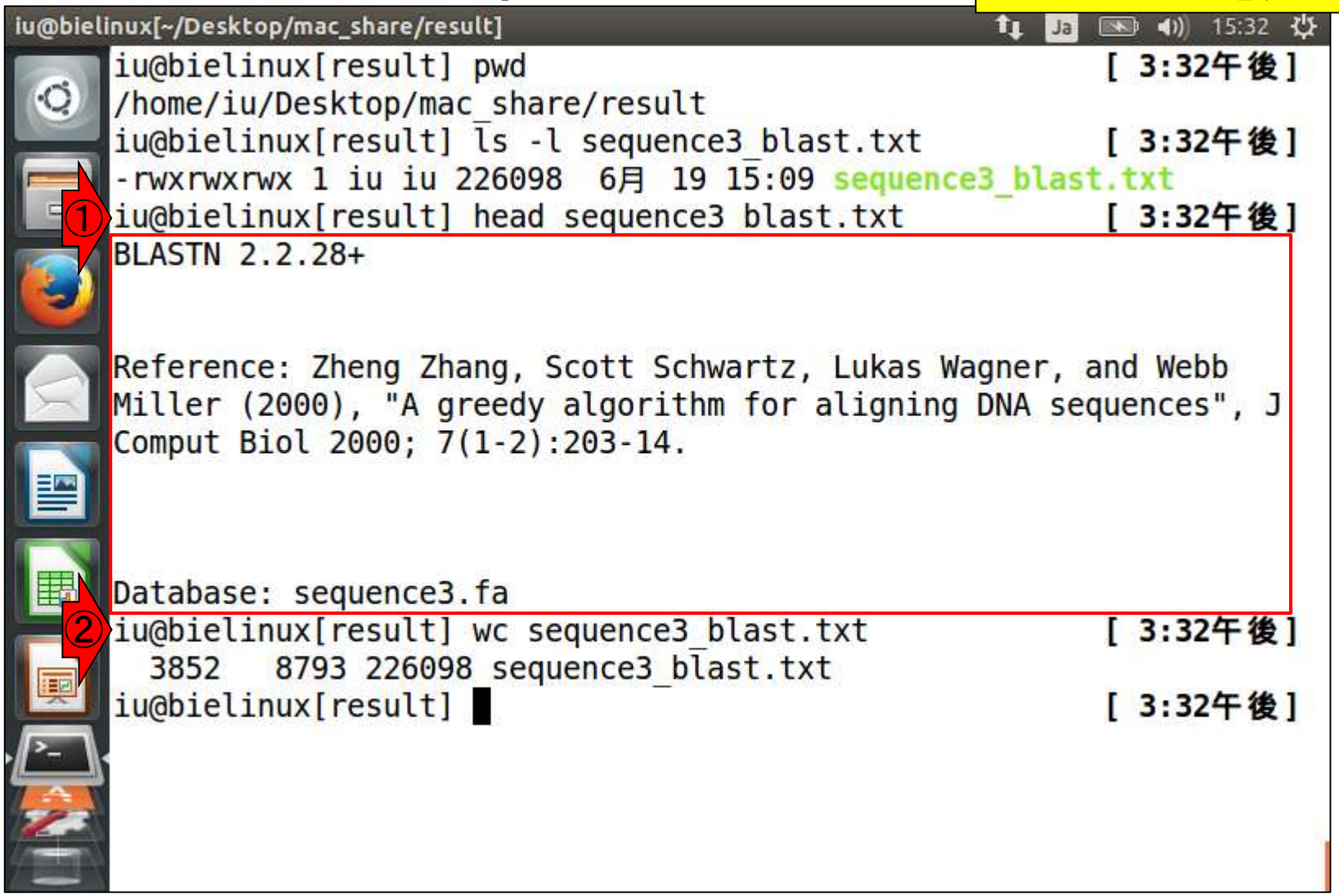


Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

W15-3：結果を眺める

blastn実行結果ファイルを眺めるべく、①sequence3_blast.txtの最初の10行分（デフォルトが10行）を表示。②行数は3,852行



W15-3：結果を眺める

sequence3_blast.txtを適当なテキストエディタで概観。①1つ前のスライドの赤枠と同じ部分

```
BLASTN 2.2.28+


Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb
Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J
Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.



Database: sequence3.fa
           1 sequences; 45,853 total letters



Query= sequence3

Length=45853

                                                                  Score        E
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)     Value

  sequence3                                                       8.468e+04  0.0


> sequence3
Length=45853

 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
```

①

W15-3：結果を眺める

①DB側の配列はsequence3.fa、②query側の配列もsequence3.fa。長さは45,853 bp

```
BLASTN 2.2.28+


Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb
Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J
Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.



Database: sequence3.fa
           1 sequences; 45,853 total letters



Query= sequence3

Length=45853

                                                                  Score        E
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)     Value

  sequence3                                                       8.468e+04  0.0


> sequence3
Length=45853

 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
```

W15-3：結果を眺める

①トップヒットのアラインメント結果の概要。
トップヒット(top hit)はsequence3の全長配列間で100%一致のアラインメントなので、
②「Identities = 45853/45853 (100%)」

```
BLASTN 2.2.28+


Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb
Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J
Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.



Database: sequence3.fa
           1 sequences; 45,853 total letters

② Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
  Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
  Strand=Plus/Plus

Query= sequence3

Length=45853

                                                                  Score        E
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)     Value

  sequence3                                                       8.468e+04  0.0


> sequence3
Length=45853

 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
```

① (Score = 8.468e+04 bits (45853), Expect = 0.0 / Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%) / Strand=Plus/Plus)

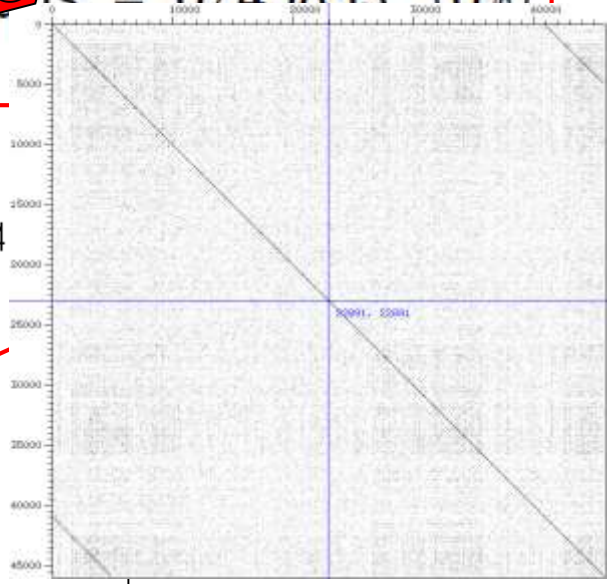
W15-3：結果を眺める

トップヒットのアラインメント結果は、①dotterによるドットプロット（W14-4）の左上から右下にかけての対角線に相当します

```
BLASTN 2.2.28+


Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb
Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J
Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.



Database: sequence3.fa
           1 sequences; 45,853 total letters


Query= sequence3

Length=45853

                                                                  Score
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)

  sequence3                                                       8.468e+04


> sequence3
Length=45853

 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
```

```
 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus
```

①



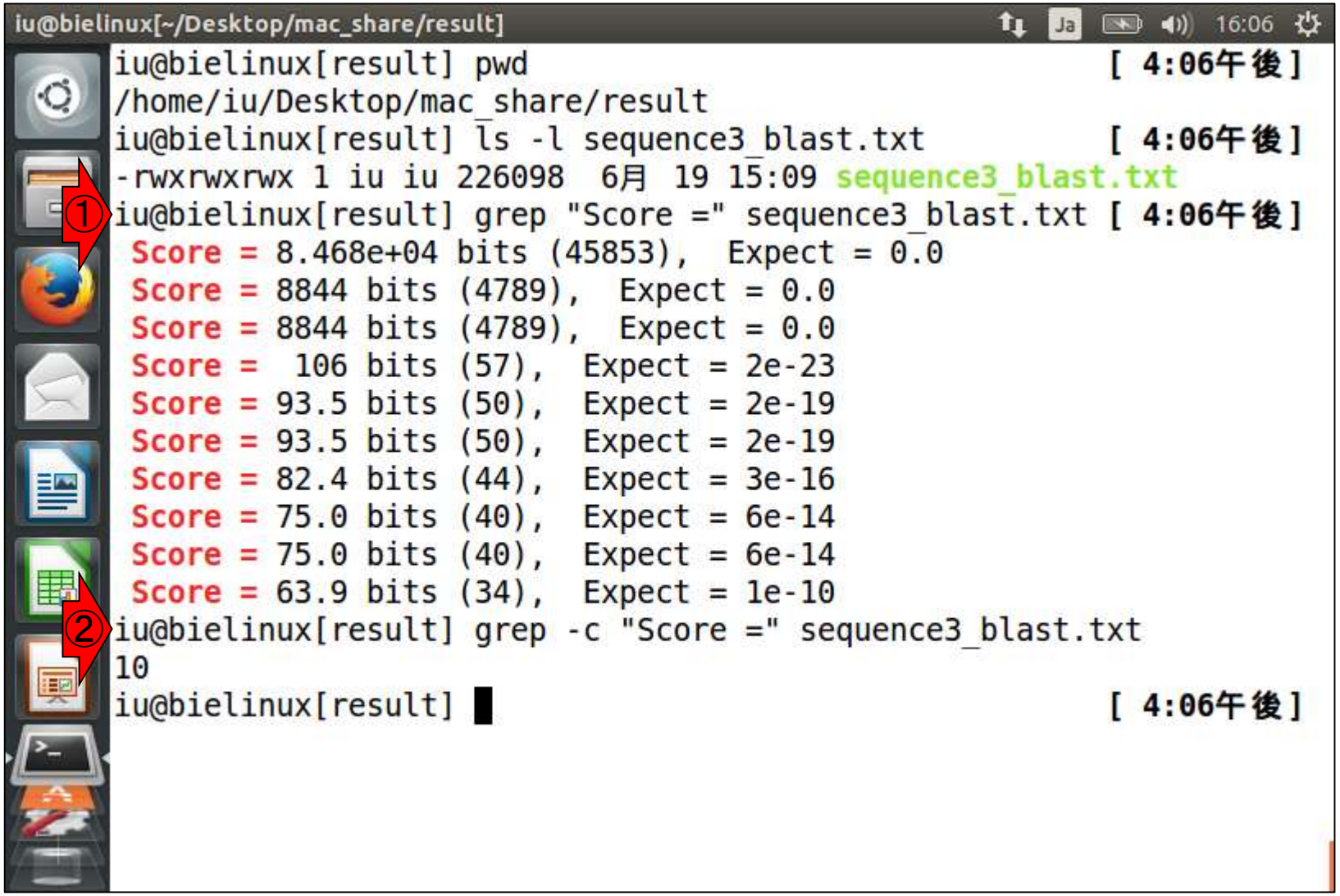
W15-4：ヒット数

①BLAST結果ファイル中のヒット総数を把握したい場合は、”Score =”という文字列を含む行数をgrepで調べればよい

```
BLASTN 2.2.28+


Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb
Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J
Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.



Database: sequence3.fa
           1 sequences; 45,853 total letters

①  Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
   Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
   Strand=Plus/Plus

Query= sequence3

Length=45853

                                                                  Score        E
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)     Value

  sequence3                                                       8.468e+04  0.0


> sequence3
Length=45853

 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCAA  60
```

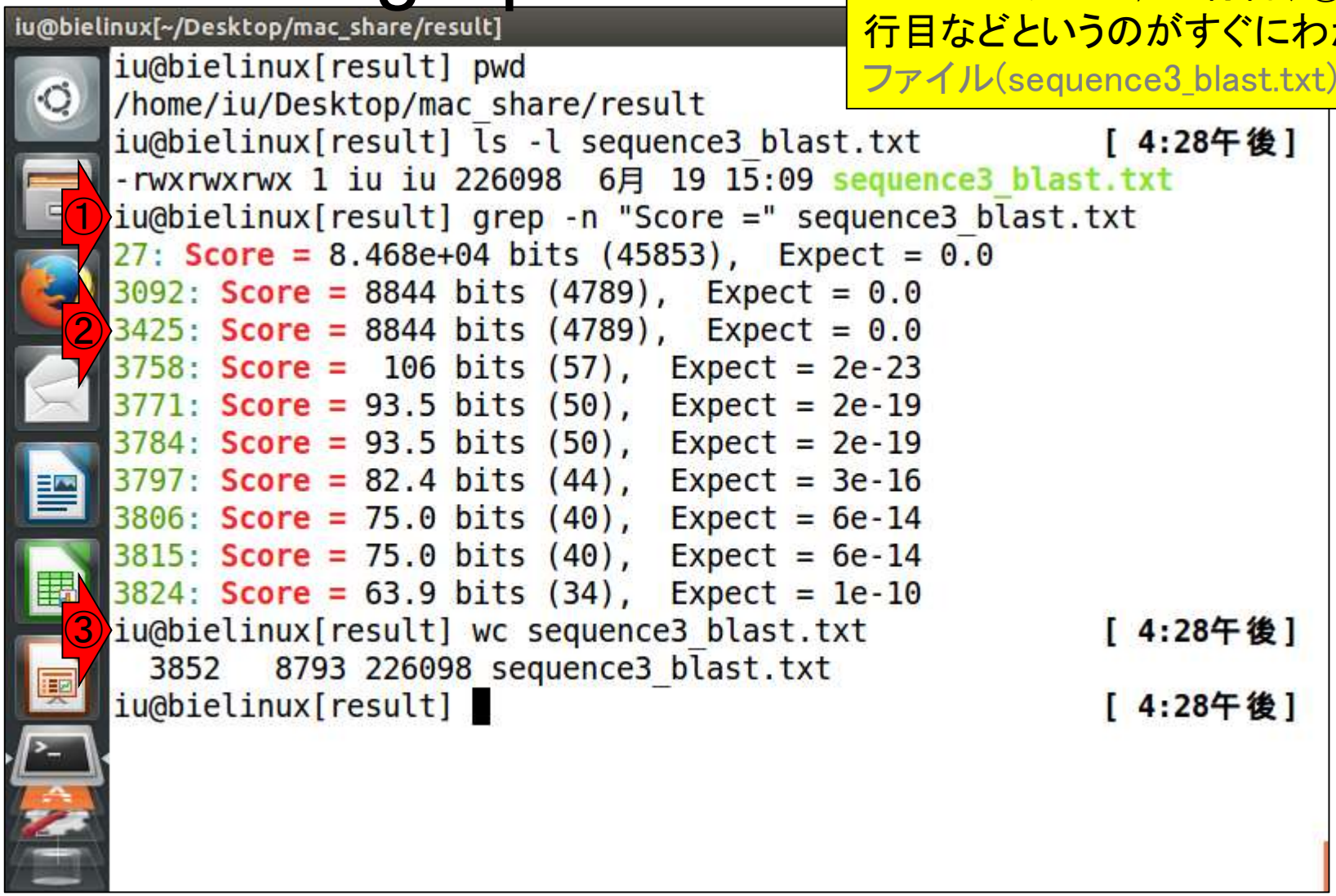
W15-4：ヒット数

①”Score =”という文字列を含む行を表示。
②その行数は10個。つまりヒット数は10



W15-5：grep -n

①grep実行時に-nをつけることで検索文字列（この場合”Score =”）を含む行番号を表示。例えばセカンドヒットは3,092行目、②サードヒットは3,425行目などというのがすぐにわかる。③BLAST結果ファイル(sequence3_blast.txt)は3,852行だった



W15-6：grep -A

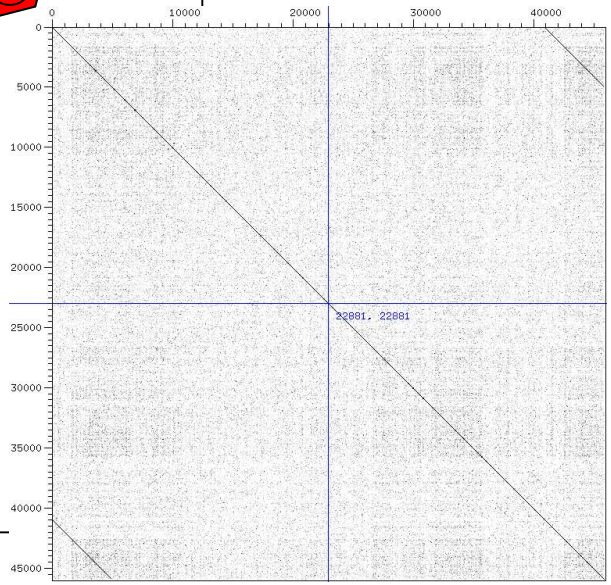
①grep -Aオプションで一致した行を含め後ろの3行分を表示。②1位は、一致領域が45,853 bpで100%一致、Gapsも0/45853。W14-4のドットプロットの③対角線の見栄えと一致

```
File  Edit  View  Search  Terminal  Help                    Ja  17:50
iu@bielinux[result] grep -A 3 "Score =" sequence3_blast.txt
 Score = 8.468e+04 bits (45853),  Expect = 0.0
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

--
 Score = 8844 bits (4789),  Expect = 0.0
 Identities = 4869/4901 (99%), Gaps = 31/4901 (1%)
 Strand=Plus/Plus

--
 Score = 8844 bits (4789),  Expect = 0.0
 Identities = 4869/4901 (99%), Gaps = 31/4901 (1%)
 Strand=Plus/Plus

--
 Score =  106 bits (57),  Expect = 2e-23
 Identities = 68/73 (93%), Gaps = 2/73 (3%)
 Strand=Plus/Minus

--
```

①

②

③



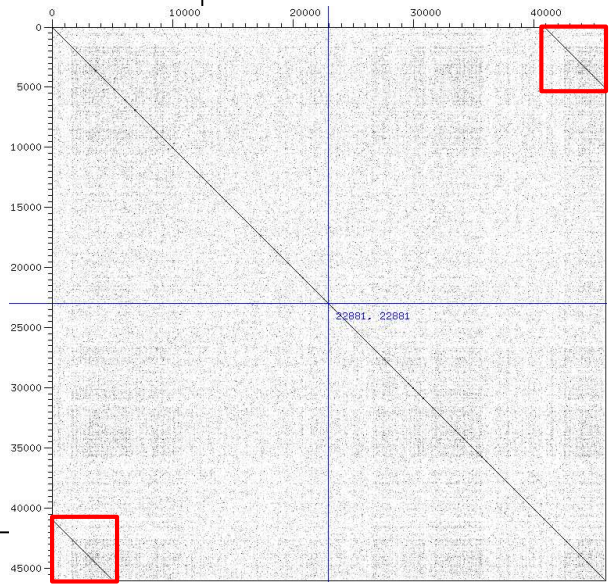
W15-6：grep -A

同率2位の①と②の2つのヒットは、一致領域が4,901 bpとなっており、W14-4のドットプロット上の2つの赤四角の見栄えと一致する。どちらがどちらに相当するかは、W15-5で得られたセカンドヒットの3,092行目以降、サードヒットの3,425行目以降のアラインメントを眺めればわかる

```
File  Edit  View  Search  Terminal  Help
iu@bielinux[result] grep -A 3 "Sco
 Score = 8.468e+04 bits (45853),
 Identities = 45853/45853 (100%), Gaps = 0/45853 (0%)
 Strand=Plus/Plus

--
 Score = 8844 bits (4789),  Expect = 0.0
 Identities = 4869/4901 (99%), Gaps = 31/4901 (1%)
 Strand=Plus/Plus

--
 Score = 8844 bits (4789),  Expect = 0.0
 Identities = 4869/4901 (99%), Gaps = 31/4901 (1%)
 Strand=Plus/Plus

--
 Score =  106 bits (57),  Expect = 2e-23
 Identities = 68/73 (93%), Gaps = 2/73 (3%)
 Strand=Plus/Minus

--
```

①

②



第7回原稿p107の左中

①今はこのあたりの話。これから②のアラインメント結果を詳細に眺め、重複除去ポイントを探る

のアラインメント結果が出力される。ここでは、query 側および DB 側の配列を sequence3.fa として、（Bio-Linux にプレインストールされている）BLAST を実行する[20]。同一配列間の比較なので、トップヒット（top hit）は sequence3 の全長配列間で 100% 一致のアラインメントとなる。今詳細に調べたいアラインメント結果は、セカンドヒットの「最初と最後の約 5,000 bp の重複配列」である。これらの予想は、図 1b のドットプロットを事前に眺めておけば立てられる。ドットプロットは、コンティグの全体像の理解に役立つだけでなく、BLAST 実行結果の理解の助けにもなる。補足情報的な位置づけではあるが、なるべく併用するといいだろう。

BLAST の実行は、① DB 側配列の BLAST 用 DB への変換、および② query 配列の相同性検索の 2 ステップで完了する［W15］。具体的には、①では makeblastdb コマンドで DB 側配列である sequence3.fa を入力として、BLAST 用 DB（インデックスファイル）を作成する［W15-1］。②では、query 側と DB 側の配列の種類（塩基配列またはアミノ酸配列）や目的に応じて、以下に示す 5 つのプログラムを使い分ける：

（最初の 1 bp、および最後の 4886 bp 分をトリム）

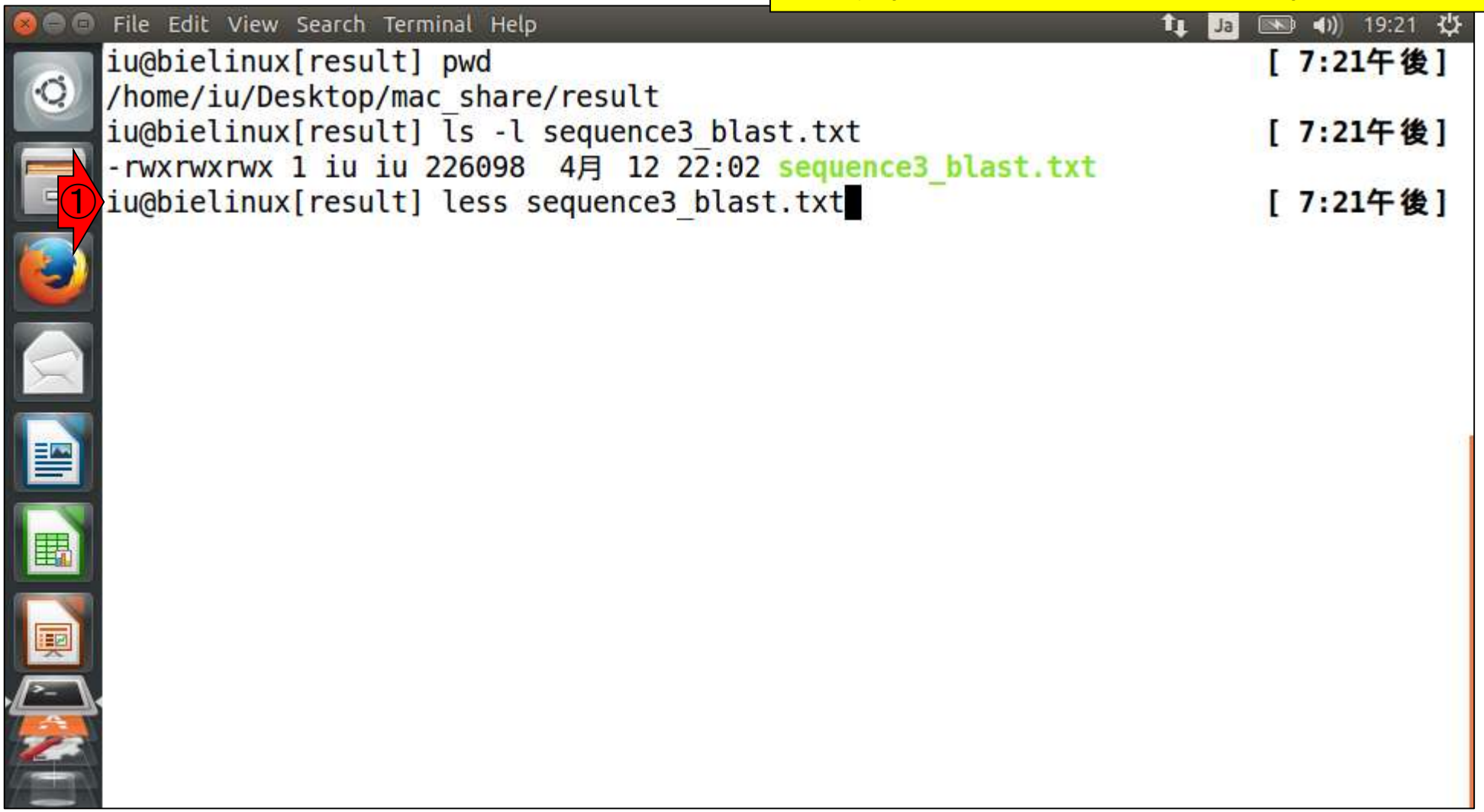
・［1, 40966 bp］を残す

（最初の 0 bp、および最後の 4887 bp 分をトリム）

概ねとした理由は、［1, 4884 bp］と［40967, 45853 bp］の範囲のアラインメント結果には Gap が含まれており、この Gap の取り扱いに関する不確定要素があるためである。範囲と塩基数の関係や計算法を含めて混乱しがちなところではあるが、始端側の［1, 4884 bp］の塩基数は（4884－1＋1）＝4884 bp と計算し、終端側の［40967, 45853 bp］の塩基数は（45853－40967＋1）＝4887 bp と計算する。アラインメント結果の始端側と終端側の塩基数が異なるのは、結論としては Gap 数の違いに起因するためであり、気にしなくてよい。実際に我々が行う重複除去は、概ね両側から同数程度の塩基のトリムである。その理由は、アセンブリ結果として得られるコンティグの末端部分のクオリティは、中央部分に比べて低いためである（図 1a; W11-9）。重複塩基数が 4900 bp 程度であることを踏まえ、BLAST アラインメント結果のセカンドまたはサードヒットの 2400-2500 番目付近を眺め、Gap やミス

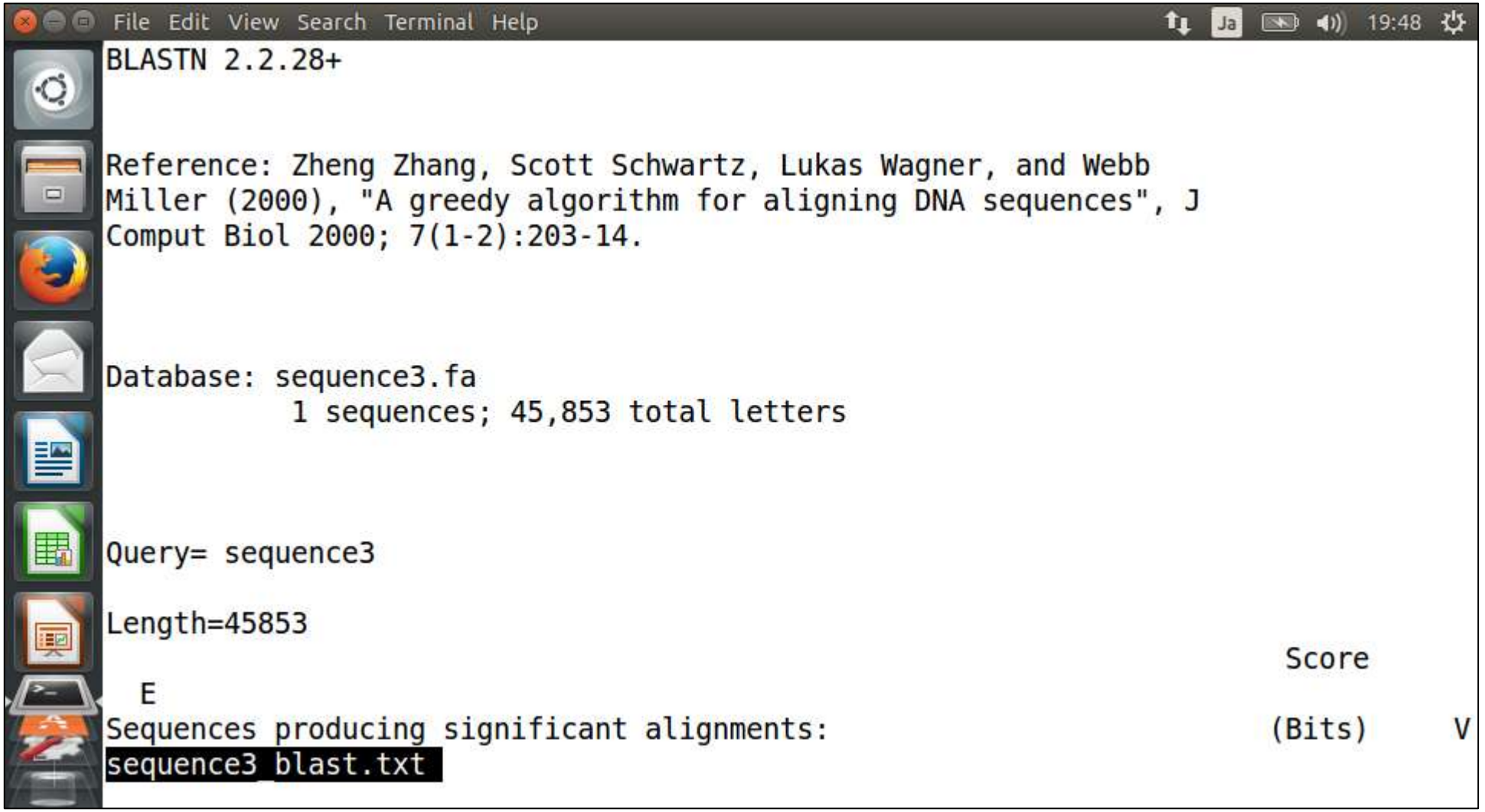
W15-7 : less

lessコマンドでsequence3_blast.txtを開き、Score =で検索。画面の横幅を広めにとっておいたほうがよい。第3回のW14-6-2に文字列検索のやり方あり



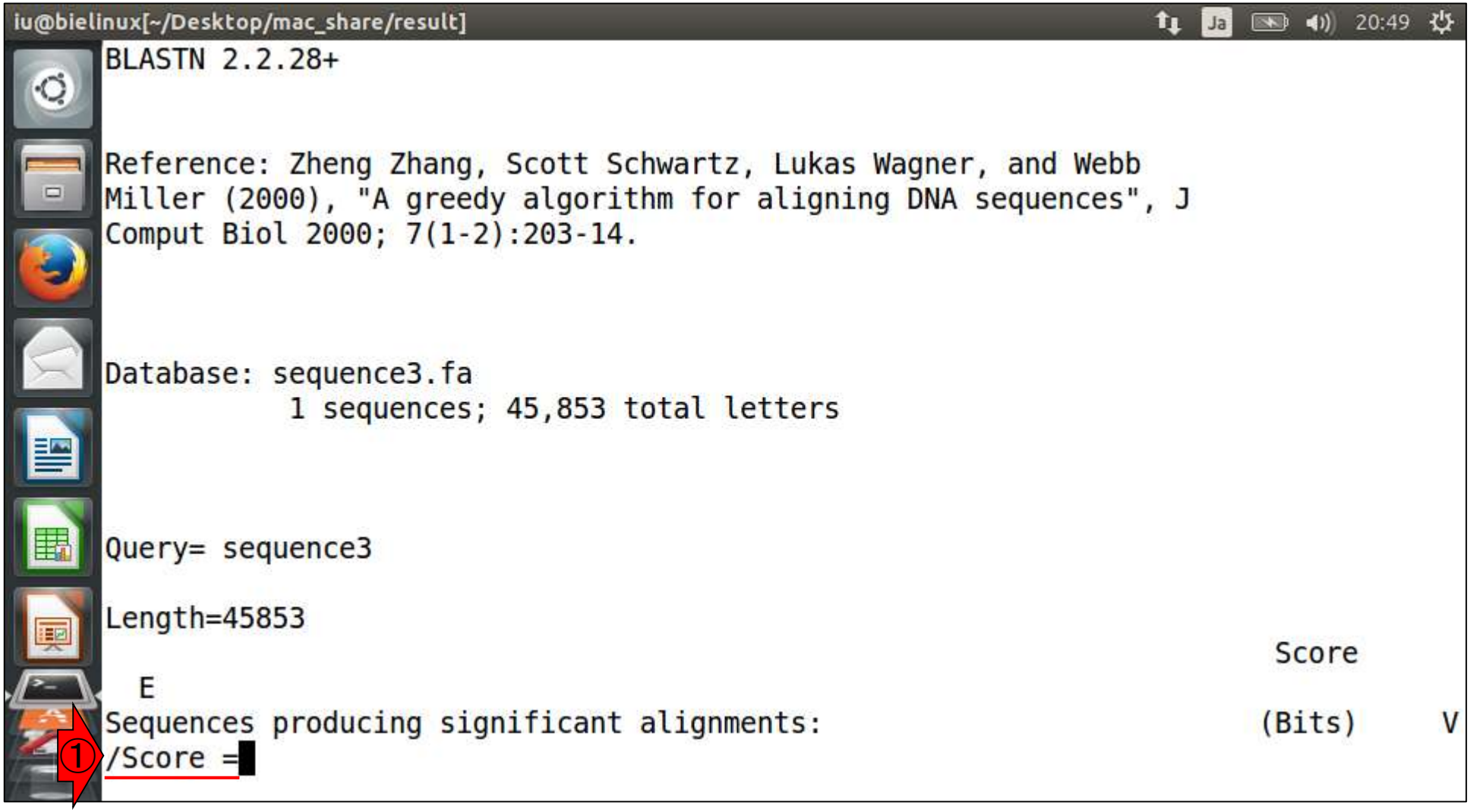
lessコマンドでsequence3_blast.txtを開いた直後

W15-7 : less



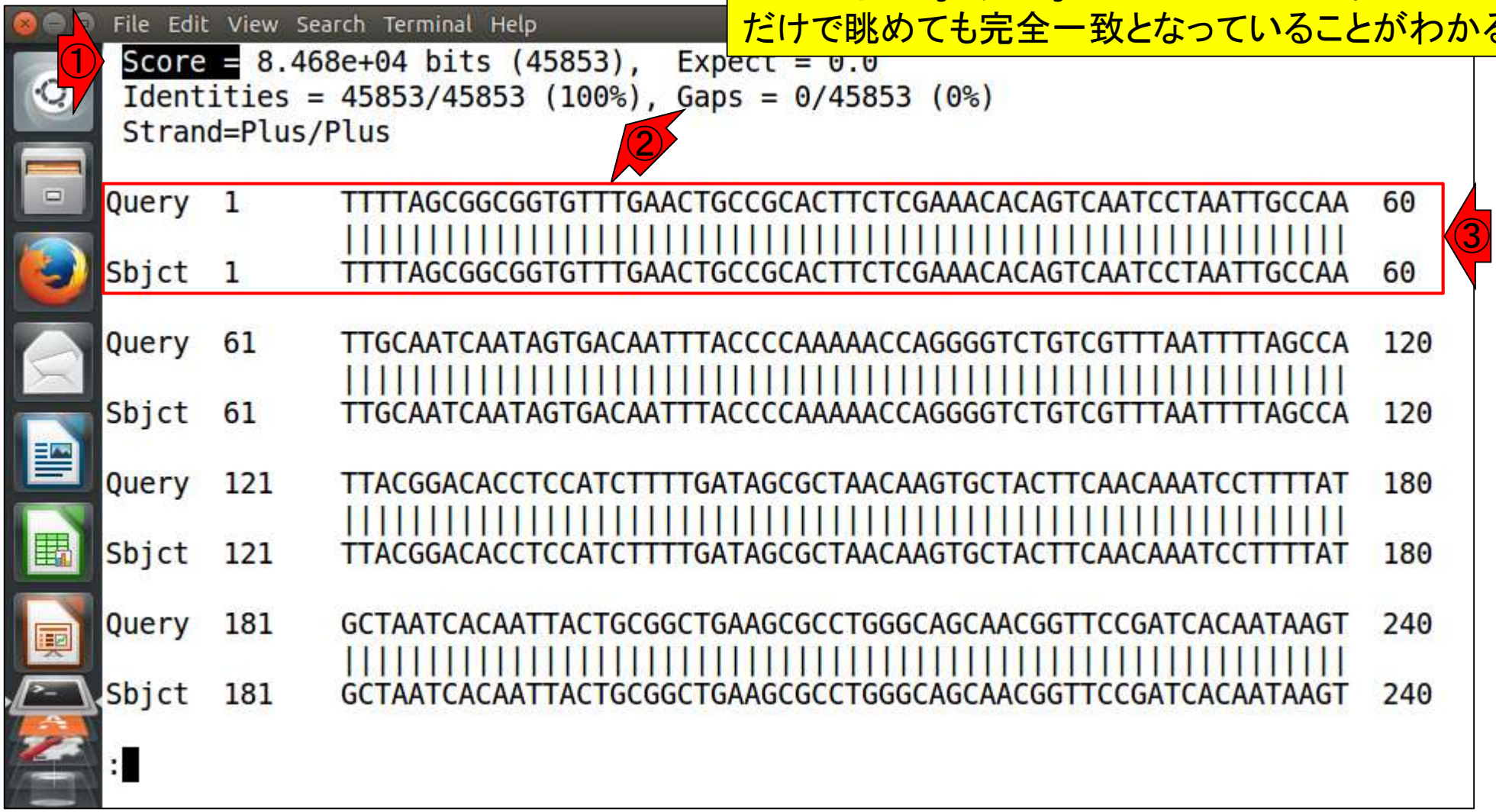
①「/Score =」と打って、Score =という文字列を検索

W15-7 : less



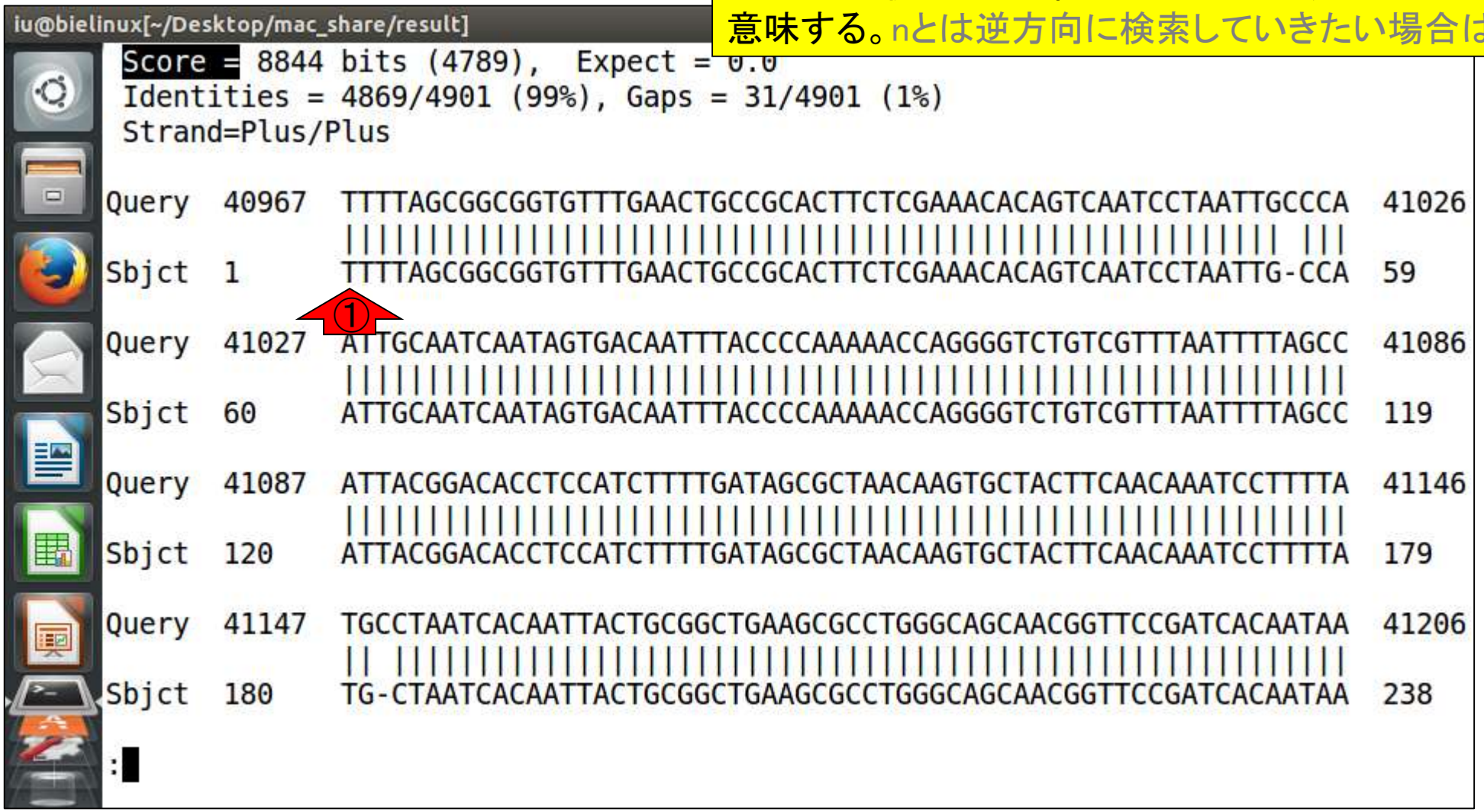
W15-7 : less

①トップヒットのものが最初に見える。②全長の45,853 bp全てで完全一致なので、③queryの1-60番目の塩基とDB側(Sbjct; Subjectの意味)の1-60番目の塩基だけで眺めても完全一致となっていることがわかる



W15-8：less

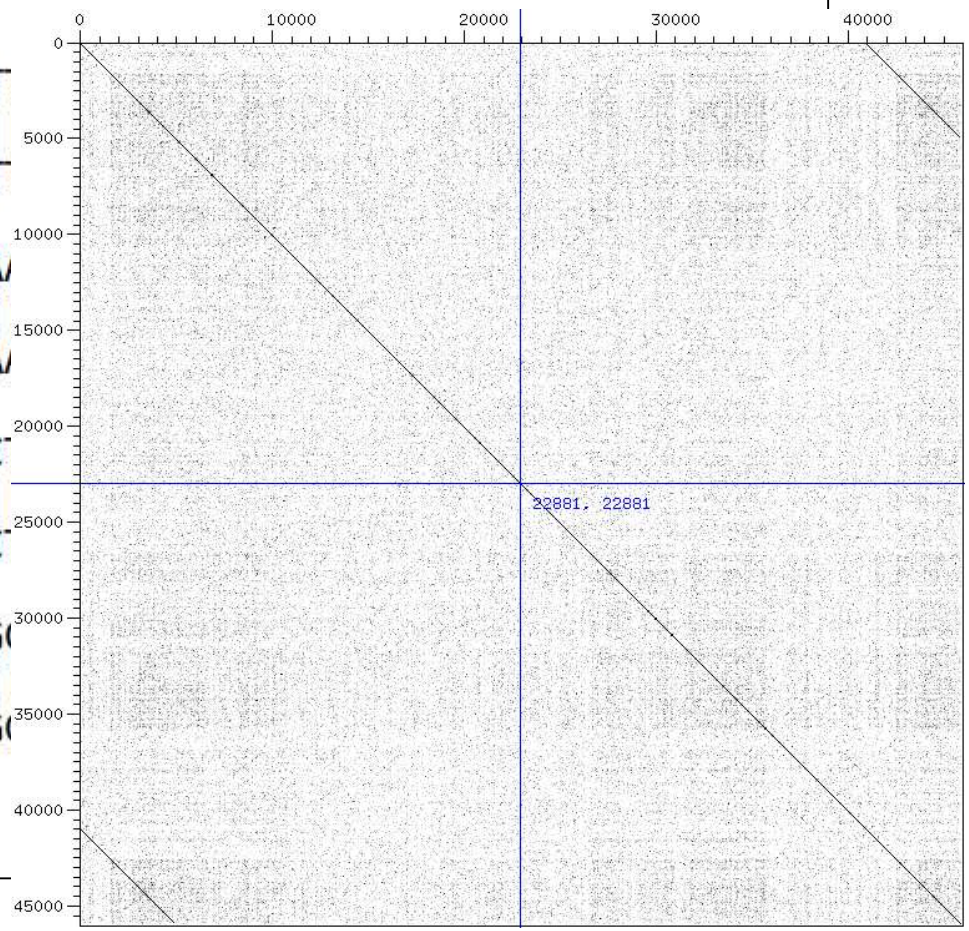
「n」と打って、2番目に一致するScore =が先頭行にくるページを表示した結果。①query配列の40,967番目の塩基がDB側配列の1番目の塩基と一致していることを意味する。nとは逆方向に検索していきたい場合はN



W15-8 : less

①query配列の40,967番目の塩基は、
②のあたりのポジションに相当します

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  21:13
 Score = 8844 bits (4789),  Expect = 0.0
 Identities = 4869/4901 (99%), Gaps = 31/4901 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  40967  TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACT
              ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACT

Query  41027  ATTGCAATCAATAGTGACAATTTACCCCAA
              ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  60     ATTGCAATCAATAGTGACAATTTACCCCAA

Query  41087  ATTACGGACACCTCCATCTTTTGATAGCGC
              ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  120    ATTACGGACACCTCCATCTTTTGATAGCGC

Query  41147  TGCCTAATCACAATTACTGCGGCTGAAGCG
              || ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  180    TG-CTAATCACAATTACTGCGGCTGAAGCG

:
```



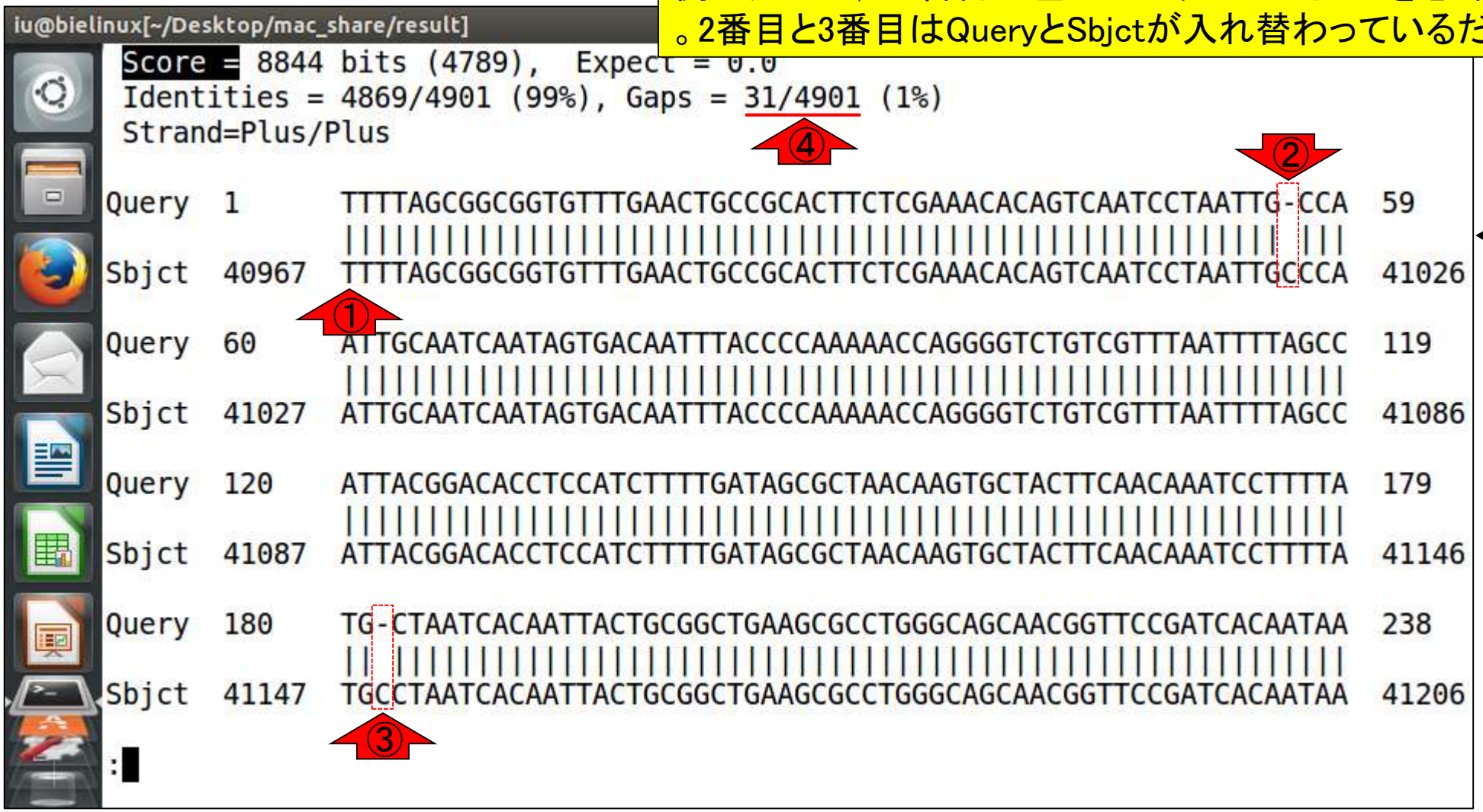
W15-8 : less

②や③のように、DB側(Sbjct)のところどころでGapが見られる。が、④全体で4,901 bpのアラインメントのうち31個だけGapがあった程度なので、実質的に無視でよい

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  21:13
 Score = 8844 bits (4789),  Expect = 0.0
 Identities = 4869/4901 (99%), Gaps = 31/4901 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  40967  TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTGCCCA  41026
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  1      TTTTAGCGGCGGTGTTTGAACTGCCGCACTTCTCGAAACACAGTCAATCCTAATTG-CCA  59

Query  41027  ATTGCAATCAATAGTGACAATTTACCCCAAAAACCAGGGGTCTGTCGTTTAATTTTAGCC  41086
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  60     ATTGCAATCAATAGTGACAATTTACCCCAAAAACCAGGGGTCTGTCGTTTAATTTTAGCC  119

Query  41087  ATTACGGACACCTCCATCTTTTGATAGCGCTAACAAGTGCTACTTCAACAAATCCTTTTA  41146
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  120    ATTACGGACACCTCCATCTTTTGATAGCGCTAACAAGTGCTACTTCAACAAATCCTTTTA  179

Query  41147  TGCCTAATCACAATTACTGCGGCTGAAGCGCCTGGGCAGCAACGGTTCCGATCACAATAA  41206
              || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  180    TG-CTAATCACAATTACTGCGGCTGAAGCGCCTGGGCAGCAACGGTTCCGATCACAATAA  238

:
```

W15-8 : less

「n」と打って、3番目に一致するScore =が先頭行にくるページを表示した結果。①query配列の1番目の塩基がDB側配列の40,967番目の塩基と一致していることを意味する。2番目と3番目はQueryとSbjctが入れ替わっているだけ



W15-9 : less

上矢印キーを10回押し、10行分だけページ上部に移動した結果画面。セカンドヒットのアラインメント結果の最後のほうを確認するのが目的

W16-1:トリム候補領域

上矢印キーをさらに押し続け、（重複塩基数が4900 bp程度なのでその半分の）2400 – 2500番目付近を眺める。具体的には①の赤枠分くらいを眺め、どこにもミスマッチやGapがないことを確認

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]

Query   2390    GAATTATCAAGCTACGACTGGGGATTCGATATAGTC
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   43363   GAATTATCAAGCTACGACTGGGGATTCGATATAGTCCCTGGATTTAGAACTGTTGATGAT   43422

Query   2450    GAGCAGGGGTATTACTACTACATCATTCCAAATGGGAACGGCACTTGGGAAAAAACAGAT   2509
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   43423   GAGCAGGGGTATTACTACTACATCATTCCAAATGGGAACGGCACTTGGGAAAAAACAGAT   43482

Query   2510    CCGCGAATAGATCGTCAAAATTTAACAGAATATCAAAAAGAAACCCCAATTGATCTAAGA   2569
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   43483   CCGCGAATAGATCGTCAAAATTTAACAGAATATCAAAAAGAAACCCCAATTGATCTAAGA   43542

Query   2570    GAAGTAGTGCGCATTATCAAATATTGGAGAAAGGCTCATAACGCAGTATGTAAGCTTAAT   2629
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   43543   GAAGTAGTGCGCATTATCAAATATTGGAGAAAGGCTCATAACGCAGTATGTAAGCTTAAT   43602

Query   2630    TCTTATGCACTAGAGACCACGGTTCTTGACTTTATAGATACTAATCCAATATATTCCAAC   2689
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   43603   TCTTATGCACTAGAGACCACGGTTCTTGACTTTATAGATACTAATCCAATATATTCCAAC   43662
:
```

①

W16-1:トリム候補領域

①のところでトリムすることにする。左端にする理由は、上が2450番目、下が43423番目の塩基だとすぐにわかるから

W16-2:トリム後の配列

①2450番目の塩基をトリム後の1塩基目にする場合は、[2450, 43422 bp]を残せばよい。こうすることで、トリム後の塩基配列の最初のほうは①の赤枠のようになり、最後のほうは②のようになるはずである。③qで終了

第7回原稿p107の右中

今は①のあたり。1つ前のスライドで決めた領域のトリム（重複除去）を行う。混乱してきたら、W13-1を復習。このあと②トリムを実行します(W16-3)

sequence3 の全長配列間で 100% 一致のアラインメントとなる。今詳細に調べたいアラインメント結果は、セカンドヒットの「最初と最後の約 5,000 bp の重複配列」である。これらの予想は、図 1b のドットプロットを事前に眺めておけば立てられる。ドットプロットは、コンティグの全体像の理解に役立つだけでなく、BLAST 実行結果の理解の助けにもなる。補足情報的な位置づけではあるが、なるべく併用するといいだろう。

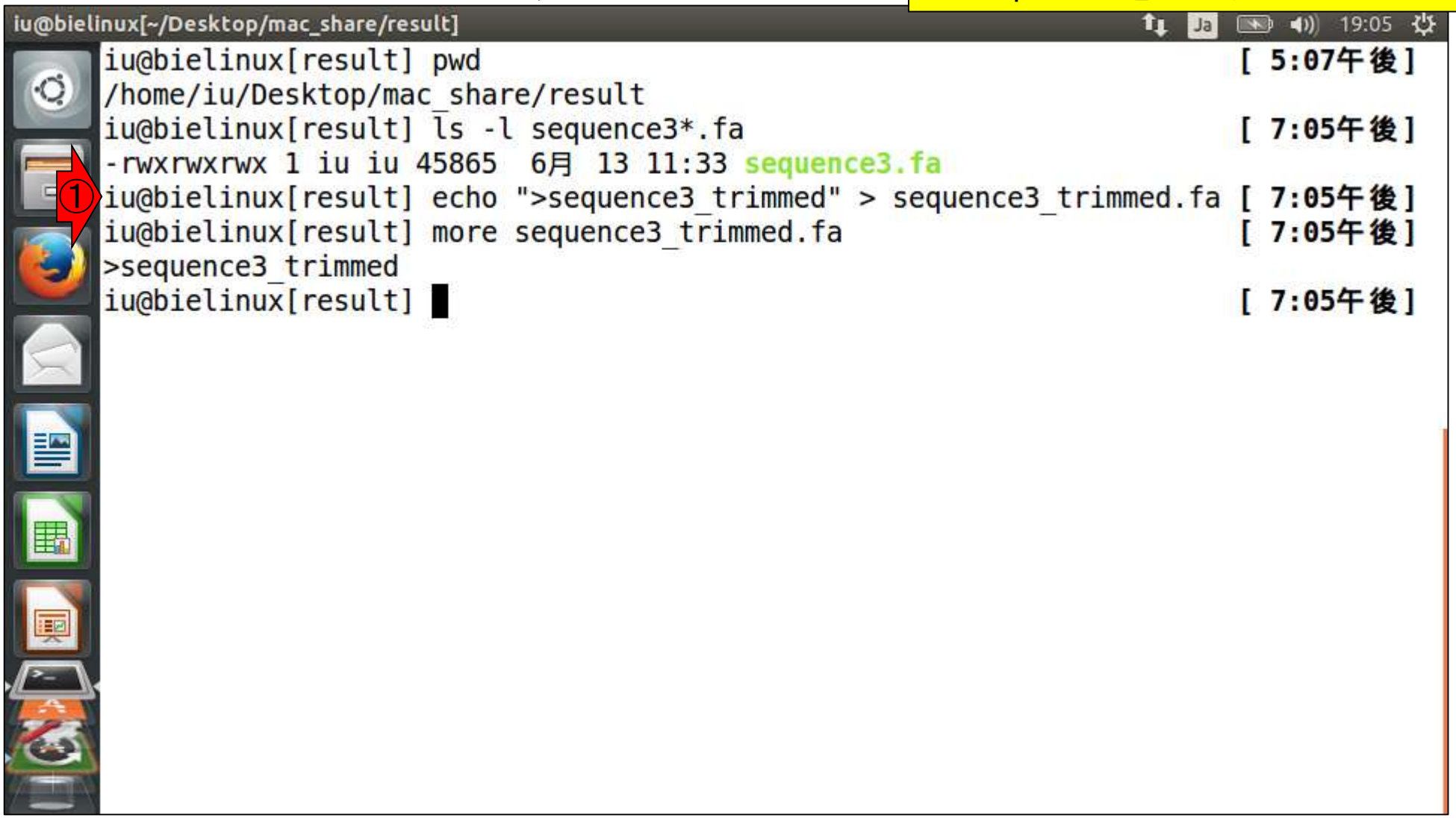
BLAST の実行は、① DB 側配列の BLAST 用 DB への変換、および② query 配列の相同性検索の 2 ステップで完了する［W15］。具体的には、①では makeblastdb コマンドで DB 側配列である sequence3.fa を入力として、BLAST 用 DB（インデックスファイル）を作成する［W15-1］。②では、query 側と DB 側の配列の種類（塩基配列またはアミノ酸配列）や目的に応じて、以下に示す 5 つのプログラムを使い分ける：

blastn：query 側、DB 側がともに塩基配列。
blastp：query 側、DB 側がともにアミノ酸配列。
blastx：query 側は塩基配列、DB 側はアミノ酸配列。query 配列をアミノ酸配列に翻訳して検索。

概ねとし
の範囲のアラインメント結果には Gap が含まれており、この Gap の取り扱いに関する不確定要素があるためである。範囲と塩基数の関係や計算法を含めて混乱しがちなところではあるが、始端側の［1, 4884 bp］の塩基数は（4884－1＋1）＝4884 bp と計算し、終端側の［40967, 45853 bp］の塩基数は（45853－40967＋1）＝4887 bp と計算する。アラインメント結果の始端側と終端側の塩基数が異なるのは、結論としては Gap 数の違いに起因するためであり、気にしなくてよい。実際に我々が行う重複除去は、概ね両側から同数程度の塩基のトリムである。その理由は、アセンブリ結果として得られるコンティグの末端部分のクオリティは、中央部分に比べて低いためである（図 1a; W11-9）。重複塩基数が 4900 bp 程度であることを踏まえ、BLAST アラインメント結果のセカンドまたはサードヒットの 2400-2500 番目付近を眺め、Gap やミスマッチのない領域でトリミング領域を決定する［W16-1］。ここでは、tail と cut コマンドを組み合わせて［2450, 43422 bp］の範囲を抽出し、（43422－2450＋1）＝40,973 bp の長さの環状コンティグ（sequence3_trimmed.fa）として出力した［W16-3］。

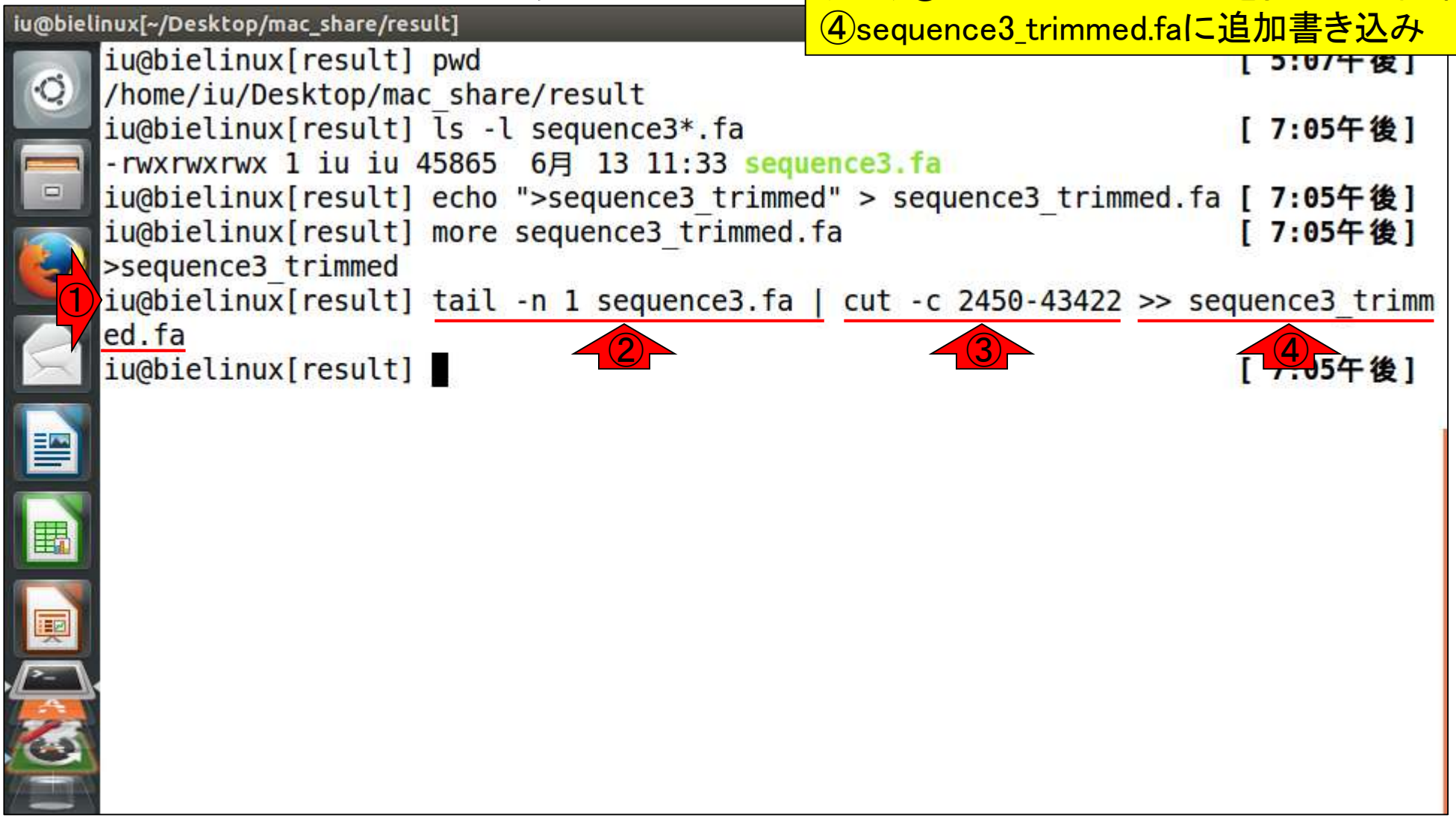
W16-3:トリム実行

①まずはトリム後のFASTAファイル(ファイル名:sequence3_trimmed.fa)のdescription行を作成。W12-7とほぼ同じ



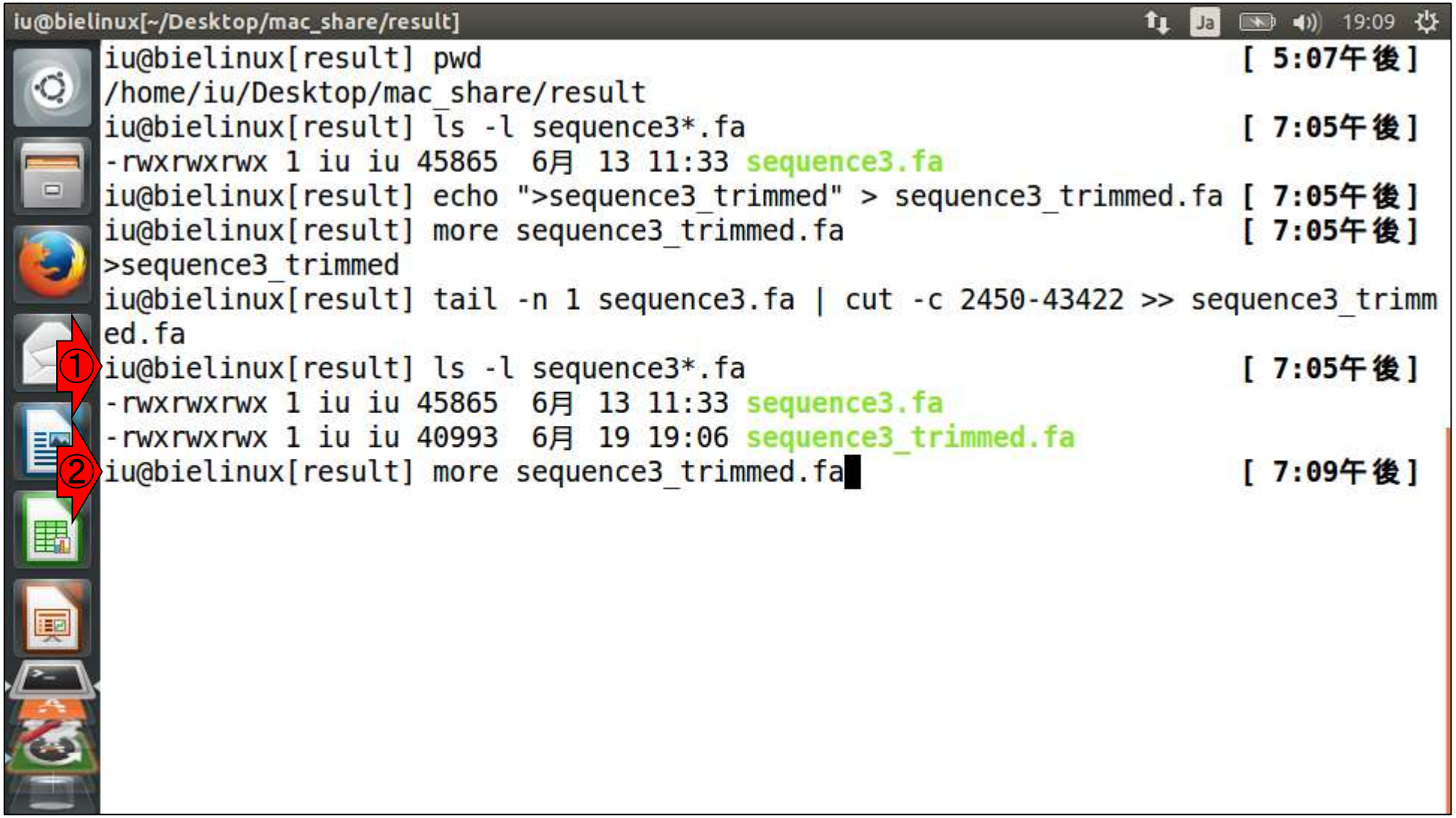
W16-3:トリム実行

①トリム実行本番。W13-2とほぼ同じ。②sequence3.faの最終行のみ取り出してパイプで流し、③2450-43422文字目を抽出した結果を、④sequence3_trimmed.faに追加書き込み



W16-4：moreで確認

①lsで確認。1 bp = 1 byte。ファイルサイズ的に妥当な印象を受ける。②moreでも確認

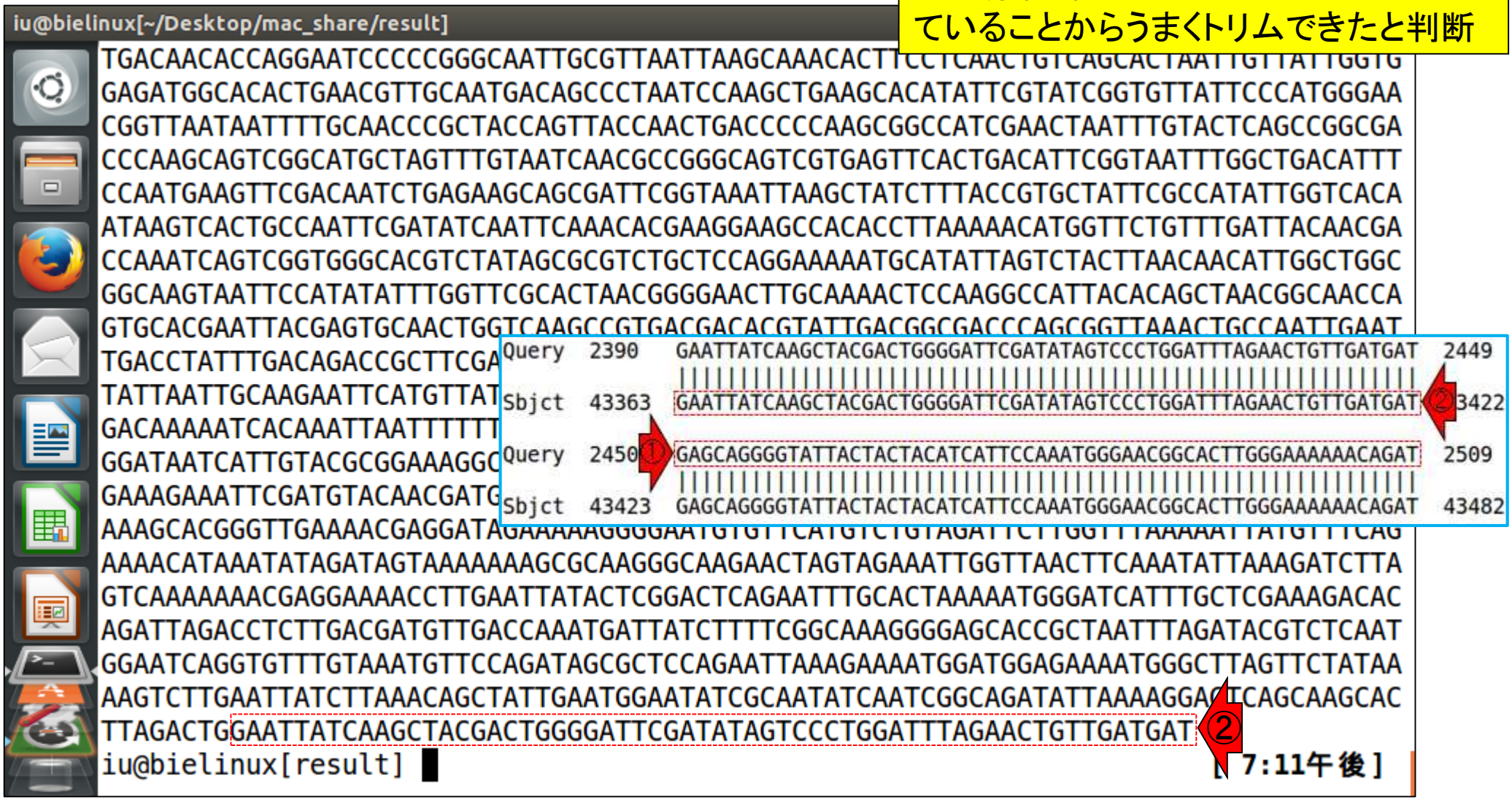


W16-4：moreで確認

①赤枠で示すトリム後の塩基配列の最初のほうは、W16-2と全く同じになっていることからうまくトリムできたと判断

W16-4：moreで確認

スペースキーをガスガス押して最後まで表示し終わったところ。②最後の塩基配列の赤枠部分もW16-2と全く同じになっていることからうまくトリムできたと判断

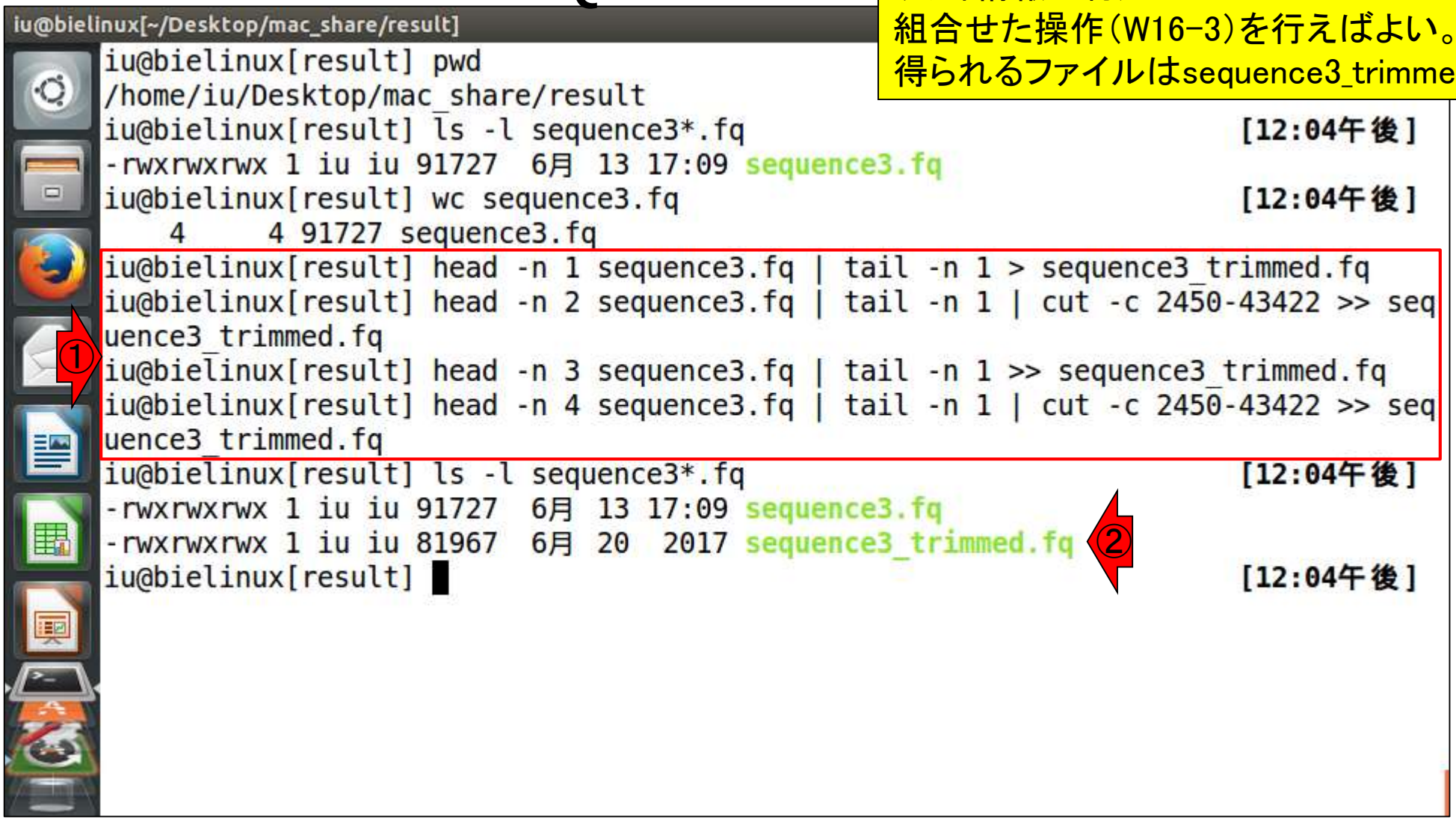


Contents（第7回後半分）

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

W17-1：FASTQのトリム

①FASTQファイル(sequence3.fq)の場合は、2行目(塩基配列情報の行)と4行目(クオリティ情報の行) についてのみheadとtailを組合せた操作(W16-3)を行えばよい。②得られるファイルはsequence3_trimmed.fq



W17-2：クオリティ分布

FASTQファイル(sequence3_trimmed.fq)を入力として、W11-9（スライド80）と同じようなクオリティスコア分布を作成

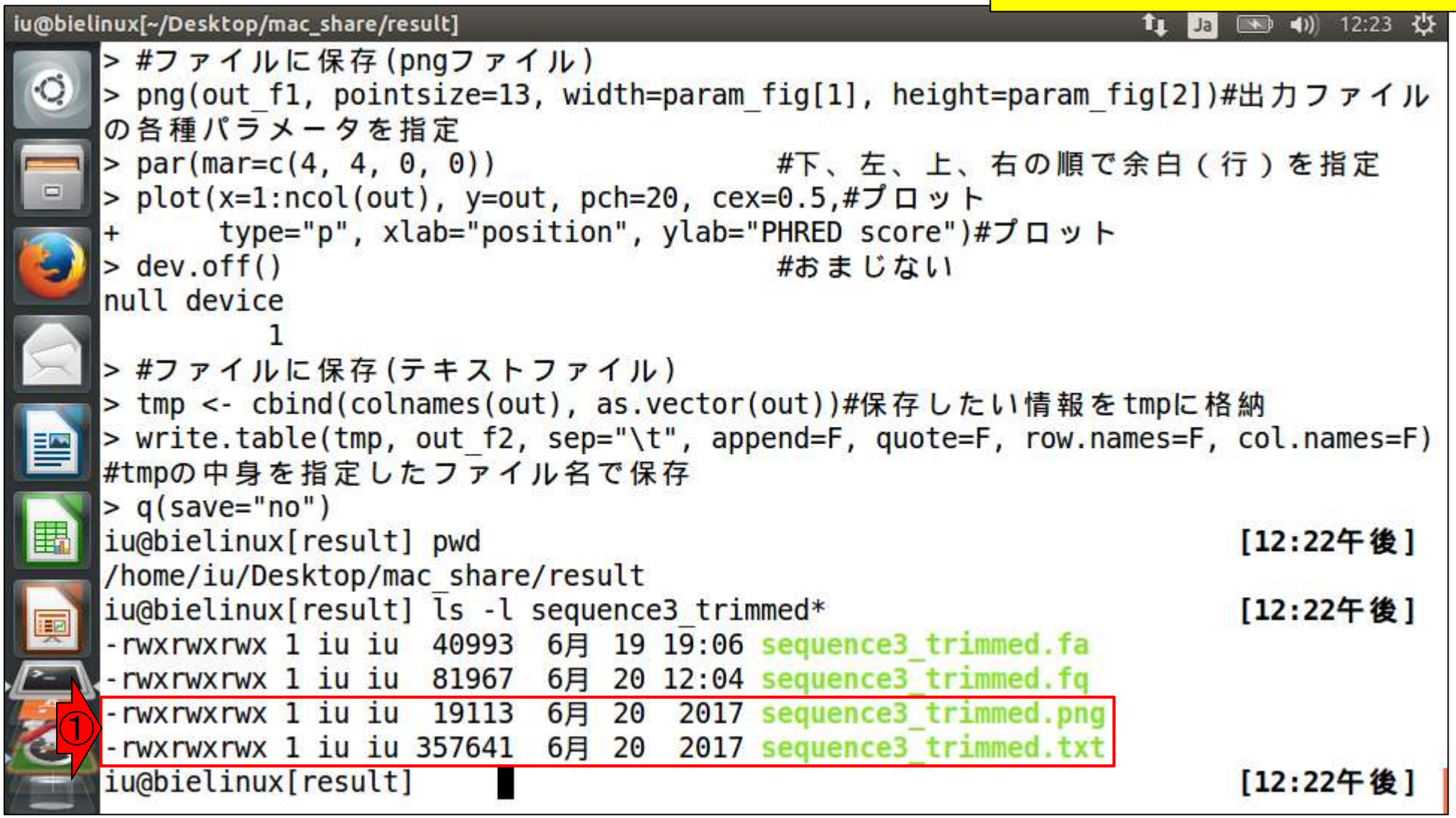
- W17-2:クオリティスコア分布 (スライド163-165)

トリム後のFASTQ形式ファイル(sequence3_trimmed.fq)を入力として、図1aおよびW11-9と同じようなクオリティスコア分布を作成。出力ファイルは、sequence3_trimmed.pngとsequence3_trimmed.txt。

```
cd ~/Desktop/mac_share/result

R -q
in_f <- "sequence3_trimmed.fq"          #入力ファイル名を指定してin_fに格納
out_f1 <- "sequence3_trimmed.png"       #出力ファイル名を指定してout_f1に格納
out_f2 <- "sequence3_trimmed.txt"       #出力ファイル名を指定してout_f2に格納
param_fig <- c(700, 350)                #ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)                      #パッケージの読み込み
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)                #in_fで指定したファイルの読み込み
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq), "matrix")     #ASCIIコードのquality scoreをPHRED scoreに変換し、データ構
colnames(out) <- 1:ncol(out)            #列名を付与
rownames(out) <- as.character(id(fastq))#行名を付与
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13, width=param_fig[1], height=param_fig[2])#出力ファイルの各種パラメータを
par(mar=c(4, 4, 0, 0))                  #下、左、上、右の順で余白（行）を指定
plot(x=1:ncol(out), y=out, pch=20, cex=0.5,#プロット
     type="p", xlab="position", ylab="PHRED score")#プロット
dev.off()                               #おまじない
#ファイルに保存(テキストファイル)
tmp <- cbind(colnames(out), as.vector(out))#保存したい情報をtmpに格納
write.table(tmp, out_f2, sep="\t", append=F, quote=F, row.names=F, col.names=F)#tmpの中身を指定
q(save="no")
pwd
ls -l sequence3_trimmed*
```

W17-2：クオリティ分布

①コピペ実行後に得られるファイル。「eog sequence3_trimmed.png &」で開けます



W17-2：クオリティ分布

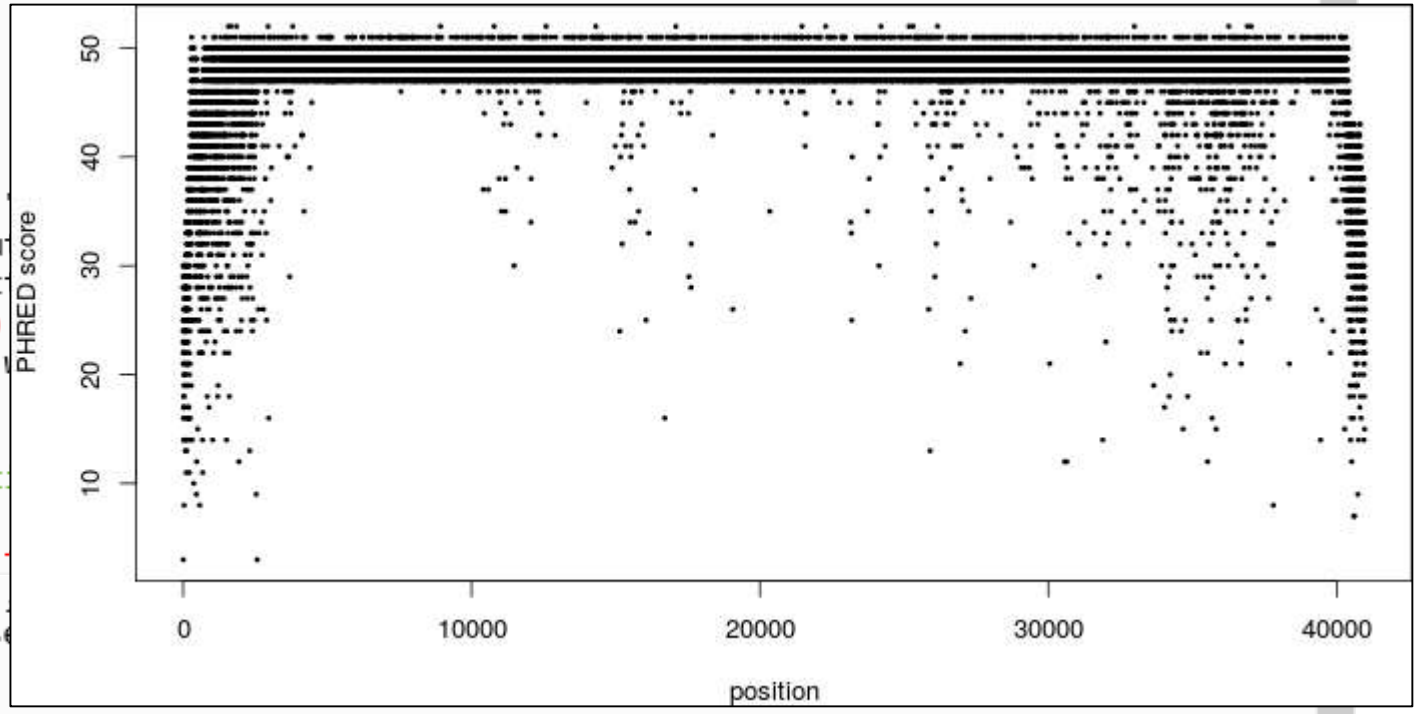
①pngファイルを眺めているところ。W11-9で見られていた両側の低クオリティ領域がうまくトリムされていることがわかる。図3aと同じ

- W17-2：クオリティスコア分布 (スライド163-165)
  トリム後のFASTQ形式ファイル(sequence3_trimmed.fq)を入力として、図1aおよびW11-9と同じようなクオリティスコア分布を作成。出力ファイルは、sequence3_trimmed.pngとsequence3_trimmed.txt。

```
cd ~/Desktop/mac_share/result

R -q
in_f <- "sequence3_trimmed.fq"
out_f1 <- "sequence3_trimmed.png"
out_f2 <- "sequence3_trimmed.txt"
param_fig <- c(700, 350)
#必要なパッケージをロード
library(ShortRead)
#入力ファイルの読み込み
fastq <- readFastq(in_f)
#本番(PHREDスコアに変換)
out <- as(quality(fastq),
colnames(out) <- 1:ncol(ou
rownames(out) <- as.charac
#ファイルに保存(pngファイル)
png(out_f1, pointsize=13,
par(mar=c(4, 4, 0, 0))
plot(x=1:ncol(out), y=out,
     type="p", xlab="posit
dev.off()
#ファイルに保存(テキストファ
tmp <- cbind(colnames(out)
write.table(tmp, out_f2, se
q(save="no")
pwd
ls -l sequence3_trimmed*
```

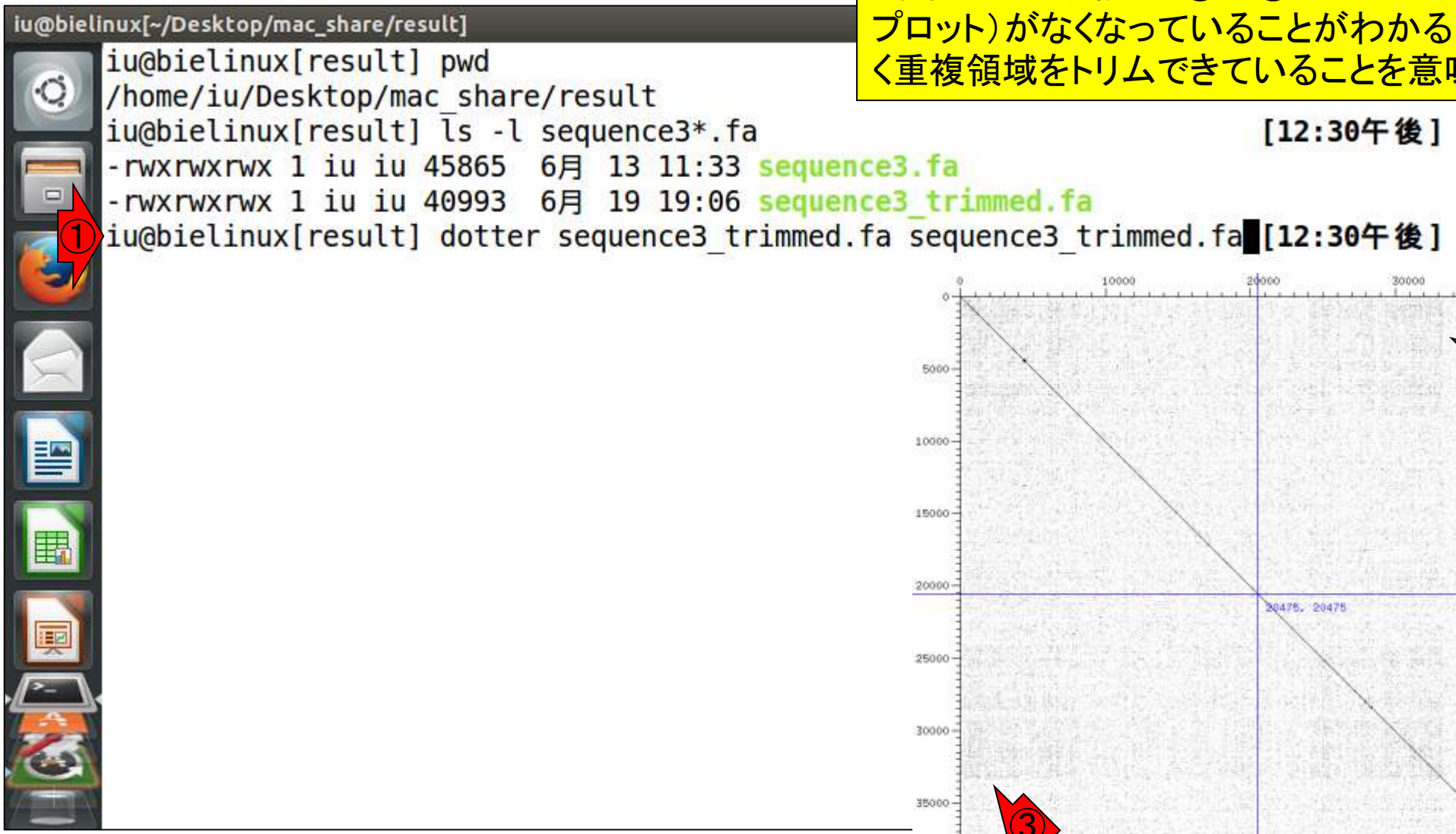
①

#入力ファイル名を指定してin_fに格納
#出力ファイル名を指定してout_f1に格納
#出力ファイル名を指定してout_f2に格納
#ファイル出力時の横幅と縦幅を指定(単位はピクセル)



W17-3：ドットプロット

①sequence3.fa同士のドットプロットをdotterで実行。トリム前（W14-4）と違って、配列末端部分の一致領域（②や③付近の対角線のプロット）がなくなっていることがわかる。うまく重複領域をトリムできていることを意味する



Sonnhammer and Durbin, *Gene*, **167**: GC1-10, 1995

ここまでのまとめ

PacBioデータの *de novo* アセンブリ結果ファイルをもとに、3番目に長い配列（約4.6万塩基のsequence3.fa）の重複配列除去を行った。時間はかかるが、2番目に長い配列（約8.7万塩基のsequence2.fa）も同じ要領で可能なので、トライしてみてください

- イントロダクション（主に予習事項の確認）
- W10：multi-FASTAファイルの分割
- W11：FASTQファイルの分割とクオリティスコア分布
- 環状化（ゲノム解読のfinishing作業の一部）
  - アセンブリ結果として、最初と最後の末端部分が同じ配列の場合は、通常そのコンティグは環状と判断。それを確認するための基本的な考え方、手段、および環状化のノウハウを伝授
  - W12：seqinrパッケージを用いて、仮想環状コンティグのドットプロットで感覚をつかむ
  - W13：重複配列の除去の感覚をつかむ（これが環状化作業の実体）
  - W14：dotterプログラムで実際のPacBio出力結果に対して適用し、環状状態の概要を知る
  - W15：Bio-Linux上のblastnで、環状の同一コンティグ同士をDB側とquery側にして実行
  - W16：正確なアラインメントを眺め、切断箇所をクオリティスコア分布と合わせて判断する
  - W17：両端切断後のコンティグに対し、クオリティスコア分布やdotterを再度実行して確認

Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

今は①のあたり。②でも書いているが、本番ではなく予備的なアノテーション

第8回原稿p188の左中

ゲノムアノテーション

ゲノムのアノテーション（genome annotation）とは、ゲノム上のどの位置にどのような遺伝子がコードされているかなどを調べ、注釈づけを行う作業である。バクテリアの自動アノテーションに関しては、MiGAP[9]やRAST[10-12]などの様々なウェブサービスが提供されており、手軽に実行可能である。今回は、乳酸菌に特化したアノテーションパイプラインDFAST（DDBJ Fast Annotation and Submission Tool）[13]を用いる。本ウェブサービスは、連載第5回[14]でも紹介したアノテーションパイプラインProkka[15]をベースとして、乳酸菌（主に*Lactobacillus*属および*Pediococcus*属）用に整備された参照データベースを組み合わせたものである。また、アノテーションだけでなく、DDBJ[16]への塩基配列登録支援を行うこともできる（もちろん登録は任意）のが特徴である。典型的なゲノムサイズ（数MB程度）の乳酸菌であれば、5分ほどで結果が返される。ここでは、アセンブリ結果の検証の一環として、アセンブリ結果ファイル（LH_hgap.fa）を入力としてDFASTを実行する［W4］。位置づけとしては、予備的なアノテーションである。

①

第7回までで予想していた通り、この2つの配列が（環状の）プラスミドであることを支持している。

sequence1（2,289,497 bp）については、最初の30,000塩基あたりまでにprophage proteinなどファージ関連遺伝子が見られる［W4-6］。また、sequence4（11,372 bp）については、4,912番目から5,699番目の領域にtransposaseがコードされている。この領域については後で議論するが、アノテーション結果の概観レベルでは見逃してもよい。後述するBLAST[17]の実行結果と合わせて総合的に判断する視点が重要である。

BLASTの実行と可視化

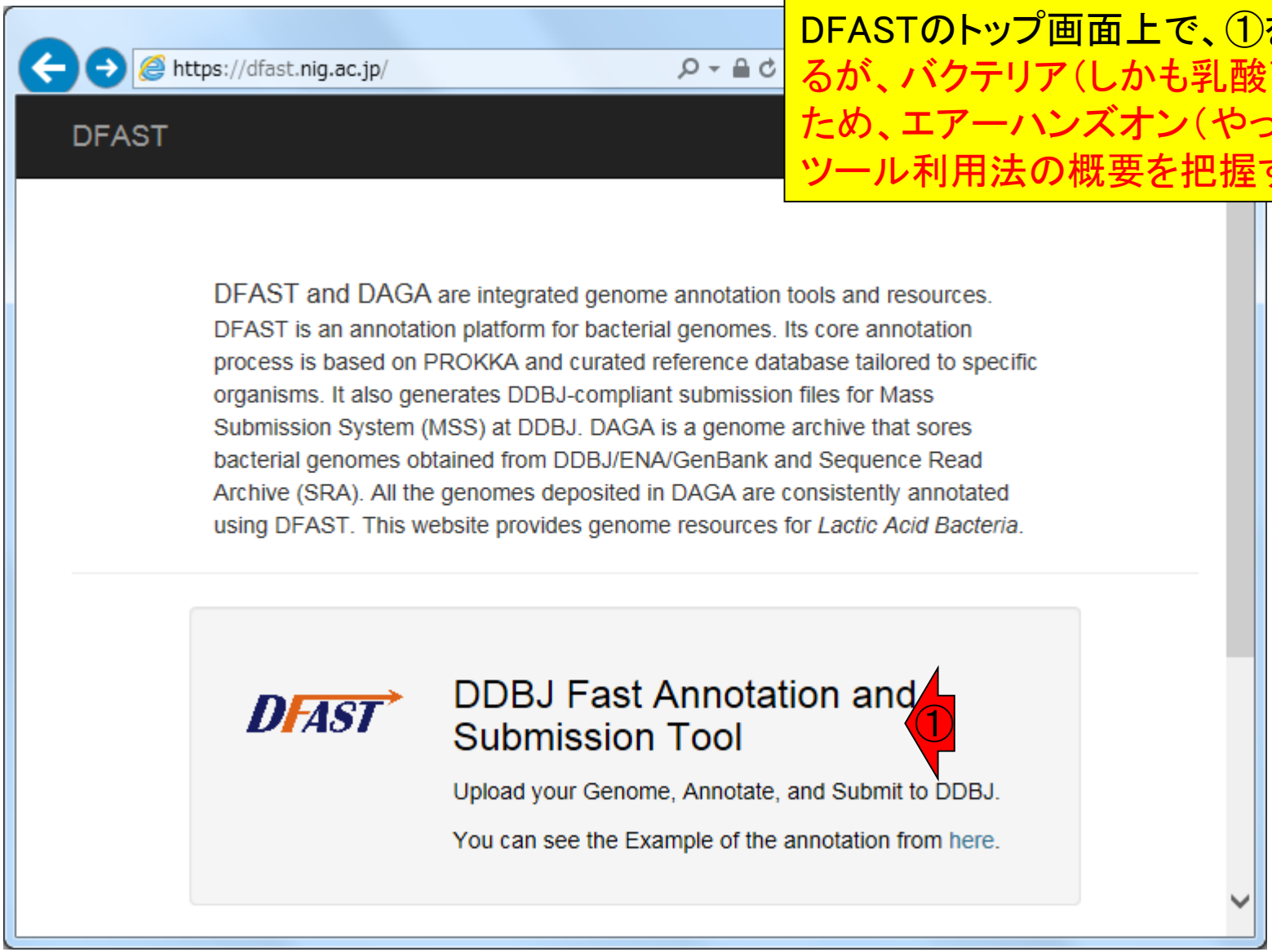
第7回では、sequence3同士を例として配列内の両末端部分の重複をドットプロットで大まかに調べ（第7回W14-2）、BLASTで重複領域の詳細なアラインメントを行った。ドットプロットについては、sequence3よりも2倍程度長いsequence2同士についてもdotter[18]を実行可能であり、両末端部分の重複が見いだせる［W5-1］。sequence4同士のドットプロットは、［1, 500 bp］と［750, 1350 bp］付近の領域が似ているものの、環状を示唆す

②

参考

W4-1：DFAST

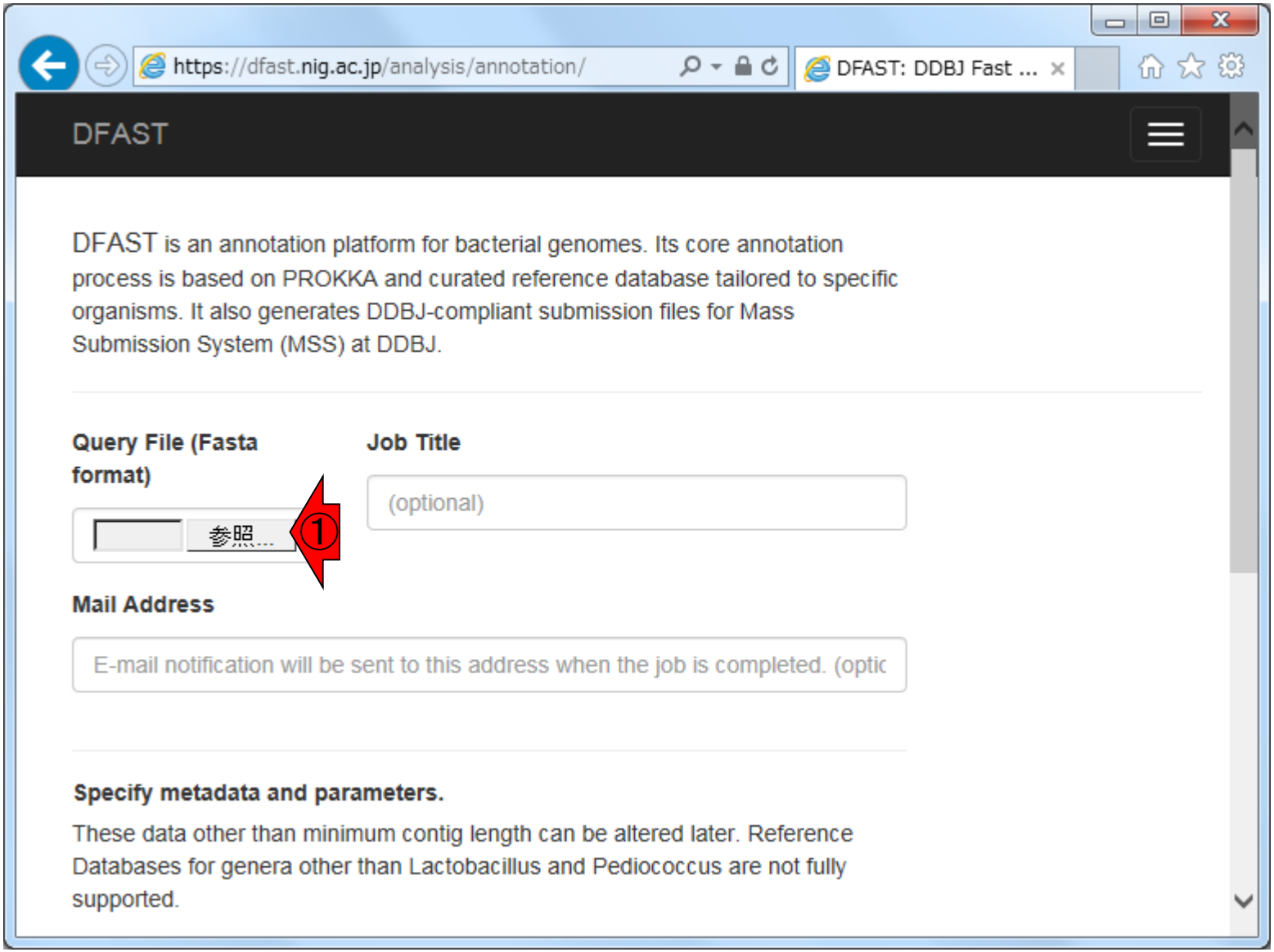
DFASTは乳酸菌に特化したゲノムアノテーションを行ってくれるウェブツール。入力はmulti-FASTAファイル。出力はGFF形式ファイルなどのアノテーション結果。DFASTのトップ画面上で、①をクリック。となってはいるが、バクテリア（しかも乳酸菌のみ）に特化しているため、エアーハンズオン（やったふり）でアノテーションツール利用法の概要を把握する程度で十分です



Tanizawa et al., *Biosci Microbiota Food Health*, **35**: 173-184, 2016

W4-1：DFAST

①のところで、参照ボタンを押して、アノテーションしたいmulti-FASTAファイル(LH_hgap.fa)を指定



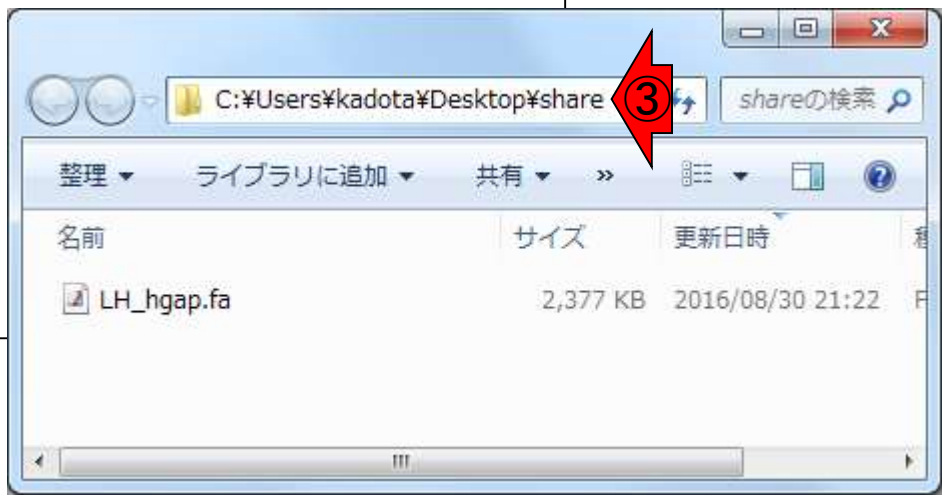
W4-2：LH_hgap.fa

①アノテーションしたいmulti-FASTAファイル(LH_hgap.fa)を共有フォルダにコピー。②共有フォルダ内の状況はヒトそれぞれだが、最低限LH_hgap.faが見えていればよい。(私のWindows環境では)ホストOS上の絶対パスとして③のところにLH_hgap.faが見えるので、これをアップロードします

```
iu@bielinux[~/Desktop/result]
iu@bielinux[result] pwd
/home/iu/Desktop/result
iu@bielinux[result] ls
corrected.fastq  LH_hgap.fa                 sequence3.fa  test3.fa
JSLAB8_1.sh      polished_assembly.fasta    sequence4.fa  test4.fa
JSLAB8_2.sh      polished_assembly.fastq    smrtpipe.log
JSLAB8_3.sh      sequence1.fa               test1.fa
JSLAB8_4.sh      sequence2.fa               test2.fa
iu@bielinux[result] cp LH_hgap.fa ../mac_share          [ 9:21午後]
iu@bielinux[result] ls -l ../mac_share                  [ 9:22午後]
total 2377
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2433662  8月 30 21:22 LH_hgap.fa
iu@bielinux[result]                                     [ 9:22午後]
```

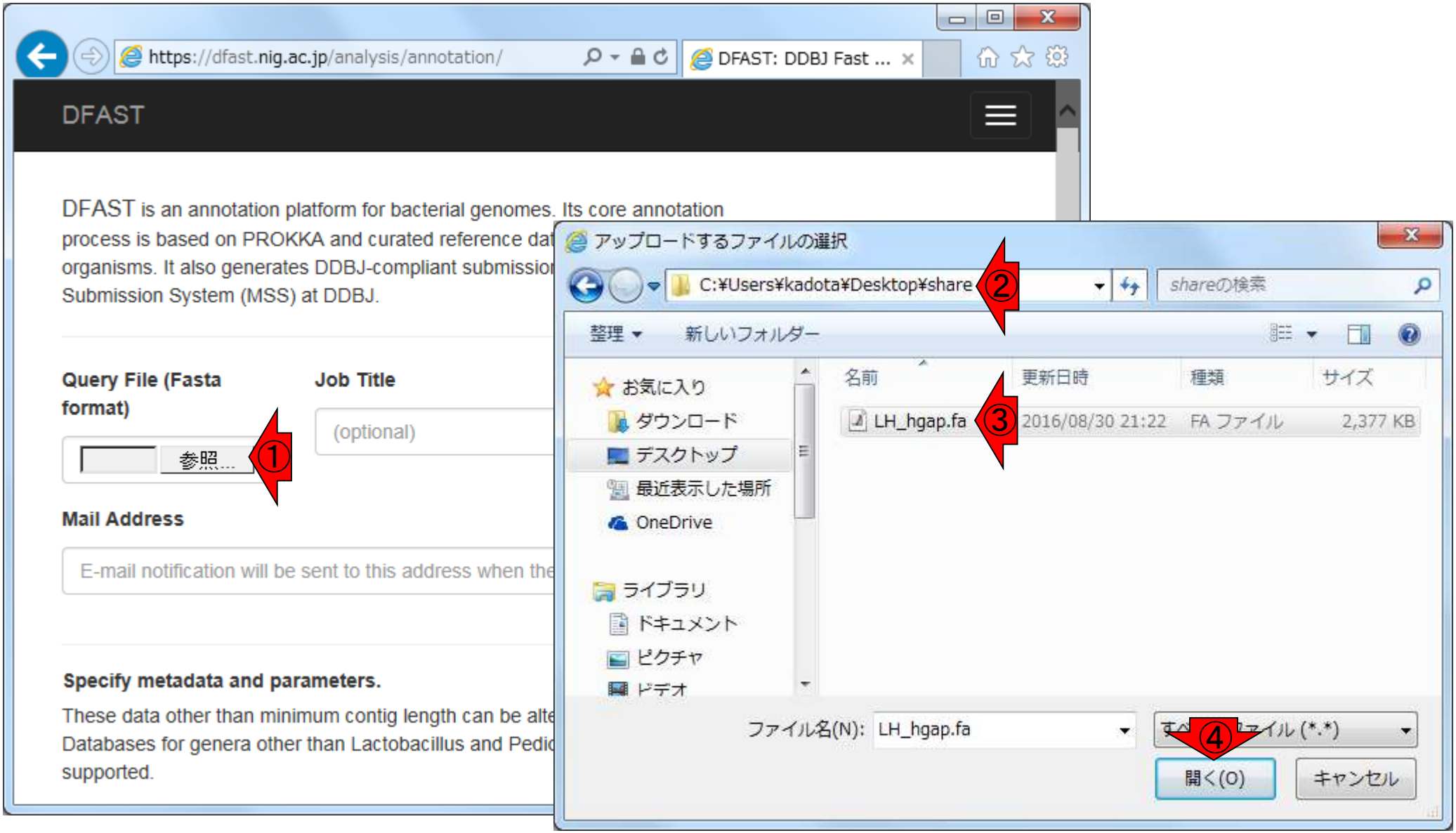
①

②



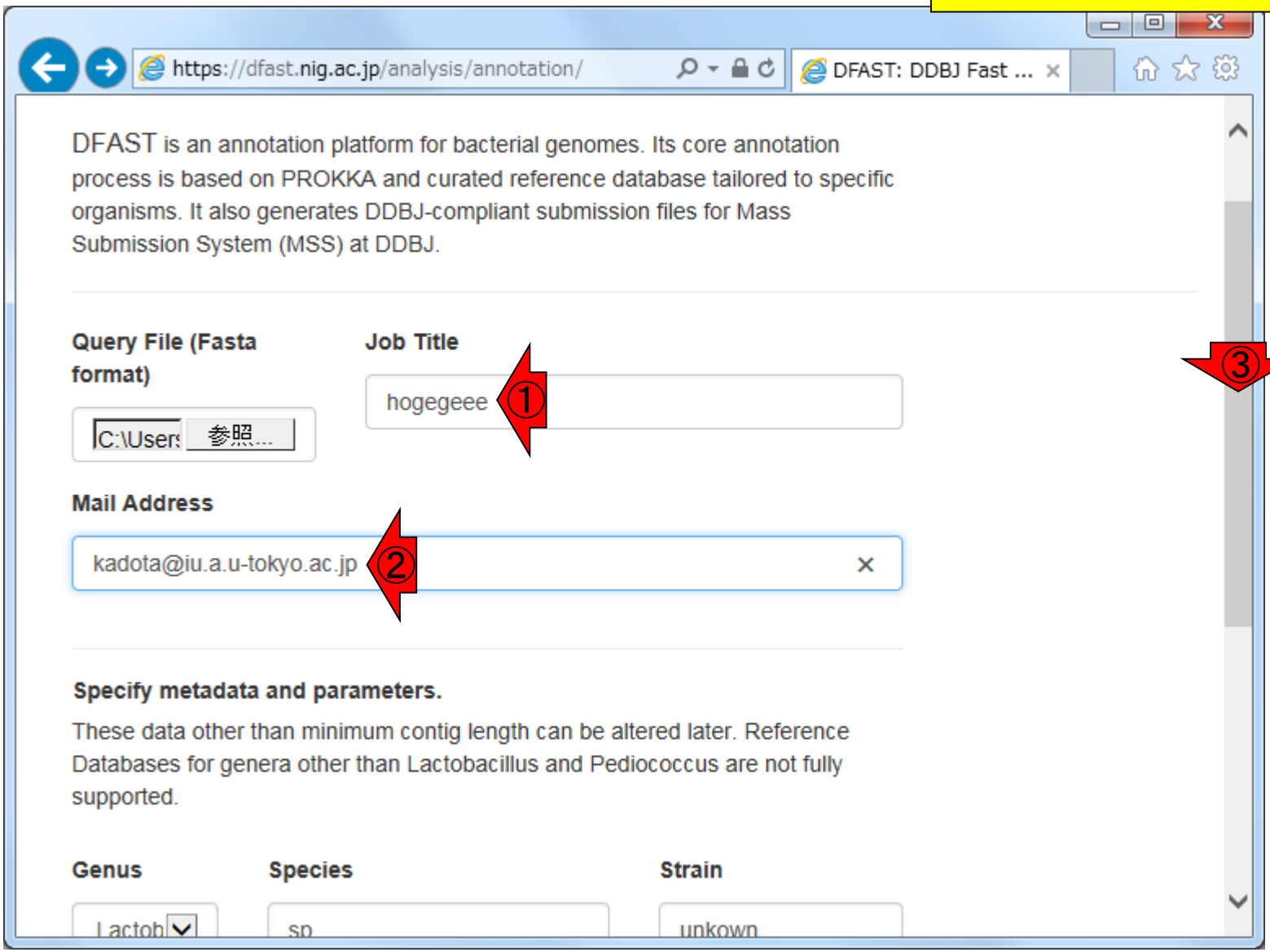
W4-3：アップロードと実行

①参照ボタン、②に移動して、③目的のファイル(LH_hgap.fa)を指定して、④開く



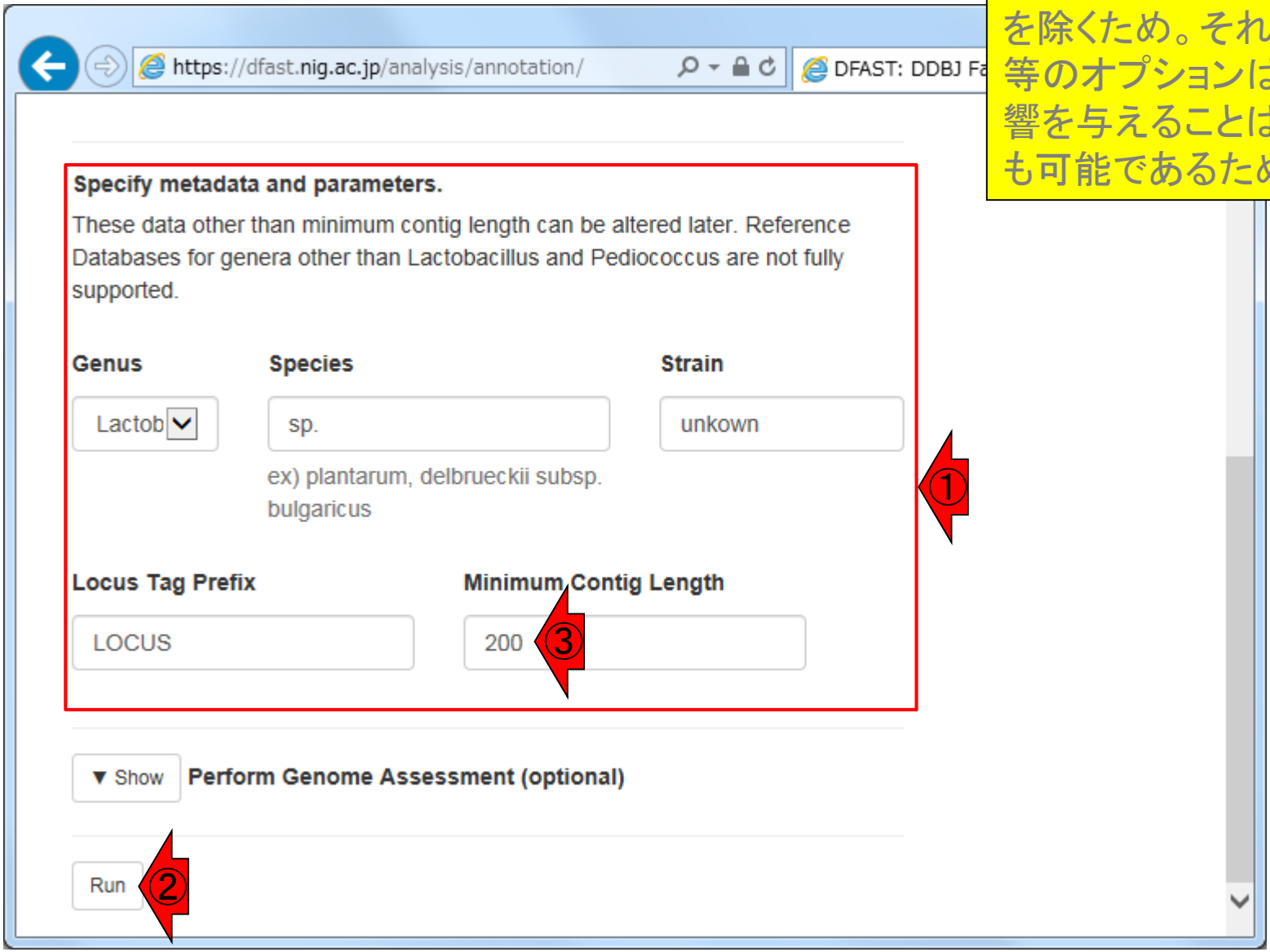
W4-3：アップロードと実

①ジョブタイトル(hogegeee)をテキトーにつけて、②計算が終わったらメールでお知らせしてくれるので入力して、③ページ下部に移動



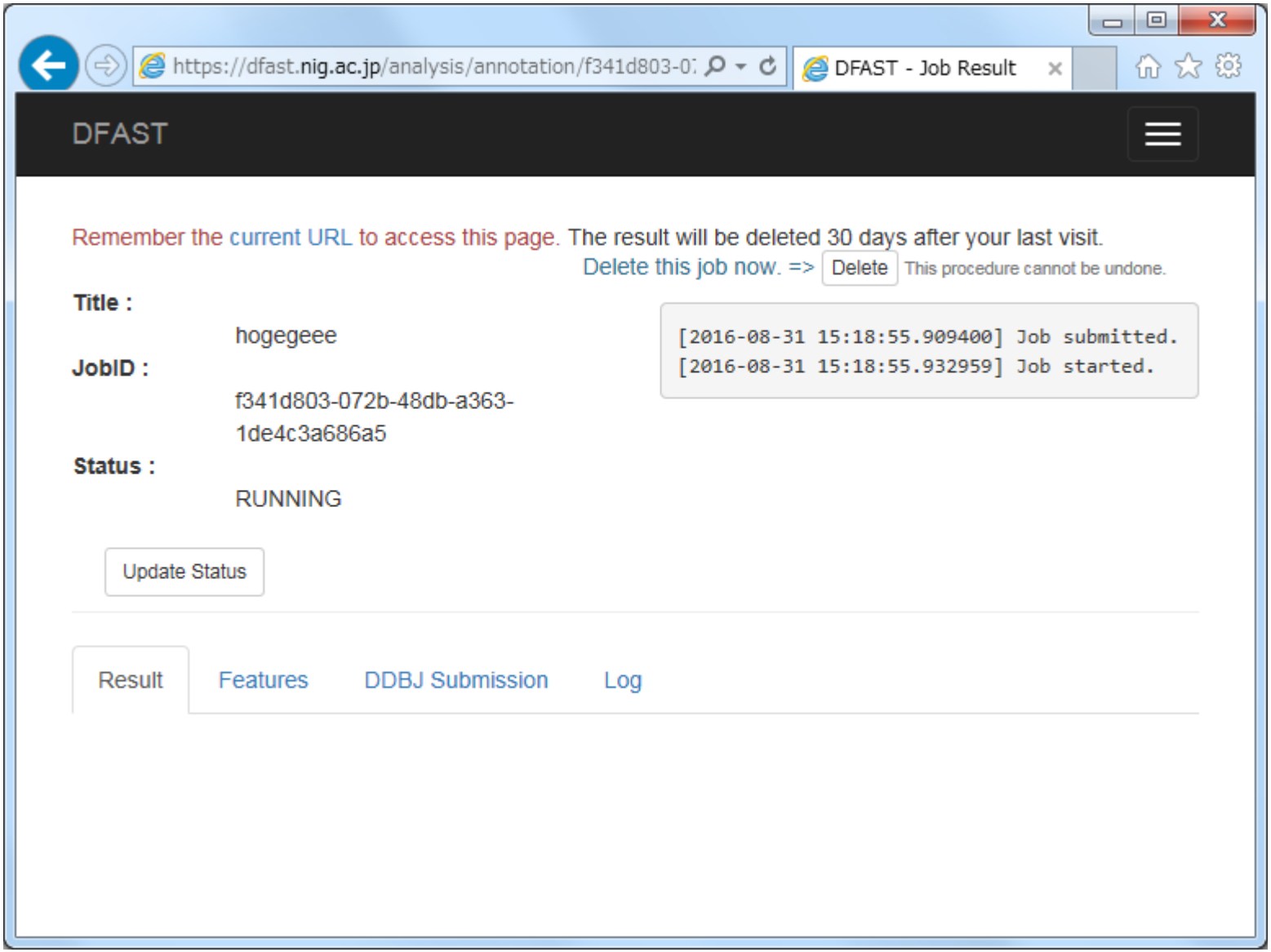
W4-3：アップロードと実行

①いろいろオプション指定できるがとりあえずここは無視して、②Run。③は設定値(デフォルトは200 bp)以下の短い配列を除くため。それ以外の赤枠の属・種名等のオプションはアノテーション結果に影響を与えることはなく、後で変更することも可能であるため、規定値のままでOK



W4-3：アップロードと実行

計算が始まったようだ。とりあえず計算終了メールが来るまで思考停止



W4-4：計算終了

計算終了メールが届く。このときは、約5分で計算が終了。①にアクセス

2016/08/31 (水) 15:22

DFAST Report <dfast@nig.ac.jp>

[DFAST] Your requested job completed.

宛先 kadota@iu.a.u-tokyo.ac.jp

Your requested job has completed.

Job Title : hogegeee

Job ID : f341d803-072b-48db-a363-1de4c3a686a5

Submitted at :2016-08-31 15:18:55.909400.

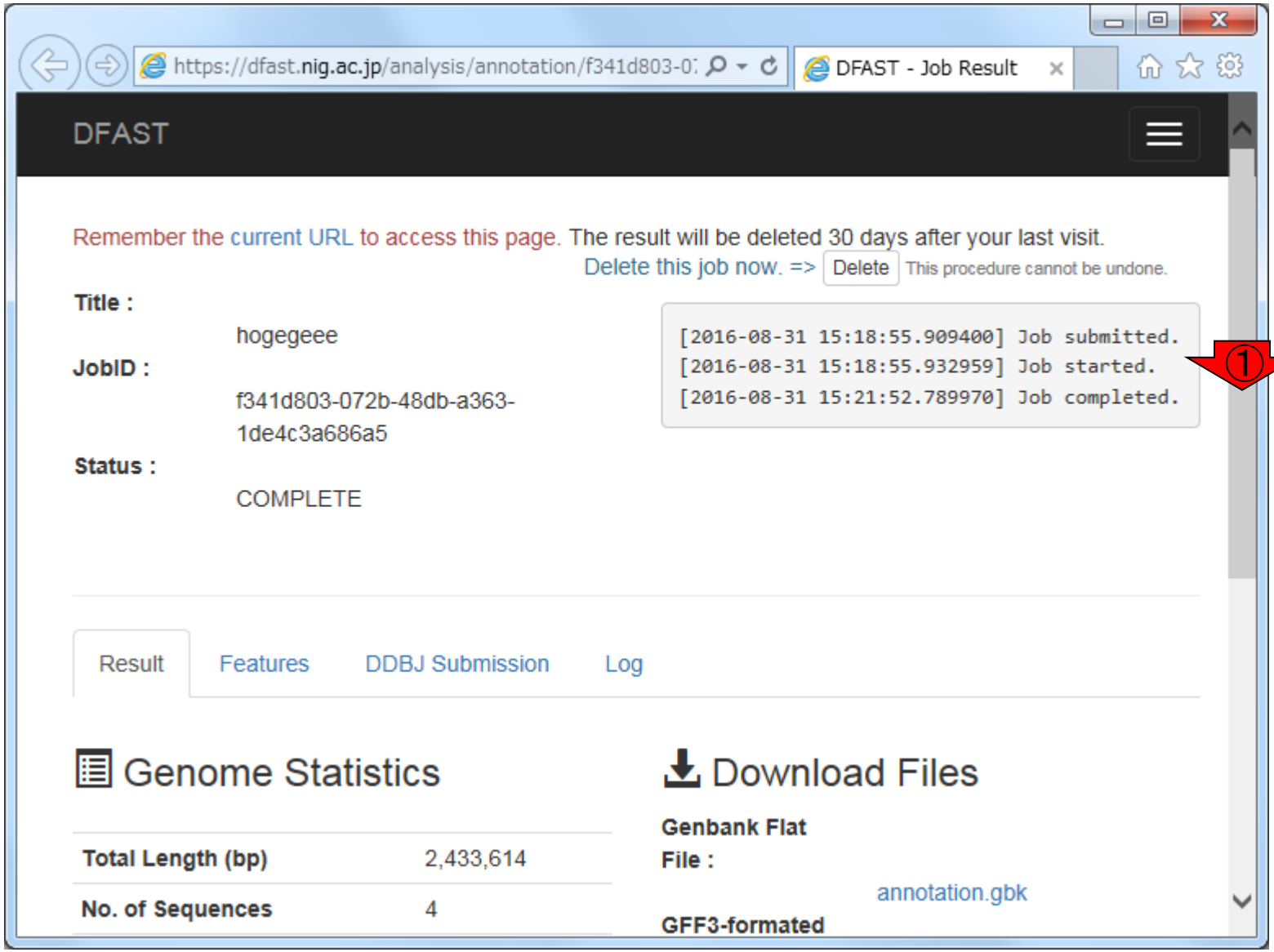
Please visit the link below to check the result.

https://dfast.nig.ac.jp/analysis/annotation/f341d803-072b-48db-a363-1de4c3a686a5 ①

DFAST <dfast@nig.ac.jp>

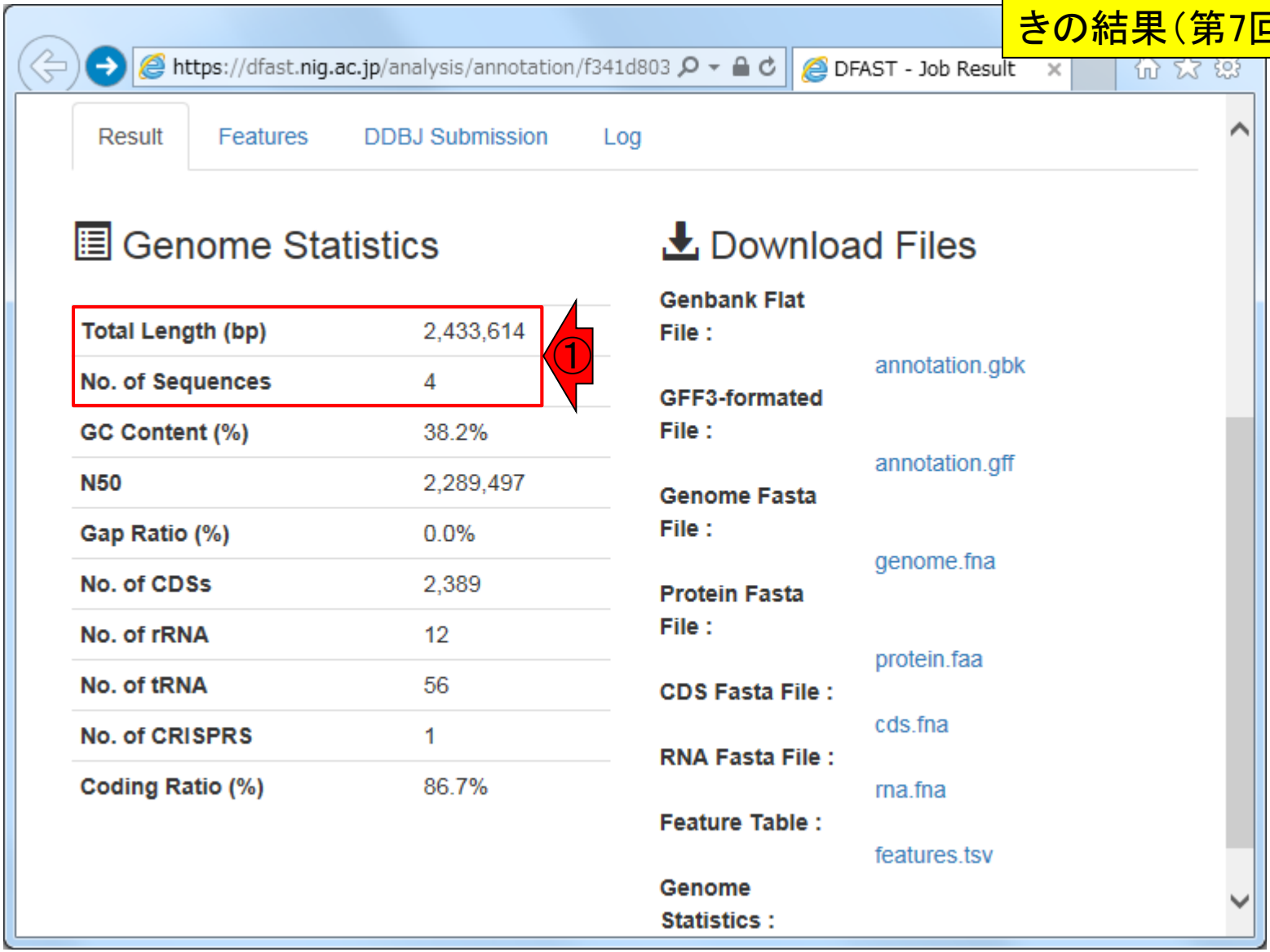
W4-5：結果を眺める

計算結果が見えている。①ページ下部に移動



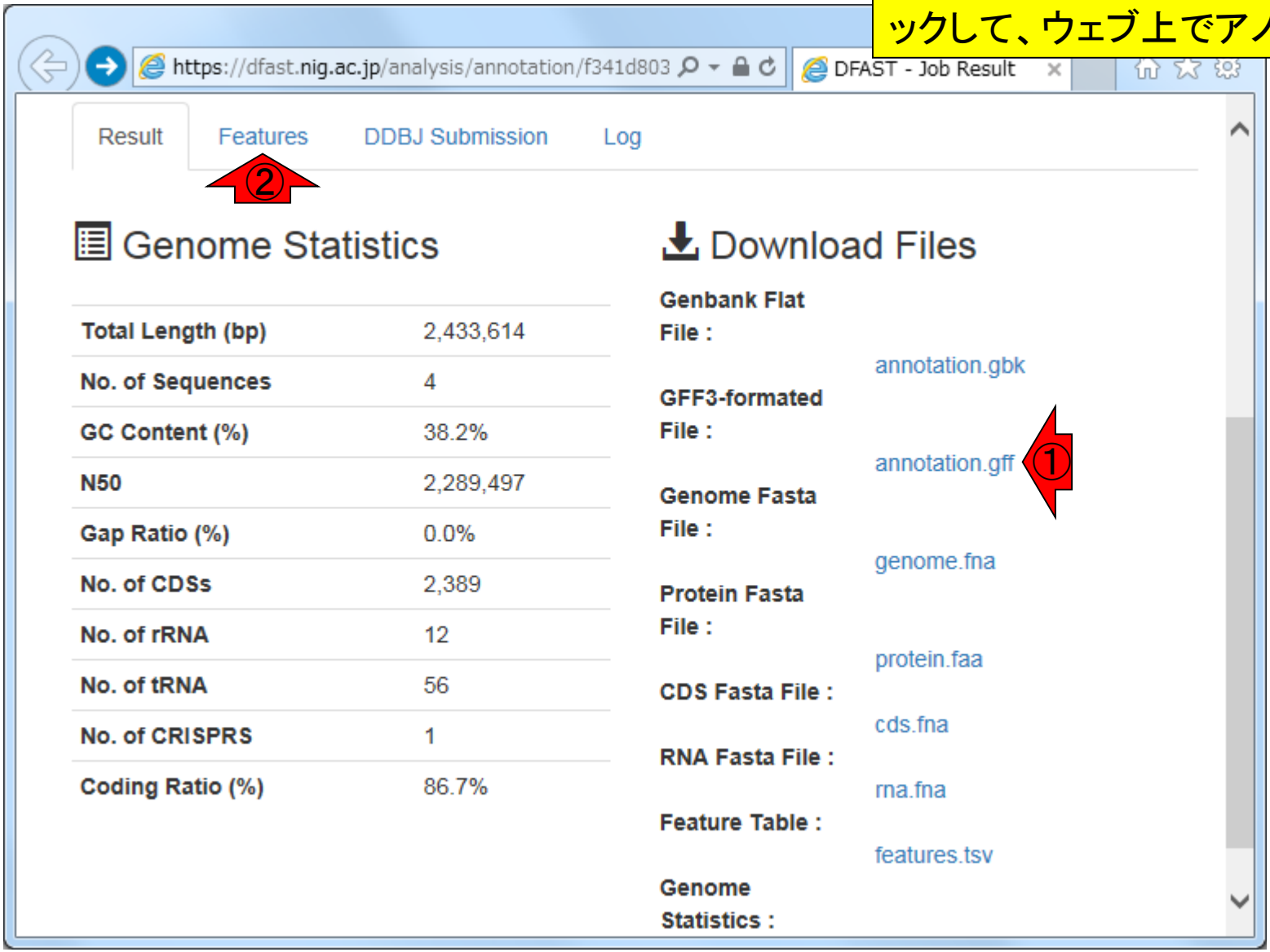
W4-5：結果を眺める

これがDFASTによるアノテーション結果の全体像。①このあたりの数値は、DDBJ Pipeline上でHGAPを実行したときの結果（第7回W9-2）と全く同じで妥当



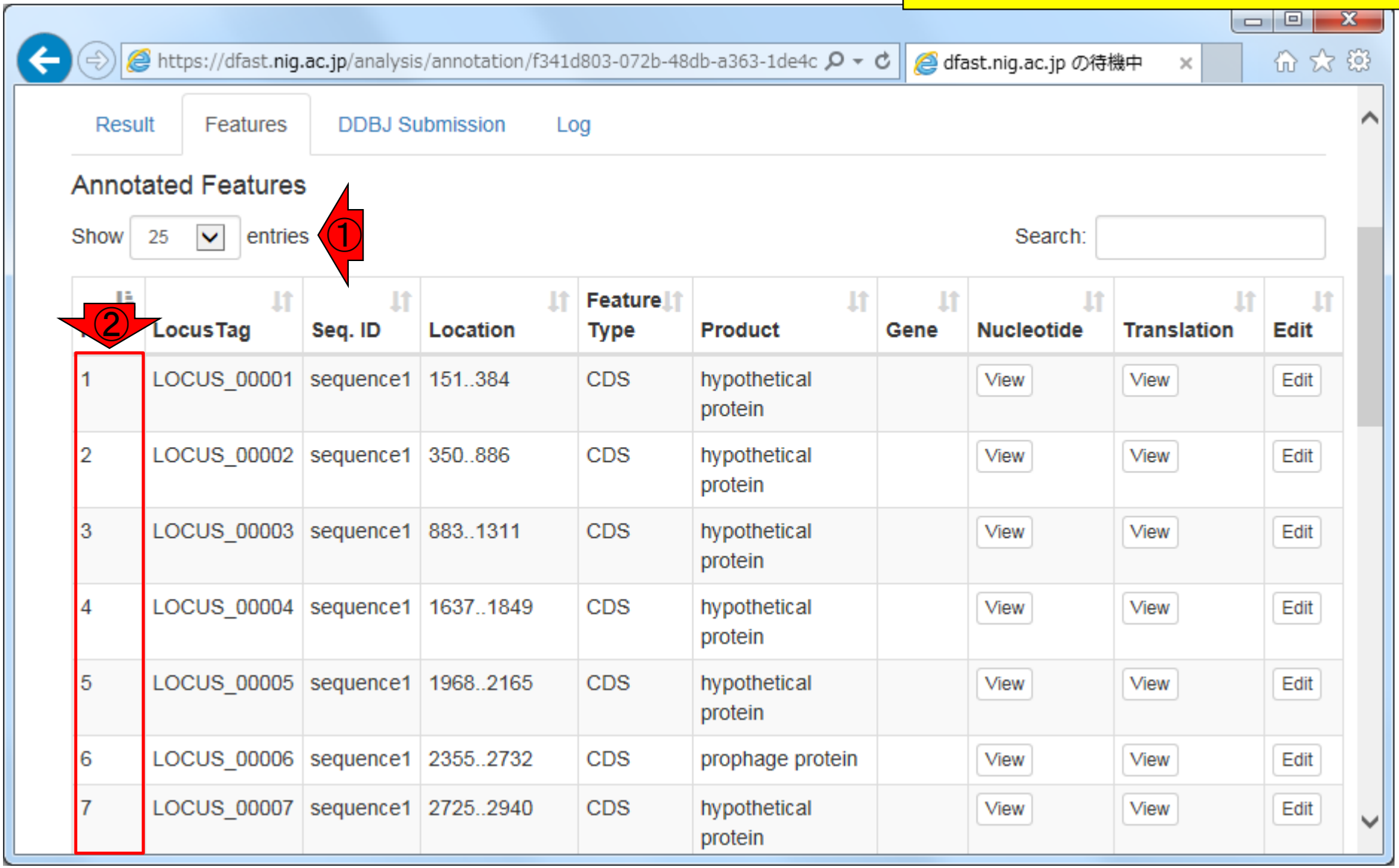
W4-5：結果を眺める

①アノテーションファイルの一般的な形式であるGFFファイルをダウンロードしてエクセルなどで眺めてもよいが、ここでは②Featuresタブをクリックして、ウェブ上でアノテーション結果を眺める



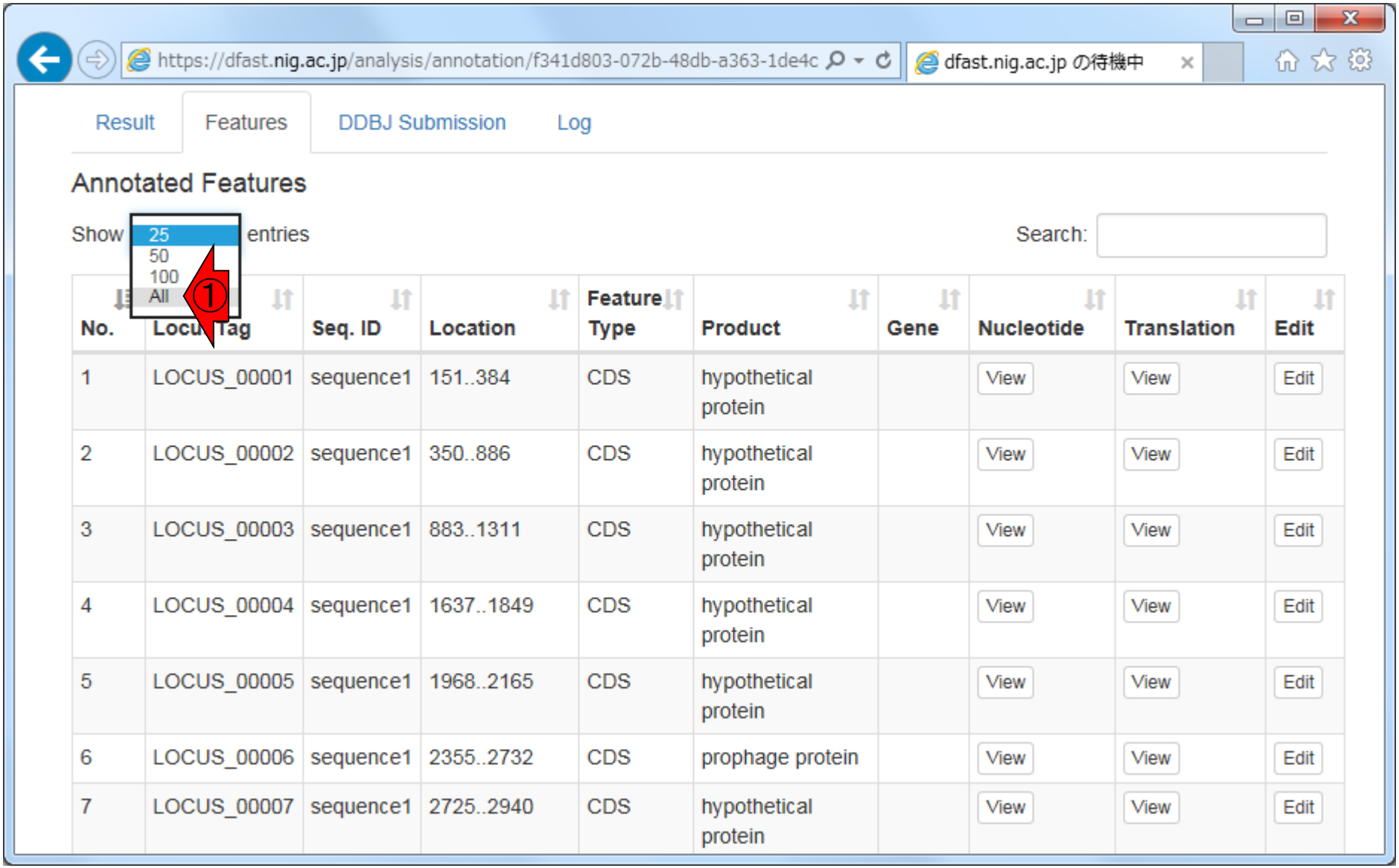
W4-5：結果を眺める

こんな感じになります。①デフォルトはページあたり25エントリーになっているので、②の部分が25行分づつ表示されます



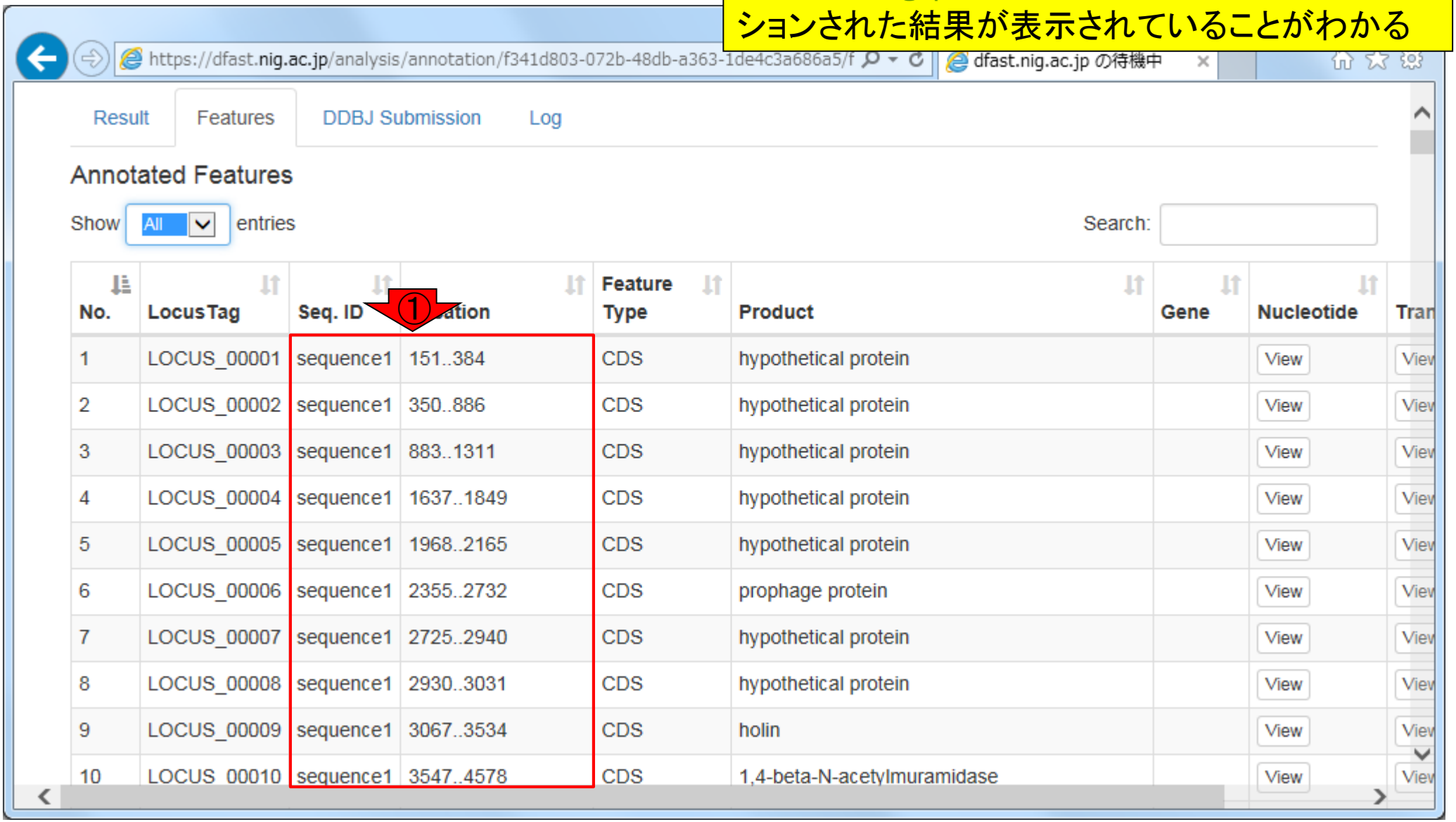
W4-5：結果を眺める

全エントリーを一気に表示させて説明したいので、①Allにする



W4-5：結果を眺める

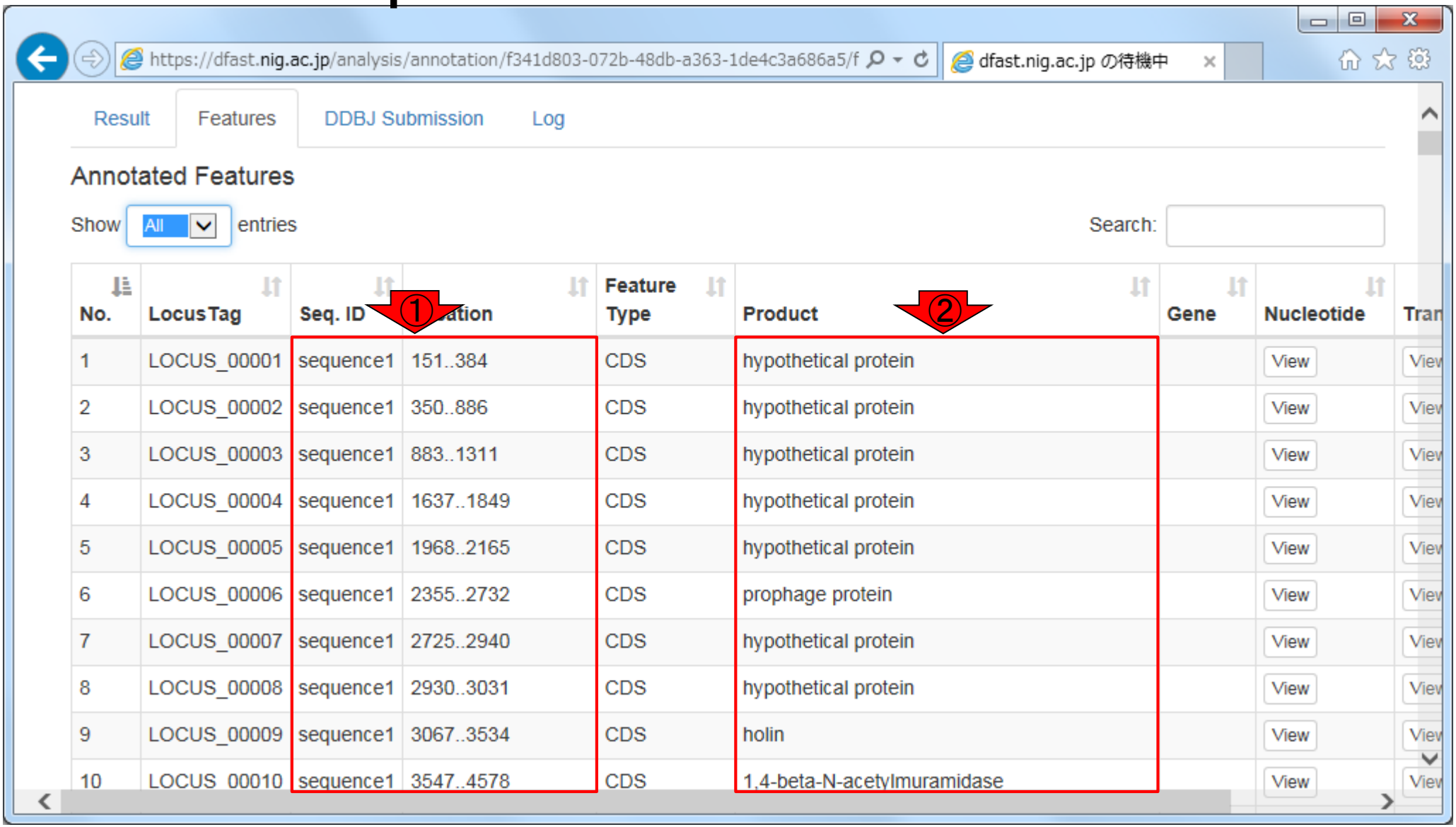
こんな感じになります。横幅が広くなるが細かいことは気にしない。①のあたりを見ることで、入力ファイル(LH_hgap.fa)の配列および座標順にアノテーションされた結果が表示されていることがわかる



No.	Locus Tag	Seq. ID	ation	Feature Type	Product	Gene	Nucleotide	Tran
1	LOCUS_00001	sequence1	151..384	CDS	hypothetical protein		View	View
2	LOCUS_00002	sequence1	350..886	CDS	hypothetical protein		View	View
3	LOCUS_00003	sequence1	883..1311	CDS	hypothetical protein		View	View
4	LOCUS_00004	sequence1	1637..1849	CDS	hypothetical protein		View	View
5	LOCUS_00005	sequence1	1968..2165	CDS	hypothetical protein		View	View
6	LOCUS_00006	sequence1	2355..2732	CDS	prophage protein		View	View
7	LOCUS_00007	sequence1	2725..2940	CDS	hypothetical protein		View	View
8	LOCUS_00008	sequence1	2930..3031	CDS	hypothetical protein		View	View
9	LOCUS_00009	sequence1	3067..3534	CDS	holin		View	View
10	LOCUS_00010	sequence1	3547..4578	CDS	1,4-beta-N-acetylmuramidase		View	View

①と②を関連づけながら、アノテーション結果の全体像を把握する

W4-6：sequence1概観



https://dfast.nig.ac.jp/analysis/annotation/f341d803-072b-48db-a363-1de4c3a686a5/f

dfast.nig.ac.jp の待機中

Result | Features | DDBJ Submission | Log

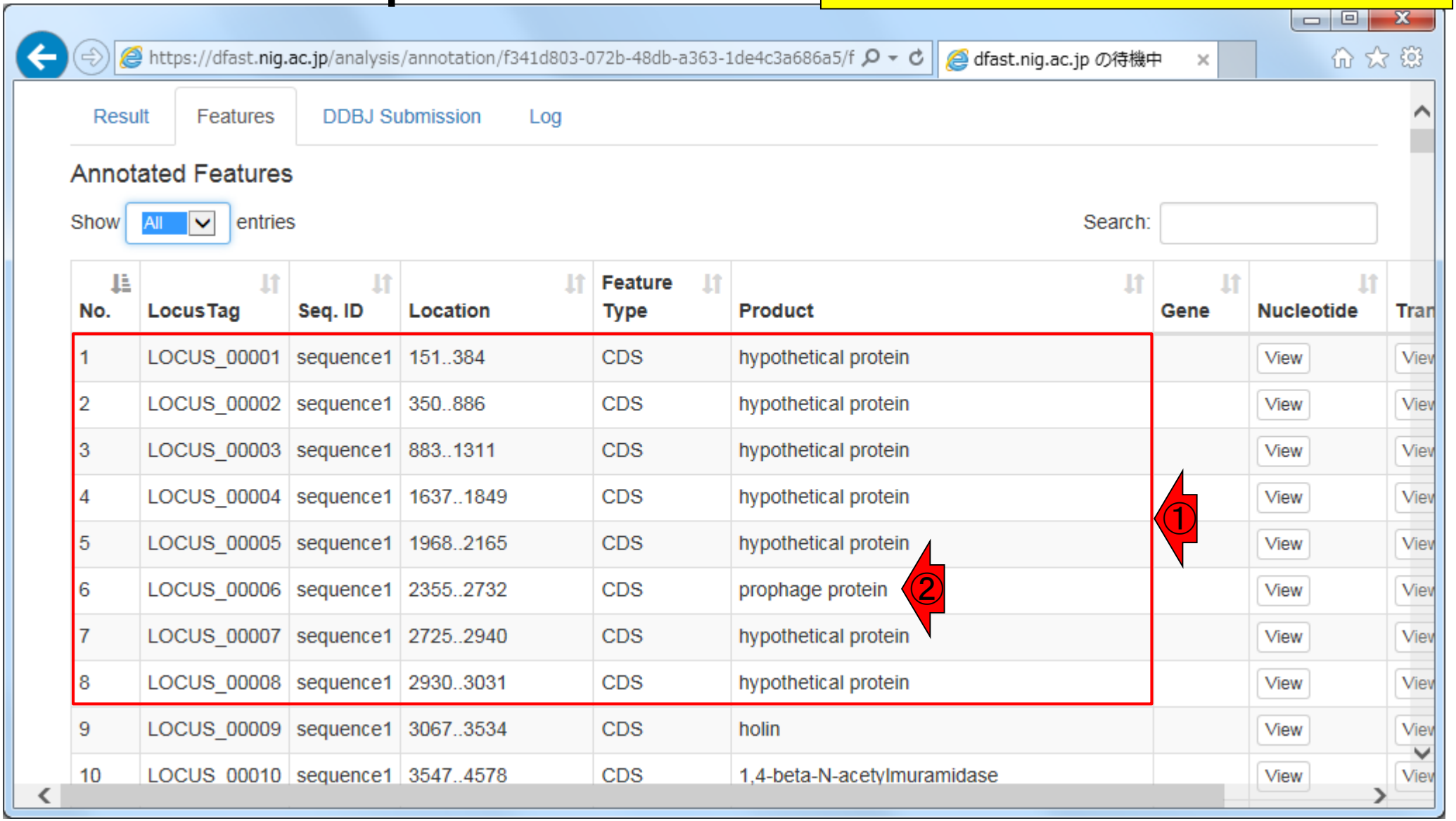
Annotated Features

Show All entries　　Search:

No.	Locus Tag	Seq. ID	①ation	Feature Type	② Product	Gene	Nucleotide	Tran
1	LOCUS_00001	sequence1	151..384	CDS	hypothetical protein		View	Vie
2	LOCUS_00002	sequence1	350..886	CDS	hypothetical protein		View	Vie
3	LOCUS_00003	sequence1	883..1311	CDS	hypothetical protein		View	Vie
4	LOCUS_00004	sequence1	1637..1849	CDS	hypothetical protein		View	Vie
5	LOCUS_00005	sequence1	1968..2165	CDS	hypothetical protein		View	Vie
6	LOCUS_00006	sequence1	2355..2732	CDS	prophage protein		View	Vie
7	LOCUS_00007	sequence1	2725..2940	CDS	hypothetical protein		View	Vie
8	LOCUS_00008	sequence1	2930..3031	CDS	hypothetical protein		View	Vie
9	LOCUS_00009	sequence1	3067..3534	CDS	holin		View	Vie
10	LOCUS_00010	sequence1	3547..4578	CDS	1,4-beta-N-acetylmuramidase		View	Vie

W4-6：sequence1概観

①sequence1の左端（最初の3031 bpまで）は「hypothetical proteinが多いなあ…」とか、②「prophage proteinがある」とか…



W4-6：sequence1概観

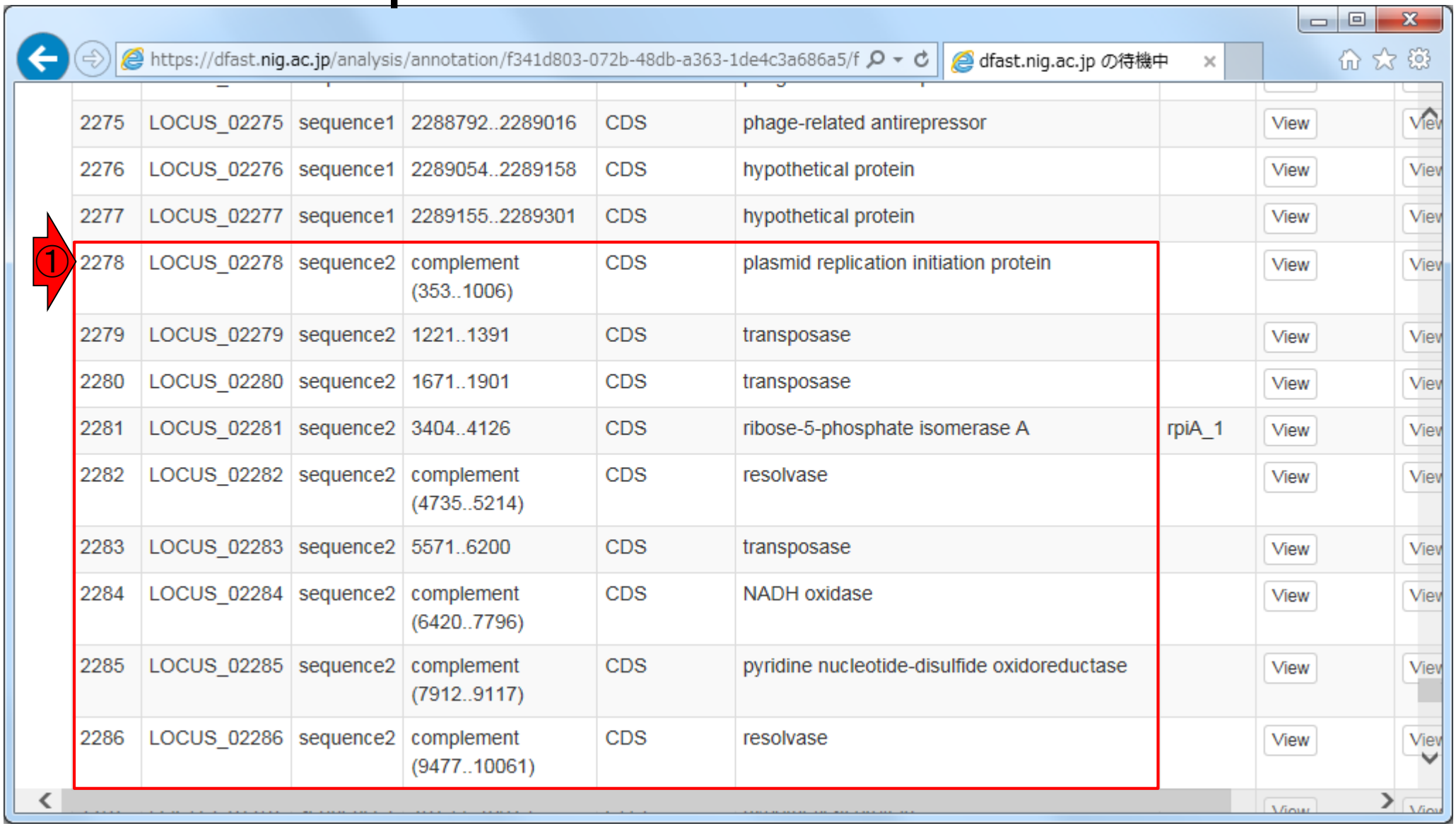
赤枠はsequence1の①19649から②34418 bpの範囲（全部で2,289,497 bpの長さがあるので、このあたりもまだ左端といえる）。赤下線で示すように、このあたりにもファージ(phage)関連のものがちらほら存在

https://dfast.nig.ac.jp/analysis/annotation/f341d803-072b-48db-a363-1de4c3a686

42	LOCUS_00042	sequen	① 19649..20095	CDS	phage protein		View	View
43	LOCUS_00043	sequence1	20310..20585	CDS	hypothetical protein		View	View
44	LOCUS_00044	sequence1	20578..21057	CDS	hypothetical protein		View	View
45	LOCUS_00045	sequence1	21180..21698	CDS	phage terminase small subunit	xtmA	View	View
46	LOCUS_00046	sequence1	21698..23599	CDS	phage terminase large subunit	xtmB	View	View
47	LOCUS_00047	sequence1	23609..23785	CDS	hypothetical protein		View	View
48	LOCUS_00048	sequence1	23786..24961	CDS	phage portal protein		View	View
49	LOCUS_00049	sequence1	24942..26834	CDS	phage capsid protein		View	View
50	LOCUS_00050	sequence1	27026..27313	CDS	hypothetical protein		View	View
51	LOCUS_00051	sequence1	27294..27671	CDS	hypothetical protein		View	View
52	LOCUS_00052	sequence1	27674..28096	CDS	hypothetical protein		View	View
53	LOCUS_00053	sequence1	28096..28476	CDS	hypothetical protein		View	View
54	LOCUS_00054	sequence1	28480..29088	CDS	phage tail protein		View	View
55	LOCUS_00055	sequence1	29239..29589	CDS	tail protein		View	View
56	LOCUS_00056	sequence1	29793..34418 ②	CDS	phage tail tape measure protein		View	View

W4-7：sequence2概観

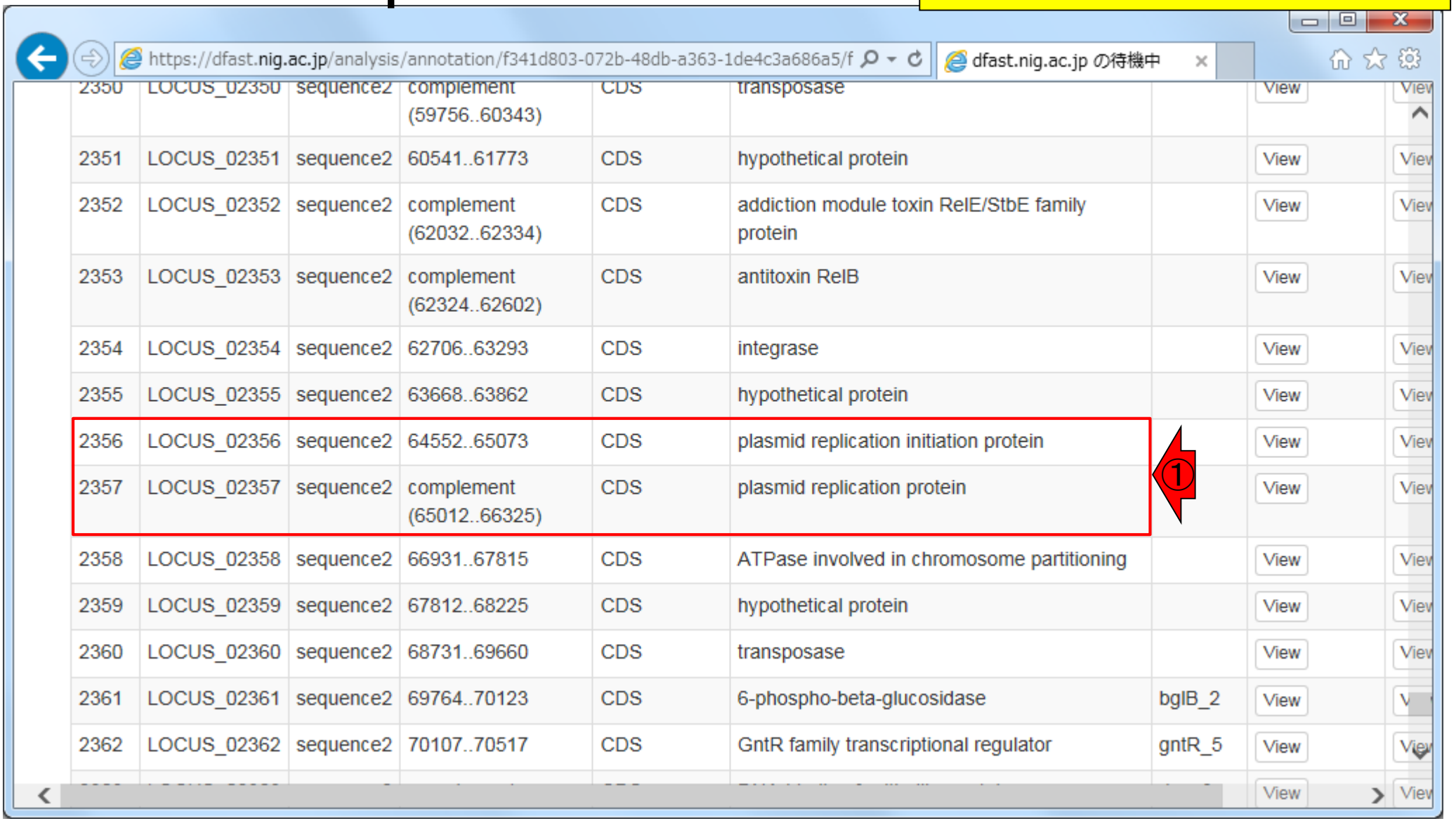
①ここからが、sequence2のアノテーション結果



2275	LOCUS_02275	sequence1	2288792..2289016	CDS	phage-related antirepressor		View	View
2276	LOCUS_02276	sequence1	2289054..2289158	CDS	hypothetical protein		View	View
2277	LOCUS_02277	sequence1	2289155..2289301	CDS	hypothetical protein		View	View
2278	LOCUS_02278	sequence2	complement (353..1006)	CDS	plasmid replication initiation protein		View	View
2279	LOCUS_02279	sequence2	1221..1391	CDS	transposase		View	View
2280	LOCUS_02280	sequence2	1671..1901	CDS	transposase		View	View
2281	LOCUS_02281	sequence2	3404..4126	CDS	ribose-5-phosphate isomerase A	rpiA_1	View	View
2282	LOCUS_02282	sequence2	complement (4735..5214)	CDS	resolvase		View	View
2283	LOCUS_02283	sequence2	5571..6200	CDS	transposase		View	View
2284	LOCUS_02284	sequence2	complement (6420..7796)	CDS	NADH oxidase		View	View
2285	LOCUS_02285	sequence2	complement (7912..9117)	CDS	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase		View	View
2286	LOCUS_02286	sequence2	complement (9477..10061)	CDS	resolvase		View	View

W4-7：sequence2概観

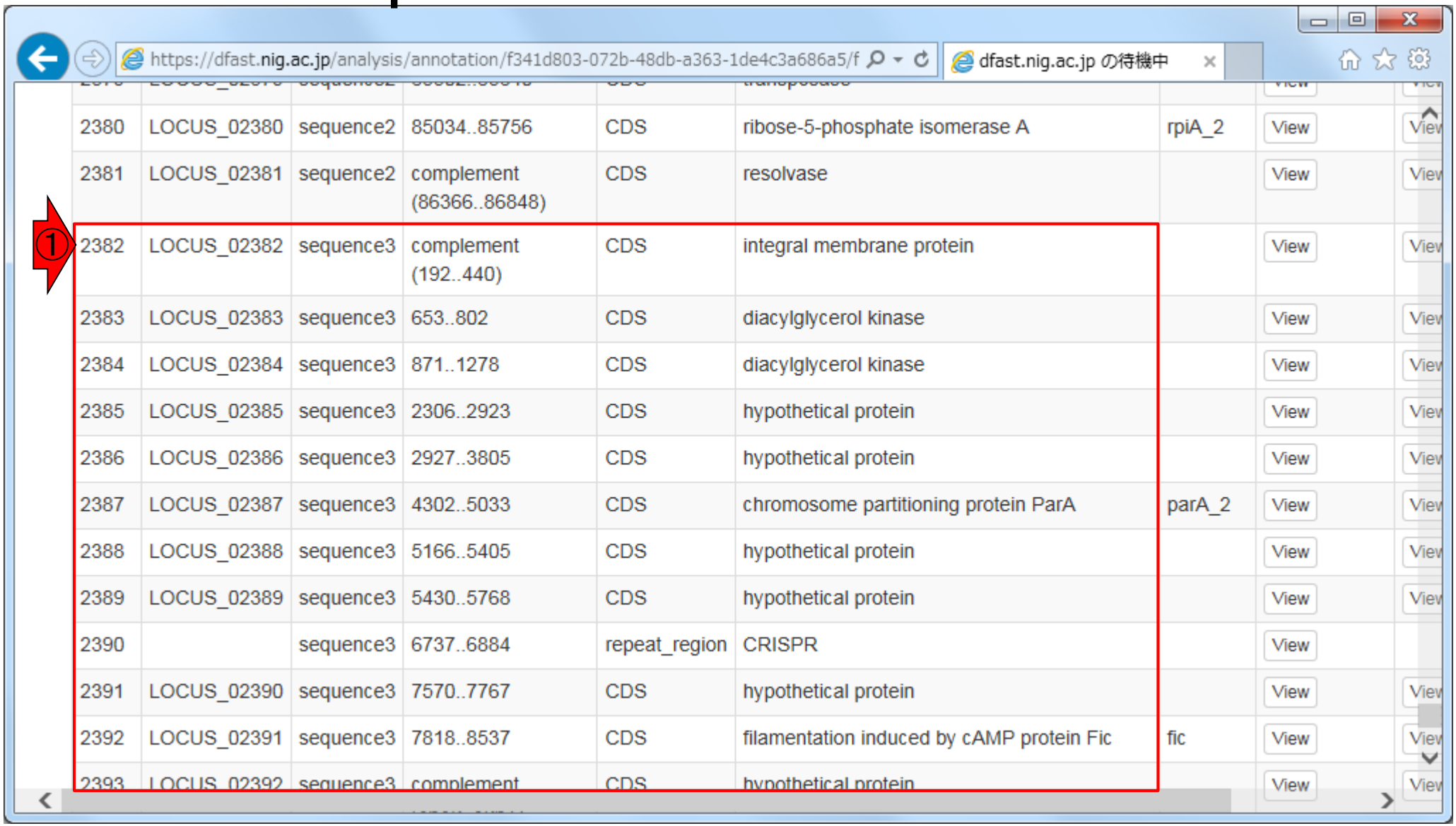
第7回でsequence2は環状のプラスミド配列だろうと予想していたが、①それを補強するアノテーション結果



2350	LOCUS_02350	sequence2	complement (59756..60343)	CDS	transposase		View	View
2351	LOCUS_02351	sequence2	60541..61773	CDS	hypothetical protein		View	View
2352	LOCUS_02352	sequence2	complement (62032..62334)	CDS	addiction module toxin RelE/StbE family protein		View	View
2353	LOCUS_02353	sequence2	complement (62324..62602)	CDS	antitoxin RelB		View	View
2354	LOCUS_02354	sequence2	62706..63293	CDS	integrase		View	View
2355	LOCUS_02355	sequence2	63668..63862	CDS	hypothetical protein		View	View
2356	LOCUS_02356	sequence2	64552..65073	CDS	plasmid replication initiation protein		View	View
2357	LOCUS_02357	sequence2	complement (65012..66325)	CDS	plasmid replication protein		View	View
2358	LOCUS_02358	sequence2	66931..67815	CDS	ATPase involved in chromosome partitioning		View	View
2359	LOCUS_02359	sequence2	67812..68225	CDS	hypothetical protein		View	View
2360	LOCUS_02360	sequence2	68731..69660	CDS	transposase		View	View
2361	LOCUS_02361	sequence2	69764..70123	CDS	6-phospho-beta-glucosidase	bglB_2	View	View
2362	LOCUS_02362	sequence2	70107..70517	CDS	GntR family transcriptional regulator	gntR_5	View	View

W4-8：sequence3概観

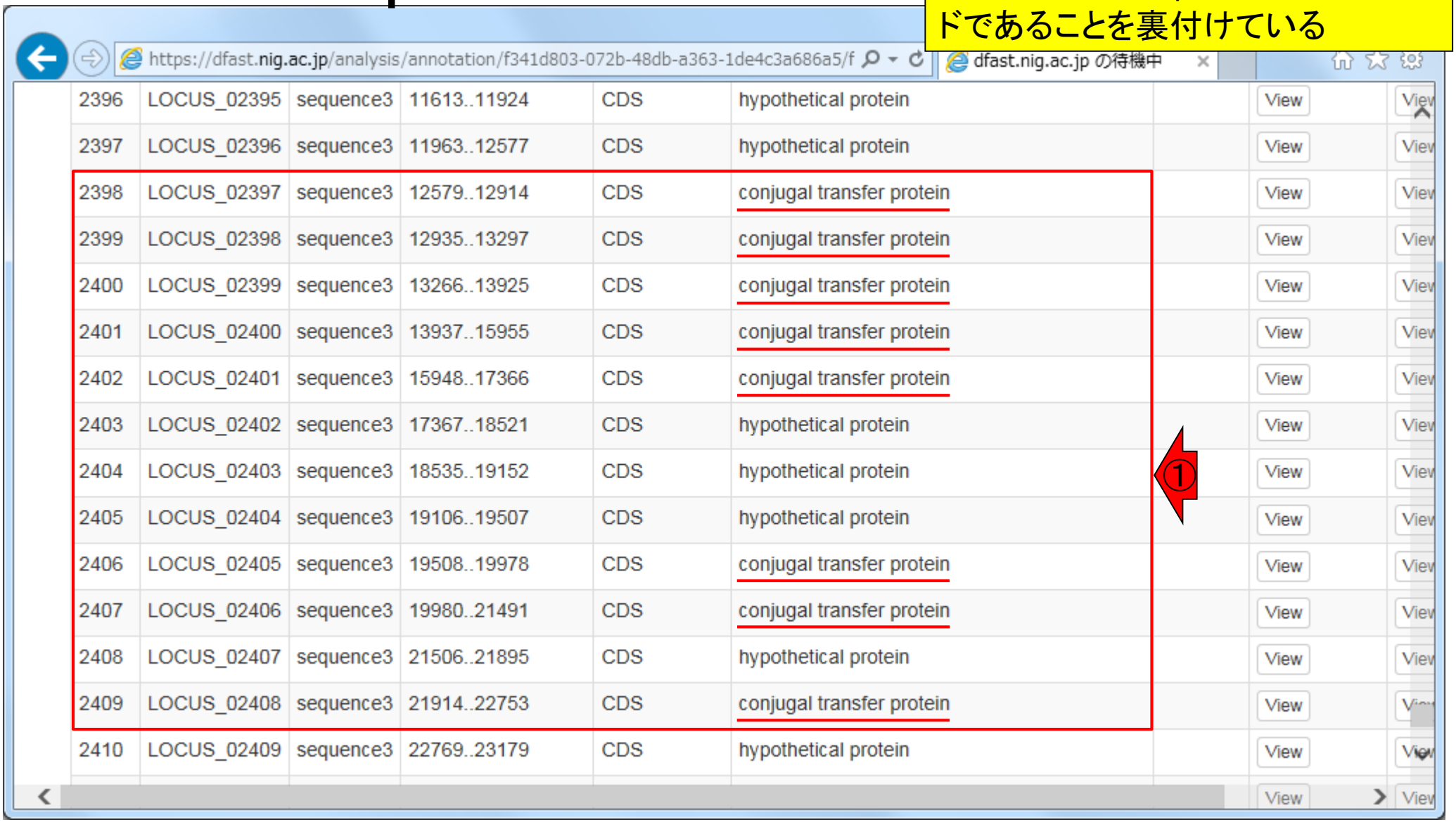
①ここからが、sequence3のアノテーション結果



2380	LOCUS_02380	sequence2	85034..85756	CDS	ribose-5-phosphate isomerase A	rpiA_2	View	View
2381	LOCUS_02381	sequence2	complement (86366..86848)	CDS	resolvase		View	View
① 2382	LOCUS_02382	sequence3	complement (192..440)	CDS	integral membrane protein		View	View
2383	LOCUS_02383	sequence3	653..802	CDS	diacylglycerol kinase		View	View
2384	LOCUS_02384	sequence3	871..1278	CDS	diacylglycerol kinase		View	View
2385	LOCUS_02385	sequence3	2306..2923	CDS	hypothetical protein		View	View
2386	LOCUS_02386	sequence3	2927..3805	CDS	hypothetical protein		View	View
2387	LOCUS_02387	sequence3	4302..5033	CDS	chromosome partitioning protein ParA	parA_2	View	View
2388	LOCUS_02388	sequence3	5166..5405	CDS	hypothetical protein		View	View
2389	LOCUS_02389	sequence3	5430..5768	CDS	hypothetical protein		View	View
2390		sequence3	6737..6884	repeat_region	CRISPR		View	
2391	LOCUS_02390	sequence3	7570..7767	CDS	hypothetical protein		View	View
2392	LOCUS_02391	sequence3	7818..8537	CDS	filamentation induced by cAMP protein Fic	fic	View	View
2393	LOCUS_02392	sequence3	complement	CDS	hypothetical protein		View	View

W4-8：sequence3概観

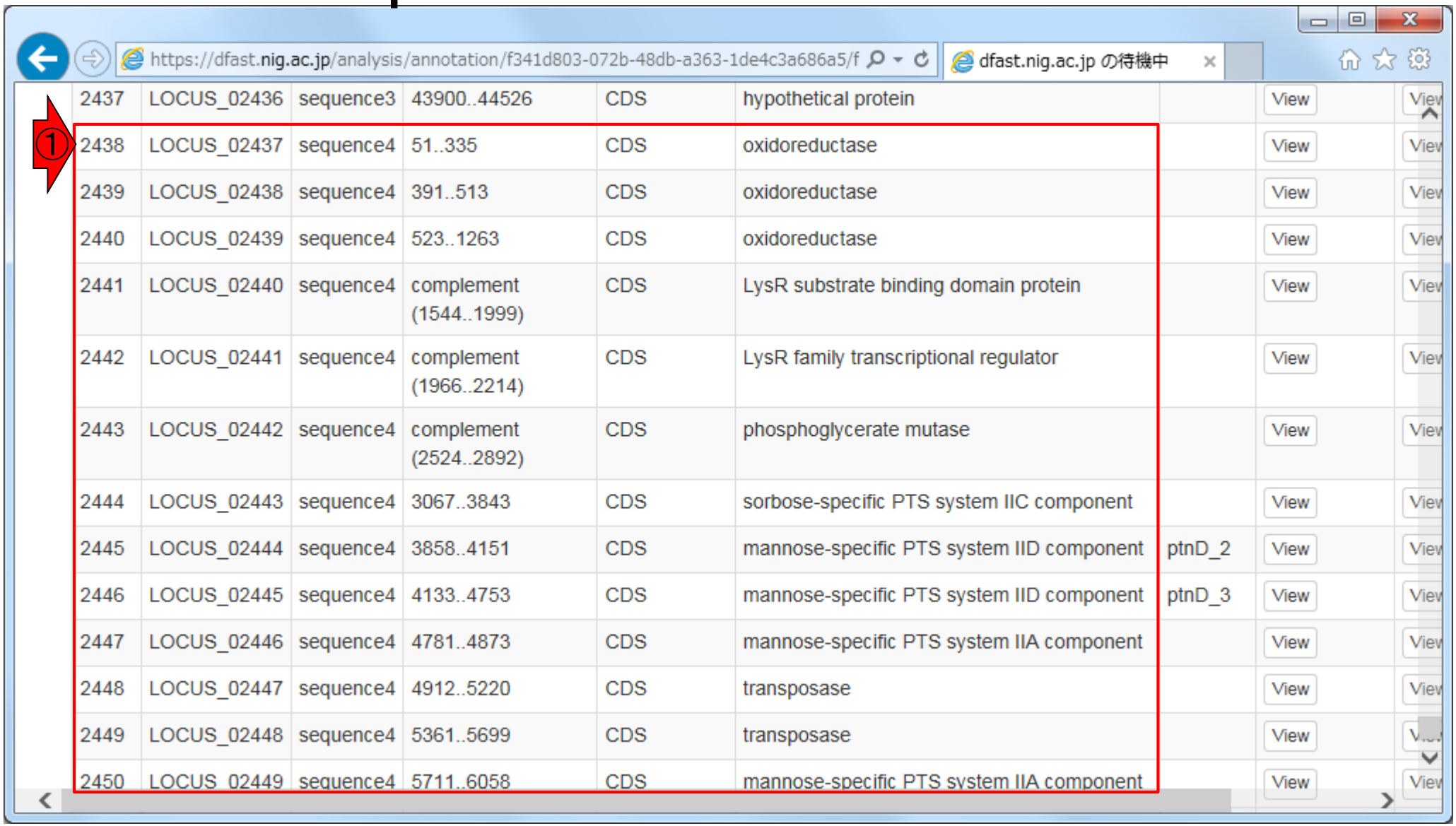
①赤下線で示す接合伝達(conjugal transfer)関連遺伝子が多く見られることからも、sequence3がプラスミドであることを裏付けている



2396	LOCUS_02395	sequence3	11613..11924	CDS	hypothetical protein	View	View
2397	LOCUS_02396	sequence3	11963..12577	CDS	hypothetical protein	View	View
2398	LOCUS_02397	sequence3	12579..12914	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2399	LOCUS_02398	sequence3	12935..13297	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2400	LOCUS_02399	sequence3	13266..13925	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2401	LOCUS_02400	sequence3	13937..15955	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2402	LOCUS_02401	sequence3	15948..17366	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2403	LOCUS_02402	sequence3	17367..18521	CDS	hypothetical protein	View	View
2404	LOCUS_02403	sequence3	18535..19152	CDS	hypothetical protein	View	View
2405	LOCUS_02404	sequence3	19106..19507	CDS	hypothetical protein	View	View
2406	LOCUS_02405	sequence3	19508..19978	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2407	LOCUS_02406	sequence3	19980..21491	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2408	LOCUS_02407	sequence3	21506..21895	CDS	hypothetical protein	View	View
2409	LOCUS_02408	sequence3	21914..22753	CDS	conjugal transfer protein	View	View
2410	LOCUS_02409	sequence3	22769..23179	CDS	hypothetical protein	View	View

W4-9：sequence4概観

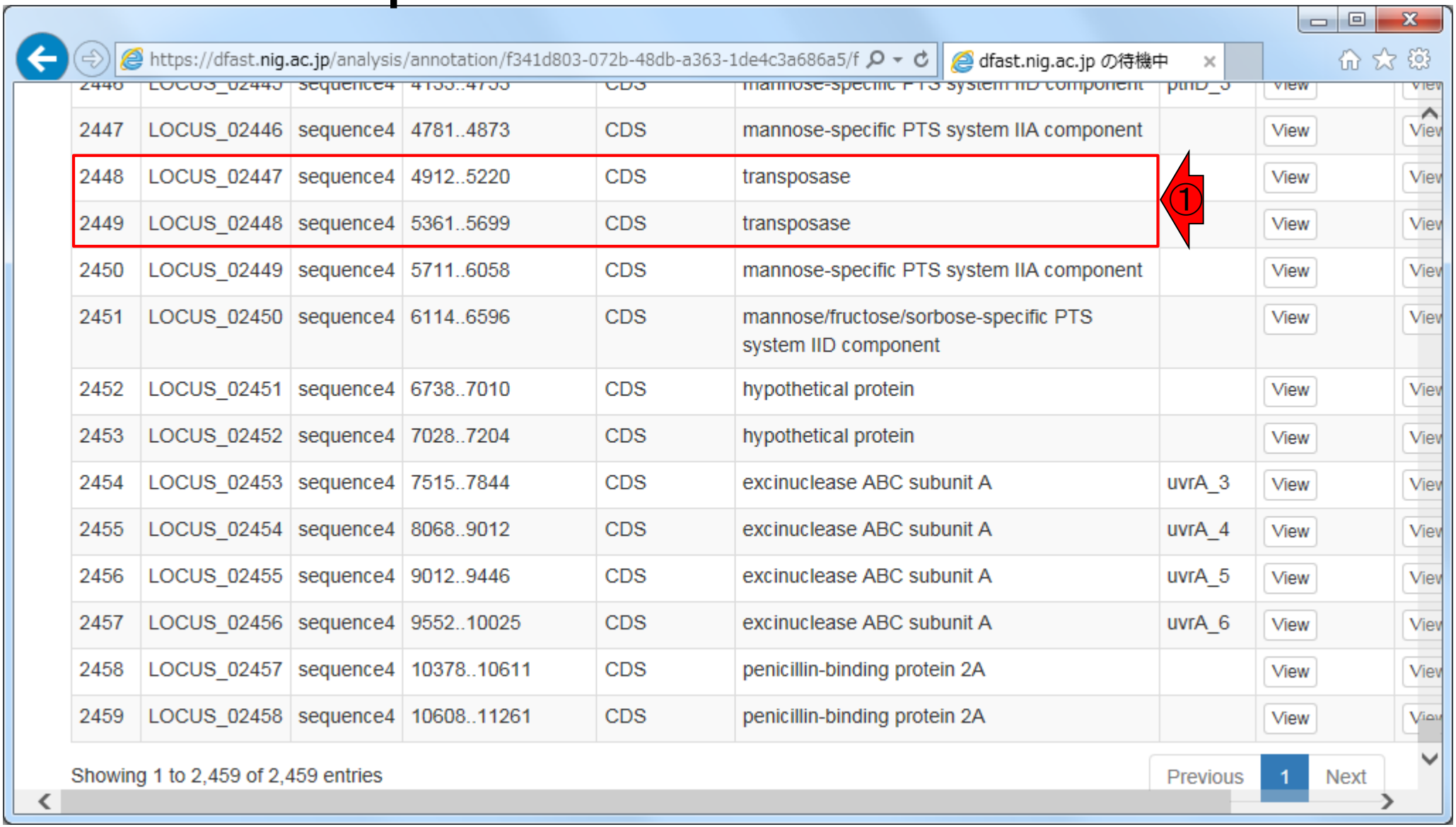
①ここからが、sequence4のアノテーション結果



2437	LOCUS_02436	sequence3	43900..44526	CDS	hypothetical protein		View	View
2438	LOCUS_02437	sequence4	51..335	CDS	oxidoreductase		View	View
2439	LOCUS_02438	sequence4	391..513	CDS	oxidoreductase		View	View
2440	LOCUS_02439	sequence4	523..1263	CDS	oxidoreductase		View	View
2441	LOCUS_02440	sequence4	complement (1544..1999)	CDS	LysR substrate binding domain protein		View	View
2442	LOCUS_02441	sequence4	complement (1966..2214)	CDS	LysR family transcriptional regulator		View	View
2443	LOCUS_02442	sequence4	complement (2524..2892)	CDS	phosphoglycerate mutase		View	View
2444	LOCUS_02443	sequence4	3067..3843	CDS	sorbose-specific PTS system IIC component		View	View
2445	LOCUS_02444	sequence4	3858..4151	CDS	mannose-specific PTS system IID component	ptnD_2	View	View
2446	LOCUS_02445	sequence4	4133..4753	CDS	mannose-specific PTS system IID component	ptnD_3	View	View
2447	LOCUS_02446	sequence4	4781..4873	CDS	mannose-specific PTS system IIA component		View	View
2448	LOCUS_02447	sequence4	4912..5220	CDS	transposase		View	View
2449	LOCUS_02448	sequence4	5361..5699	CDS	transposase		View	View
2450	LOCUS_02449	sequence4	5711..6058	CDS	mannose-specific PTS system IIA component		View	View

①ここにtransposaseがあります

W4-9：sequence4概観



2447	LOCUS_02446	sequence4	4781..4873	CDS	mannose-specific PTS system IIA component		View	View
2448	LOCUS_02447	sequence4	4912..5220	CDS	transposase		View	View
2449	LOCUS_02448	sequence4	5361..5699	CDS	transposase		View	View
2450	LOCUS_02449	sequence4	5711..6058	CDS	mannose-specific PTS system IIA component		View	View
2451	LOCUS_02450	sequence4	6114..6596	CDS	mannose/fructose/sorbose-specific PTS system IID component		View	View
2452	LOCUS_02451	sequence4	6738..7010	CDS	hypothetical protein		View	View
2453	LOCUS_02452	sequence4	7028..7204	CDS	hypothetical protein		View	View
2454	LOCUS_02453	sequence4	7515..7844	CDS	excinuclease ABC subunit A	uvrA_3	View	View
2455	LOCUS_02454	sequence4	8068..9012	CDS	excinuclease ABC subunit A	uvrA_4	View	View
2456	LOCUS_02455	sequence4	9012..9446	CDS	excinuclease ABC subunit A	uvrA_5	View	View
2457	LOCUS_02456	sequence4	9552..10025	CDS	excinuclease ABC subunit A	uvrA_6	View	View
2458	LOCUS_02457	sequence4	10378..10611	CDS	penicillin-binding protein 2A		View	View
2459	LOCUS_02458	sequence4	10608..11261	CDS	penicillin-binding protein 2A		View	View

Showing 1 to 2,459 of 2,459 entries

Previous 1 Next

第8回原稿p188の右上

①までで予備的なアノテーション結果の概観が終了

ゲノムアノテーション

ゲノムのアノテーション（genome annotation）とは、ゲノム上のどの位置にどのような遺伝子がコードされているかなどを調べ、注釈づけを行う作業である。バクテリアの自動アノテーションに関しては、MiGAP[9]やRAST[10-12]などの様々なウェブサービスが提供されており、手軽に実行可能である。今回は、乳酸菌に特化したアノテーションパイプラインDFAST（DDBJ Fast Annotation and Submission Tool）[13]を用いる。本ウェブサービスは、連載第5回[14]でも紹介したアノテーションパイプラインProkka[15]をベースとして、乳酸菌（主に*Lactobacillus*属および*Pediococcus*属）用に整備された参照データベースを組み合わせたものである。また、アノテーションだけでなく、DDBJ[16]への塩基配列登録支援を行うこともできる（もちろん登録は任意）のが特徴である。典型的なゲノムサイズ（数MB程度）の乳酸菌であれば、5分ほどで結果が返される。ここでは、アセンブリ結果の検証の一環として、アセンブリ結果ファイル（LH_hgap.fa）を入力としてDFASTを実行する［W4］。位置づけとしては、予備的なアノテーションである。

第7回までで予想していた通り、この2つの配列が（環状の）プラスミドであることを支持している。

sequence1（2,289,497 bp）については、最初の30,000塩基あたりまでにprophage proteinなどファージ関連遺伝子が見られる［W4-6］。また、sequence4（11,372 bp）については、4,912番目から5,699番目の領域にtransposaseがコードされている。この領域については後で議論するが、アノテーション結果の概観レベルでは見逃してもよい。後述するBLAST[17]の実行結果と合わせて総合的に判断する視点が重要である。

①

BLASTの実行と可視化

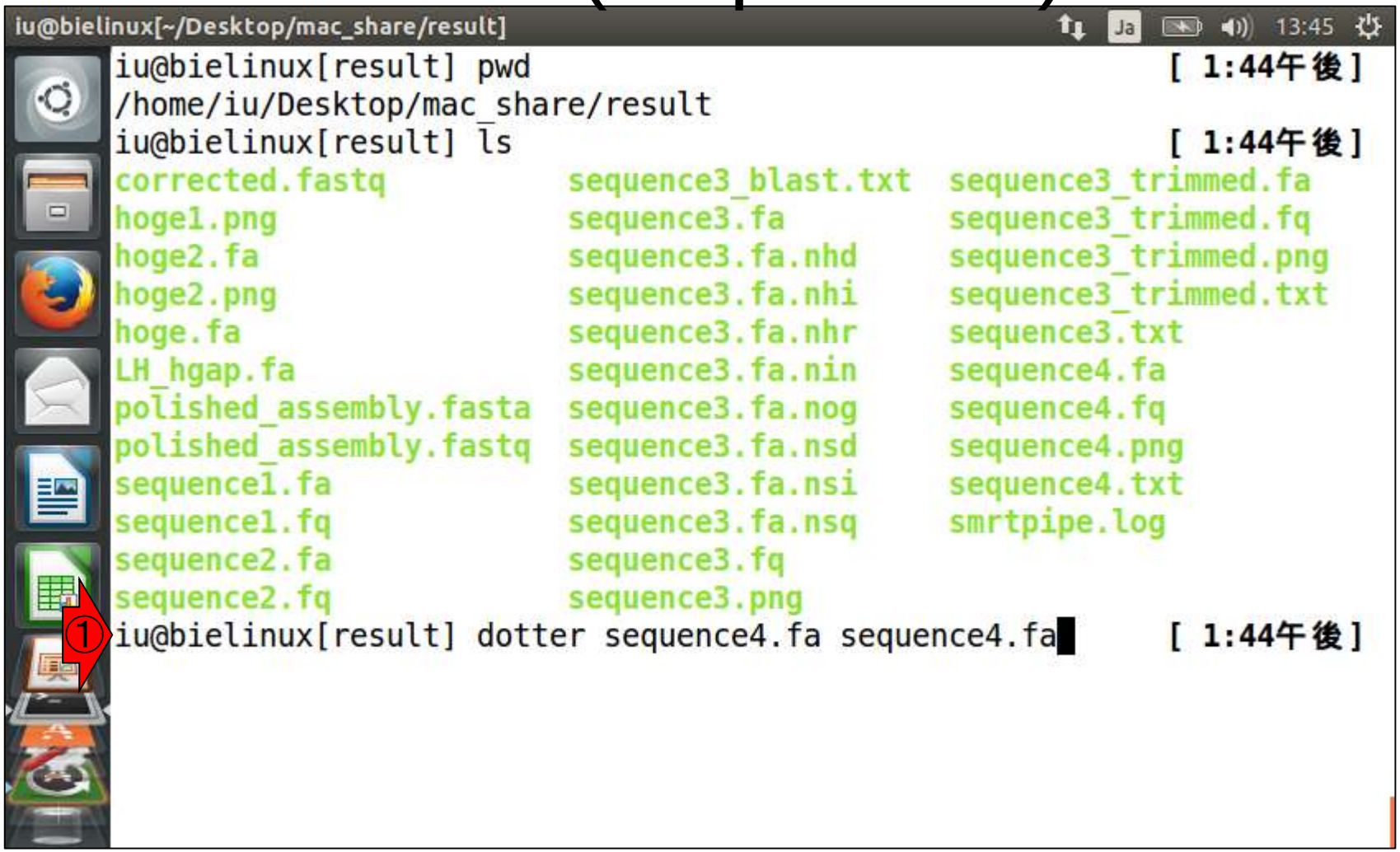
第7回では、sequence3同士を例として配列内の両末端部分の重複をドットプロットで大まかに調べ（第7回W14-2）、BLASTで重複領域の詳細なアラインメントを行った。ドットプロットについては、sequence3よりも2倍程度長いsequence2同士についてもdotter[18]を実行可能であり、両末端部分の重複が見いだせる［W5-1］。sequence4同士のドットプロットは、［1, 500 bp］と［750, 1350 bp］付近の領域が似ているものの、環状を示唆す

Contents（主に第8回）

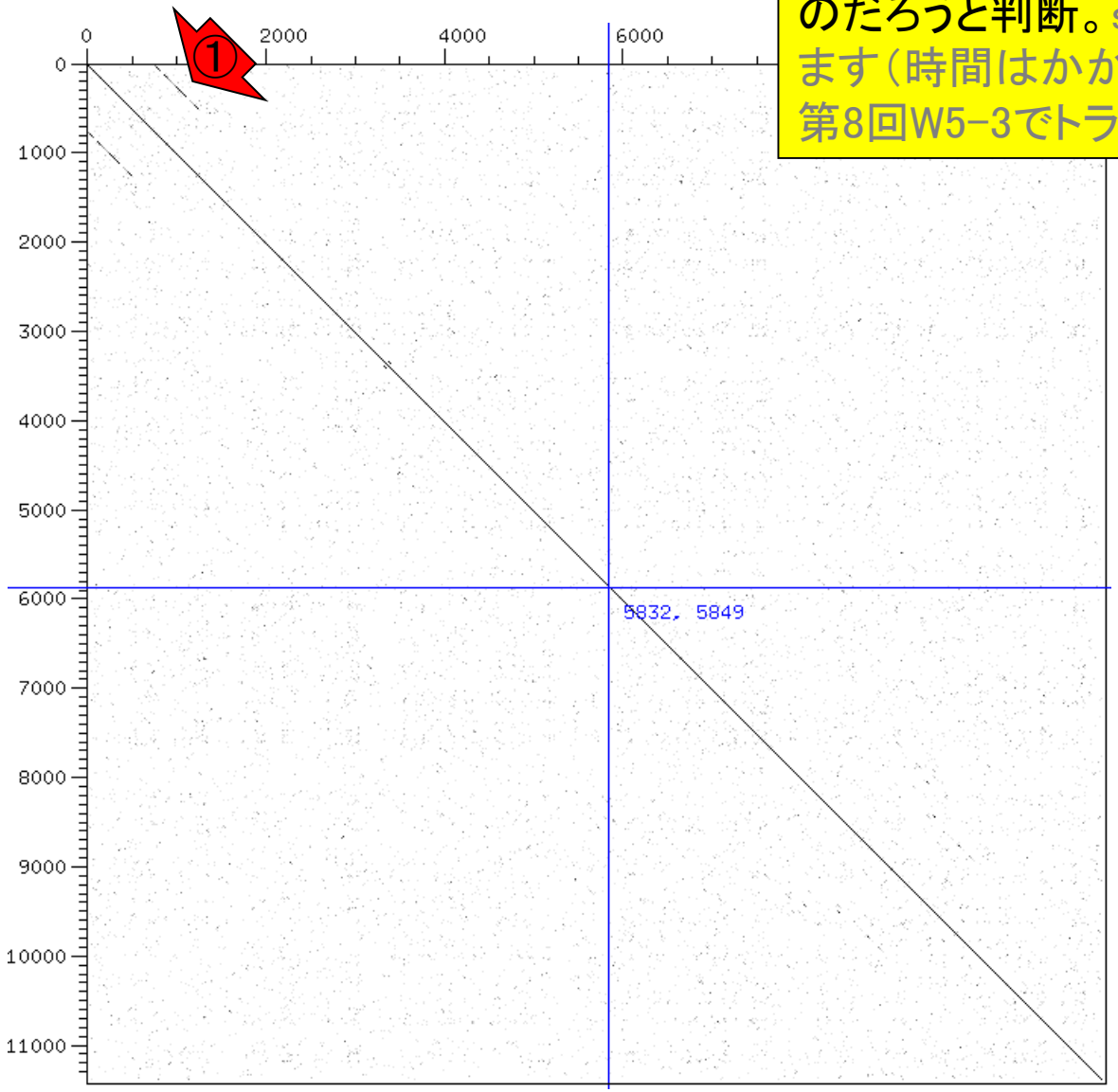
- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

①dotterでsequence4同士を比較

W5-2：dotter (sequence4)



W5-2：dotter (sequ



①この結果は、(1 – 500)番目と(750 – 1,350)番目付近の領域が似ていることを意味する。しかし両末端ではないので、sequence4は環状（プラスミド）ではないのだろうと判断。sequence2同士は第8回W5-1にあります（時間はかかるが実行可能）。sequence1同士は第8回W5-3でトライしています（事実上実行不可能）

第8回原稿p188の右下

今は①のあたり。sequence1をquery側の配列、sequence1-4をDB側の配列としてBlast実行する話へと移行していきます

ンパイプライン Prokka[15] をベースとして、乳酸菌（主に *Lactobacillus* 属および *Pediococcus* 属）用に整備された参照データベースを組み合わせたものである。また、アノテーションだけでなく、DDBJ[16] への塩基配列登録支援を行うこともできる（もちろん登録は任意）のが特徴である。典型的なゲノムサイズ（数 MB 程度）の乳酸菌であれば、5分ほどで結果が返される。ここでは、アセンブリ結果の検証の一環として、アセンブリ結果ファイル（LH_hgap.fa）を入力として DFAST を実行する［W4］。位置づけとしては、予備的なアノテーションである。

オプションとして、Job Title には好きな名称をつけられ、DDBJ Pipeline 実行時と同じくジョブ完了通知をメールで受け取ることもできる。"Minimum Contig Length" オプションは、設定値以下の短い断片配列を除くためのものである。今回の入力配列は、全てデフォルトの 200 塩基以上なので影響はない。属・種名などのオプションは、デフォルトのままで構わない。アノテーション結果に影響を与えることはなく、後で変更することも可能だからである［W4-3］。主なアノテーション結果は、入力ファイル中

①

BLAST の実行と可視化

第 7 回では、sequence3 同士を例として配列内の両末端部分の重複をドットプロットで大まかに調べ（第 7 回 W14-2）、BLAST で重複領域の詳細なアラインメントを行った。ドットプロットについては、sequence3 よりも 2 倍程度長い sequence2 同士についても dotter[18] を実行可能であり、両末端部分の重複が見いだせる［W5-1］。sequence4 同士のドットプロットは、［1, 500 bp］と［750, 1350 bp］付近の領域が似ているものの、環状を示唆する結果は得られなかった［W5-2］。約 2.3Mb と最も長い sequence1 同士は、ゲスト OS（Bio-Linux）への割り当てメモリが 2GB の著者らの PC 環境では、dotter を実行できなかった（数分程度では描画できなかった）［W5-3］。

通常は、sequence1 vs. sequence1 のような同一配列間の比較以外にも、sequence1 vs. sequence4 のような異なる配列間の比較も行い、配列類似領域を探索する。合計 4 配列しかないこのアセンブリ結果の場合はそれほどの作業量でもないが、ペアワイズアラインメントだと一般に組合

Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

第8回原稿p188の右下

①sequence1をquery側の配列、sequence1-4を含むLH_hgap.faをDB側の配列として、Blast実行する話へと移行。
②Blastだといっぺんに調べられて便利

オプションとして、Job Title には好きな名称をつけられ、DDBJ Pipeline 実行時と同じくジョブ完了通知をメールで受け取ることもできる。"Minimum Contig Length" オプションは、設定値以下の短い断片配列を除くためのものである。今回の入力配列は、全てデフォルトの 200 塩基以上なので影響はない。属・種名などのオプションは、デフォルトのままで構わない。アノテーション結果に影響を与えることはなく、後で変更することも可能だからである［W4-3］。主なアノテーション結果は、入力ファイル中の配列の順番通りに、「どの配列（コンティグ）中のどの座標上にどんな遺伝子が存在するか」という情報である。ウェブ上の Features タブ経由で見られる情報以外に、拡張子が .gbk の Genbank 形式や GFF3 形式ファイルがダウ

①

る結果は
sequence1 同士は、ゲスト OS（Bio-Linux）への割り当てメモリが 2GB の著者らの PC 環境では、dotter を実行できなかった（数分程度では描画できなかった）［W5-3］。

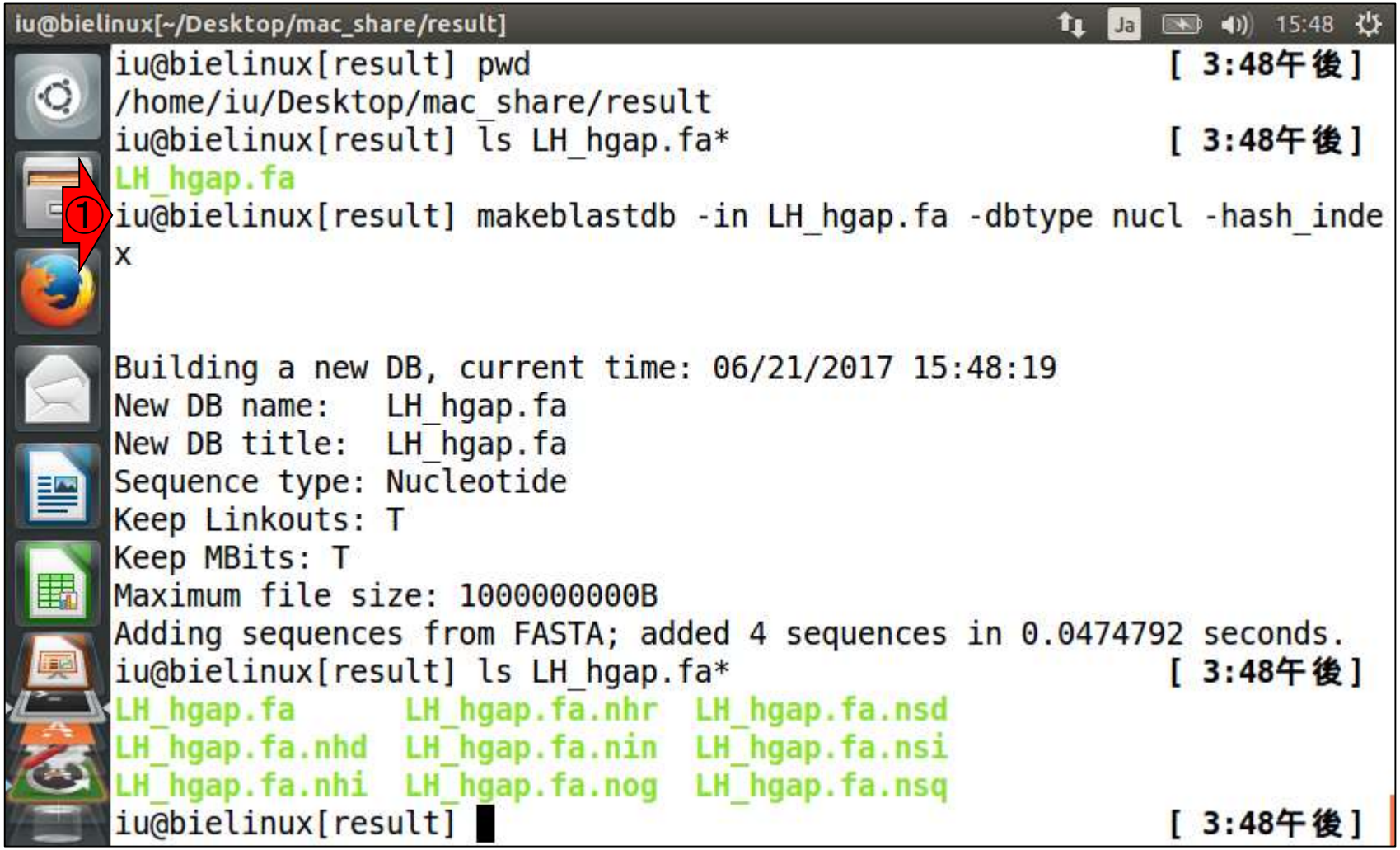
②

通常は、sequence1 vs. sequence1 のような同一配列間の比較以外にも、sequence1 vs. sequence4 のような異なる配列間の比較も行い、配列類似領域を探索する。合計 4 配列しかないこのアセンブリ結果の場合はそれほどの作業量でもないが、ペアワイズアラインメントだと一般に組合せ数が膨大になる。BLAST はこのような局面でも威力を発揮する。例えば、query 側の配列として sequence1 を、データベース（DB）側の配列として LH_hgap.fa を指定すれば、（自分自身を含む）4 通りの比較に相当する［W6］。

—188—

W6-1：makeblastdb

①makeblastdbの実行。第7回W15-1と基本的に同じ



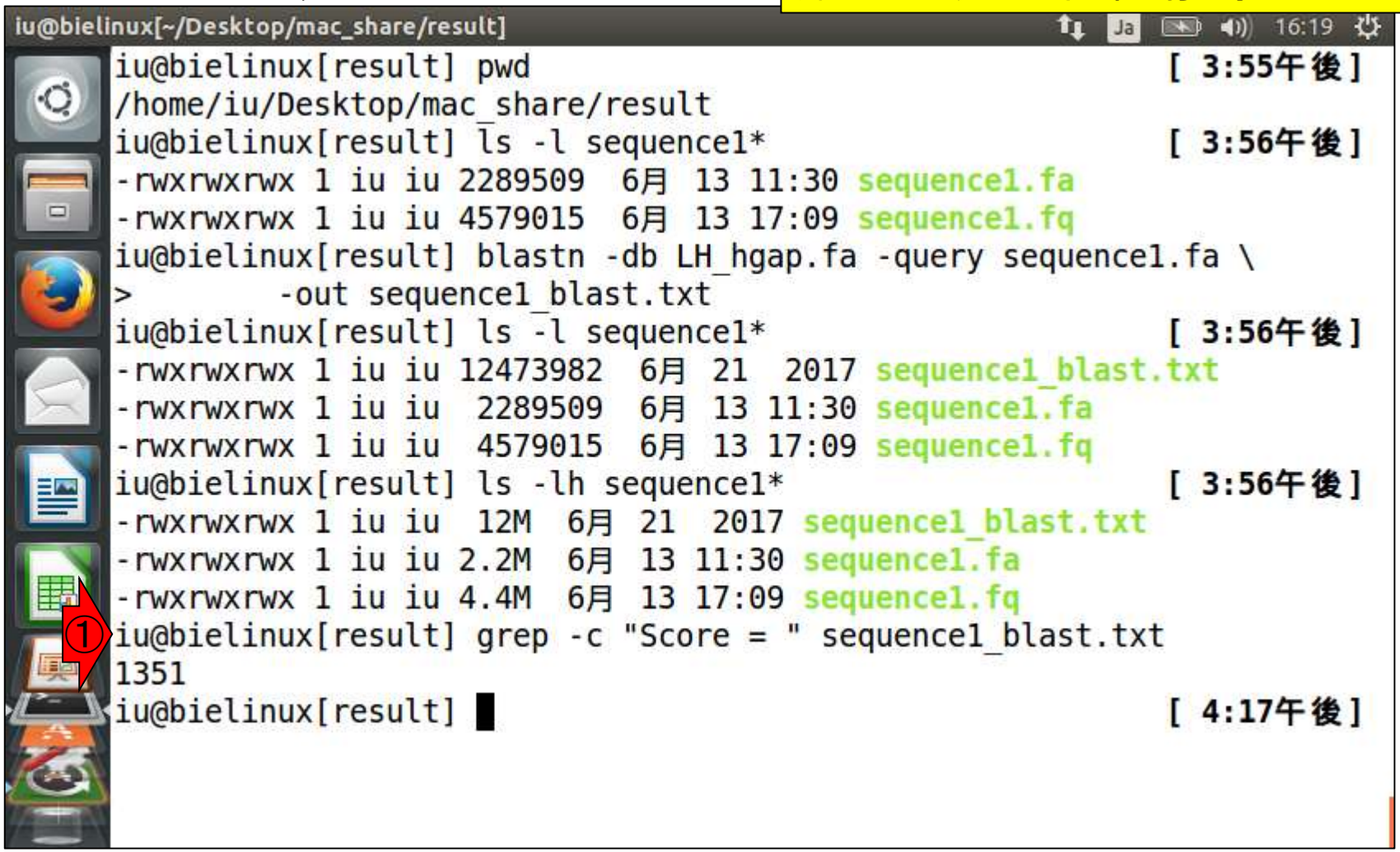
W6-2 : blastn

①DB側をLH_hgap.fa、query側をsequence1.fa、出力ファイルをsequence1_blast.txtとしてblastnを実行。②出力ファイルは12MB。sequence1.fa同士のアラインメント結果を丸々含んでいるためであろう

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]
iu@bielinux[result] pwd                                          [ 3:55午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l sequence1*                             [ 3:56午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2289509  6月 13 11:30 sequence1.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 4579015  6月 13 17:09 sequence1.fq
iu@bielinux[result] blastn -db LH_hgap.fa -query sequence1.fa \
>         -out sequence1_blast.txt
iu@bielinux[result] ls -l sequence1*                             [ 3:56午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 12473982  6月 21  2017 sequence1_blast.txt
-rwxrwxrwx 1 iu iu  2289509  6月 13 11:30 sequence1.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu  4579015  6月 13 17:09 sequence1.fq
iu@bielinux[result] ls -lh sequence1*                            [ 3:56午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu  12M  6月 21  2017 sequence1_blast.txt
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2.2M  6月 13 11:30 sequence1.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 4.4M  6月 13 17:09 sequence1.fq
iu@bielinux[result]                                              [ 3:56午後]
```

ヒット数

①"Score ="という文字列を含む行数は1,351個。つまりヒット数は1,351。これだけ多いと全体像の把握が困難なので、Blast結果閲覧専用のViewerを利用する



Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

第8回原稿p189の左上

①Blast結果閲覧用Viewerの1つであるBlastViewerで説明していきます

但し、sequence1 は非常に長いため、デフォルト出力形式の BLAST 実行結果ファイル（sequence1_blast.txt）を眺めて全体像を把握するのは困難である。

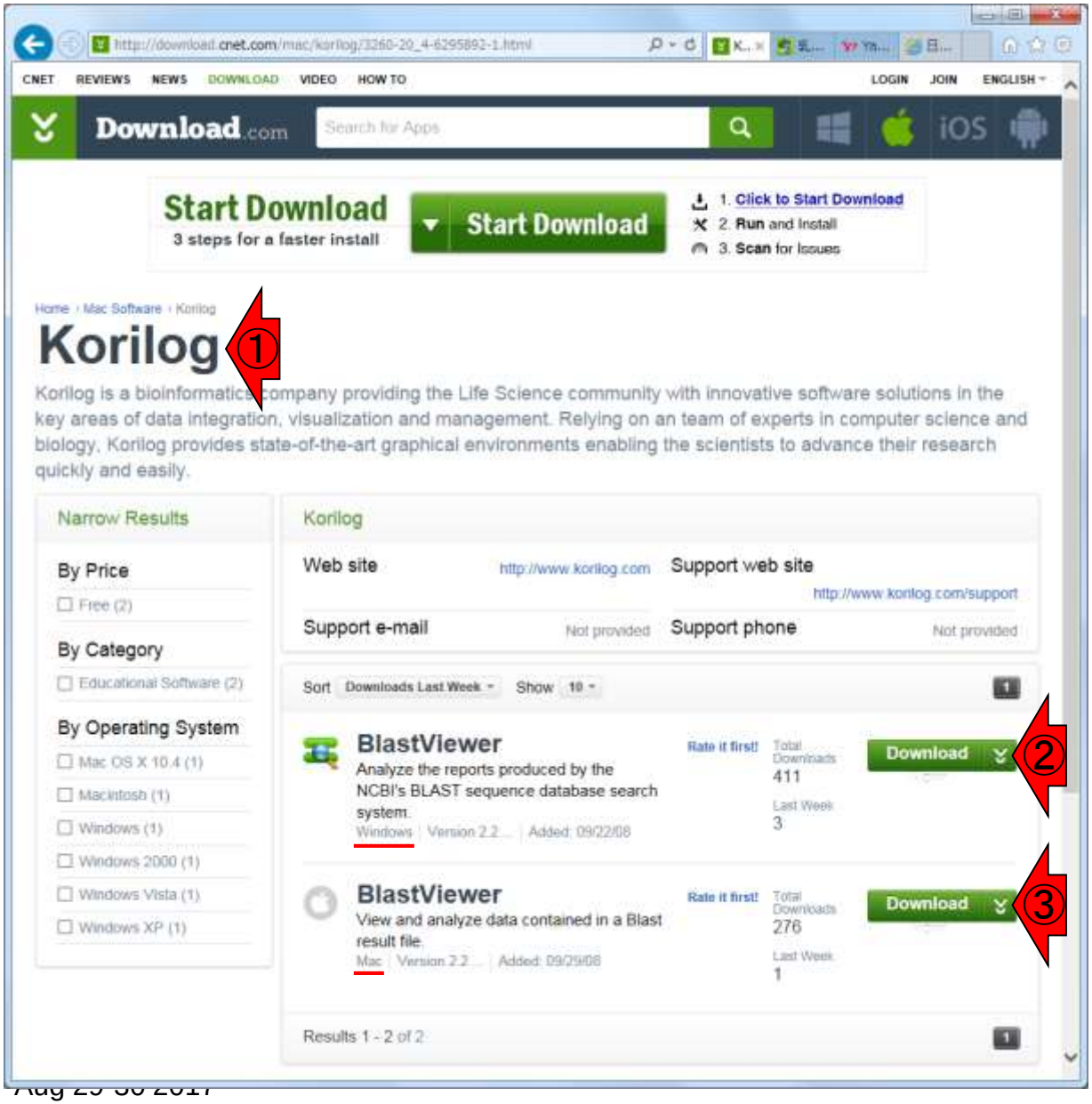
もちろん、BOV[19] や BLASTGrabber[20] [W7-1] など、BLAST 実行結果の全体像を把握するための可視化ソフトウェア（ビューワ；viewer）は存在する。ここでは、BlastViewer を利用する [W7-2]。BlastViewer は Windows 用と Macintosh 用のみが提供されているため、ホスト OS 上でインストールして利用する。XML 形式の BLAST 実行結果ファイル（sequence1_blast.xml）しか受け付けないが、DB 側の配列ごとにヒット数（配列類似領域数；HSP 数）が示されているなど、全体的な操作感がよい[W7-4]。例えば、sequence1 に対するヒット数が 1,347 個、sequence4 が 2 個、sequence3 と sequence2 がそれぞれ 1 個であったことがわかる。また、ヒット数やスコア分布の全体像を眺めることで、sequence1 にいくつかの重複領域が存在することや、11,372 bp からなる sequence4 の大部分の領域が sequence1 と類似していることなどがわかる [W8-1]。

②

た [W8-3]。また、スコアの低いほう（Score＝8,907）の 2 つめの HSP（以下、HSP2）は、sequence1 の領域 [555167, 560027 bp] と、sequence4 の領域 [4852, 1 bp] から形成されていた [W8-4]。いずれの HSP も、sequence1 が Plus（+）鎖、sequence4 が Minus(−)鎖でアラインメントされていた。これは、sequence1 の一続きの領域 [549494, 560027 bp] と、領域 [4853, 5705 bp] を除く sequence4 の全長がほぼ一致していることを意味する（図 1a；W8-5）。

アラインメントされなかった sequence4 の領域 [4853, 5705 bp] に対するアノテーション結果を眺めると、transposase がコードされていたことがわかる（図 1b；W8-5）。これは、該当領域が挿入配列（insertion sequence; IS）であることを示唆する。これはおそらく、乳酸菌の培養途中で一部の細胞に IS の挿入が起こったためであろう。結果として、シークエンスされた細胞集団の中に IS を含むものと含まないものが混在することになり、sequence4 が独立したコンティグとして出力されたものと思われる。sequence4 は全体的にクオリティスコアが低く

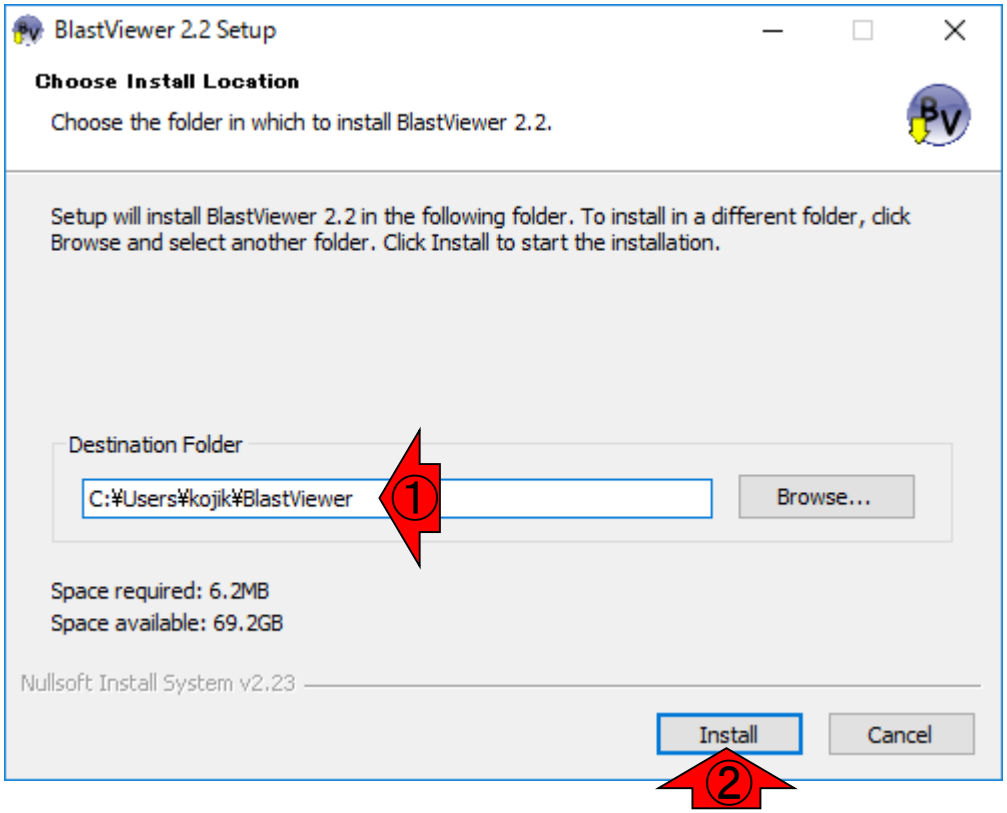
W7-2 : BlastViewer

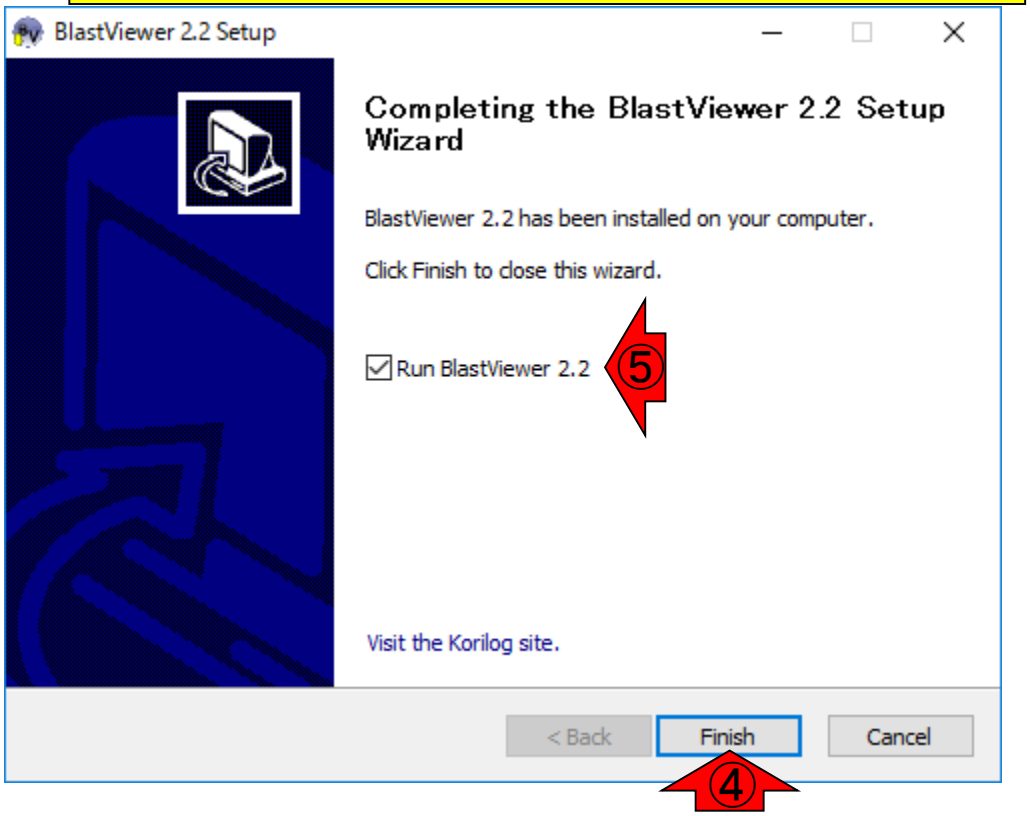


①Korilogというところが提供しているBlastViewerのウェブページ。②Windows版と③Macintosh版。ときどき②と③の上下が入れ替わるようなので注意。次のスライド以降はWindows版で説明

W7-2 : BlastViewer

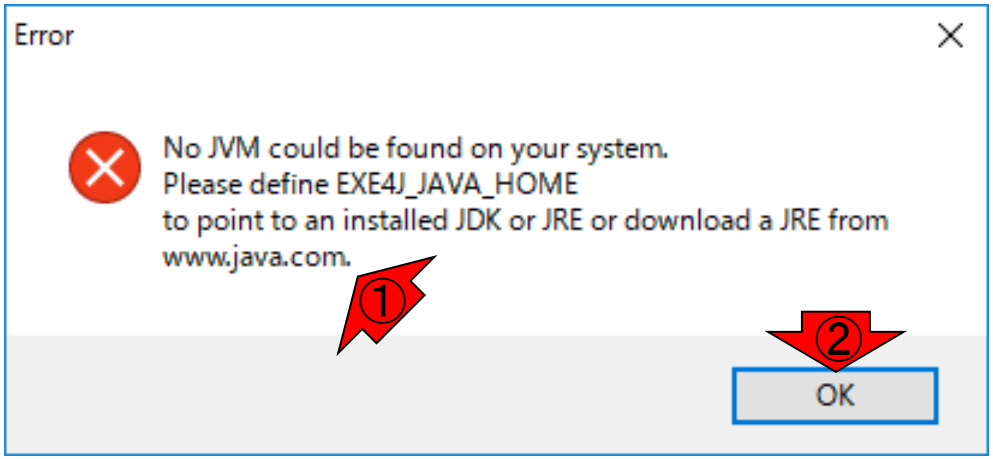
Windows 10上でのインストール画面。①ここに作成されるようだ。②Install。③デスクトップにBlastViewerのアイコンが作成されるはず。④Finish。デフォルトでは⑤にチェックが入っているのでBlastViewer (ver. 2.2)が起動する





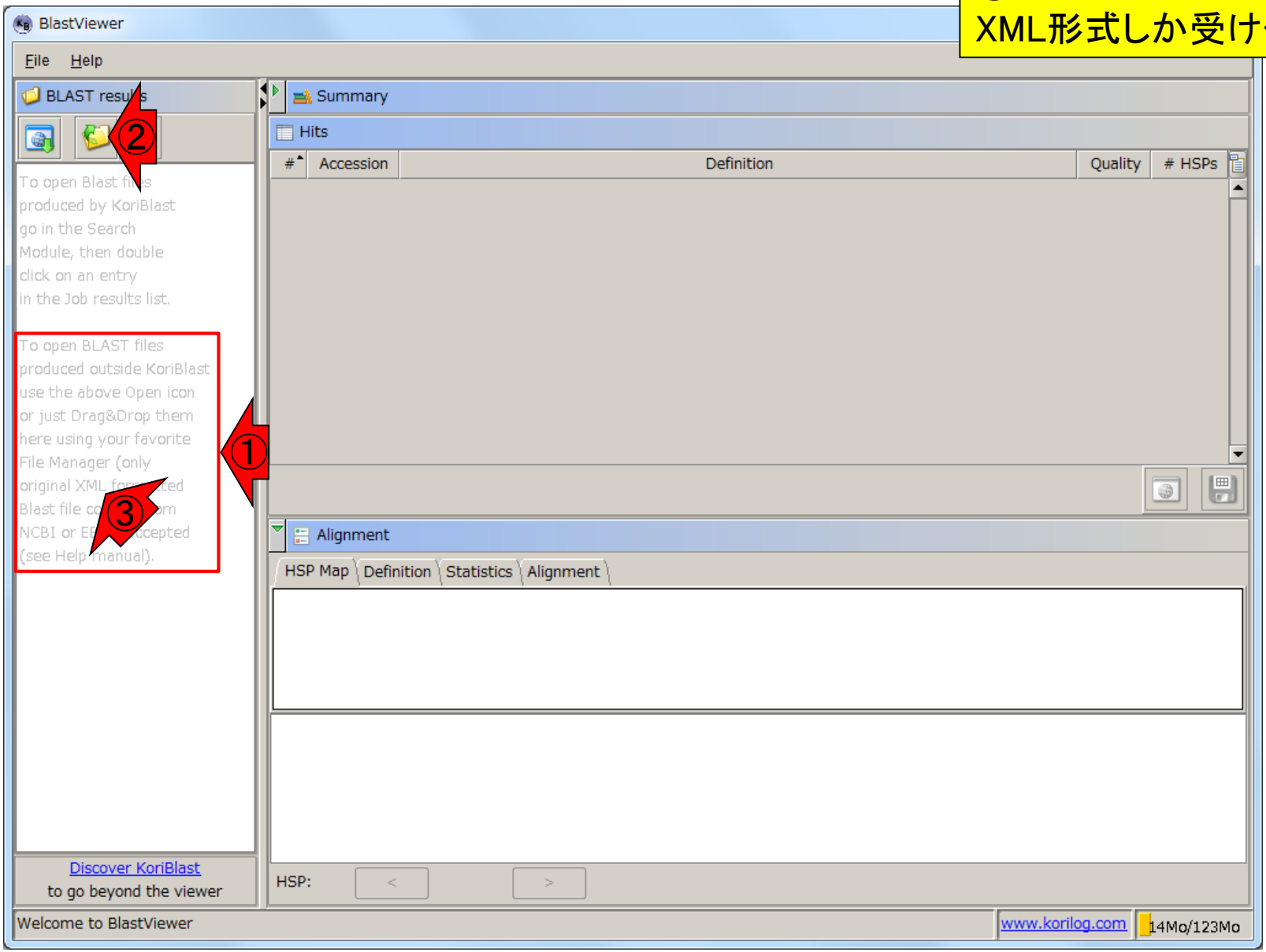
Java関連でエラーが出たら

BlastViewer (ver. 2.2)が起動できず、①Java関連でエラーが出たら、③どうにかして自力でインストールしてください。アグリバイオ貸与PCはJavaインストール済み(なはず)



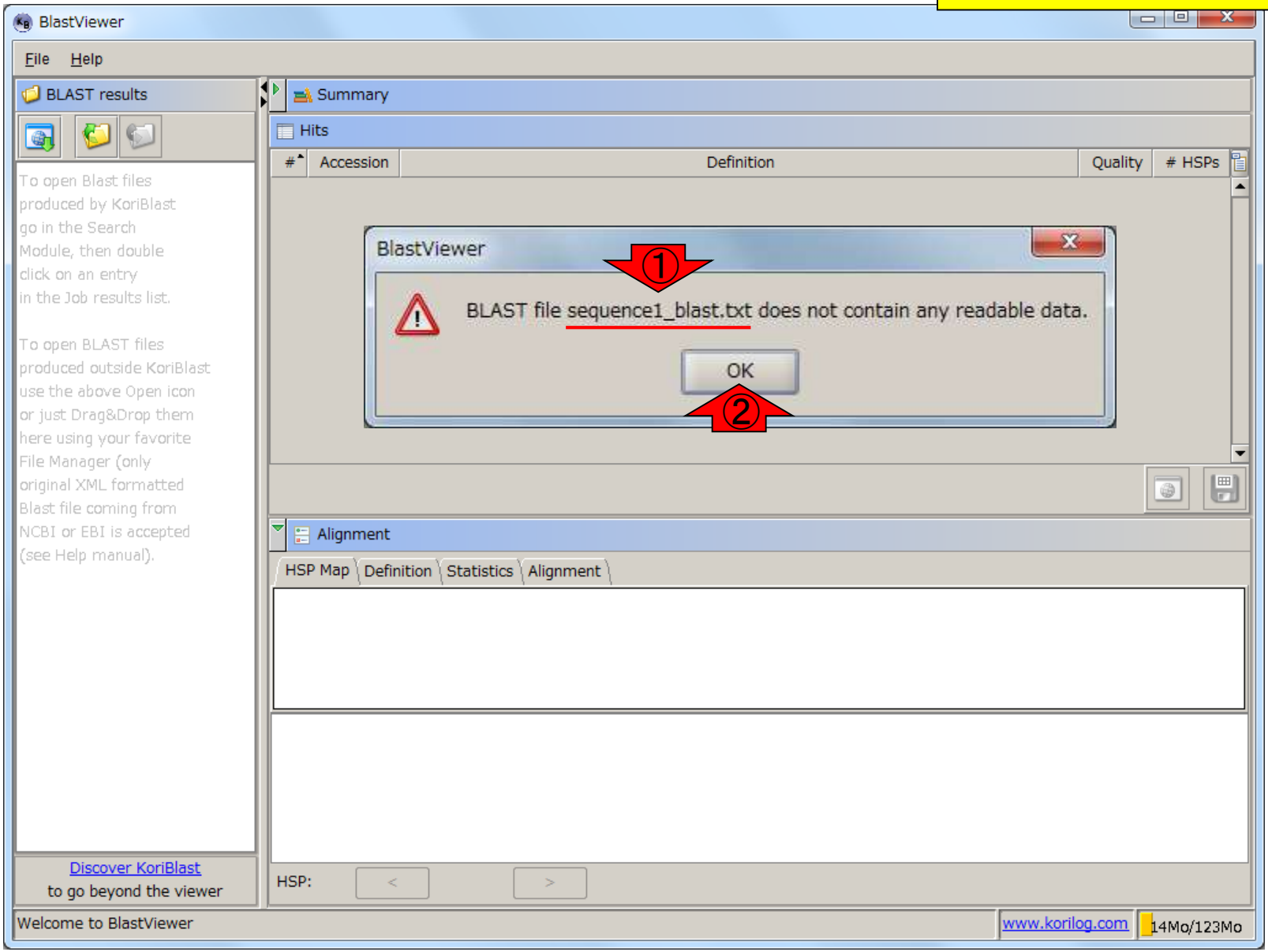
W7-2 : BlastViewer

①を見ることで、Blast結果ファイルを開く際には、②を押せばよいことがわかる。
③をよく見るとBlast出力結果ファイルはXML形式しか受け付けていないようだ



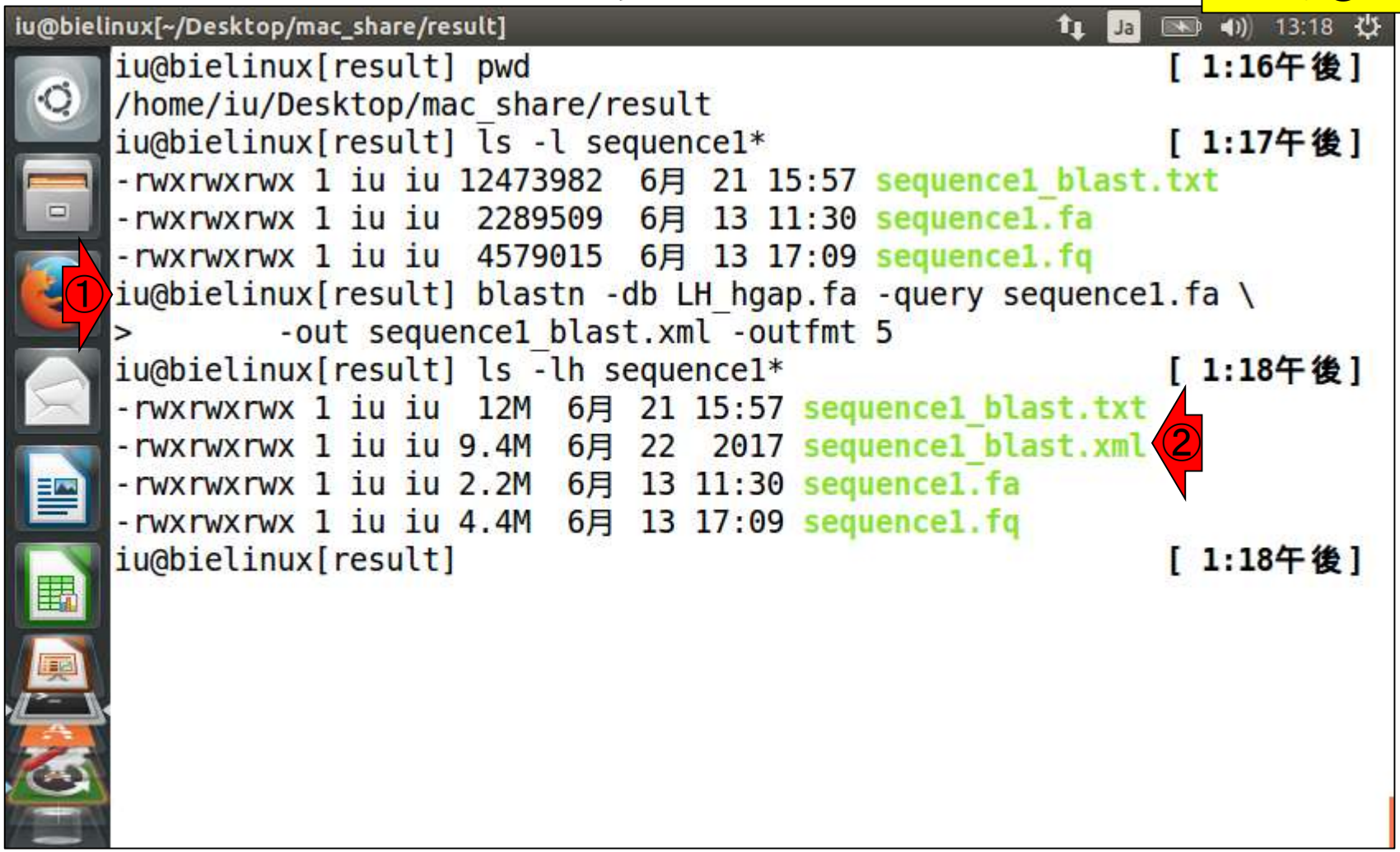
W7-2 : BlastViewer

①ためしにW6-2で作成したテキスト形式のBlast結果ファイル(sequence1_blast.txt)を読み込もうとしたらダメでした。②OK



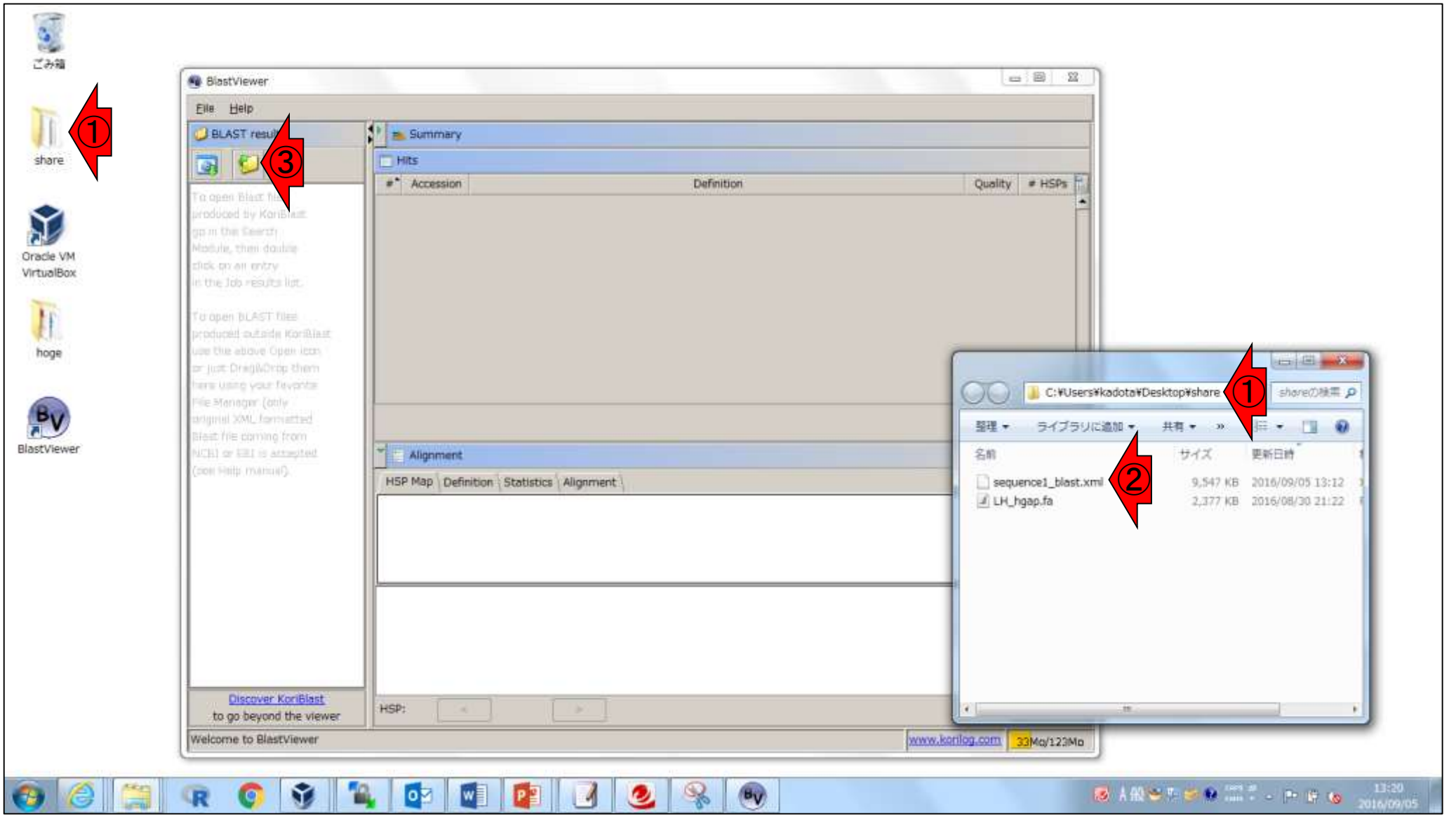
W7-3：Blast再実行

①XML形式のBlast結果ファイル(sequence1_blast.xml)を作成。②確かにあります



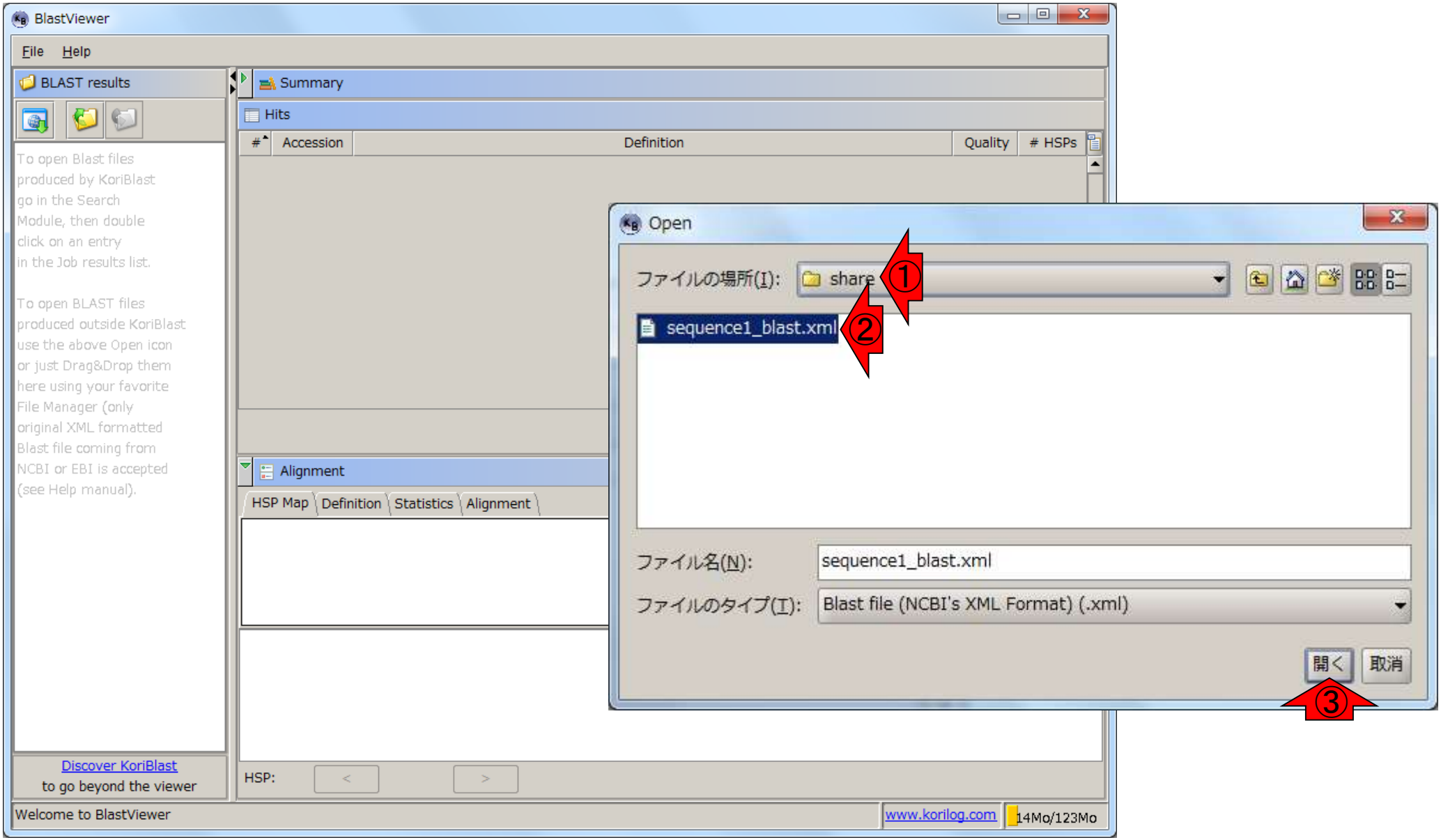
W7-4： BlastViewer

①共有フォルダ上の、②XML形式のBlast結果ファイル(sequence1_blast.xml)を、③開く



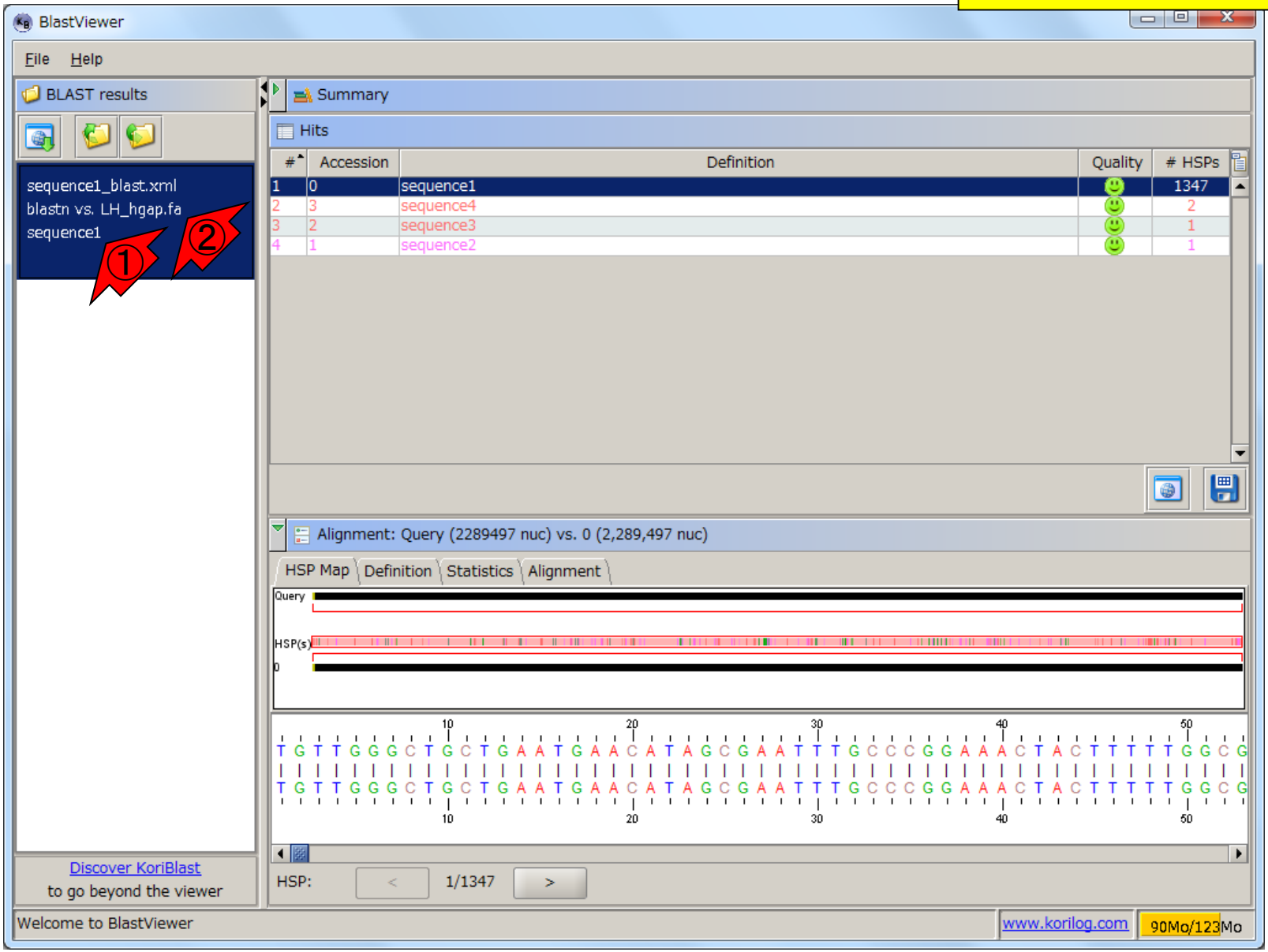
W7-4： BlastViewer

①共有フォルダ上の、②XML形式のBlast結果ファイル(sequence1_blast.xml)を、③開く



W7-4：BlastViewer

読み込み後の状態。①query側がsequence1.fa、②DB側がsequence1−4からなるLH_hgap.faだったことを思い出そう

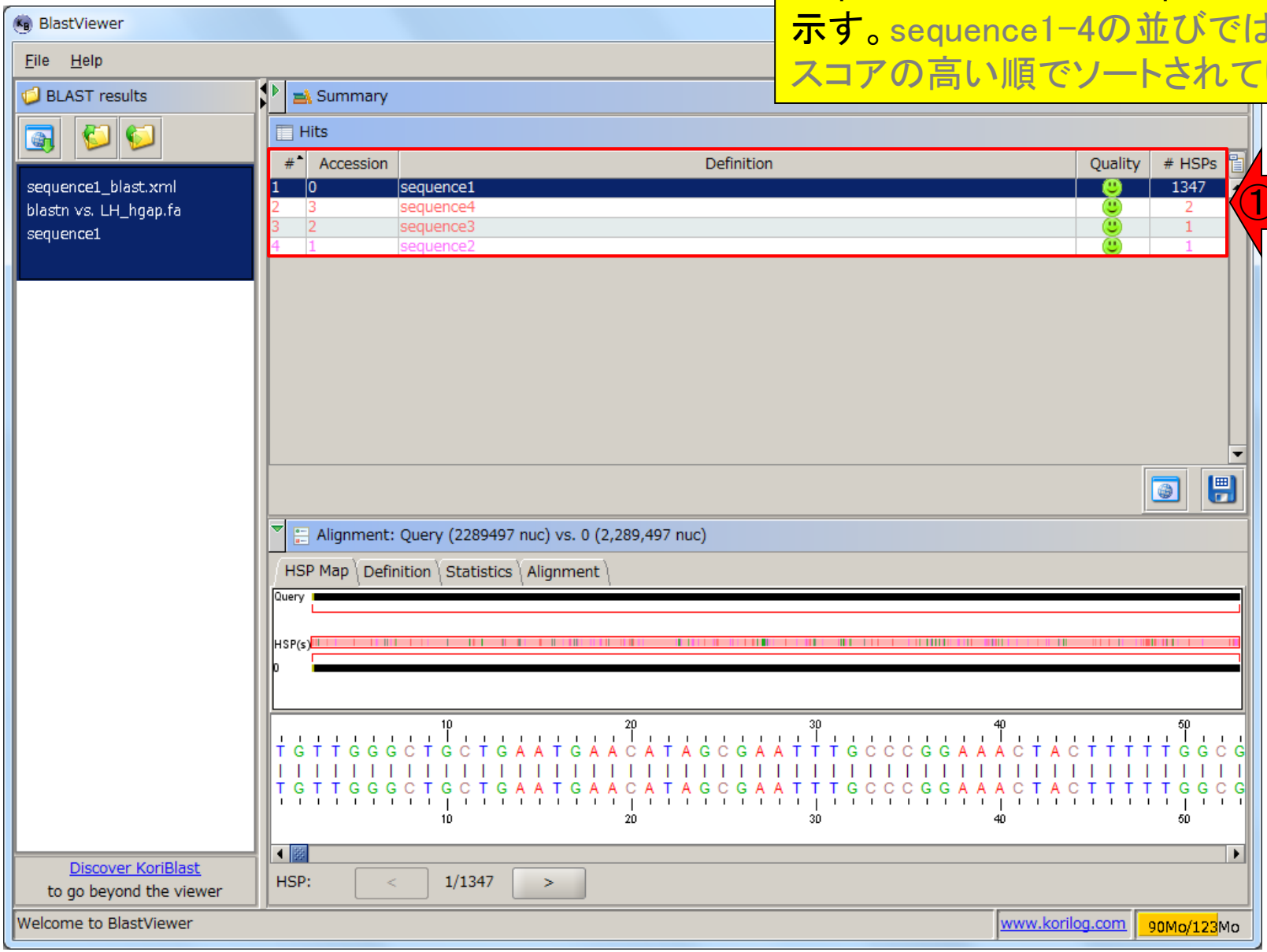


Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

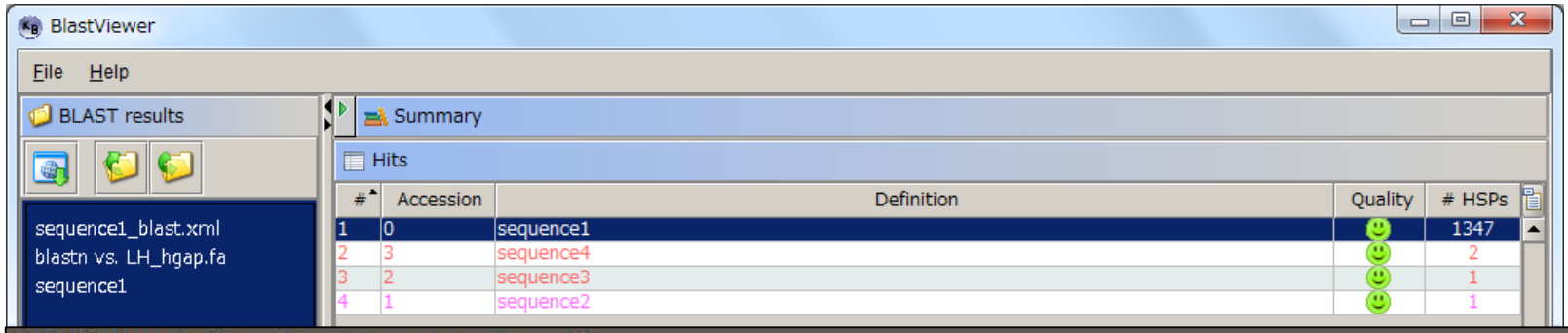
W7-5：解釈1

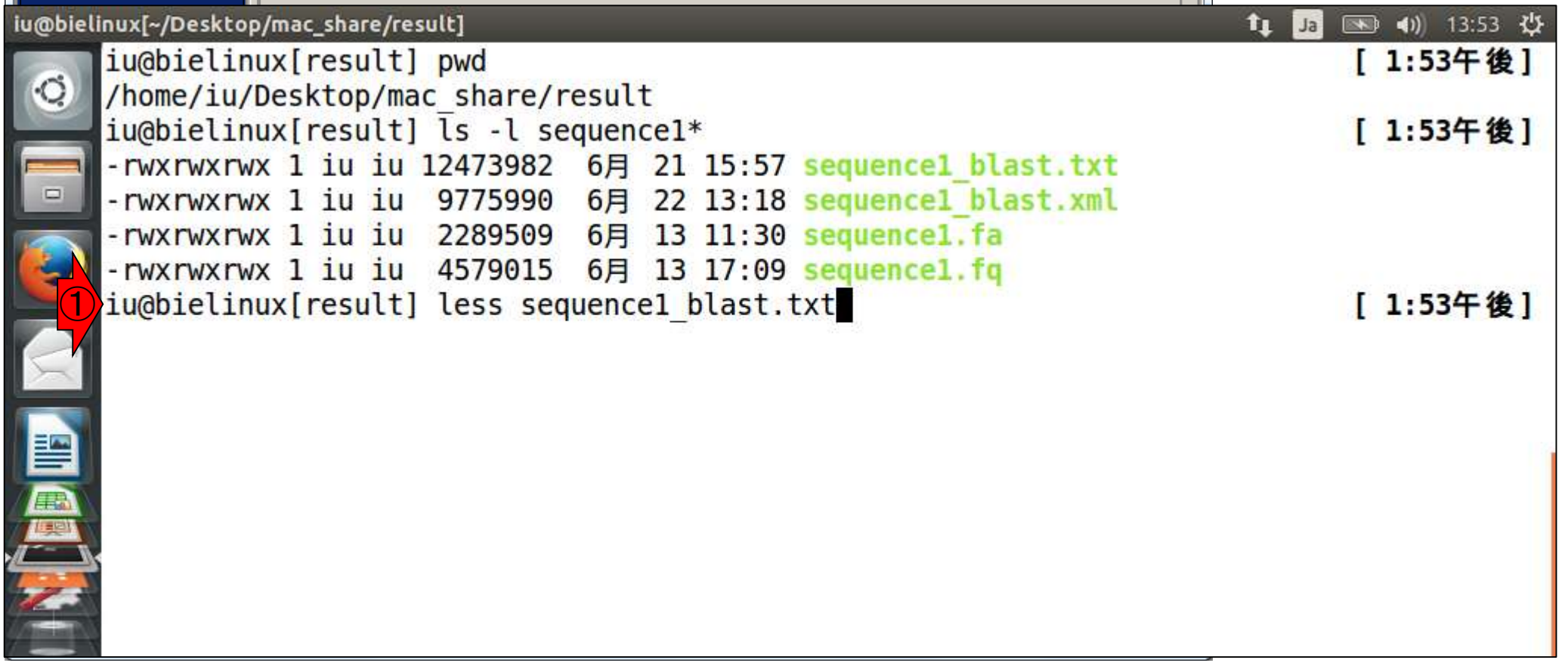
①は、DB側のヒット数（配列類似領域の数；HSPの数）が、sequence1中に1347個、sequence4中に2個、sequence3中に1個、sequence2中に1個あったことを示す。sequence1−4の並びではないので、HSP数かスコアの高い順でソートされているのだろうと妄想



W7-5：解釈2

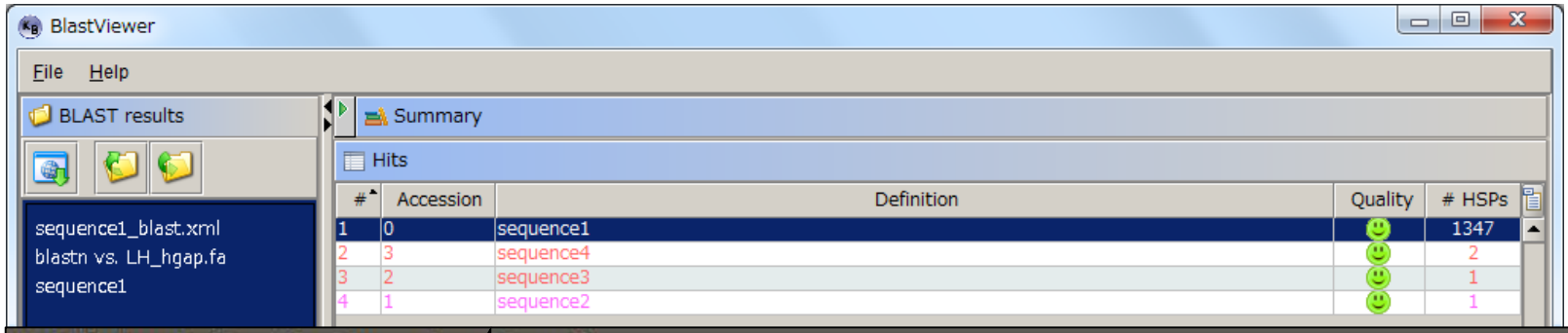
①テキスト形式のBLAST結果ファイル(sequence1_blast.txt)をlessで眺めて全体像を大まかに把握

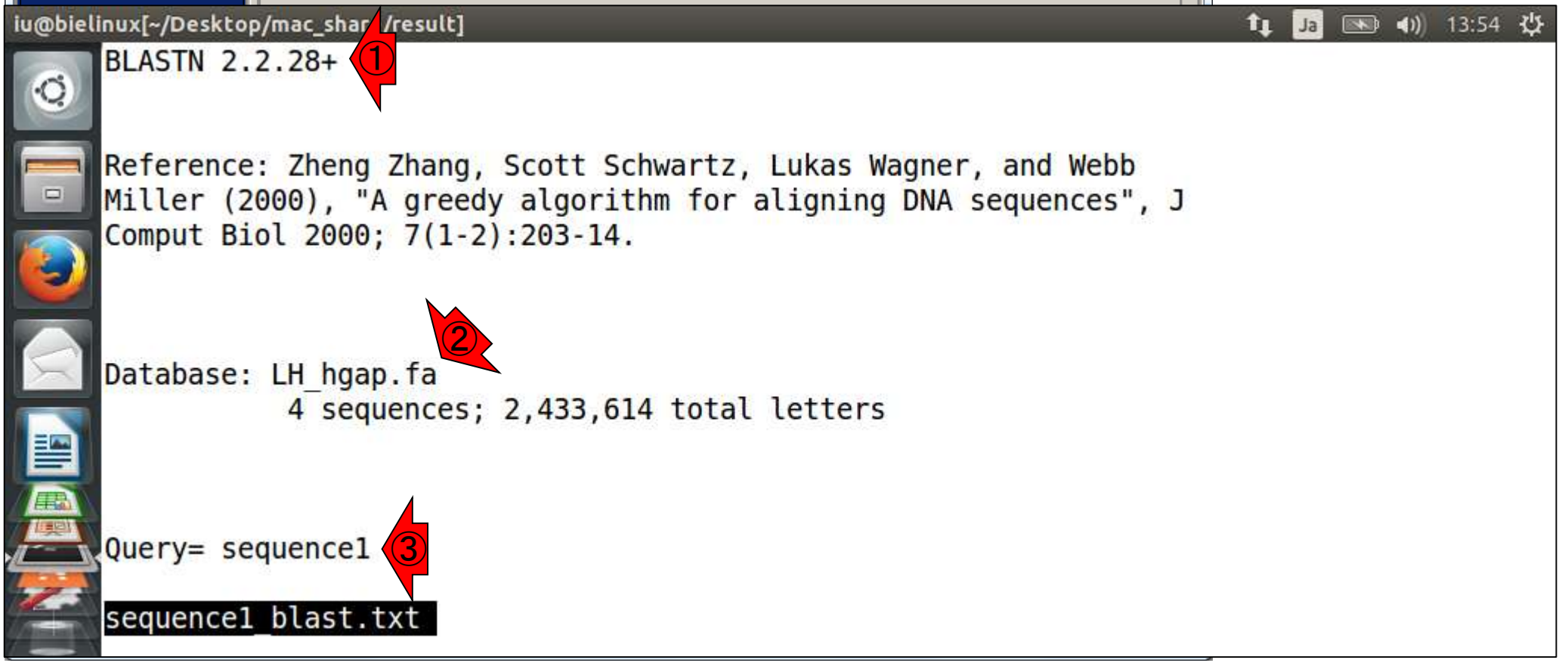




W7-5：解釈3

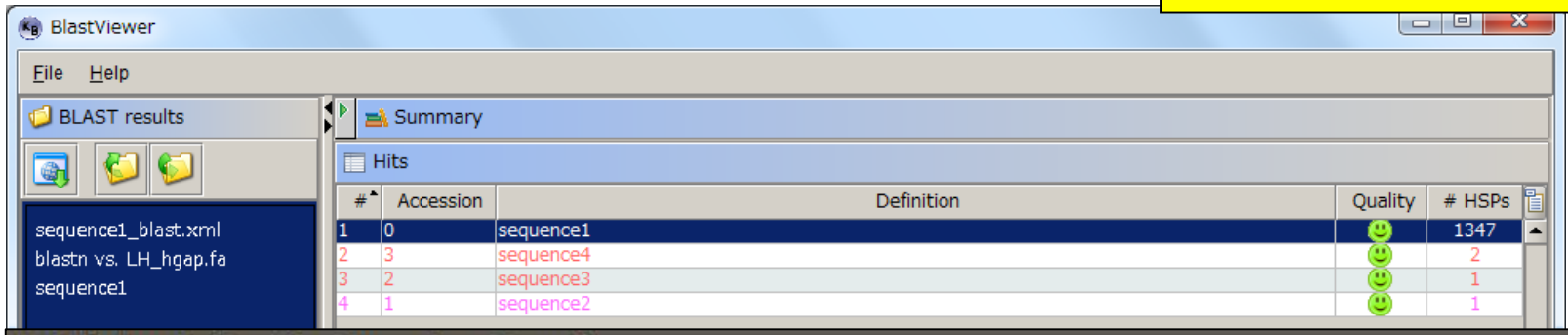
lessで開いた直後の状態。①用いたBLASTNのバージョン、②DB側、③query側の情報

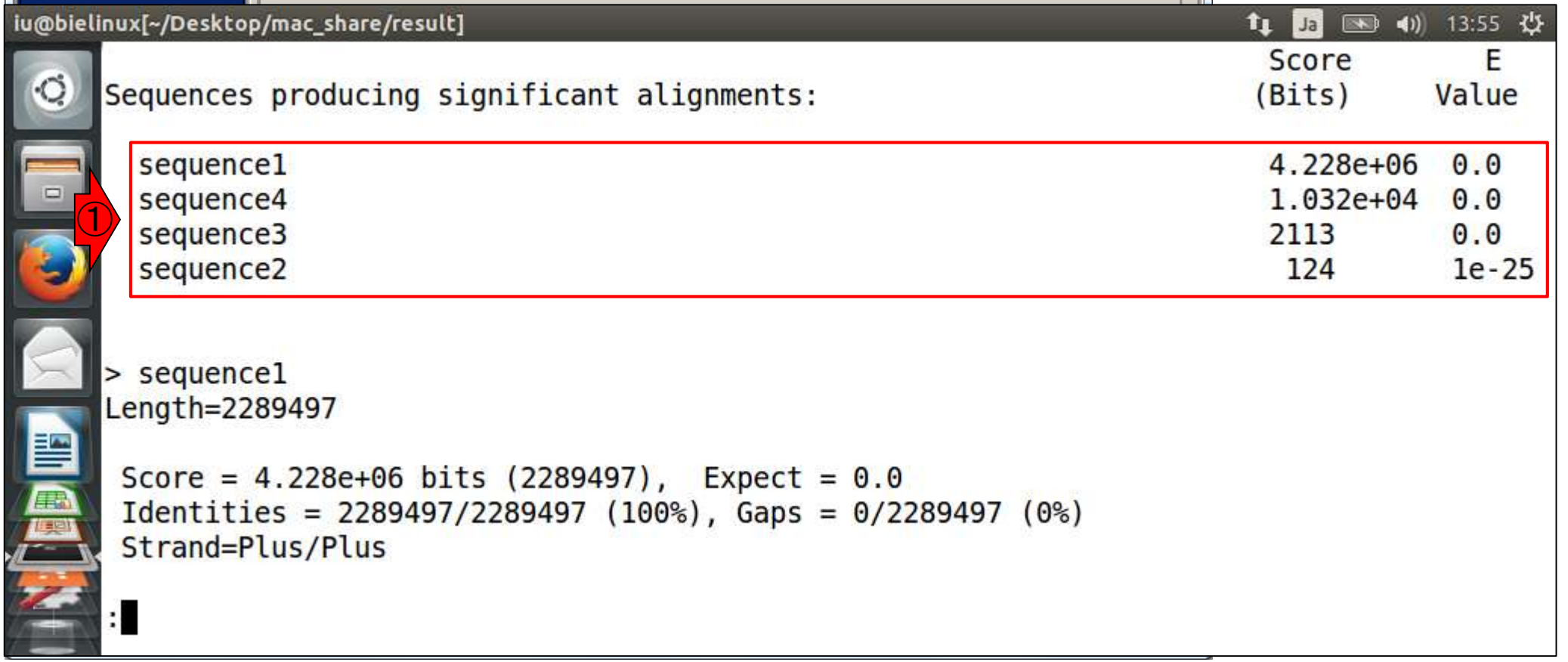




W7-5：解釈4

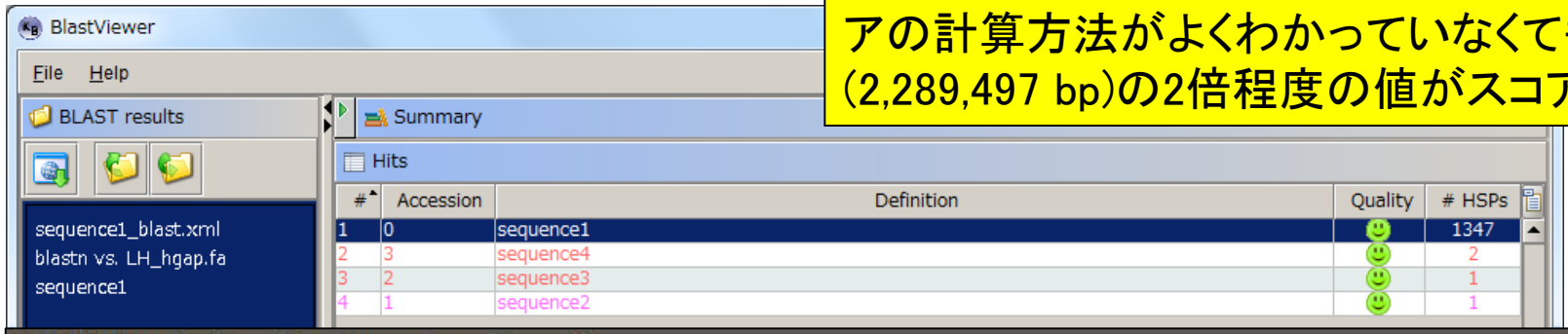
1ページ分ほど下に移動(上下左右の矢印キーで移動)。①確かにBlastViewerと同じ並び(sequence1, 4, 3, 2)になっている

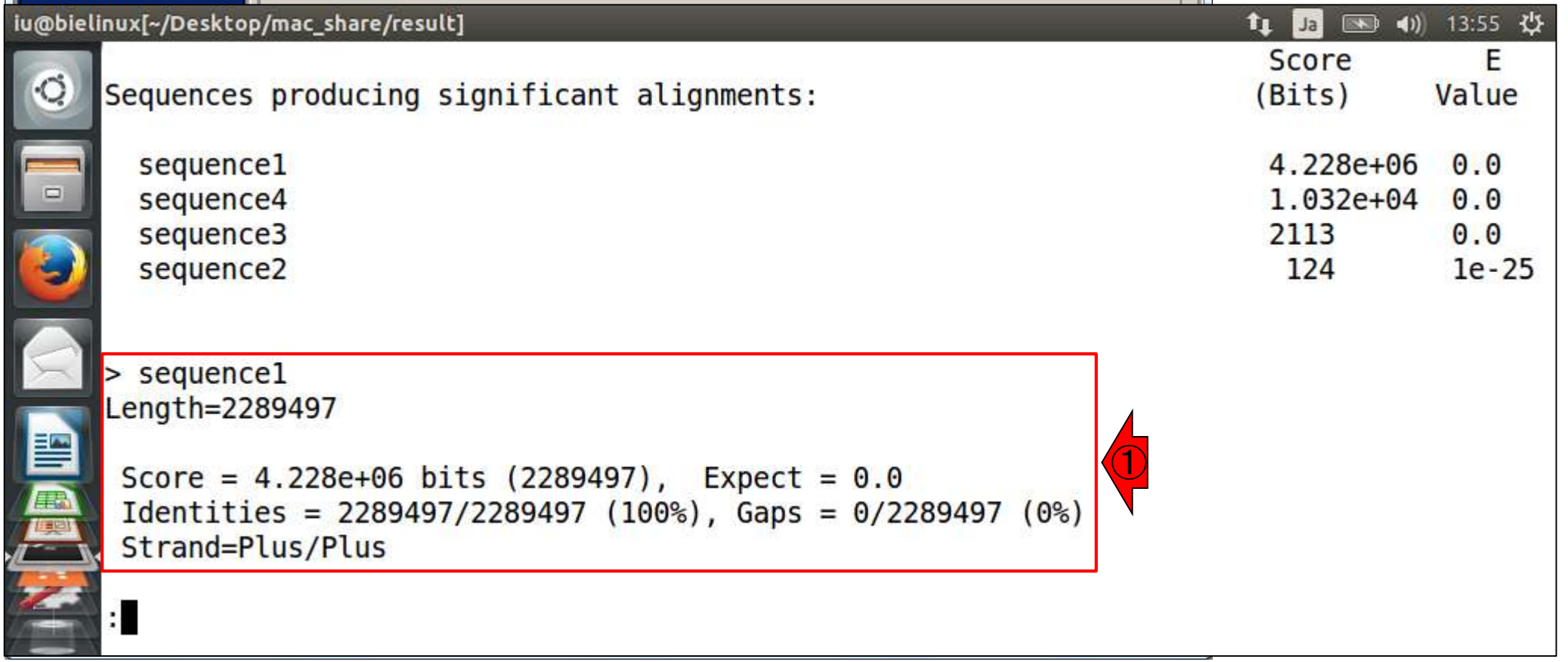




W7-5：解釈5

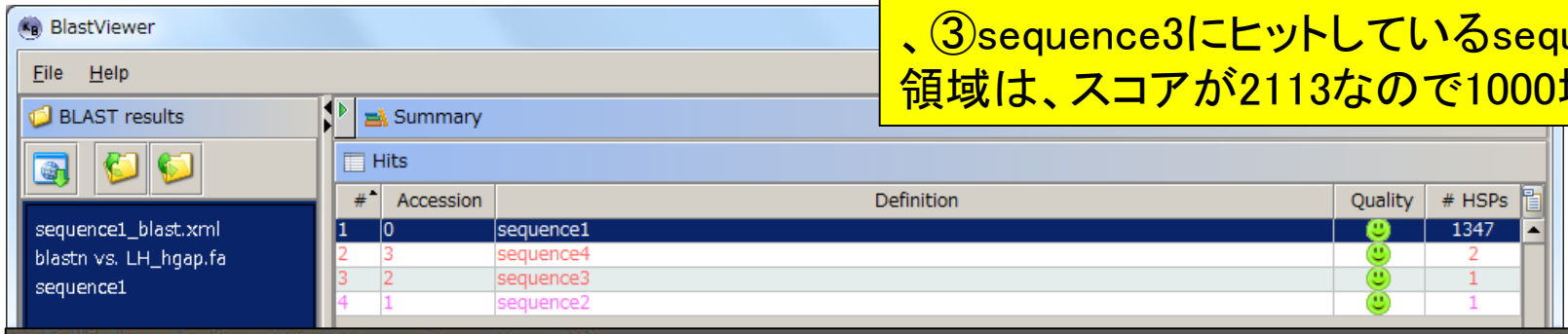
①これがトップヒットの基本情報。query（sequence1）とDB（sequence1-4）の関係が分かっていれば、これがsequence1 vs. sequence1の100%一致の結果であることがわかる。スコアの計算方法がよくわかっていなくても、大まかに配列長（2,289,497 bp）の2倍程度の値がスコアっぽいなと学習する

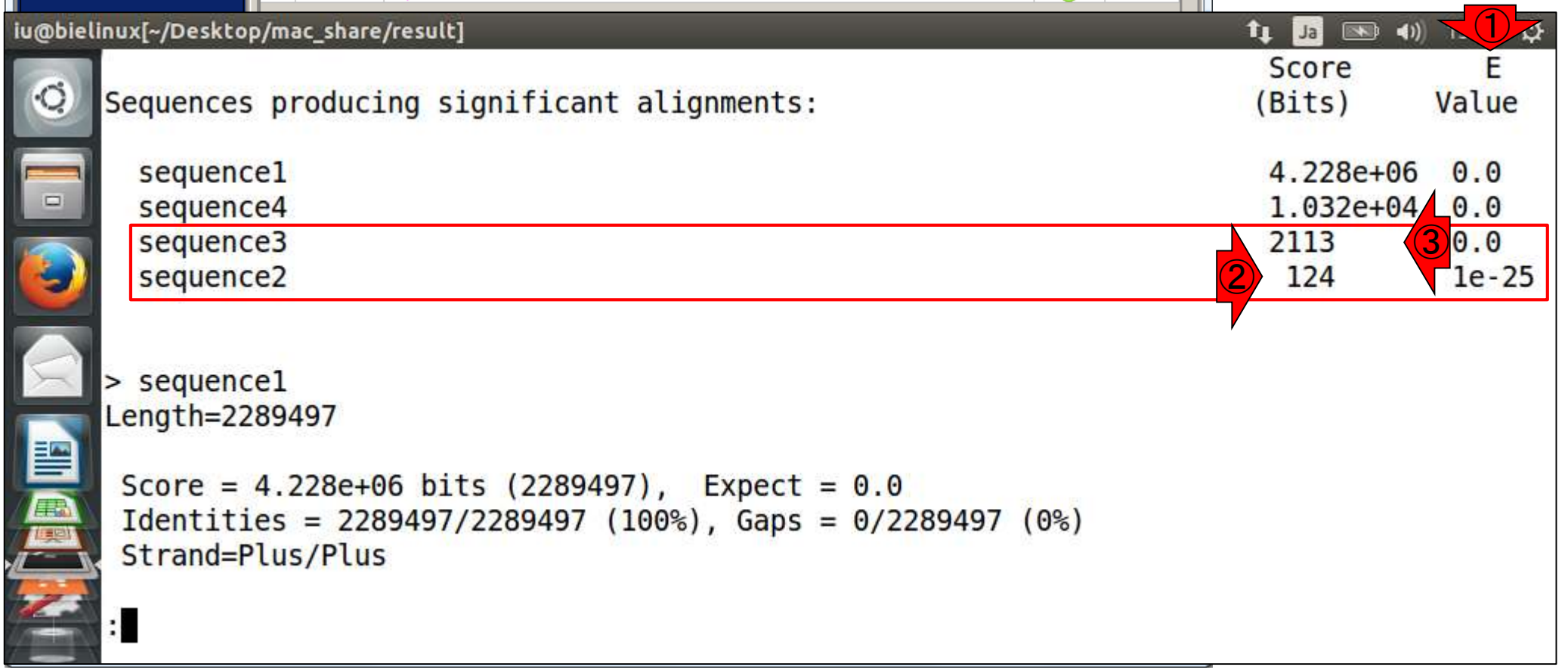




W7-5：解釈6

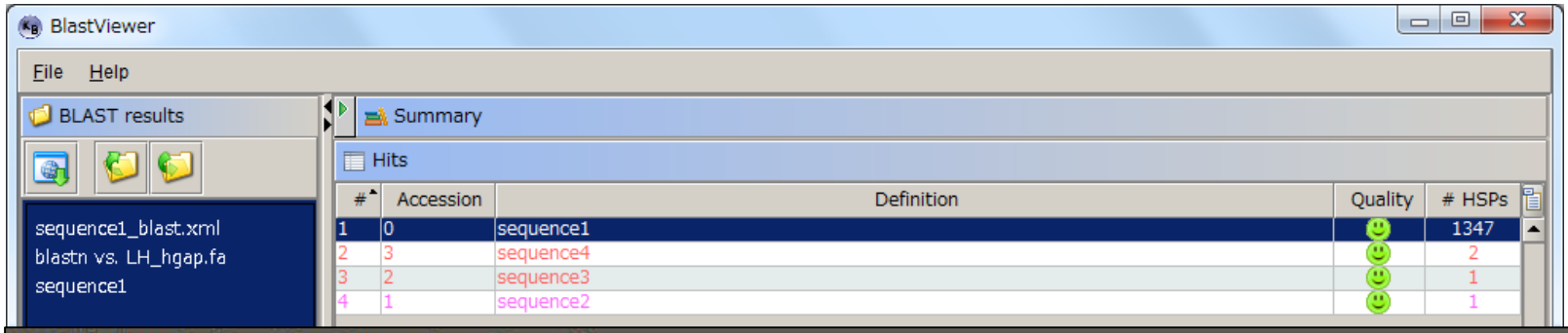
となると、いくら①E-valueがそこそこ低くても、②sequence2にヒットしているsequence1の断片配列の領域は、スコアが124なので60塩基程度だろうと予想。また、③sequence3にヒットしているsequence1の断片配列の領域は、スコアが2113なので1000塩基程度だろうと予想

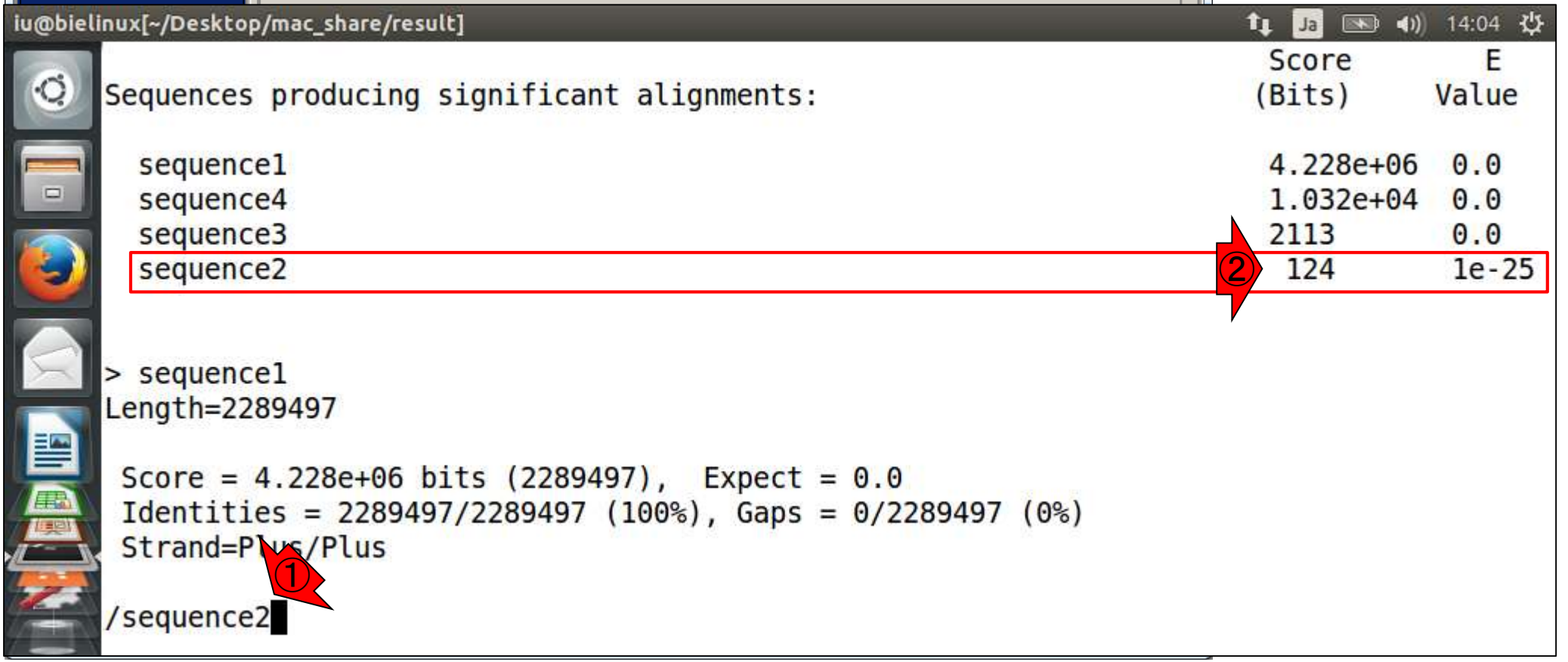




W7-5：解釈7

①sequence2でキーワード検索し、
②のアラインメント結果を眺めます





最初はこんな感じになります

W7-5：解釈8

BlastViewer

File Help

BLAST results

sequence1_blast.xml
blastn vs. LH_hgap.fa
sequence1

Summary

Hits

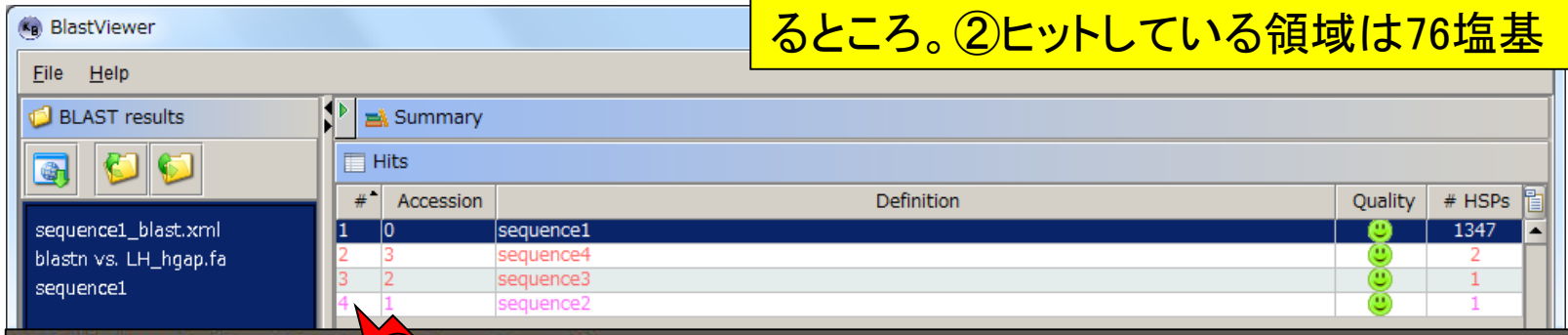
#	Accession	Definition	Quality	# HSPs
1	0	sequence1		1347
2	3	sequence4		2
3	2	sequence3		1
4	1	sequence2		1

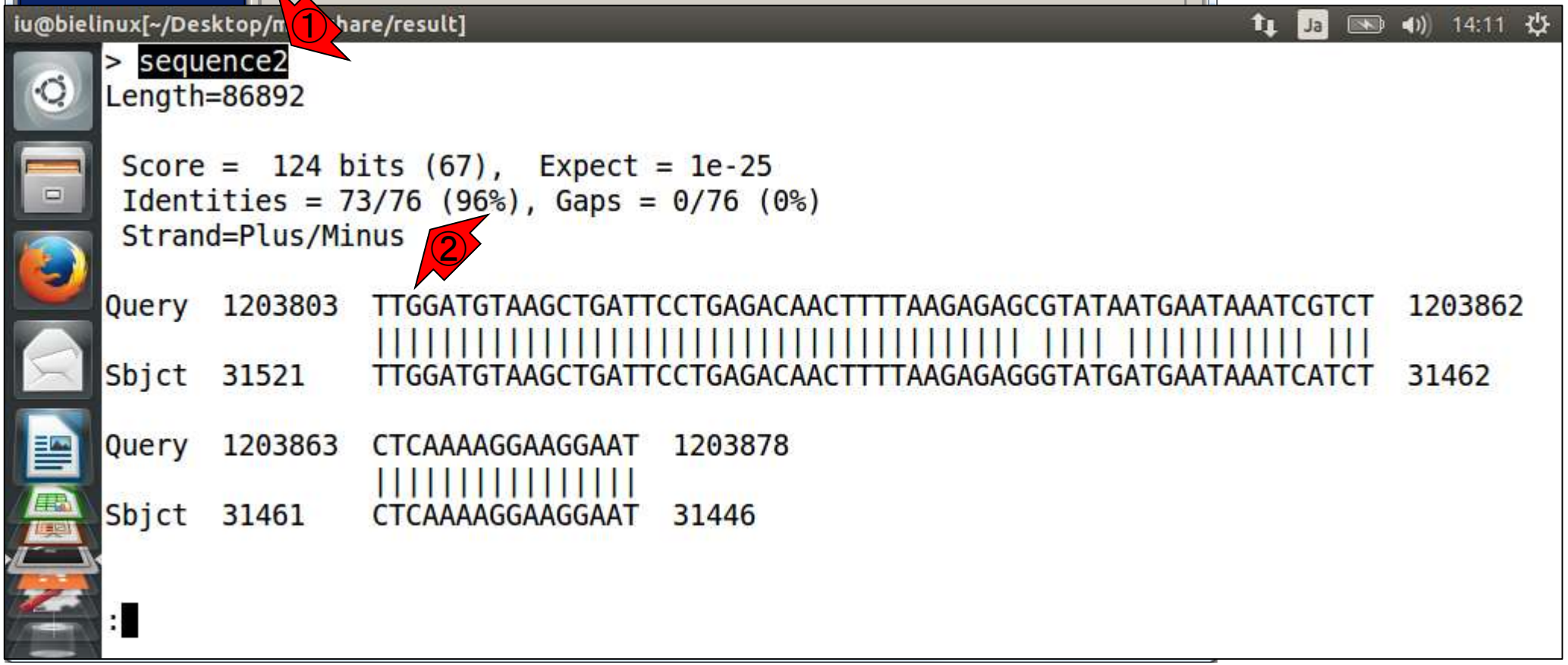
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]

```
  sequence2                                                  124       1e-25


> sequence1
Length=2289497

 Score = 4.228e+06 bits (2289497),  Expect = 0.0
 Identities = 2289497/2289497 (100%), Gaps = 0/2289497 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1        TGTTGGGCTGCTGAATGAACATAGCGAATTTGCCCGGAAACTACTTTTTGGCGGTGGCAA  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1        TGTTGGGCTGCTGAATGAACATAGCGAATTTGCCCGGAAACTACTTTTTGGCGGTGGCAA  60

Query  61       TCGCGCTGACAGATTTACGCTCAAAGGAAACCATGATGATGGTAGTGGCAGGATTCTGCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
:
```

W7-5：解釈9

今は、テキスト形式のBLAST結果ファイル(sequence1_blast.txt)をlessで眺めている。①sequence2でキーワード検索（nで順方向に検索、Nで逆方向に検索）し、アラインメントを表示させているところ。②ヒットしている領域は76塩基





①sequence3でキーワード検索

W7-5：解釈10

BlastViewer

File Help

BLAST results

sequence1_blast.xml
blastn vs. LH_hgap.fa
sequence1

Summary

Hits

#	Accession	Definition	Quality	# HSPs
1	0	sequence1		1347
2	3	sequence4		2
3	2	sequence3		1
4	1	sequence2		1

iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]

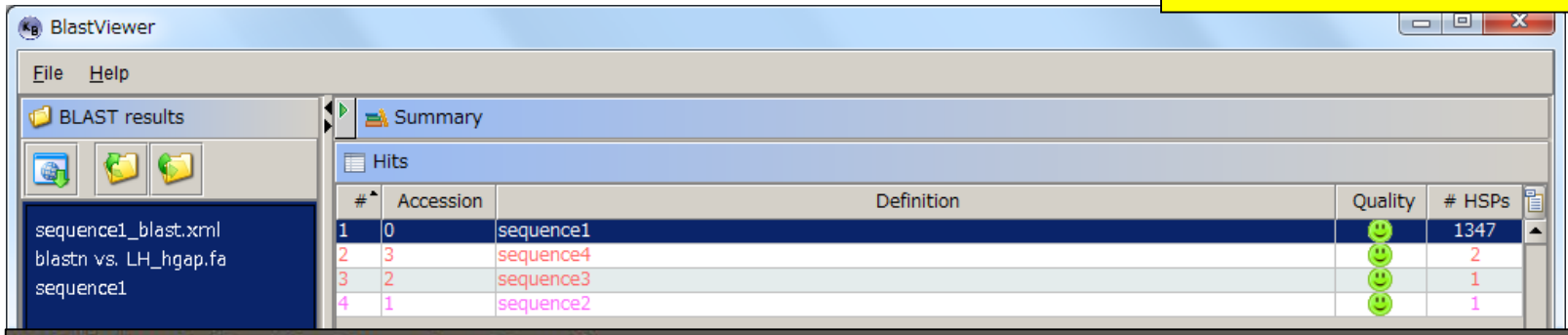
Ja 14:13

```
> sequence2
Length=86892

 Score =  124 bits (67),  Expect = 1e-25
 Identities = 73/76 (96%), Gaps = 0/76 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1203803  TTGGATGTAAGCTGATTCCTGAGACAACTTTTAAGAGAGCGTATAATGAATAAATCGTCT  1203862
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| |||||||||||| |||
Sbjct  31521    TTGGATGTAAGCTGATTCCTGAGACAACTTTTAAGAGAGGGTATGATGAATAAATCATCT  31462

Query  1203863  CTCAAAAGGAAGGAAT  1203878
                ||||||||||||||||
Sbjct  31461    CTCAAAAGGAAGGAAT  31446


/sequence3
```

①

W7-5：解釈11

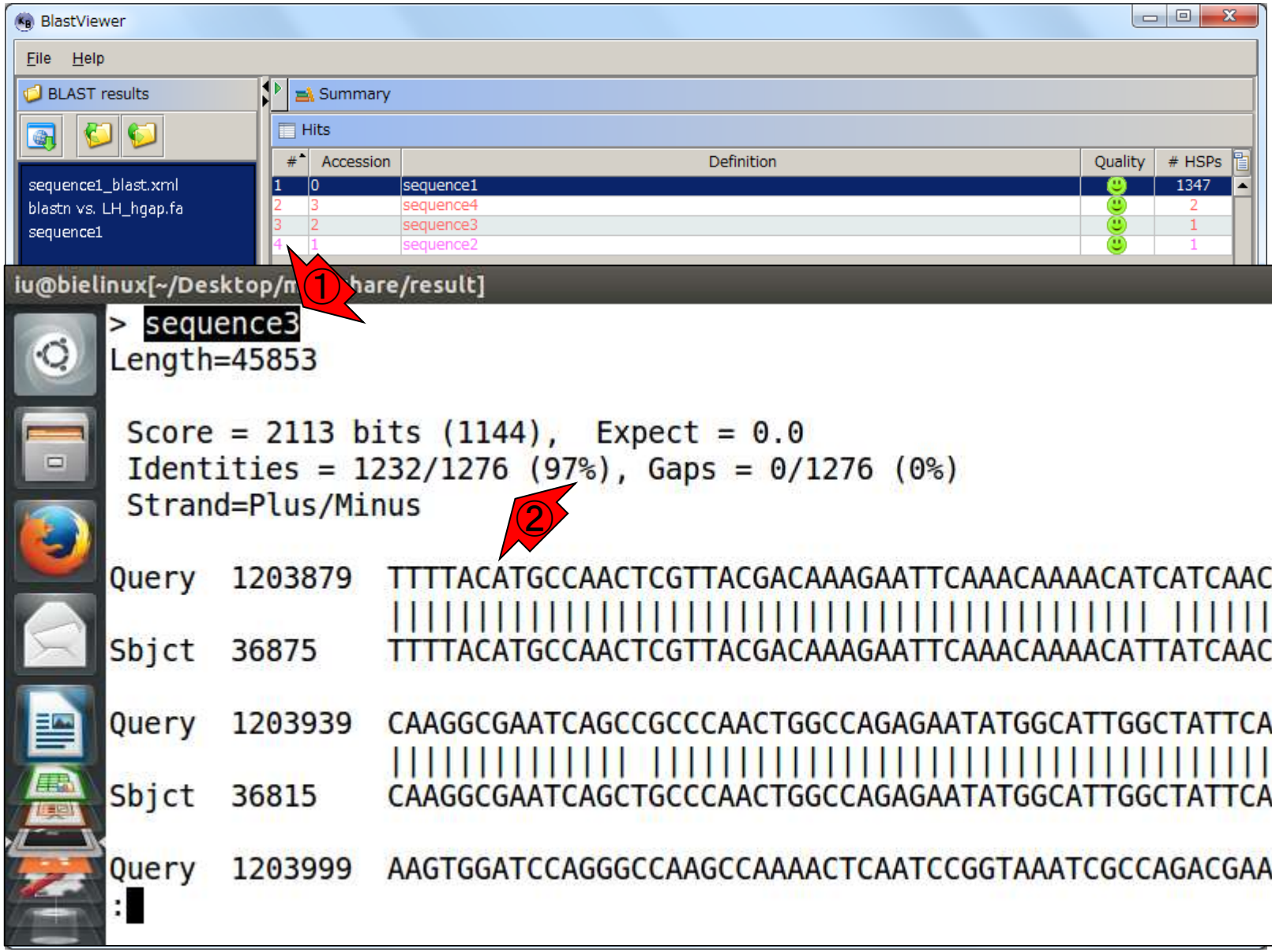
最初はこんな感じになるかもしれないが、「nで順方向に検索、Nで逆方向に検索」なので、Nと打ってページ上部を探すと…




```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  14:15
> sequence2
Length=86892

 Score =  124 bits (67),  Expect = 1e-25
 Identities = 73/76 (96%), Gaps = 0/76 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1203803  TTGGATGTAAGCTGATTCCTGAGACAACTTTTAAGAGAGCGTATAATGAATAAATCGTCT  1203862
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| |||||||||||| |||
Sbjct  31521    TTGGATGTAAGCTGATTCCTGAGACAACTTTTAAGAGAGGGTATGATGAATAAATCATCT  31462

Query  1203863  CTCAAAAGGAAGGAAT  1203878
                ||||||||||||||||
Sbjct  31461    CTCAAAAGGAAGGAAT  31446


Pattern not found  (press RETURN)
```

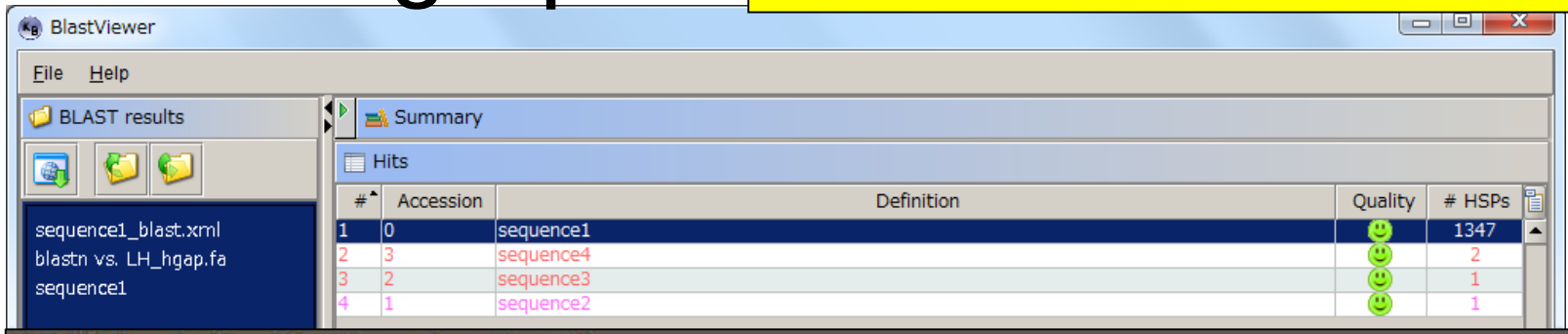
W7-5：解釈12

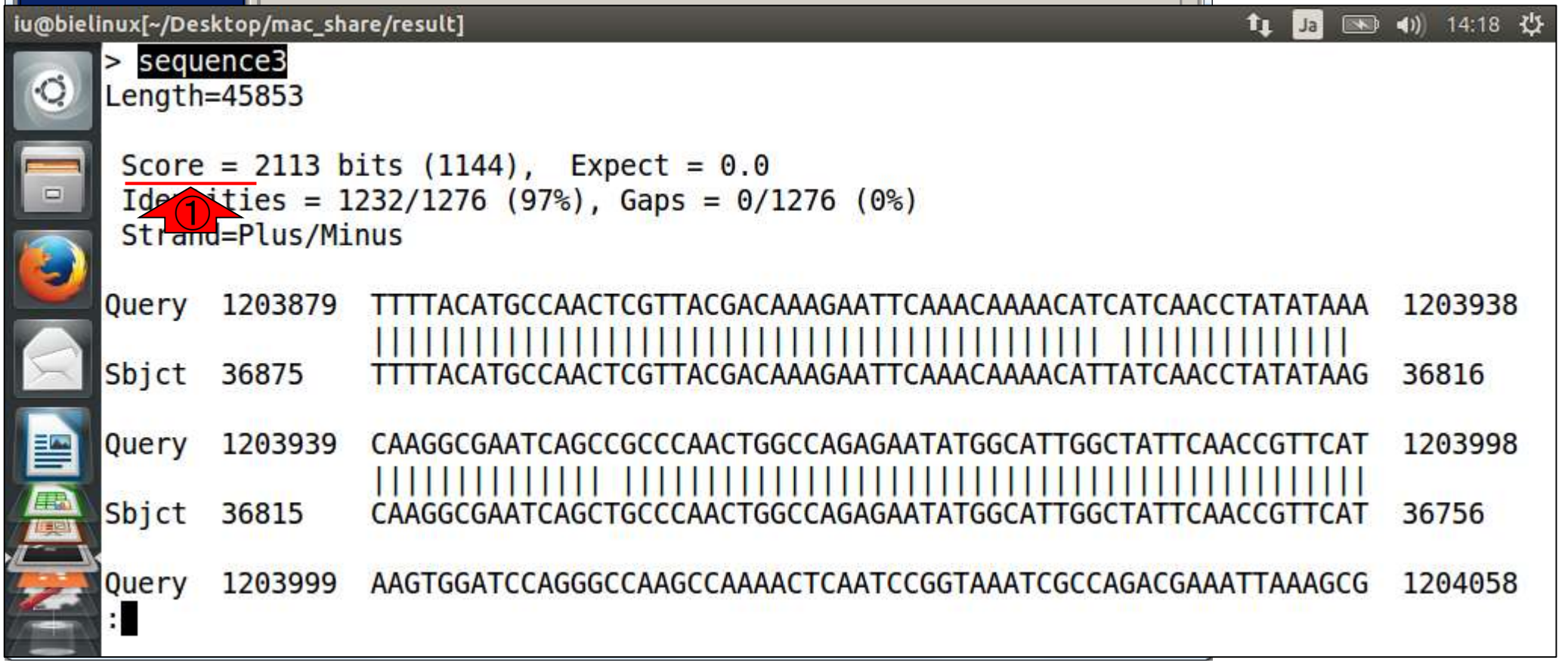
こんな感じになって、①sequence3のアラインメント結果を見ることができます。②ヒットしている領域は1276塩基



W7-6：grep

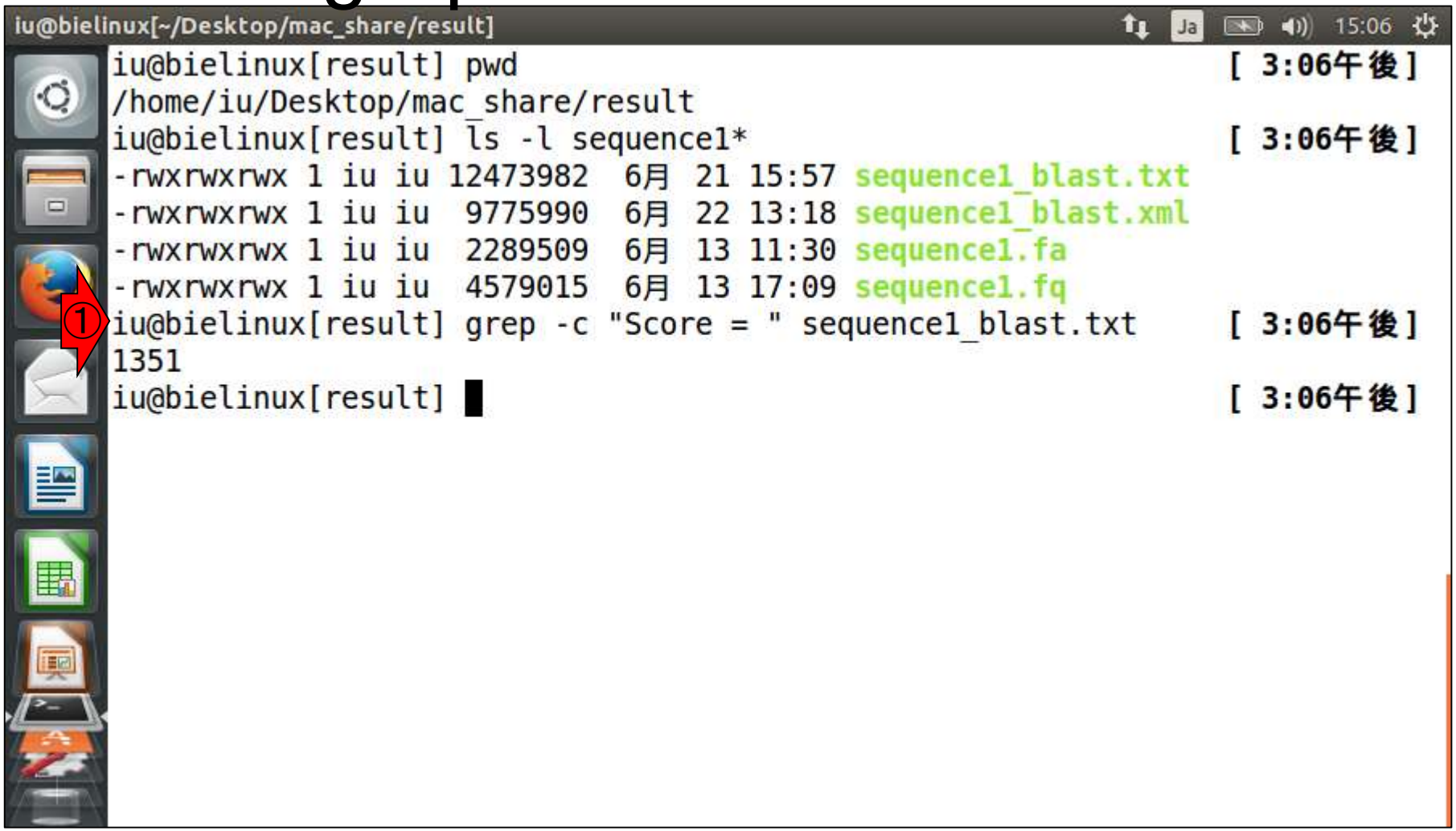
トータルのヒット数が(1347 + 2 + 1 + 1) = 1351個だったということは、①「Score = 」を含む行数も1351個あるのだろうと予想（スライド215）。grepで確認すべく、qを押してlessから一旦抜ける





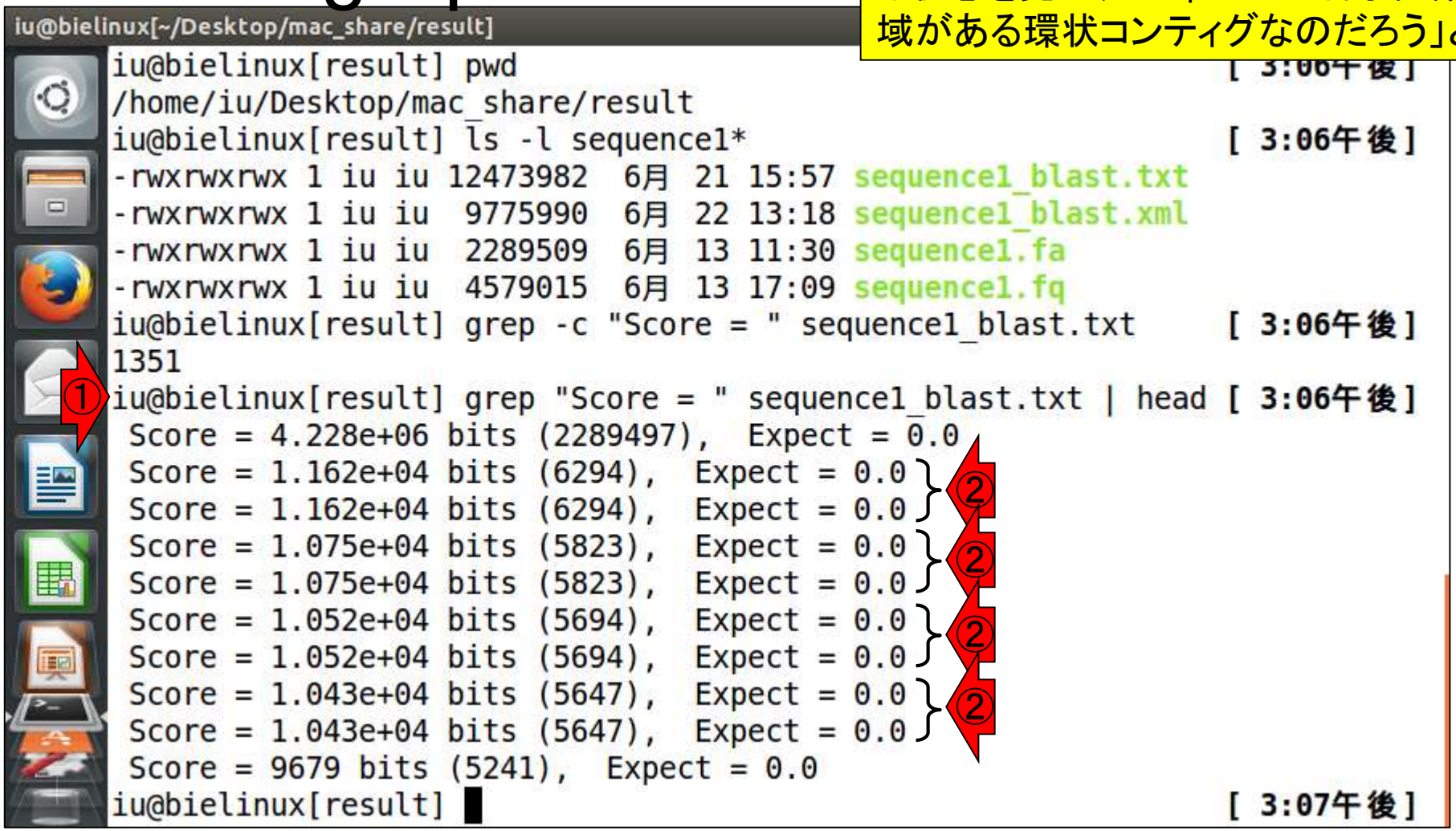
W7-6：grep

①「Score = 」を含む行数をgrepで調査。確かに1351個ある（スライド202）



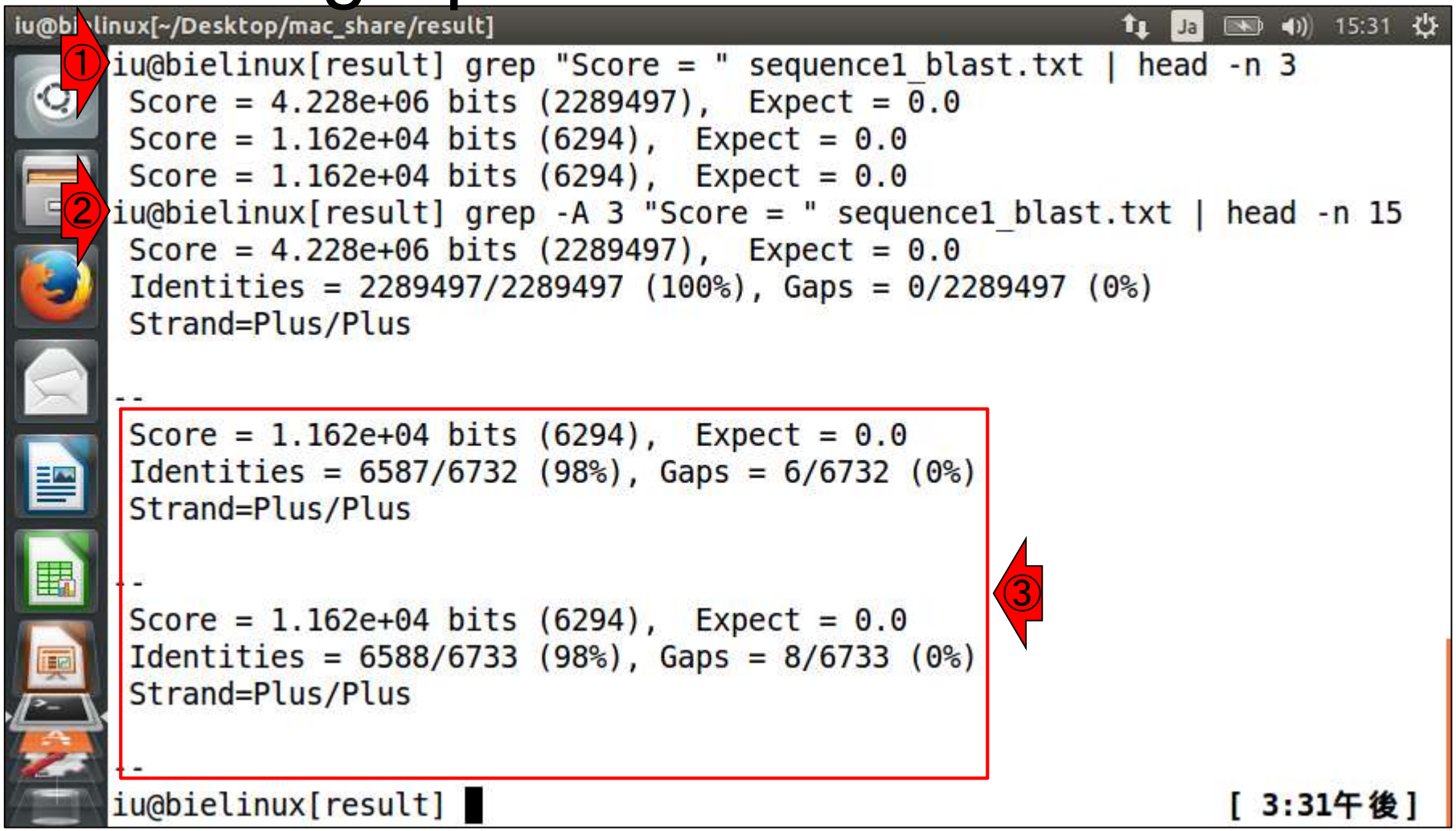
W7-6：grep

①「Score = 」を含む最初の10行分を表示。②のように同じスコアのものが2個づつ表示されている状態を見て、「sequence1も両末端に重複領域がある環状コンティグなのだろう」と予想する



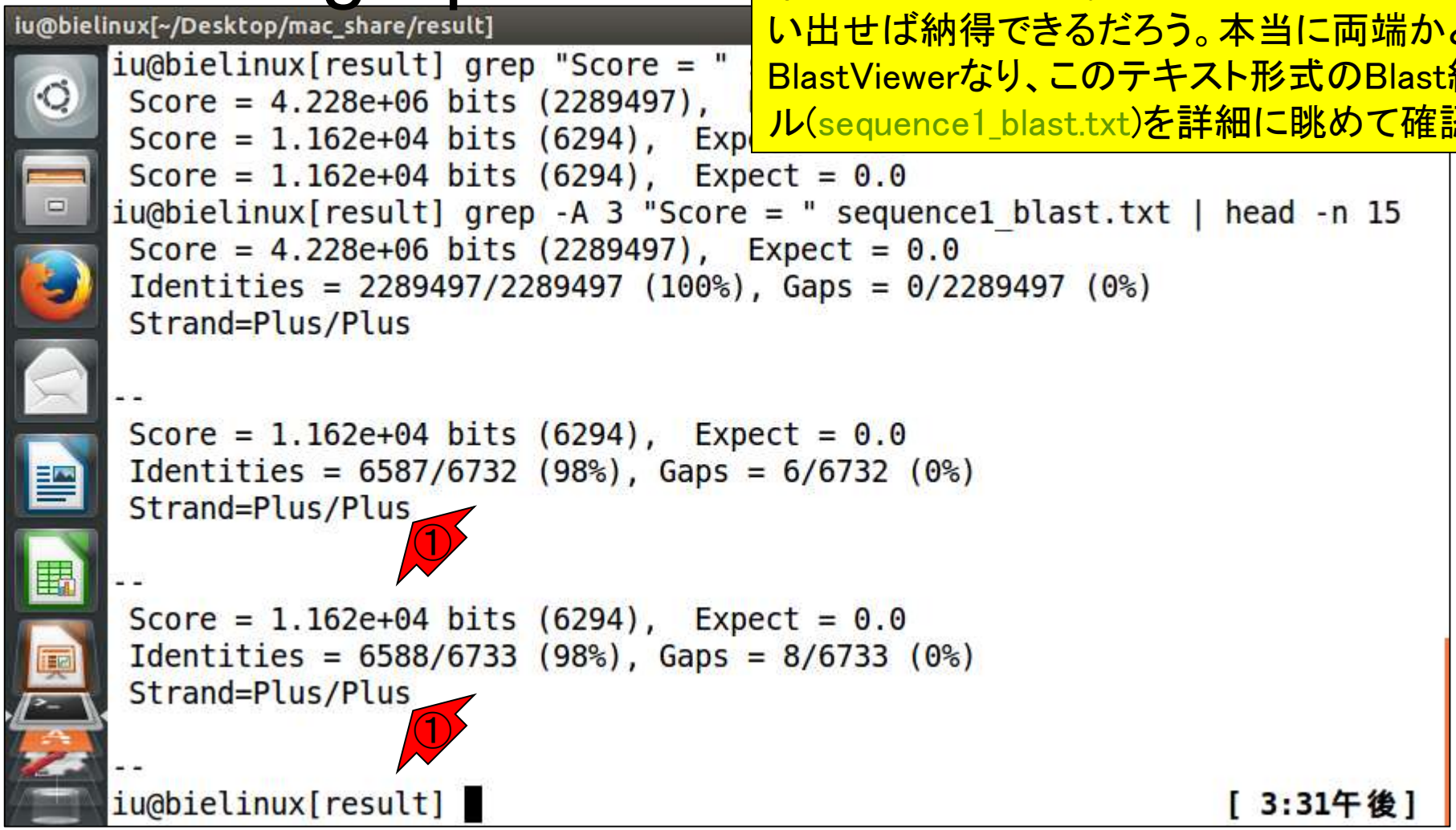
①「Score = 」を含む最初の3行分を表示。②grep -Aオプションで一致した行を含め後ろの3行分を表示。③が今注目しているところ

W7-6：grep



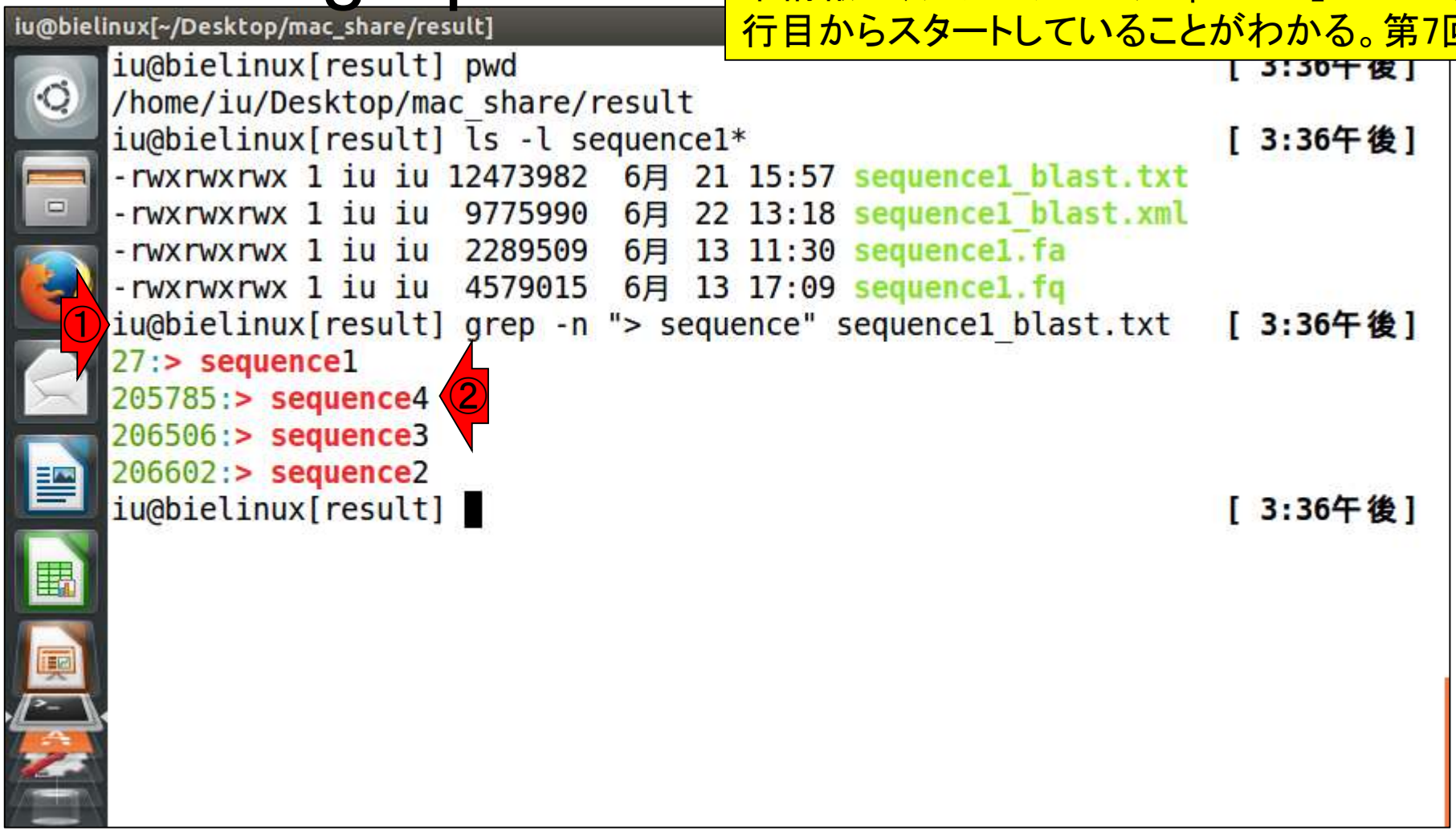
W7-6：grep -A

①Plus/Plusになっているので、おそらく両端に重複領域があるのだろう。sequence3同士のBlast実行結果（第7回W15-6）も両端でPlus/Plusになっていたことを思い出せば納得できるだろう。本当に両端かどうかはBlastViewerなり、このテキスト形式のBlast結果ファイル(sequence1_blast.txt)を詳細に眺めて確認する



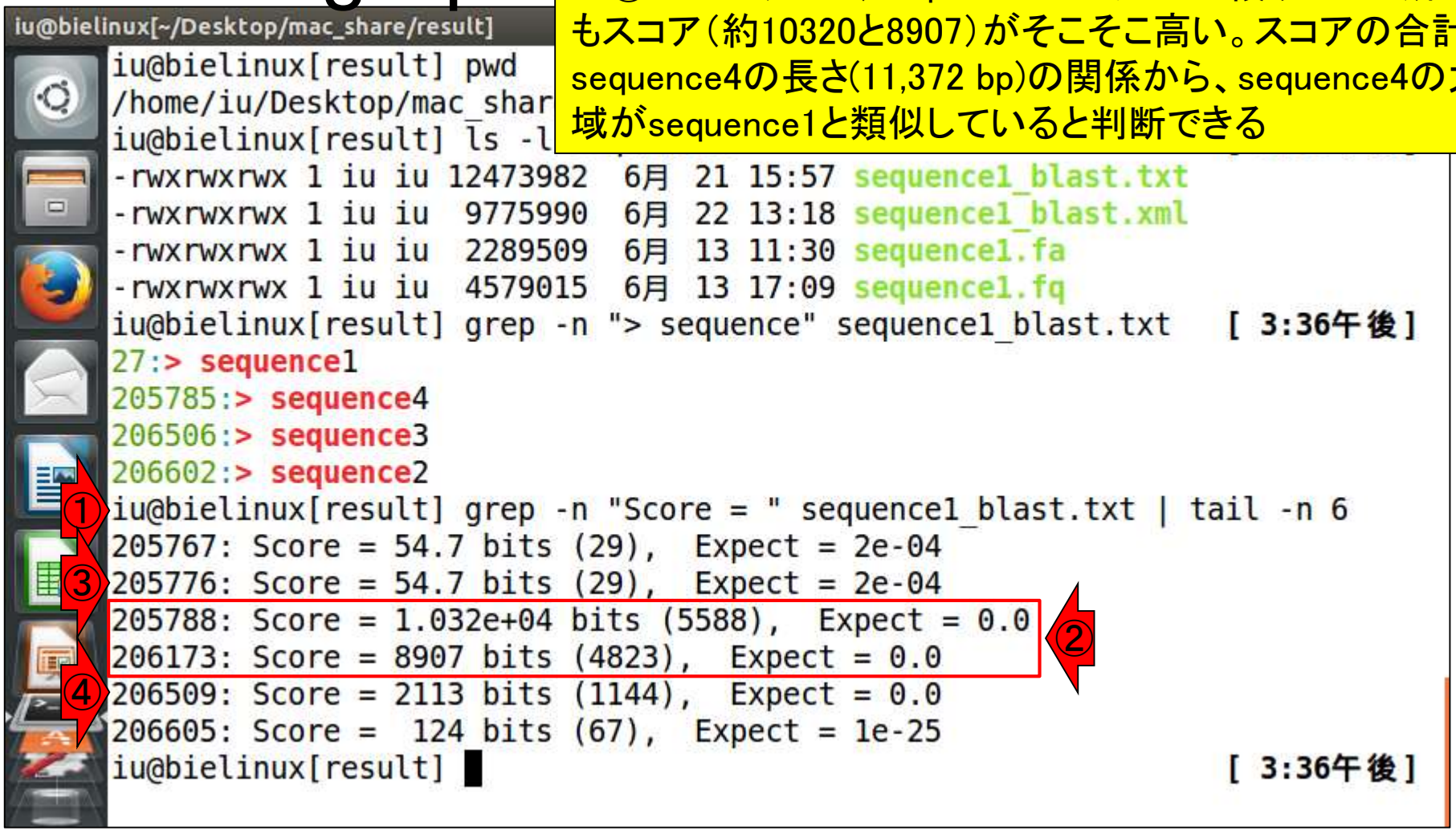
W7-6：grep -n

①grep -nで検索文字列（この場合”> sequence”）を含む行番号を表示。例えば②sequence4とヒットしたという結果情報は、入力ファイル(sequence1_blast.txt)の205785行目からスタートしていることがわかる。第7回W15-5



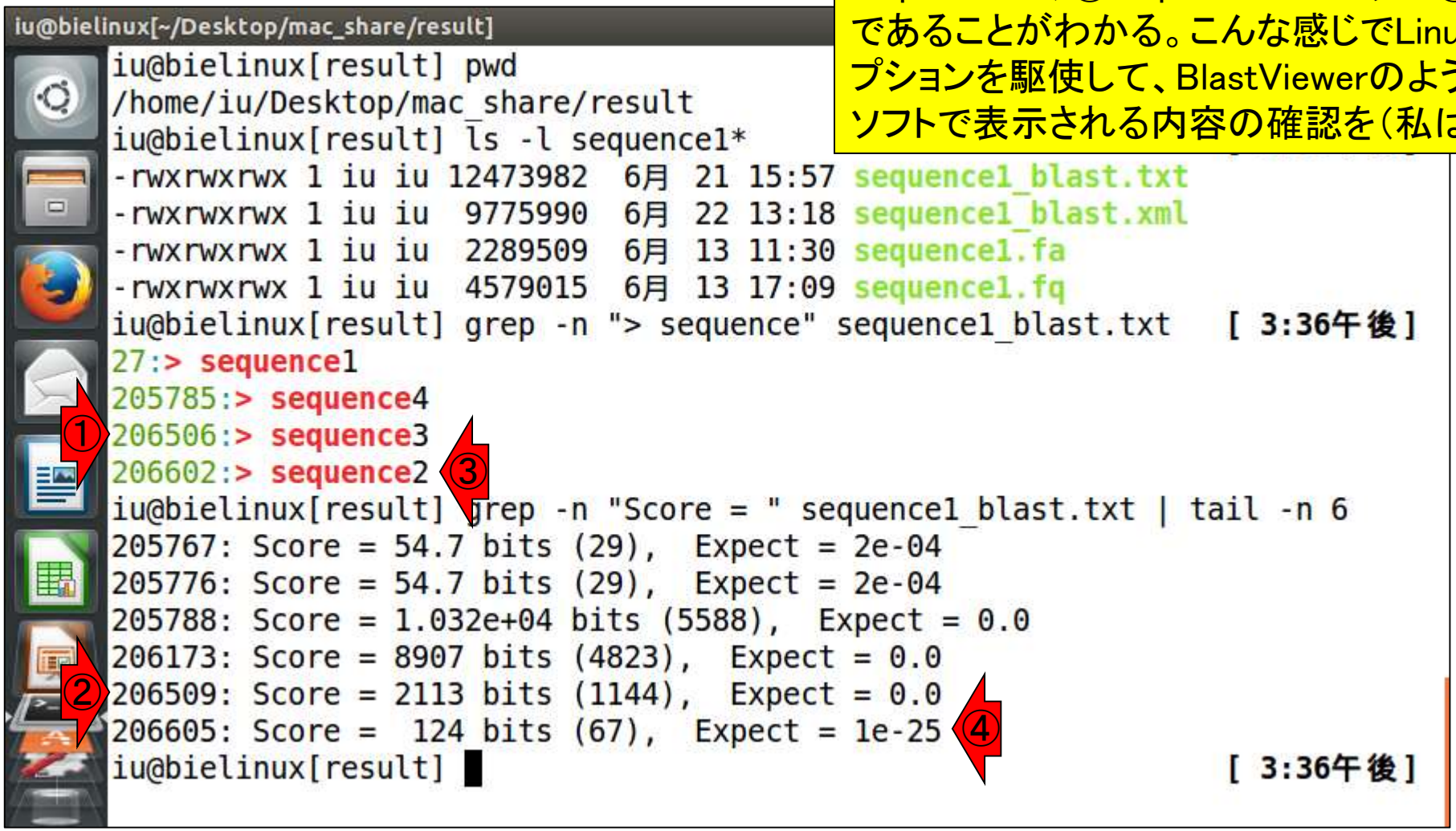
W7-6：grep -n

①grep -nで検索文字列（この場合"Score ="）を含む行番号も表示。②赤枠の上下関係（sequence1の最後の③205776とsequence3の④206509）から、sequence4とヒットした領域は2か所あり、いずれもスコア（約10320と8907）がそこそこ高い。スコアの合計（2万弱）とsequence4の長さ(11,372 bp)の関係から、sequence4の大部分の領域がsequence1と類似していると判断できる



ちなみに

行番号の関係性から、(queryであるsequence1と)①sequence3の一致が②のスコアであり、(sequence1と)③sequence2の一致が④のスコアであることがわかる。こんな感じでLinuxコマンドオプションを駆使して、BlastViewerのような可視化ソフトで表示される内容の確認を(私は)行います



Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

第8回原稿p189の左上

①今はこのあたり。だんだんマニアックな話になっていくが、Blast結果とアノテーション結果を眺めることで②のようなことが判明することもある、といったことをご自身の研究に活かせると…いいですね

は、BlastViewer を利用する［W7-2］。BlastViewer は Windows 用と Macintosh 用のみが提供されているため、ホスト OS 上でインストールして利用する。XML 形式の BLAST 実行結果ファイル（sequence1_blast.xml）しか受け付けないが、DB 側の配列ごとにヒット数（配列類似領域数：HSP 数）が示されているなど、全体的な操作感がよい［W7-4］。例えば、sequence1 に対するヒット数が 1,347 個、sequence4 が 2 個、sequence3 と sequence2 がそれぞれ 1 個であったことがわかる。また、ヒット数やスコア分布の全体像を眺めることで、sequence1 にいくつかの重複領域が存在することや、11,372 bp からなる sequence4 の大部分の領域が sequence1 と類似していることなどがわかる［W8-1］。

sequence4 は sequence1 の一部

BlastViewer で sequence4（11,372 bp）に対する sequence1（2,289,497 bp）のヒット領域を眺める［W8］。

560027
の全長
W8-5）。

アラインメントされなかった sequence4 の領域［4853, 5705 bp］に対するアノテーション結果を眺めると、transposase がコードされていたことがわかる（図 1b；W8-5）。これは、該当領域が挿入配列（insertion sequence; IS）であることを示唆する。これはおそらく、乳酸菌の培養途中で一部の細胞に IS の挿入が起こったためであろう。結果として、シークエンスされた細胞集団の中に IS を含むものと含まないものが混在することになり、sequence4 が独立したコンティグとして出力されたものと思われる。sequence4 は全体的にクオリティスコアが低く（第 7 回 W11-7）、また、後述の Illumina によるシーケンス結果には当該部分が確認できなかったことから、IS が挿入された細胞の存在比率は高くないと考え、sequence4 は除外した。

①この話をします

第8回原稿p189の左中

は、BlastViewer を利用する［W7-2］。BlastViewer は Windows 用と Macintosh 用のみが提供されているため、ホスト OS 上でインストールして利用する。XML 形式の BLAST 実行結果ファイル（sequence1_blast.xml）しか受け付けないが、DB 側の配列ごとにヒット数（配列類似領域数：HSP 数）が示されているなど、全体的な操作感がよい［W7-4］。例えば、sequence1 に対するヒット数が 1,347 個、sequence4 が 2 個、sequence3 と sequence2 がそれぞれ 1 個であったことがわかる。また、ヒット数やスコア分布の全体像を眺めることで、sequence1 にいくつかの重複領域が存在することや、11,372 bp からなる sequence4 の大部分の領域が sequence1 と類似していることなどがわかる［W8-1］。

sequence4 は sequence1 の一部

BlastViewer で sequence4（11,372 bp）に対する sequence1（2,289,497 bp）のヒット領域を眺める［W8］。

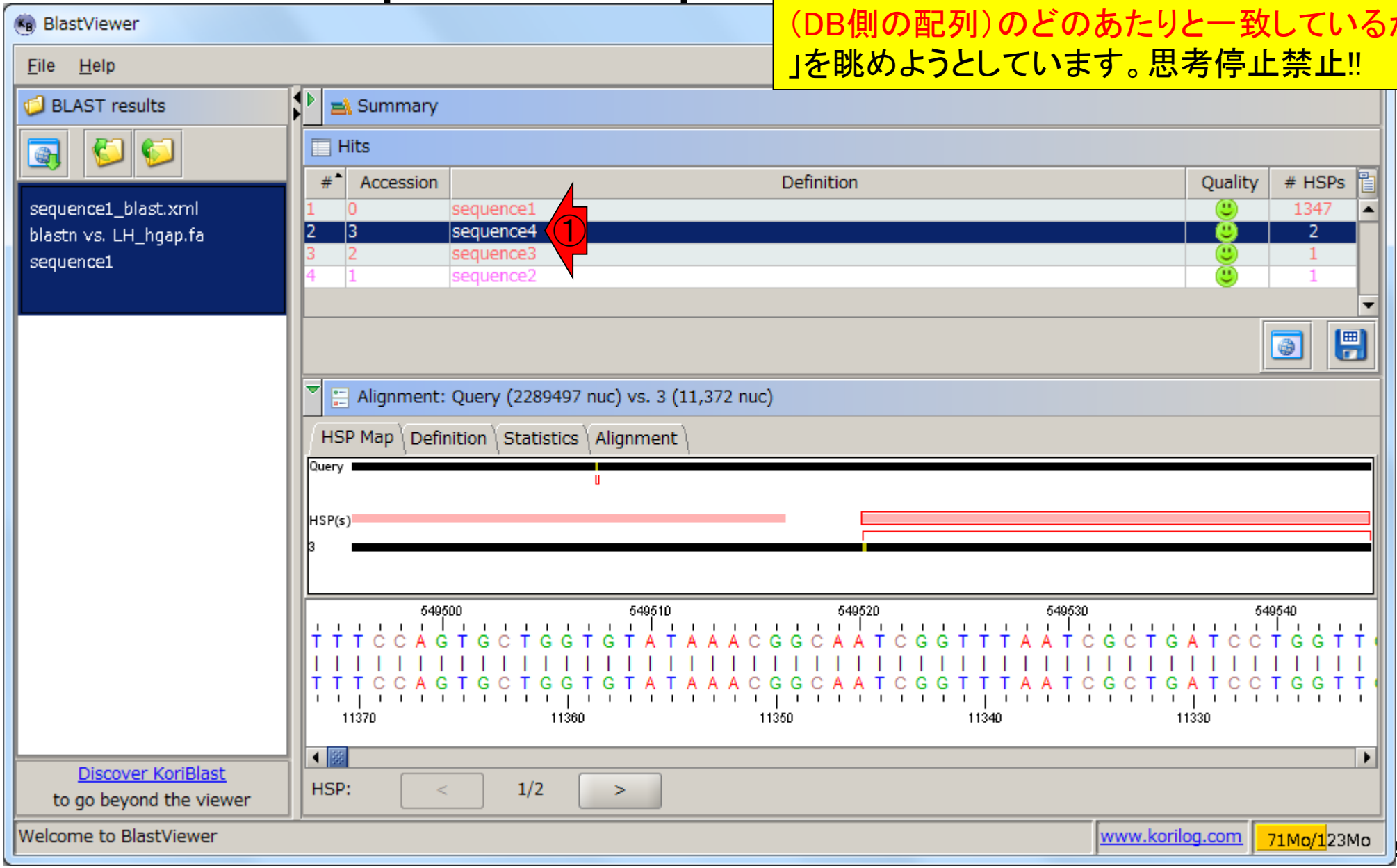
①

560027 bp］と、領域［4853, 5705 bp］を除く sequence4 の全長がほぼ一致していることを意味する（図 1a；W8-5）。

アラインメントされなかった sequence4 の領域［4853, 5705 bp］に対するアノテーション結果を眺めると、transposase がコードされていたことがわかる（図 1b；W8-5）。これは、該当領域が挿入配列（insertion sequence; IS）であることを示唆する。これはおそらく、乳酸菌の培養途中で一部の細胞に IS の挿入が起こったためであろう。結果として、シークエンスされた細胞集団の中に IS を含むものと含まないものが混在することになり、sequence4 が独立したコンティグとして出力されたものと思われる。sequence4 は全体的にクオリティスコアが低く（第 7 回 W11-7）、また、後述の Illumina によるシーケンス結果には当該部分が確認できなかったことから、IS が挿入された細胞の存在比率は高くないと考え、sequence4 は除外した。

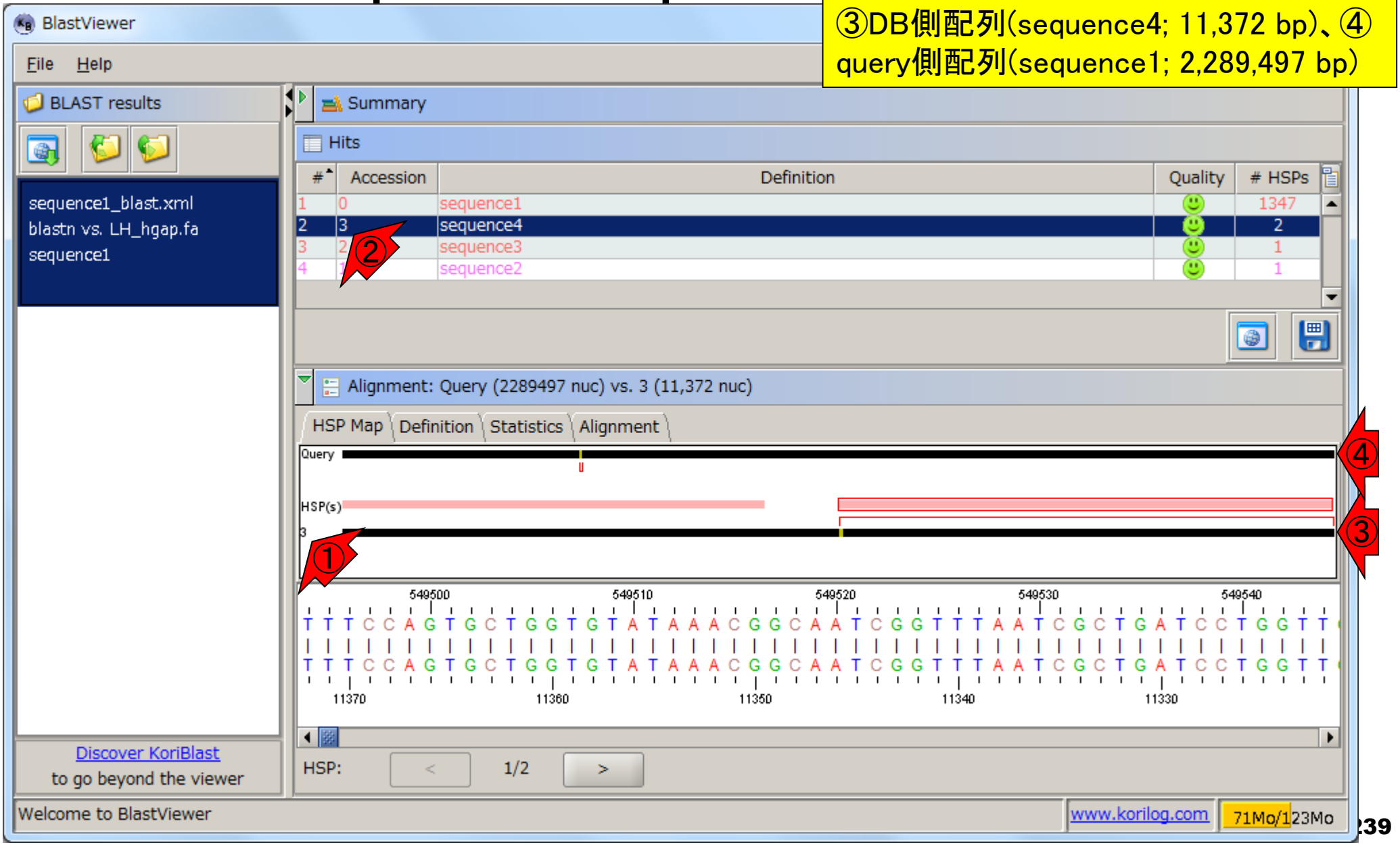
W8-1：seq1 vs. seq4

BlastViewerに戻り、①を押してsequence4とのヒット領域を眺める。ここでは、「sequence1（query側の配列）のどのあたりが、sequence4（DB側の配列）のどのあたりと一致しているか」を眺めようとしています。思考停止禁止!!



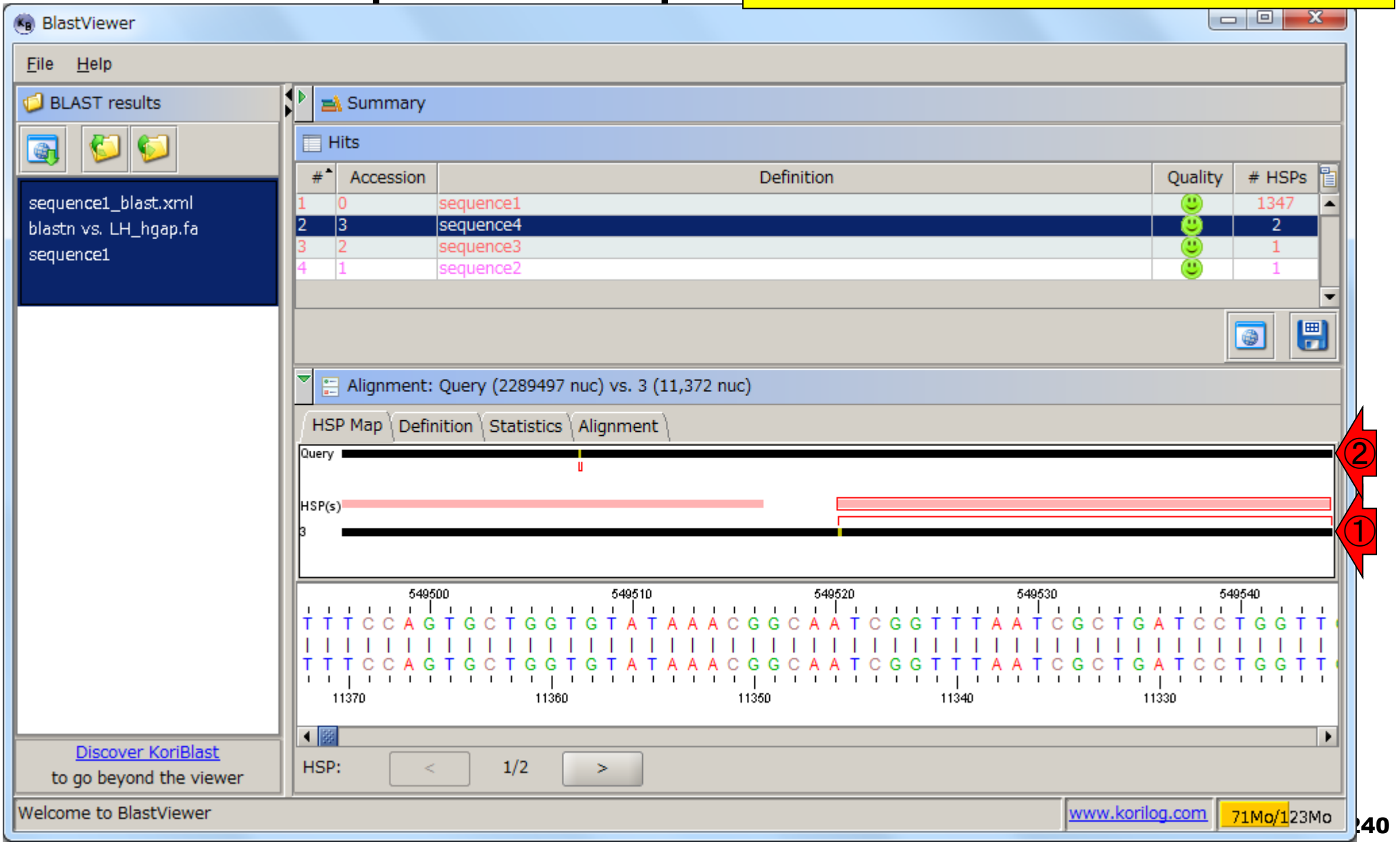
W8-1：seq1 vs. seq4

大まかな見方を説明。①3という数字は、②Accessionのところの数字と同じものであり、3’末端などという意味ではない。③DB側配列(sequence4; 11,372 bp)、④query側配列(sequence1; 2,289,497 bp)



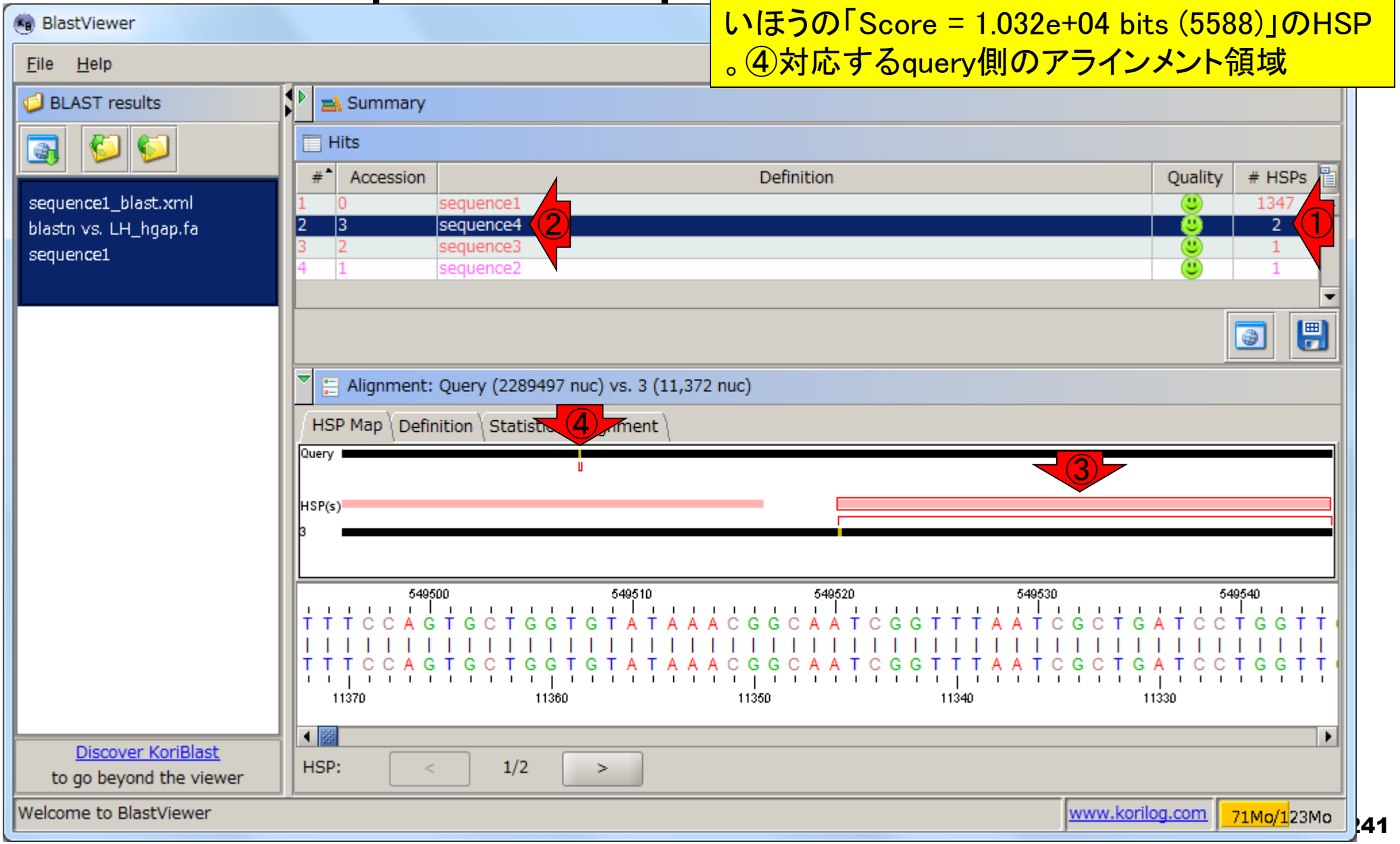
W8-1：seq1 vs. seq4

①DB側配列(sequence4; 11,372 bp)と、②query側配列(sequence1; 2,289,497 bp)は実際の長さは異なるが、長さを揃えて表示している



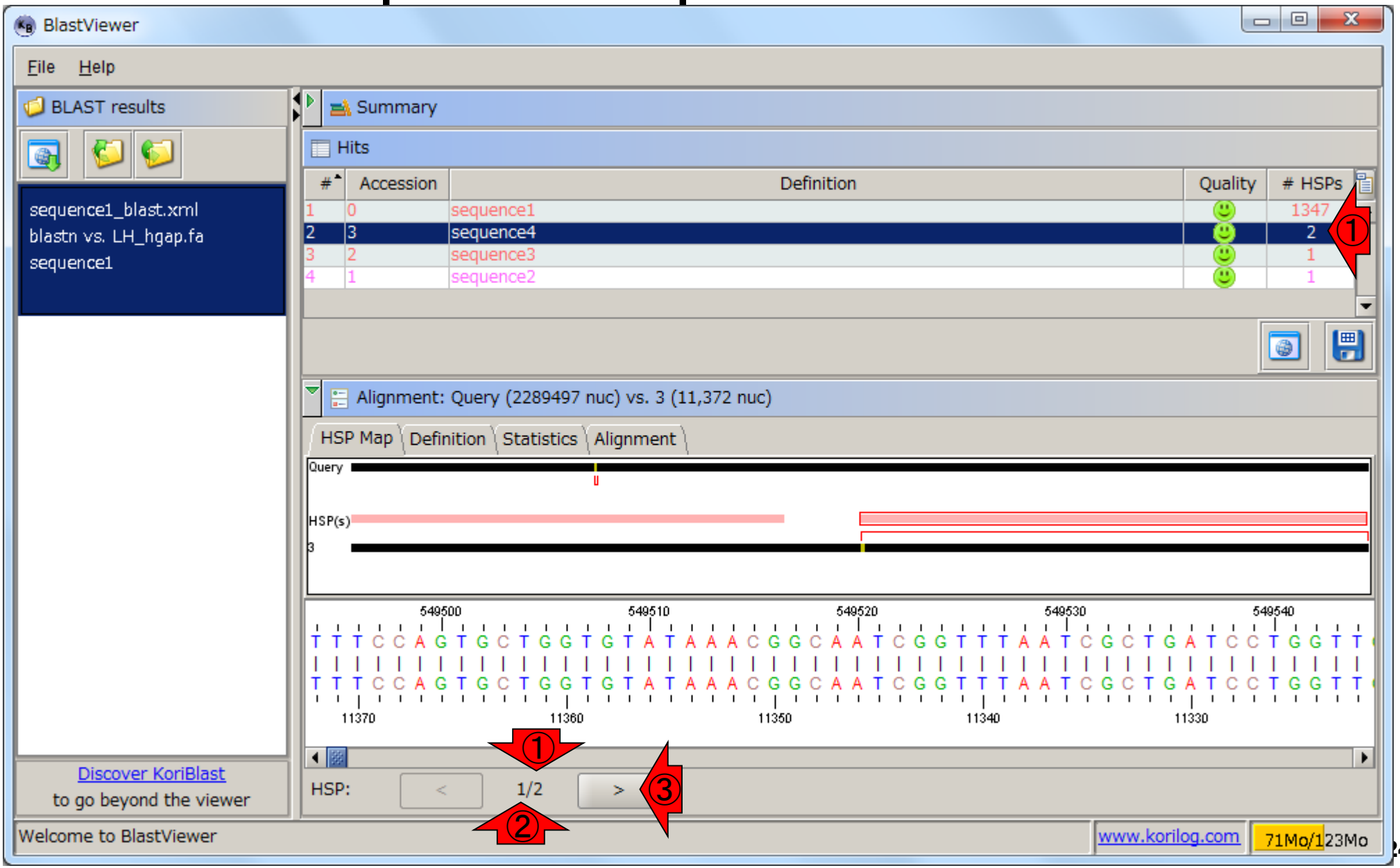
W8-1：seq1 vs. seq4

①(sequence4; 11,372 bp)中には、配列類似領域が2つ(HSPが2個)あったことを思い出そう。②をクリックして最初に見ているのは、③スコアが高いほうの「Score = 1.032e+04 bits (5588)」のHSP。④対応するquery側のアラインメント領域



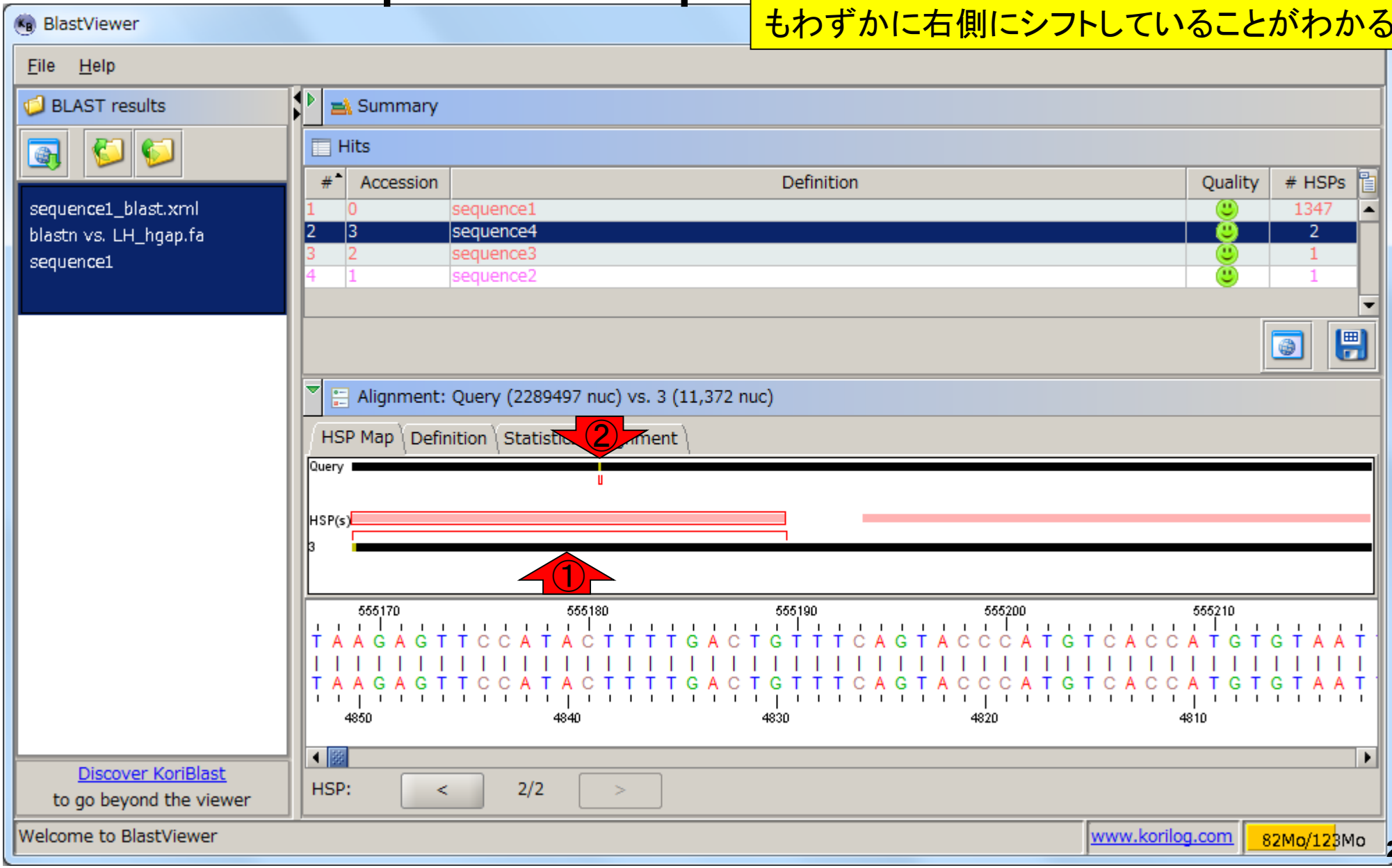
W8-1：seq1 vs. seq4

①2つあるHSPのうち、②最初の1個目という意味。③次のHSPのアラインメントが見られる



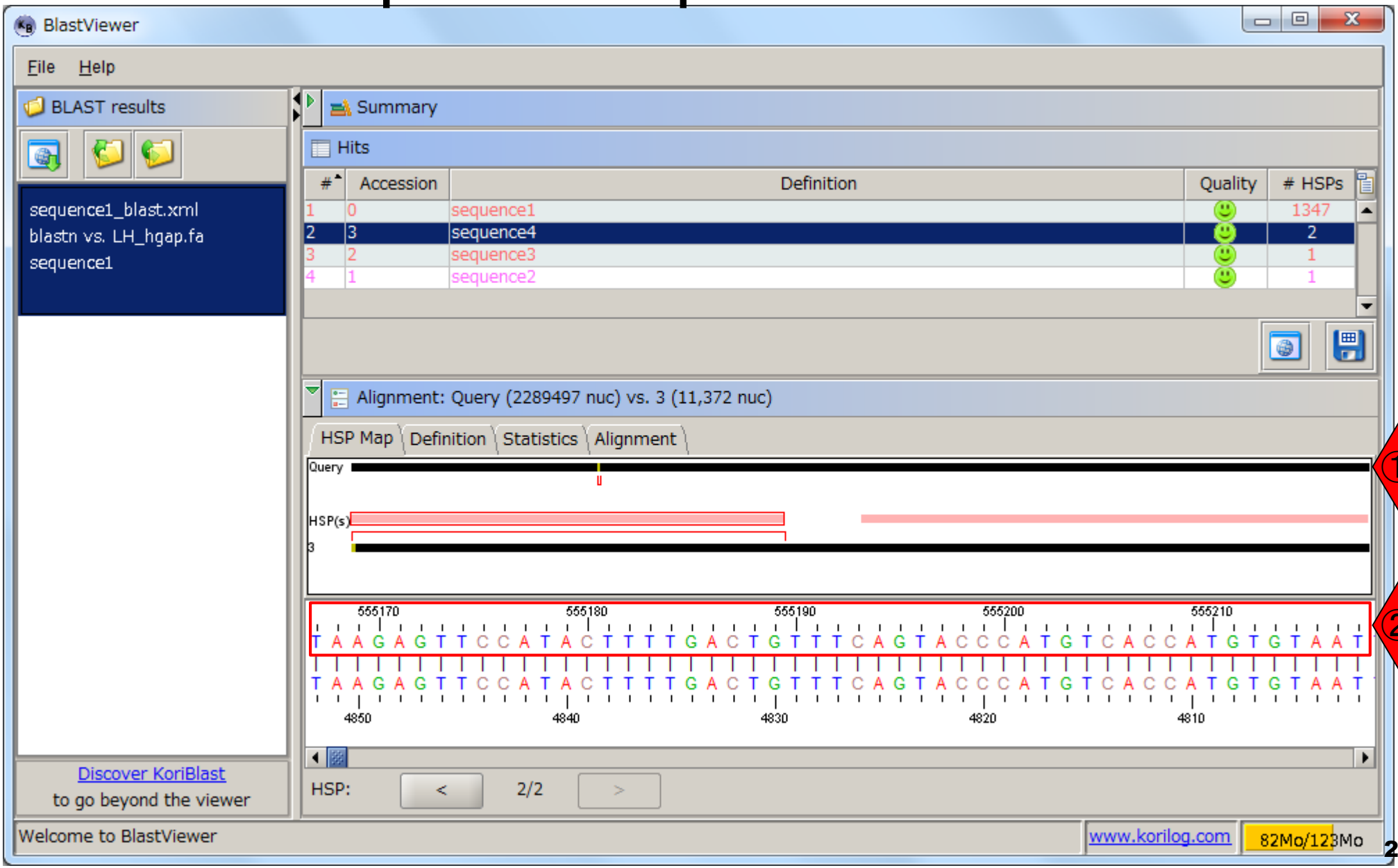
W8-1：seq1 vs. seq4

次のHSP（「Score = 8907 bits (4823)」）のアラインメント。①赤枠の位置が変わっているのがわかる。②対応するquery側のアラインメント領域もわずかに右側にシフトしていることがわかる



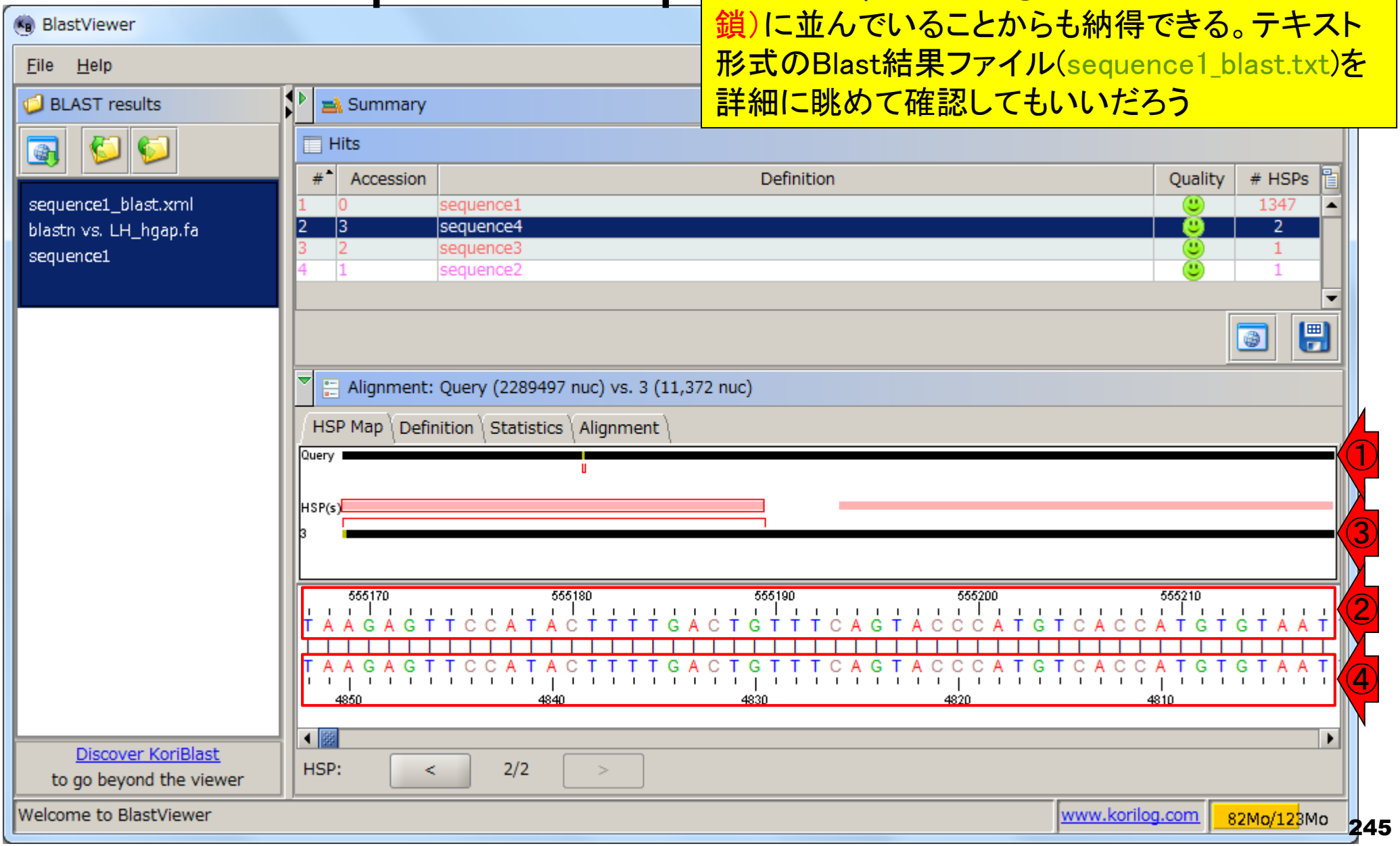
これは、①query側配列(sequence1)が②左から右の方向(Plus鎖)に並んでいるのに対して…

W8-1：seq1 vs. seq4



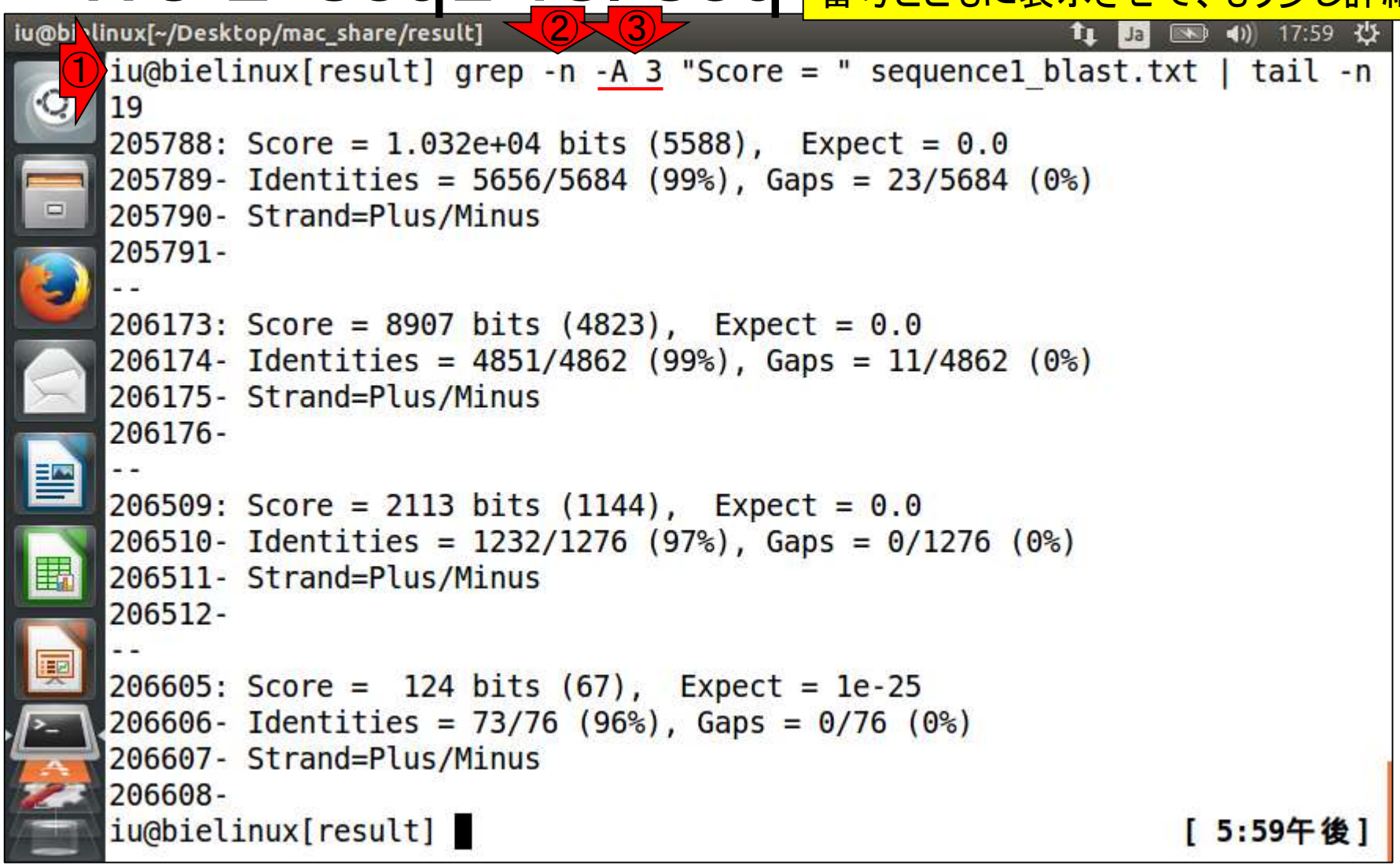
W8-1：seq1 vs. seq4

これは、①query側配列(sequence1)が②左から右の方向(Plus鎖)に並んでいるのに対して、③DB側配列(sequence4)が④右から左の方向（Minus鎖）に並んでいることからも納得できる。テキスト形式のBlast結果ファイル(sequence1_blast.txt)を詳細に眺めて確認してもいいだろう



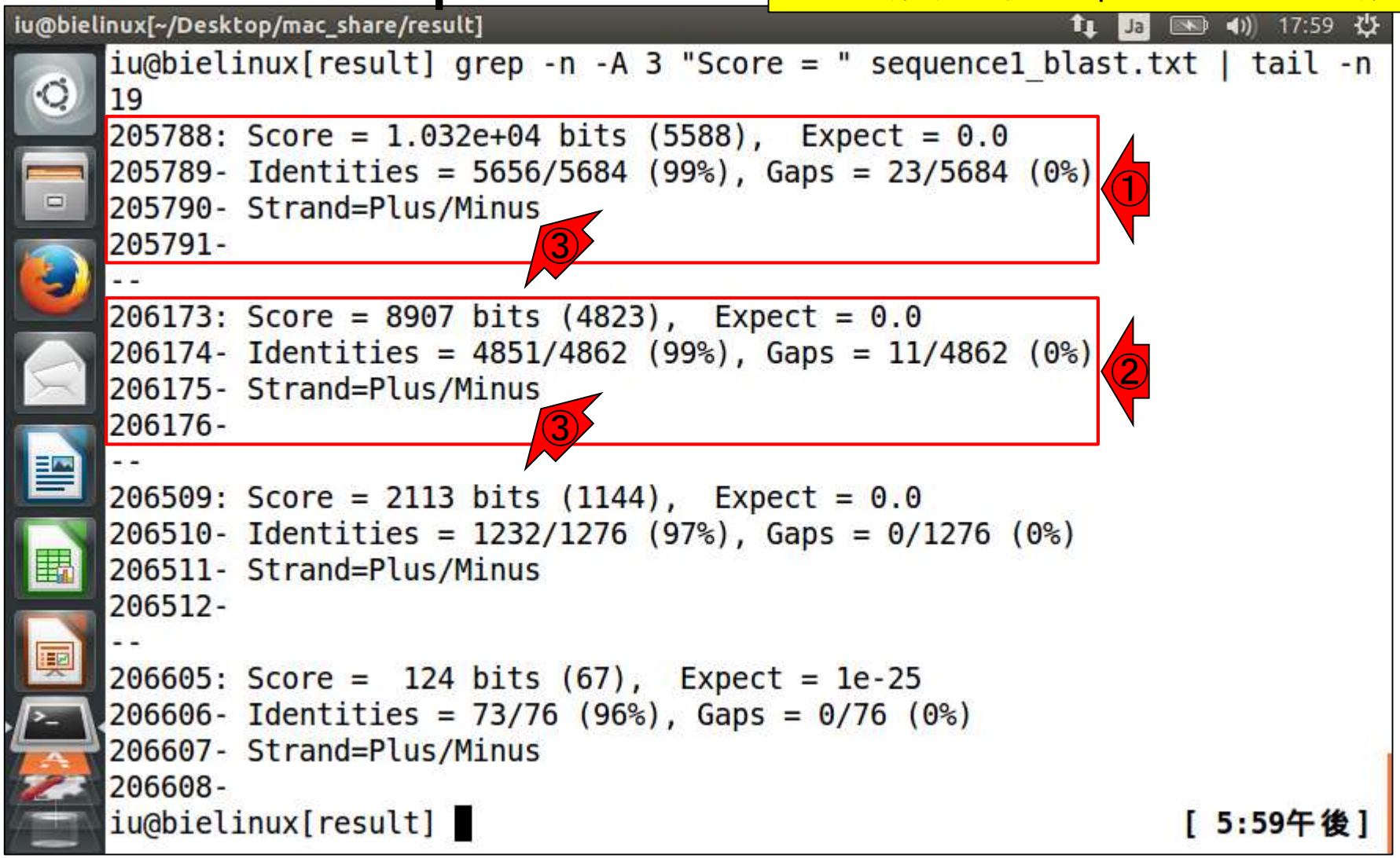
W8-2：seq1 vs. seq4

①grep実行時に②-nと③-A 3を組み合わせて、“Score = ”と一致した行を含めた後ろの3行分を行番号とともに表示させて、もう少し詳細情報を表示



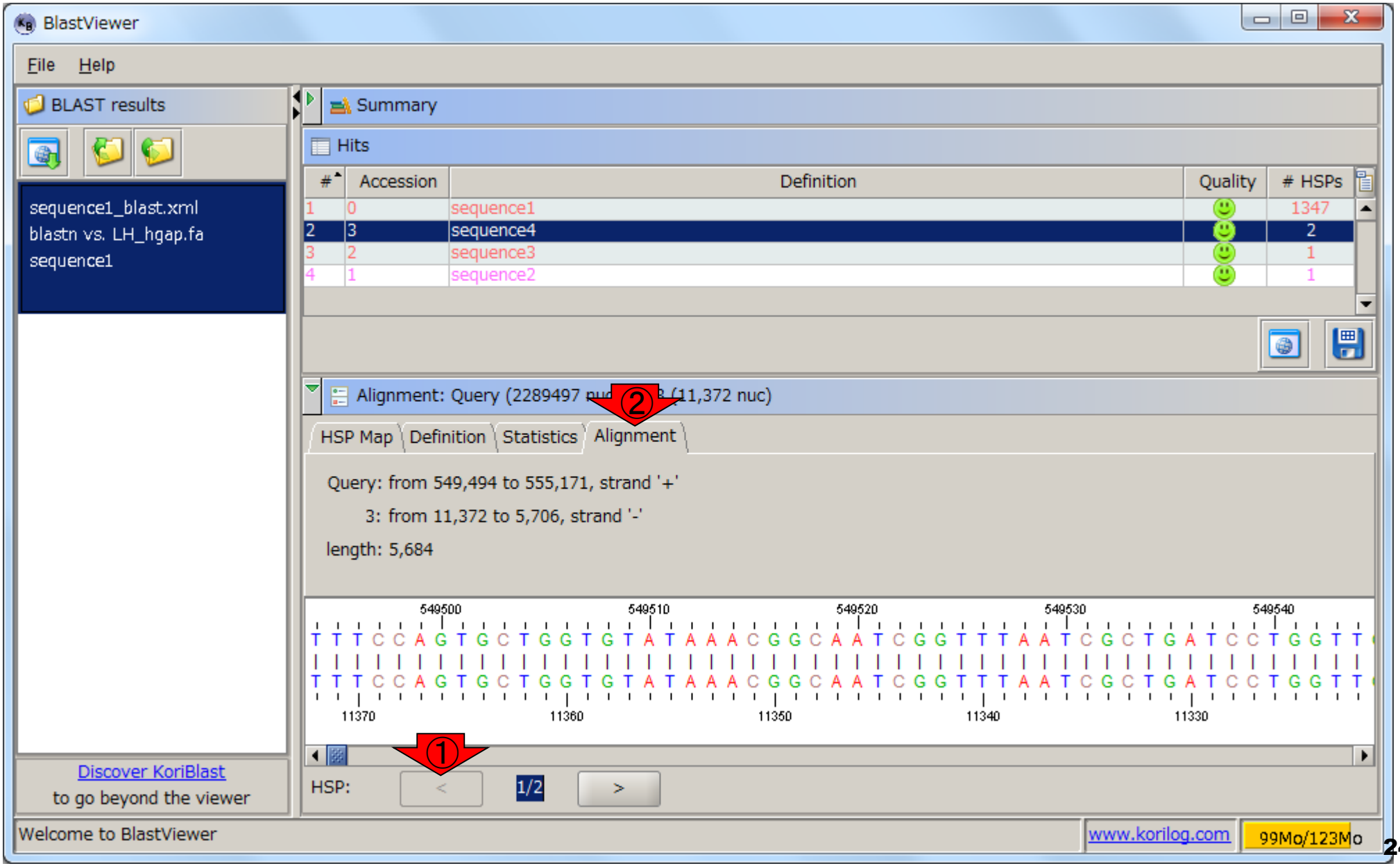
W8-2：seq1 vs. seq

sequence4上の配列類似領域の①1つめと②2つめ。
③確かにストランド情報として、query側(sequence1)がPlus鎖、DB側(sequence4)がMinus鎖となっている



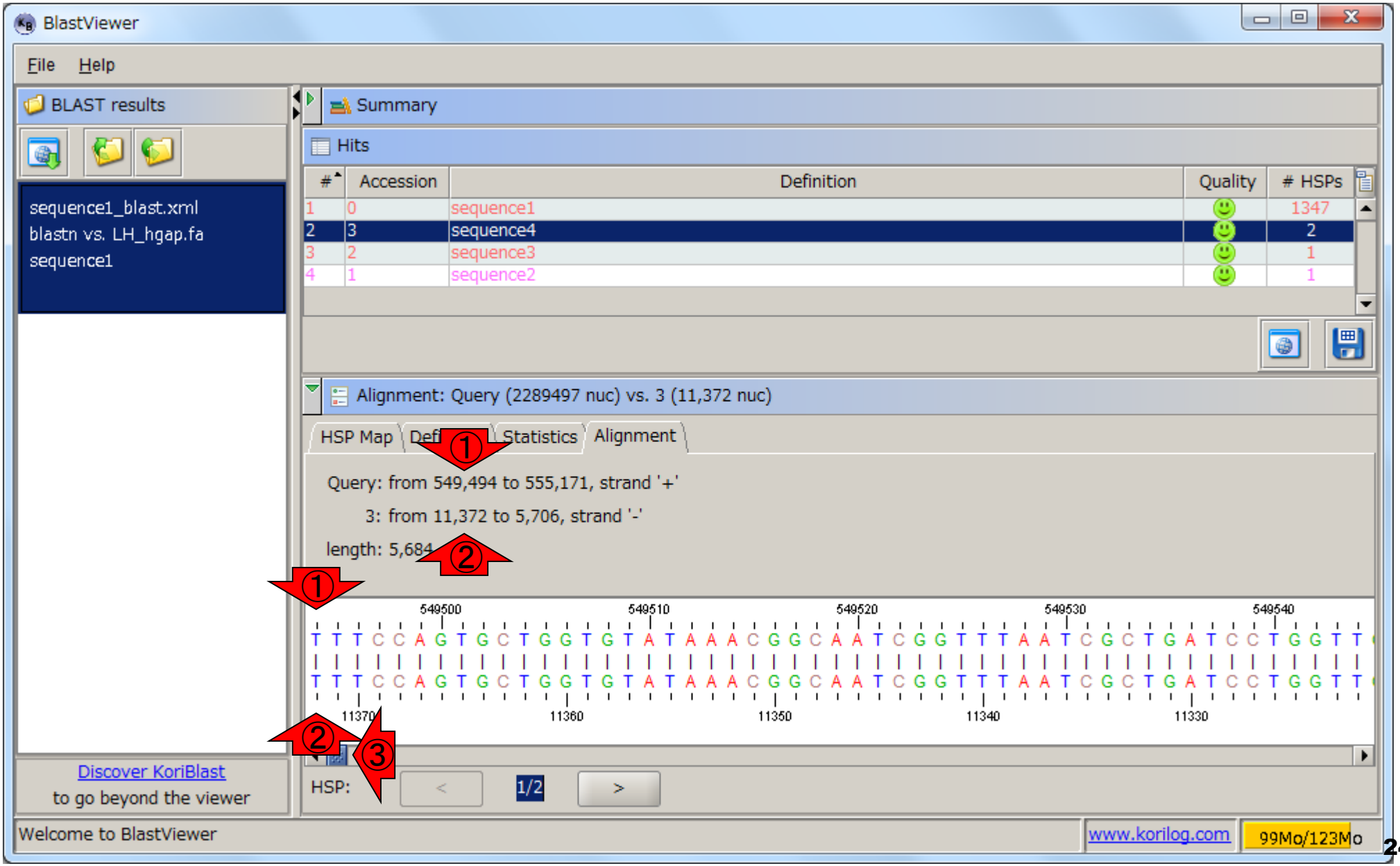
W8-3：HSP1

①1つめのHSP（以下、HSP1)に切り替えて、②Alignmentタブをクリック。ここでアラインメント結果の詳細情報がわかる



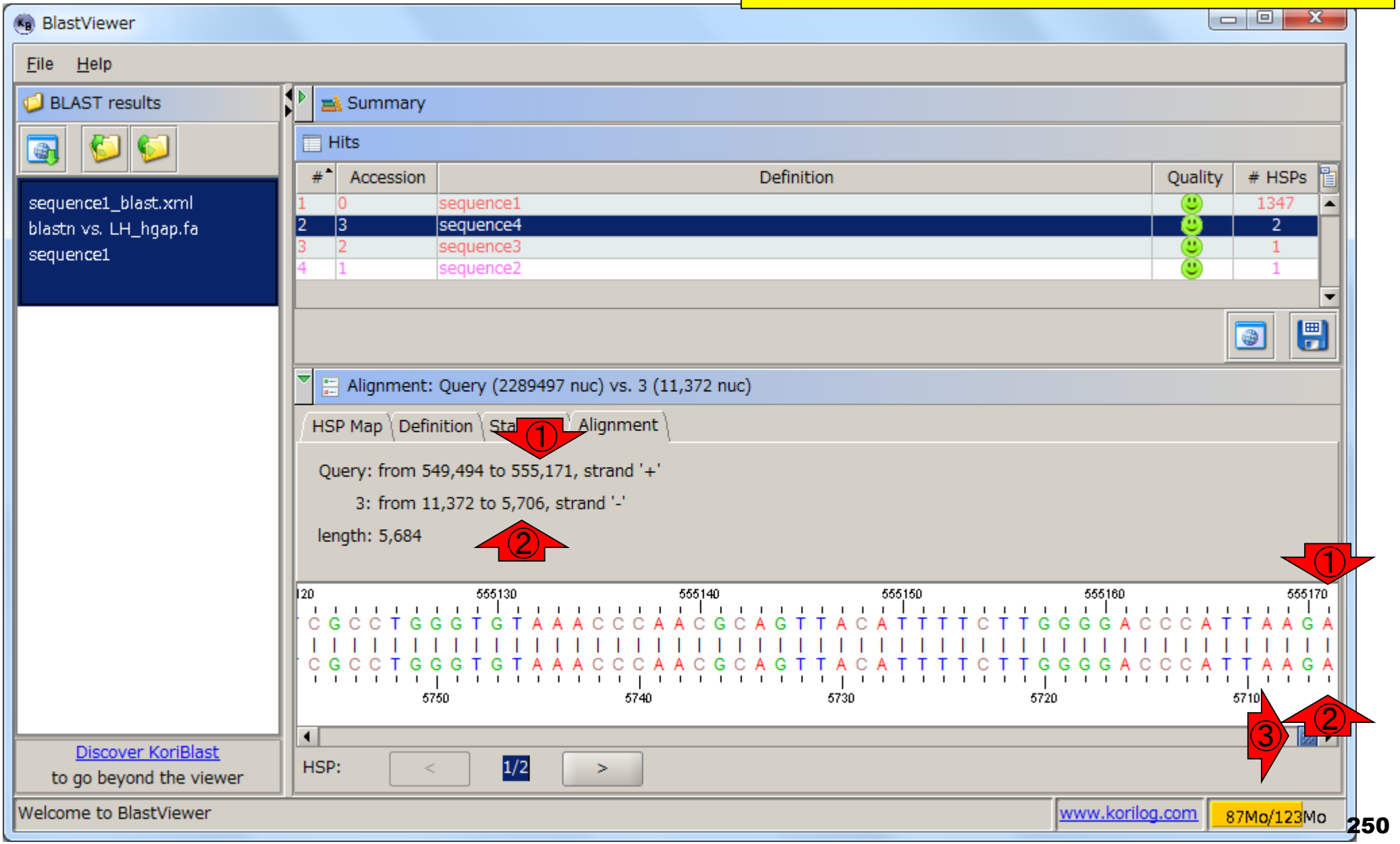
W8-3：HSP1

①query側(sequence1)の549,494番目と、②DB側(sequence4)の11,372番目から…③を一番右まで移動



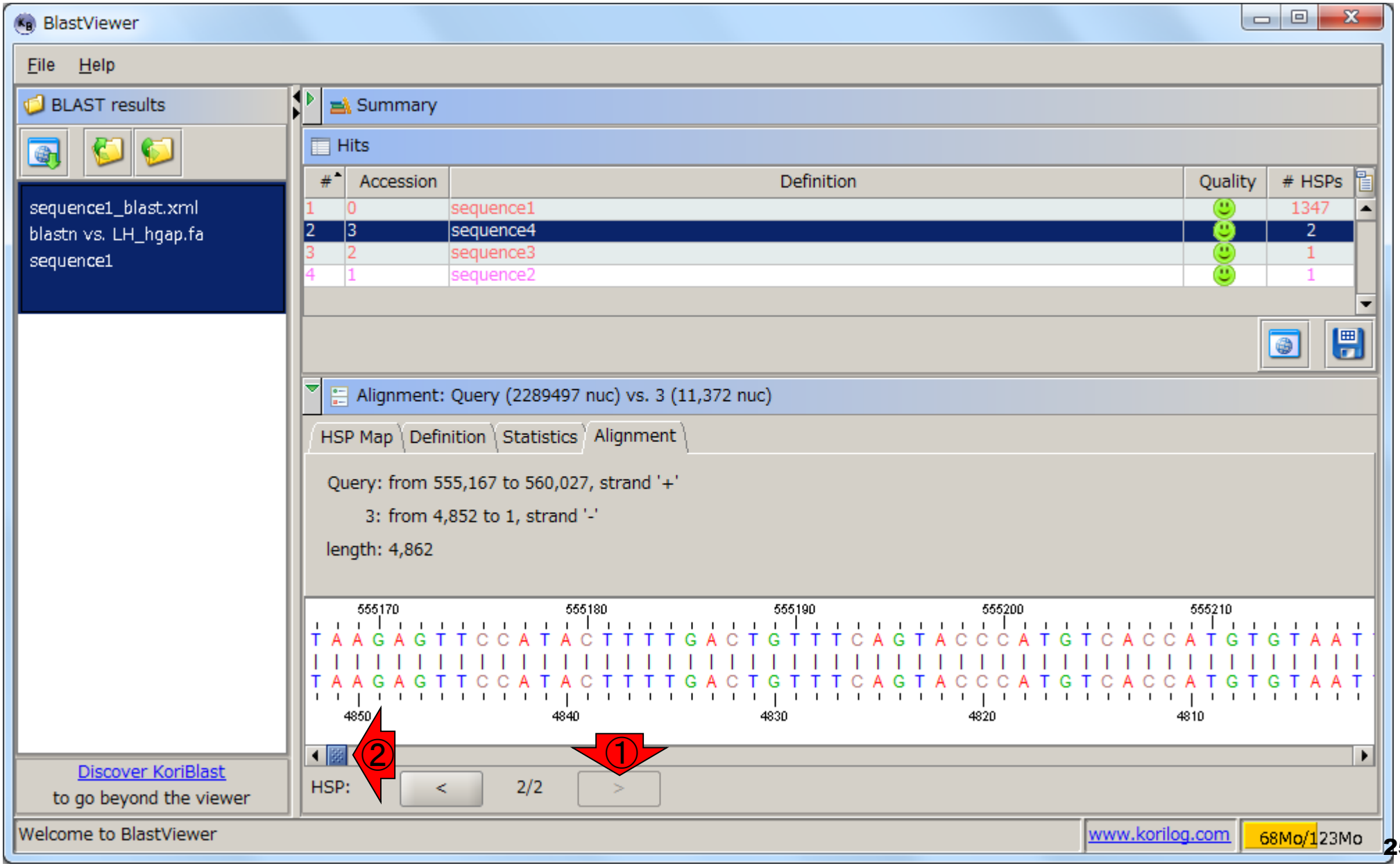
W8-3：HSP1

①query側(sequence1)の555,171番目と、②DB側(sequence4)の5,706番目の領域がHSP1。③を一番右まで移動させた結果で見ています



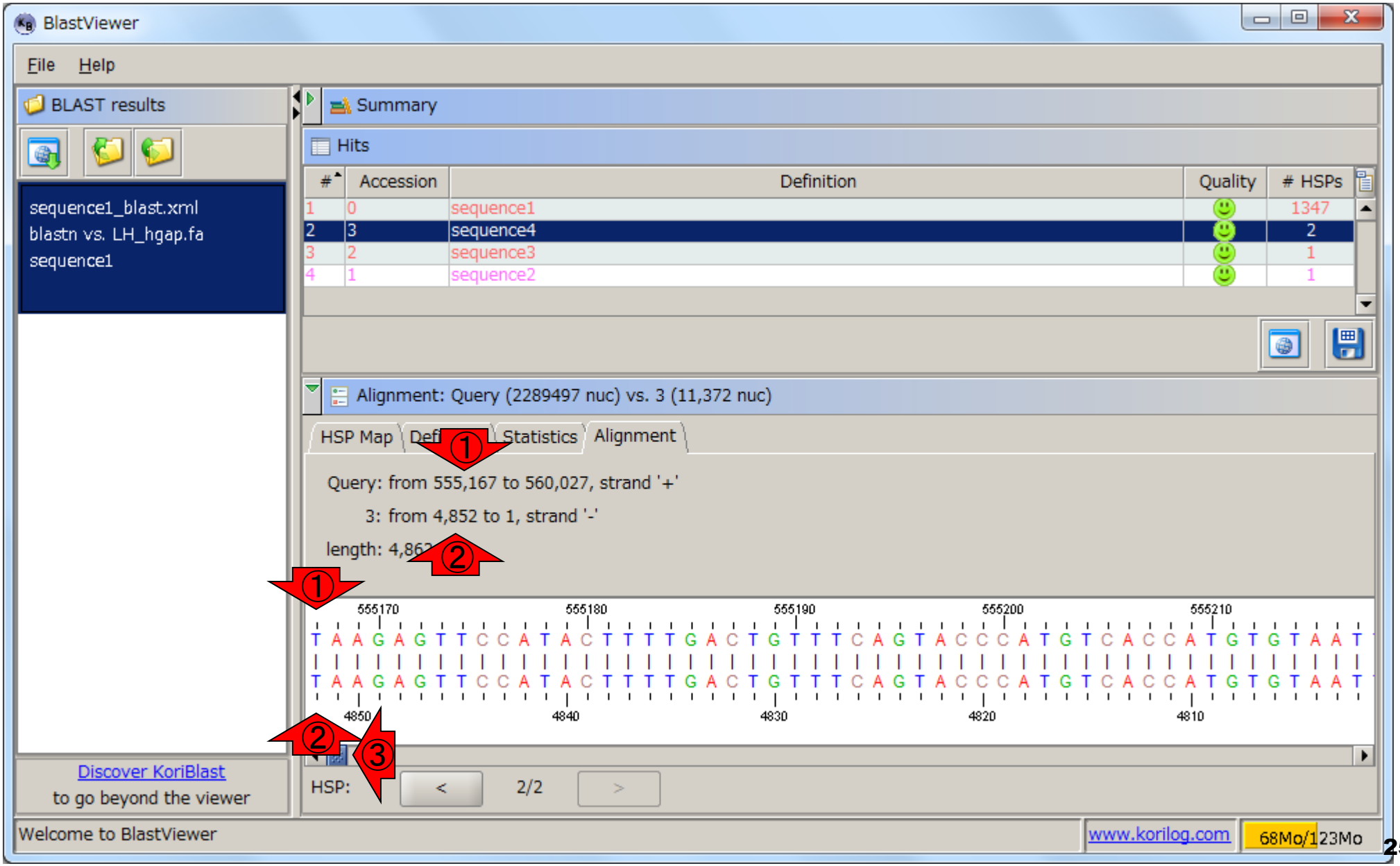
①2つめのHSP（以下、HSP2)に切り替えて、②一番左に移動

W8-4：HSP2



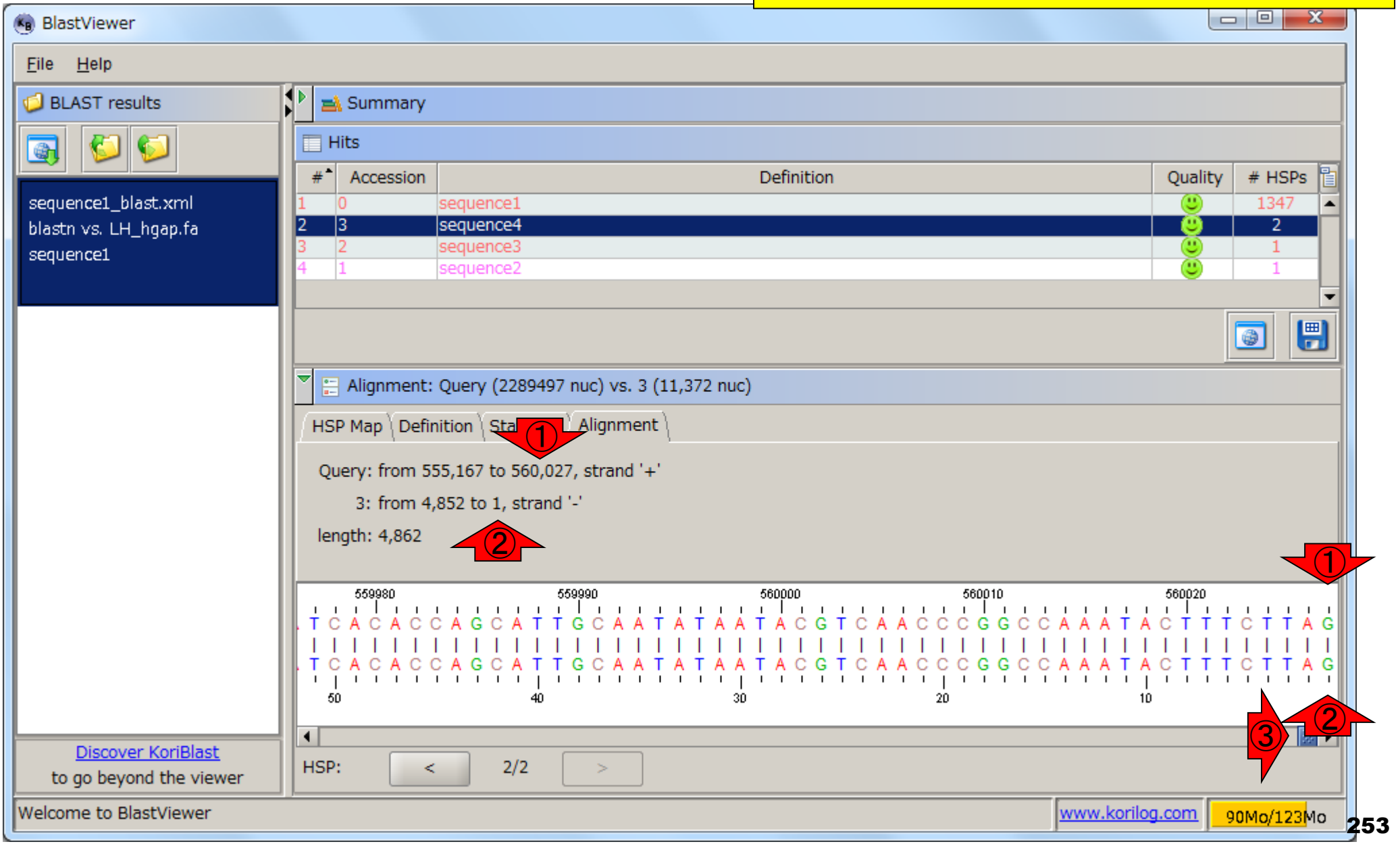
W8-4：HSP2

①query側(sequence1)の555,167番目と、②DB側(sequence4)の4,852番目から…③を一番右まで移動



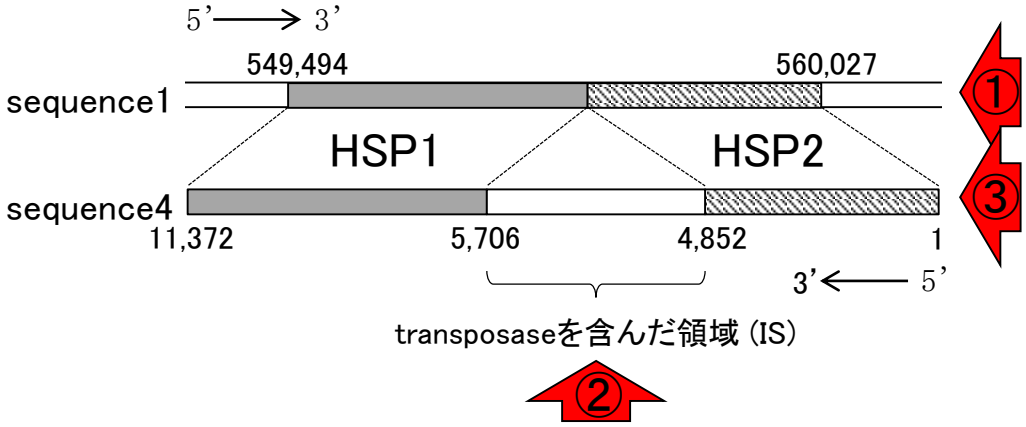
W8-4：HSP2

①query側(sequence1)の560,027番目と、②DB側(sequence4)の1番目の領域がHSP2。③を一番右まで移動させた結果で見ています



W8-5：模式図

sequence1とsequence4のアラインメント模式図。①sequence1の一続きの領域[549494, 560027 bp]と、②領域[4853, 5705 bp]を除く、③sequence4の全長がほぼ一致。そして、④アラインメントされなかった領域[4853, 5705 bp]には、transposaseがコードされていた(W4-9)。第8回の図1と同じ



sequence4	4133..4753	CDS	mannose-specific PTS system IID component
sequence4	4781..4873	CDS	mannose-specific PTS system IIA component
sequence4	4912..5220	CDS	transposase
sequence4	5361..5699	CDS	transposase
sequence4	5711..6058	CDS	mannose-specific PTS system IIA component
sequence4	6114..6596	CDS	mannose/fructose/sorbose-specific PTS system IID component

④

第8回原稿p189の右上

①このあたりまでの話が終了。sequence4除外後、残るはsequence1の詳細な解析。②sequence1は(ちょっとややこしいが)環状染色体、が結論

BLAST 実行結果ファイル（sequence1_blast.xml）しか受け付けないが、DB 側の配列ごとにヒット数（配列類似領域数：HSP 数）が示されているなど、全体的な操作感がよい[W7-4]。例えば、sequence1 に対するヒット数が 1,347 個、sequence4 が 2 個、sequence3 と sequence2 がそれぞれ 1 個であったことがわかる。また、ヒット数やスコア分布の全体像を眺めることで、sequence1 にいくつかの重複領域が存在することや、11,372 bp からなる sequence4 の大部分の領域が sequence1 と類似していることなどがわかる［W8-1］。

sequence4 は sequence1 の一部

BlastViewer で sequence4（11,372 bp）に対する sequence1（2,289,497 bp）のヒット領域を眺める［W8］。スコアの高いほう（Score＝10,320）の 1 つめの HSP（以下、HSP1）は、sequence1 の［549494, 555171 bp］と、sequence4 の［11372, 5706 bp］の領域から形成されてい

アライン

5705 bp］に対するアノテーション結果を眺めると、transposase がコードされていたことがわかる（図 1b；W8-5）。これは、該当領域が挿入配列（insertion sequence; IS）であることを示唆する。これはおそらく、乳酸菌の培養途中で一部の細胞に IS の挿入が起こったためであろう。結果として、シークエンスされた細胞集団の中に IS を含むものと含まないものが混在することになり、sequence4 が独立したコンティグとして出力されたものと思われる。sequence4 は全体的にクオリティスコアが低く（第 7 回 W11-7）、また、後述の Illumina によるシーケンス結果には当該部分が確認できなかったことから、IS が挿入された細胞の存在比率は高くないと考え、sequence4 は除外した。

①

sequence1 はプロファージ領域を含む環状染色体 ②

BlastViewer で sequence1（2,289,497 bp）に対する

Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

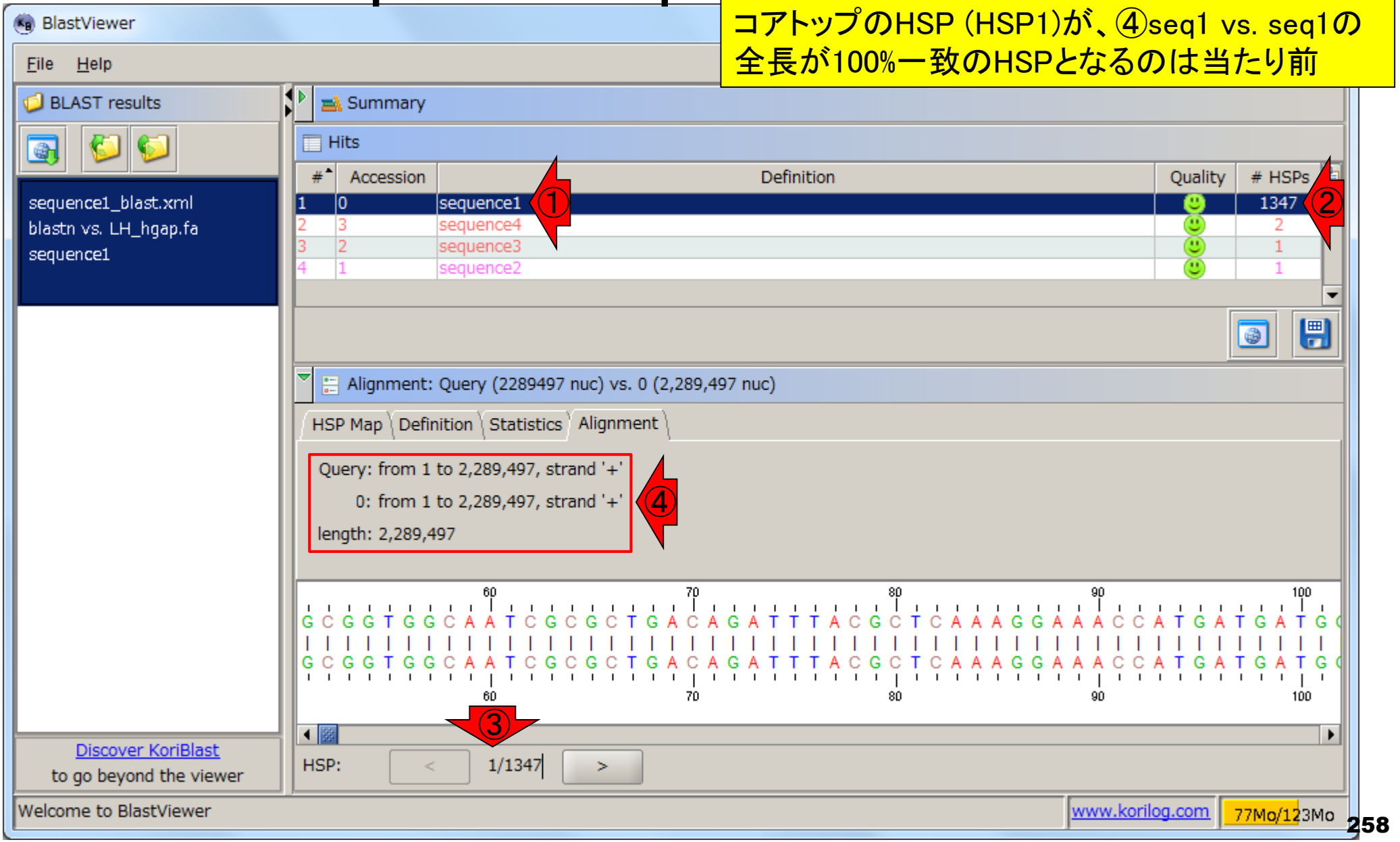
第8回原稿p187

①第8回原稿のアブストラクト。特にsequence1の解釈は赤下線部分を実感できます。得られた結果をパズルゲームのように組み合わせて合理的な結論を導き出す考え方は、バクテリア以外の分野のヒトにとっても有意義かも。取捨選択してご自身の研究に活かしてください

de novo ゲノムアセンブリ結果から、概要・完全配列（draft and complete genome sequences）にする作業は、基本的な塩基配列解析用プログラムの活用や自作、プログラム実行結果の検証や合理的な解釈など、ウェットとドライ両面の幅広い知識とスキル、そして精神力を要する。第8回は、PacBio データの *de novo* ゲノムアセンブリの後処理として、特に染色体ゲノムに相当する長いコンティグの検証作業を解説する。具体的には、DFAST による乳酸菌に特化したアノテーション、BLAST の実行と可視化、環状染色体の完成、Illumina データのマッピングによる検証と修正について述べる。ウェブサイト（Rで）塩基配列解析（URL: http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html）中に本連載をまとめた項目（URL: http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html#about_book_JSLAB）が存在する。ウェブ資料（以下、W）や関連ウェブサイトなどを効率的に活用してほしい。

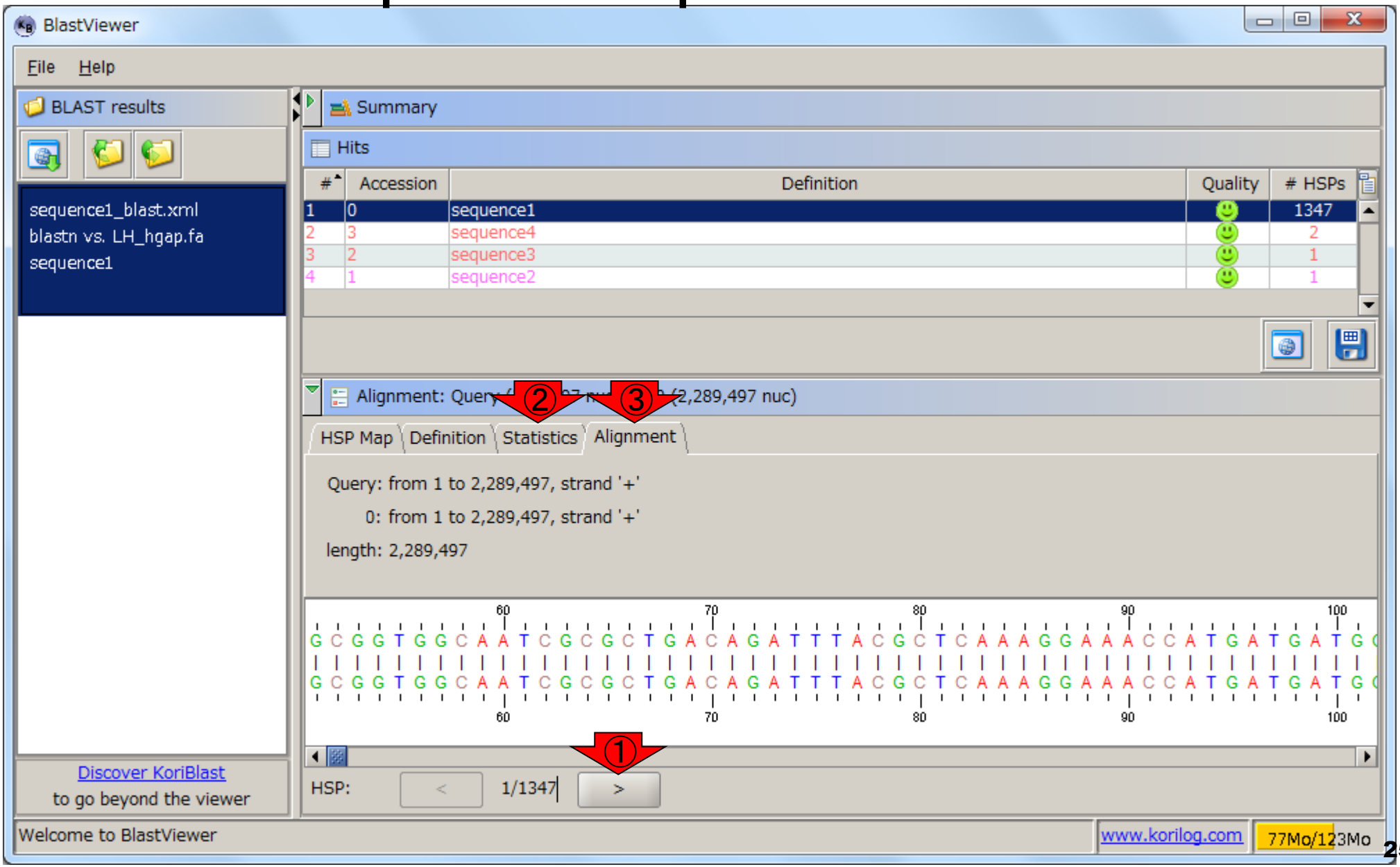
W9-1：seq1 vs. seq1

query側(sequence1)は固定で、①DB側がsequence1のBlast結果を表示。②配列類似領域(HSP)は1,347個あったことを思い出そう。③スコアトップのHSP (HSP1)が、④seq1 vs. seq1の全長が100%一致のHSPとなるのは当たり前



W9-1：seq1 vs. seq1

①や②や③を押して、スコアの上位33個(HSP1−33)までの全体像をまとめたのが…



W9-2：HSP1-33

これです。①括弧内のHSPは、カッコ外のHSPとqueryとDB側の一致領域が入れ替わっているだけで、実質的に同じものです。この表作成は1つ1つ確認しながらの手作業

HSP番号	スコア	一致領域(query側)			一致領域(DB側)			Length	query側の領域	DB側の領域
		start	end	strand	start	end	strand			
HSP1	4,227,900	1	2,289,497	plus	1	2,289,497	plus	2,289,497		
HSP2 (HSP3)	11,624	2,058,465	2,065,193	plus	2,057,850	2,064,578	plus	6,732		
HSP4 (HSP5)	10,754	37,329	43,187	plus	1	5,860	plus	5,865	①'	①
HSP6 (HSP7)	10,516	2,059,080	2,065,193	plus	2,057,850	2,063,963	plus	6,117		
HSP8 (HSP9)	10,429	2,283,820	2,289,497	plus	5,839	11,509	plus	5,679	②'	②
HSP10 (HSP11)	9,679	2,273,804	2,279,100	plus	717,190	711,892	minus	5,301		
HSP12 (HSP13)	9,524	2,059,672	2,065,193	plus	2,057,830	2,063,348	plus	5,525		
HSP14 (HSP15)	9,362	1,088,170	1,093,274	plus	999,673	1,004,778	plus	5,106		
HSP16 (HSP17)	8,385	2,060,310	2,065,194	plus	2,057,850	2,062,735	plus	4,887		
HSP18 (HSP19)	7,301	2,060,901	2,065,194	plus	2,057,830	2,062,120	plus	4,296		
HSP20 (HSP21)	6,186	2,061,516	2,065,193	plus	2,057,830	2,061,504	plus	3,680		
HSP22 (HSP23)	6,047	2,275,808	2,279,168	plus	1,002,969	999,608	minus	3,365		
HSP24 (HSP**26**)	6,043	999,670	1,002,969	plus	711,886	715,184	plus	3,300		
HSP25 (HSP**27**)	6,043	1,088,173	1,091,466	plus	711,892	715,184	plus	3,294		
HSP28 (HSP29)	6,038	2,275,808	2,279,100	plus	1,091,466	1,088,173	minus	3,295		
HSP30 (HSP31)	5,050	2,062,154	2,065,193	plus	2,057,850	2,060,889	plus	3,042		
HSP32 (HSP33)	4,021	2,062,769	2,065,197	plus	2,057,850	2,060,279	plus	2,431		

①

①の数値でソートした結果

W9-2：HSP1-33

HSP番号	スコア	一致領域(query側)			一致領域(DB側)			Length	query側の領域	DB側の領域
		start	end	strand	start	end	strand			
HSP1	4,227,900	1	2,289,497	plus	1	2,289,497	plus	2,289,497		
HSP4 (HSP5)	10,754	37,329	43,187	plus	1	5,860	plus	5,865	①'	①
HSP24 (HSP**26**)	6,043	999,670	1,002,969	plus	711,886	715,184	plus	3,300		
HSP14 (HSP15)	9,362	1,088,170	1,093,274	plus	999,673	1,004,778	plus	5,106		
HSP25 (HSP**27**)	6,043	1,088,173	1,091,466	plus	711,892	715,184	plus	3,294		
HSP2 (HSP3)	11,624	2,058,465	2,065,193	plus	2,057,850	2,064,578	plus	6,732		
HSP6 (HSP7)	10,516	2,059,080	2,065,193	plus	2,057,850	2,063,963	plus	6,117		
HSP12 (HSP13)	9,524	2,059,672	2,065,193	plus	2,057,830	2,063,348	plus	5,525		
HSP16 (HSP17)	8,385	2,060,310	2,065,194	plus	2,057,850	2,062,735	plus	4,887		
HSP18 (HSP19)	7,301	2,060,901	2,065,194	plus	2,057,830	2,062,120	plus	4,296		
HSP20 (HSP21)	6,186	2,061,516	2,065,193	plus	2,057,830	2,061,504	plus	3,680		
HSP30 (HSP31)	5,050	2,062,154	2,065,193	plus	2,057,850	2,060,889	plus	3,042		
HSP32 (HSP33)	4,021	2,062,769	2,065,197	plus	2,057,850	2,060,279	plus	2,431		
HSP10 (HSP11)	9,679	2,273,804	2,279,100	plus	717,190	711,892	minus	5,301		
HSP22 (HSP23)	6,047	2,275,808	2,279,168	plus	1,002,969	999,608	minus	3,365		
HSP28 (HSP29)	6,038	2,275,808	2,279,100	plus	1,091,466	1,088,173	minus	3,295		
HSP8 (HSP9)	10,429	2,283,820	2,289,497	plus	5,839	11,509	plus	5,679	②'	②

①

①や②の一致領域が、後の議論対象です

W9-2：HSP1-33

HSP番号	スコア	一致領域(query側) start	end	strand	一致領域(DB側) start	end	strand	Length	query側の領域	DB側の領域
HSP1	4,227,900	1	2,289,497	plus	1	2,289,497	plus	2,289,497		
HSP4 (HSP5)	10,7	37,329	43,187	plus	1	5,860	plus	5,865	①'	①
HSP24 (HSP**26**)	6,04	999,670	1,002,969	plus	711,886	715,184	plus	3,300		
HSP14 (HSP15)	9,362	1,088,170	1,093,274	plus	999,673	1,004,778	plus	5,106		
HSP25 (HSP**27**)	6,043	1,088,173	1,091,466	plus	711,892	715,184	plus	3,294		
HSP2 (HSP3)	11,624	2,058,465	2,065,193	plus	2,057,850	2,064,578	plus	6,732		
HSP6 (HSP7)	10,516	2,059,080	2,065,193	plus	2,057,850	2,063,963	plus	6,117		
HSP12 (HSP13)	9,524	2,059,672	2,065,193	plus	2,057,830	2,063,348	plus	5,525		
HSP16 (HSP17)	8,385	2,060,310	2,065,194	plus	2,057,850	2,062,735	plus	4,887		
HSP18 (HSP19)	7,301	2,060,901	2,065,194	plus	2,057,830	2,062,120	plus	4,296		
HSP20 (HSP21)	6,186	2,061,516	2,065,193	plus	2,057,830	2,061,504	plus	3,680		
HSP30 (HSP31)	5,050	2,062,154	2,065,193	plus	2,057,850	2,060,889	plus	3,042		
HSP32 (HSP33)	4,021	2,062,769	2,065,197	plus	2,057,850	2,060,279	plus	2,431		
HSP10 (HSP11)	9,679	2,273,804	2,279,100	plus	717,190	711,892	minus	5,301		
HSP22 (HSP23)	6,047	2,275,808	2,279,168	plus	1,002,969	999,608	minus	3,365		
HSP28 (HSP29)	6,03	2,275,808	2,279,100	plus	1,091,466	1,088,173	minus	3,295		
HSP8 (HSP9)	10,4	2,283,820	2,289,497	plus	5,839	11,509	plus	5,679	②'	②

W9-2：HSP1-33

右側の①’が領域[37329, 43187 bp]、①が[1, 5860 bp]、②’が [2283820, 2289497 bp]、②が[5839, 11509 bp]に相当。ここの「①’, ①, ②’, ②」が後の議論対象

HSP番号	スコア	一致領域(query側)			一致領域(DB側)			Length	query側の領域	DB側の領域
		start	end	strand	start	end	strand			
HSP1	4,227,900	1	2,289,497	plus	1	2,289,497	plus	2,289,497		
HSP4 (HSP5)	10,754	37,329	43,187	plus	1	5,860	plus	5,865	①’	①
HSP24 (HSP**26**)	6,043	999,670	1,002,969	plus	711,886	715,184	plus	3,300		
HSP14 (HSP15)	9,362	1,088,170	1,093,274	plus	999,673	1,004,778	plus	5,106		
HSP25 (HSP**27**)	6,043	1,088,173	1,091,466	plus	711,892	715,184	plus	3,294		
HSP2 (HSP3)	11,624	2,058,465	2,065,193	plus	2,057,850	2,064,578	plus	6,732		
HSP6 (HSP7)	10,516	2,059,080	2,065,193	plus	2,057,850	2,063,963	plus	6,117		
HSP12 (HSP13)	9,524	2,059,672	2,065,193	plus	2,057,830	2,063,348	plus	5,525		
HSP16 (HSP17)	8,385	2,060,310	2,065,194	plus	2,057,850	2,062,735	plus	4,887		
HSP18 (HSP19)	7,301	2,060,901	2,065,194	plus	2,057,830	2,062,120	plus	4,296		
HSP20 (HSP21)	6,186	2,061,516	2,065,193	plus	2,057,830	2,061,504	plus	3,680		
HSP30 (HSP31)	5,050	2,062,154	2,065,193	plus	2,057,850	2,060,889	plus	3,042		
HSP32 (HSP33)	4,021	2,062,769	2,065,197	plus	2,057,850	2,060,279	plus	2,431		
HSP10 (HSP11)	9,679	2,273,804	2,279,100	plus	717,190	711,892	minus	5,301		
HSP22 (HSP23)	6,047	2,275,808	2,279,168	plus	1,002,969	999,608	minus	3,365		
HSP28 (HSP29)	6,038	2,275,808	2,279,100	plus	1,091,466	1,088,173	minus	3,295		
HSP8 (HSP9)	10,429	2,283,820	2,289,497	plus	5,839	11,509	plus	5,679	②’	②

W9-3：アノテーション

③のあたりはribosomal RNAがほとんど。DFASTで得られたアノテーション情報を追加しています

HSP番号	スコア	一致領域(query側) start	end	strand	一致領域(DB側) start	end	strand	Length	query側の領域	DB側の領域
HSP1	4,227,900	1	2,289,497	plus	1	2,289,497	plus	2,289,497		
HSP4 (HSP5)	10,754	37,329	43,187	plus	1	5,860	plus	5,865	①'	①
HSP24 (HSP26)	6,04[illegible]	999,670	1,002,969	plus	711,886	715,184	plus	3,300	ribosomal RNA	
HSP14 (HSP15)	9,3[illegible] ③	1,088,170	1,093,274	plus	999,673	1,004,778	plus	5,106	ribosomal RNA	
HSP25 (HSP27)	6,04[illegible]	1,088,173	1,091,466	plus	711,892	715,184	plus	3,294	ribosomal RNA	
HSP2 (HSP3)	11,624	2,058,465	2,065,193	plus	2,057,850	2,064,578	plus	6,732		
HSP6 (HSP7)	10,516	2,059,080	2,065,193	plus	2,057,850	2,063,963	plus	6,117		
HSP12 (HSP13)	9,524	2,059,672	2,065,193	plus	2,057,830	2,063,348	plus	5,525		
HSP16 (HSP17)	8,385	2,060,310	2,065,194	plus	2,057,850	2,062,735	plus	4,887		
HSP18 (HSP19)	7,301	2,060,901	2,065,194	plus	2,057,830	2,062,120	plus	4,296		
HSP20 (HSP21)	6,186	2,061,516	2,065,193	plus	2,057,830	2,061,504	plus	3,680		
HSP30 (HSP31)	5,050	2,062,154	2,065,193	plus	2,057,850	2,060,889	plus	3,042		
HSP32 (HSP33)	4,021	2,062,769	2,065,197	plus	2,057,850	2,060,279	plus	2,431		
HSP10 (HSP11)	9,67[illegible]	2,273,804	2,279,100	plus	717,190	711,892	minus	5,301	ribosomal RNA	
HSP22 (HSP23)	6,0[illegible] ③	2,275,808	2,279,168	plus	1,002,969	999,608	minus	3,365	ribosomal RNA	
HSP28 (HSP29)	6,03[illegible]	2,275,808	2,279,100	plus	1,091,466	1,088,173	minus	3,295	ribosomal RNA	
HSP8 (HSP9)	10,429	2,283,820	2,289,497	plus	5,839	11,509	plus	5,679	②'	②

W9-3：アノテーション

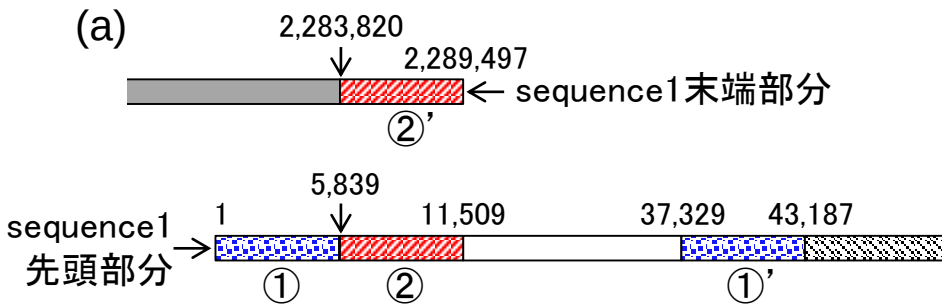
④のあたりは、「adhesion exoprotein、mucus-binding protein、hypothetical protein」となっており、はっきり言ってよくわからない

HSP番号	スコア	一致領域(query側) start	end	strand	一致領域(DB側) start	end	strand	Length	query側の領域	DB側の領域
HSP1	4,227,900	1	2,289,497	plus	1	2,289,497	plus	2,289,497		
HSP4 (HSP5)	10,754	37,329	43,187	plus	1	5,860	plus	5,865	①'	①
HSP24 (HSP26)	6,043	999,670	1,002,969	plus	711,886	715,184	plus	3,300	ribosomal RNA	
HSP14 (HSP15)	9,362	1,088,170	1,093,274	plus	999,673	1,004,778	plus	5,106	ribosomal RNA	
HSP25 (HSP27)	6,043	1,088,173	1,091,466	plus	711,892	715,184	plus	3,294	ribosomal RNA	
HSP2 (HSP3)	11,624	2,058,465	2,065,193	plus	2,057,850	2,064,578	plus	6,732		
HSP6 (HSP7)	10,516	2,059,080	2,065,193	plus	2,057,850	2,063,963	plus	6,117		
HSP12 (HSP13)	9,524	2,059,672	2,065,193	plus	2,057,830	2,063,348	plus	5,525		
HSP16 (HSP17)	8,38	2,060,310	2,065,194	plus	2,057,850	2,062,735	plus	4,887		
HSP18 (HSP19)	7,30	2,060,901	2,065,194	plus	2,057,830	2,062,120	plus	4,296		
HSP20 (HSP21)	6,186	2,061,516	2,065,193	plus	2,057,830	2,061,504	plus	3,680		
HSP30 (HSP31)	5,050	2,062,154	2,065,193	plus	2,057,850	2,060,889	plus	3,042		
HSP32 (HSP33)	4,021	2,062,769	2,065,197	plus	2,057,850	2,060,279	plus	2,431		
HSP10 (HSP11)	9,679	2,273,804	2,279,100	plus	717,190	711,892	minus	5,301	ribosomal RNA	
HSP22 (HSP23)	6,047	2,275,808	2,279,168	plus	1,002,969	999,608	minus	3,365	ribosomal RNA	
HSP28 (HSP29)	6,038	2,275,808								NA
HSP8 (HSP9)	10,429	2,283,820								②

④

sequence1	2055735..2060864	CDS	adhesion exoprotein
sequence1	2060942..2063323	CDS	mucus-binding protein
sequence1	2063401..2066928	CDS	hypothetical protein

W10-1：sequence1

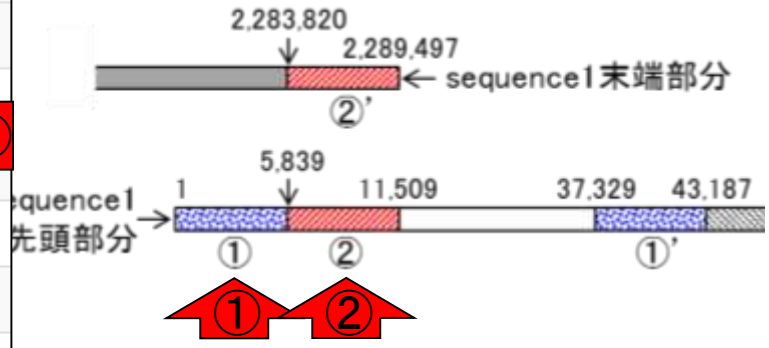


sequence1の末端付近の重複は、HSP8の一致領域（②と②'）に相当。これにHSP4の一致領域（①と①'）を含めた模式図。第8回の図2aと同じ。後の検証により、①の領域は染色体上に存在しないことが確認された

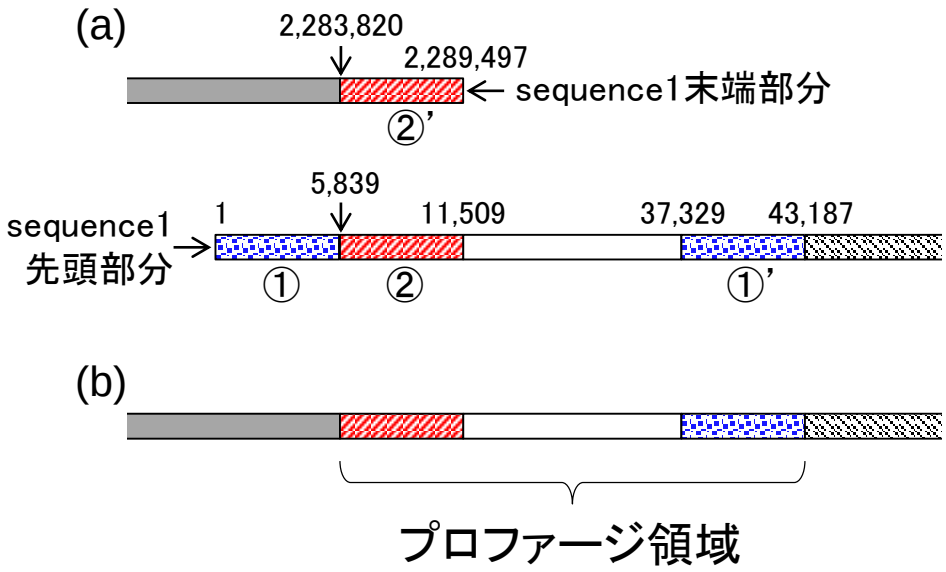
W10-2：アノテーション

HSP4の一致領域①[1, 5860 bp]のDFASTアノテーション。HSP8の一致領域②[5839, 11509 bp]のアノテーションの一部。マニアックすぎるので、このあたりは飛ばします。第8回ウェブ資料に詳細情報あり

LOCUS_00001	sequence1	151..384	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00002	sequence1	350..886	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00003	sequence1	883..1311	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00004	sequence1	1637..1849	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00005	sequence1	1968..2165	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00006	sequence1	2355..2732	CDS	prophage protein
LOCUS_00007	sequence1	2725..2940	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00008	sequence1	2930..3031	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00009	sequence1	3067..3534	CDS	holin
LOCUS_00010	sequence1	3547..4578	CDS	1,4-beta-N-acetylmuramidase
LOCUS_00011	sequence1	4765..4935	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00012	sequence1	4936..5517	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00013	sequence1	complement (6059..7228)	CDS	integrase
LOCUS_00014	sequence1	complement (7407..8267)	CDS	hypothetical protein
LOCUS_00015	sequence1	complement (8301..8813)	CDS	hypothetical protein



W10-3：染色体構造



(b) sequence1の両末端である①と②'の領域をトリム。得られた領域[5839, 2283819 bp]の両末端を結合した環状コンティグが実際の染色体構造であると予想した

①のあたりまでが終了

第8回原稿p190右上

sequence1（2,289,497 bp）のヒット領域を眺める［W9］。最もスコアの高いHSP（HSP1）はsequence1同士の全長が100%一致のものであるため、2番目のHSP（HSP2）以降のアラインメントが精査対象となる。総ヒット数（1,347個）が非常に多いため、ここではスコアが4,000以上という条件を満たすHSP1-33の一致領域をまとめた［W9-2］。ゲノム配列決定論文[1]中では、結論として下記の計4領域が議論の対象となっているが、どこまでのHSPを眺め、どのように解釈して結論づけるかは、利用可能な情報を徹底的に調べ、試行錯誤しながら整理していく以外にはないだろう。

・HSP4（HSP5）の一致領域①［1, 5860 bp］と①'［37329, 43187 bp］
・HSP8（HSP9）の一致領域②［5839, 11509 bp］と②'［2283820, 2289497 bp］

上記以外のHSPのアノテーションとして、HSP10, 14, 22, 24, 25, 28の領域には、ribosomal RNAがコードされ

改めて強調しておきたい点は、**配列相同性とアノテーションの併用**の重要性である。BLAST結果だけではわからないこともある。しかし、どのような遺伝子がコードされているかなど、アノテーション情報と合わせて総合的に判断すればわかる場合もある。また、シークエンス対象**サンプルは均一な集団ではない**点も胆に銘じておかねばならない。実際、今回の乳酸菌サンプル中には、図2bで示すようなプロファージ領域を含む環状染色体だけでなく、図2cで示すような（i）プロファージ領域が切り出されてできた環状ファージDNAや、（ii）プロファージ領域が切り出されてなくなった残りの環状染色体も含まれていた。このあたりが、本稿の冒頭で述べた幅広い知識や合理的な解釈に相当する。

①

乳酸菌ゲノム概要配列の作成

ここまで*de novo*アセンブリ結果ファイル（LH_hgap.fa）を入力として、アノテーションや配列相同性検索を行った。得られた方針は下記の通りである：

Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

①のあたりと…

第8回原稿p190右中

・HSP8（HSP9）の一致領域②［5839, 11509 bp］と②'［2283820, 2289497 bp］

上記以外のHSPのアノテーションとして、HSP10, 14, 22, 24, 25, 28の領域には、ribosomal RNAがコードされていた。また、残りのHSP2, 6, 12, 16, 18, 20, 30, 32は、［2057850, 2065197 bp］にかけての反復構造を含んだ領域の中に全て含まれ、この中には3つの遺伝子（adhesion exoprotein, mucus-binding protein, and hypothetical protein）がコードされていた［W9-3］。遺伝子名からは細胞接着に関わる表層タンパクと推察され、ここに見られた反復構造が何らかの働きを持っているのかもしれない。いずれもsequence1末端から10,000塩基以上離れた領域であることから、アセンブリ結果の検証という点では無関係であろう。

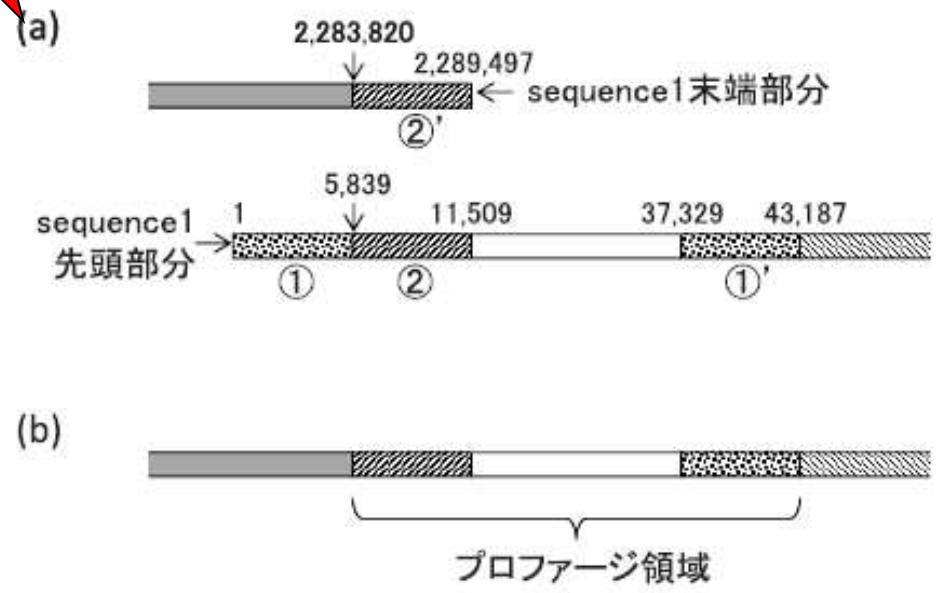
sequence1末端付近の重複は、HSP8の一致領域（②と②'）に相当する。これにHSP4の一致領域（①と①'）を含めた模式図を示す（図2a：W10-1）。もし①の領域がなければ、sequence2や3と同様に「両末端の重複 → 環状コンティグ」と結論づけられる。現在利用可能な他の情

①

乳酸菌ゲノム概要配列の作成

ここまで*de novo*アセンブリ結果ファイル（LH_hgap.fa）を入力として、アノテーションや配列相同性検索を行った。得られた方針は下記の通りである：

sequence1：環状染色体（図2）。主に①や②'の重複部分を除けばよい。ここでは、W10-4のアラインメントを参



①のあたりを行います

第8回原稿p191左上

考にして、領域［5839, 2283819 bp］を抽出する。
sequence2：環状プラスミド［W5-1］。BLAST で重複領域のアラインメントをとり、領域［2641, 84270 bp］を抽出する［W11-1］。
sequence3：環状プラスミド。領域［2450, 43422 bp］を抽出する（第 7 回 W16）。
sequence4：sequence1 の一部なので却下（図 1）。

この方針に従って重複除去を行い、概要配列（LH_draft.fa）を作成する［W11-2］。どのレベルを「概要（ドラフト）」と呼ぶかはヒトそれぞれであるが、少なくとも重複除去でおしまいではないため、ここでは重複除去後の状態を概要と呼ぶ。

概要配列への MiSeq データのマッピング

乳酸菌ゲノム配列決定の原著論文[1]では、概要配列（LH_draft.fa）の元となった PacBio データ（DRR054113）以外に、paired-end Illumina MiSeq データ（DRR024501）も存在

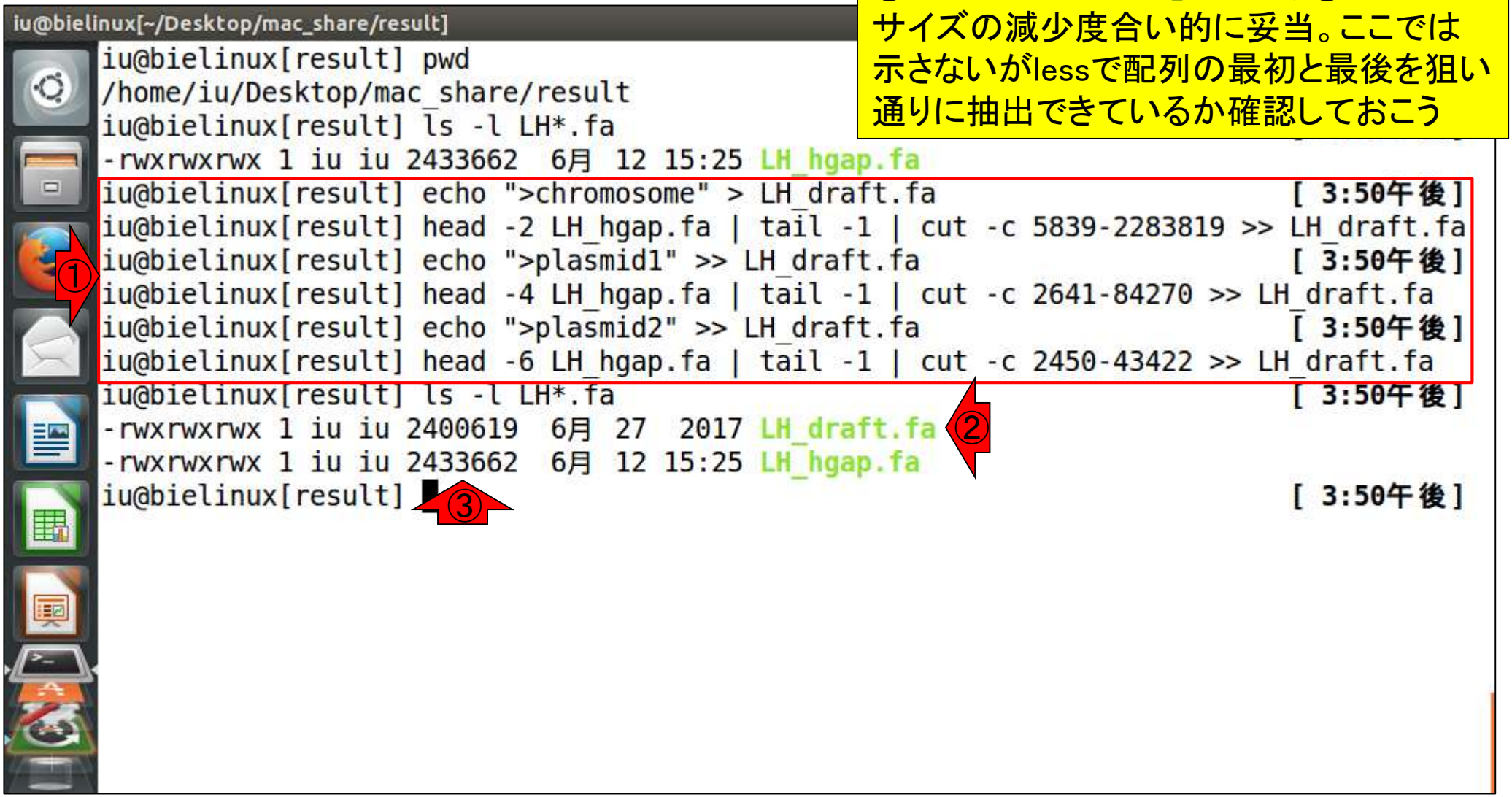
①

DDBJ Pipeline 上での BWA 実行時のオプションは、基本的にデフォルト設定のままでよい［W14-5］。補足として、オプション画面の Step3（ユニーク化処理）は、ペアのリードがともにリファレンス配列の 1 か所にのみマップされたリード（uniquely mapped read; unique mapper）を残し、それ以外のリードを除去している。これは、反復配列のような領域が存在すると、1 つのリードが複数個所にマップされて解析結果の解釈が難しくなるからである。変異解析では、これらのリードは除外して行う場合が多い。

BWA（ver. 0.6.1-r104）実行結果として、297,633 リード中 281,303 個（94.513%）がマップされた［W15-2］。リファレンス配列（LH_draft.fa）のゲノムサイズは 2,400,584 bp であるが、そのうち 2,400,552 bp 分がマップされたリードで覆われていた。つまり被覆率（coverage）は、2,400,552 / 2,400,584 = 99.99867% である。また、マップされたリードの総塩基数（130,565,653 bp）をマップされたリードで覆われている領域（2,400,552 bp）で割れば、平均してどれだけの厚み（depth）でマップされているかがわかる。この場合は、depth = 54.390 である。

W11-2:ドラフト配列作成

①アセンブリ結果ファイル(LH_hgap.fa)を入力として、重複除去を行う一連のコマンド。②出力ファイルはLH_draft.fa。③ファイルサイズの減少度合い的に妥当。ここでは示さないがlessで配列の最初と最後を狙い通りに抽出できているか確認しておこう



Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

この後の展開（第8回）

①自分は変異解析をやるつもりがなく、VCFファイルの理解はこれまで拒否していました。今回ドラフト配列の修正という局面で用いることになり、嫌々ながら必要最小限の勉強をしました

- W12：bwaでマッピング
  - （Bio-Linuxにプレインストールされている）bwaを利用し、PacBioデータから得られたドラフト配列をリファレンスとして、Illumina MiSeqデータをマップ。
  - やり方のみを示し、この結果は使わない。後述のDDBJ Pipelineの結果のほうがVCFファイルまで出力してくれて便利だから。
- W13：CyberduckのインストールとMiSeqデータのアップロード
  - CyberduckはFTPソフト。DDBJ Pipelineへのデータアップロード用として利用。
- W14：DDBJ Pipeline上でbwaを実行
- W15：実行結果の概観とダウンロード
- W16～W17：マッピング結果ファイル（SAM/BAM形式）の説明
- W18：VCFファイルの説明
  - PacBioデータから得られたリファレンス配列と違っている部分を示したもの。リード数およびクオリティスコアの点でIllumina MiSeqデータのほうが優位。VCFファイルの結果をもとに手作業でドラフト配列を修正するための基礎知識や基本的な考え方を身につけることを目的として、VCFファイルの読み取り方を解説。VCF形式については、（平成27-28年度のNGSハンズオン講習会の）変異解析」でも紹介。

この後の展開（第8回）

①Tabletの解説も兼ねています。W12からW27の範囲は、PacBioデータしかない場合は行いません。MiSeqデータもあるので援用しています

- W19：Tabletのインストールと利用
  - Tabletは、リファレンス配列へのマッピング結果をローカル環境で可視化するViewer。VCFファイルでみた変異箇所は、ドラフト配列の修正候補箇所に相当する。MiSeqデータのマッピング結果のほうを採用するかどうかを、Tabletで修正候補箇所を実際に眺めて判断する。
- W20：plasmid2上の変異箇所を確認
- W21：plasmid1上の変異箇所を確認
- W22：chromosome上の変異箇所を確認
- W23：マップされたリードの詳細情報を知るTips

- W24：ドラフト配列修正方針のまとめとVCFファイルのおさらい
- W26：変異の反映…が意外と文字列置換でうまくいかないことを学ぶ
- W27：テキストエディタ(EmEditor)を用いてベタで修正
  - 文字列検索と該当塩基位置情報を組み合わせて、ドラフト配列を修正

この後の展開（第9回）

連載第9回以降は、Illumina MiSeqデータの有無に関係なく行う。①は、環状バクテリアゲノムの場合にしばしば慣例として行われる。GC skewで眺めたときに、時計の0時あたりで分布が切り替わるようにするのが主目的

- W3：Ori-Finderで転写開始点を同定
- W4： 配列の“回転”
  - *dnaA*遺伝子が配列の先頭となるように“回転”
- W5：INSDCフラットファイルの説明
  - entry, feature, qualifierからなる3つの階層構造の話など
- W6：locus_tagの説明
- W7とW8：DFASTアノテーションの実行と結果の確認、Tips
- W9とW10：DFAST結果画面からのDDBJへの登録の概要
- W11とW12：描画ソフトDNAPlotterのインストールと利用
- W13：grepを駆使してgenbank(.gbk)形式を理解
- W14：awkコマンドの利用（最初の配列のみ抽出）
- W15とW16：DNAPlotterを再度利用（プラスミド配も描画し）
- W17：描画結果を原著論文の図と比較
- W18：ovaファイルの再インストール関連情報
- W19：配列情報つきgffファイルを作成してDNAPlotterで描画

この後の展開(第10回)

連載第10回は、*de novo*アセンブリ結果ファイルをDFASTアノテーション結果とともに、DDBJに登録する一連の作業を解説

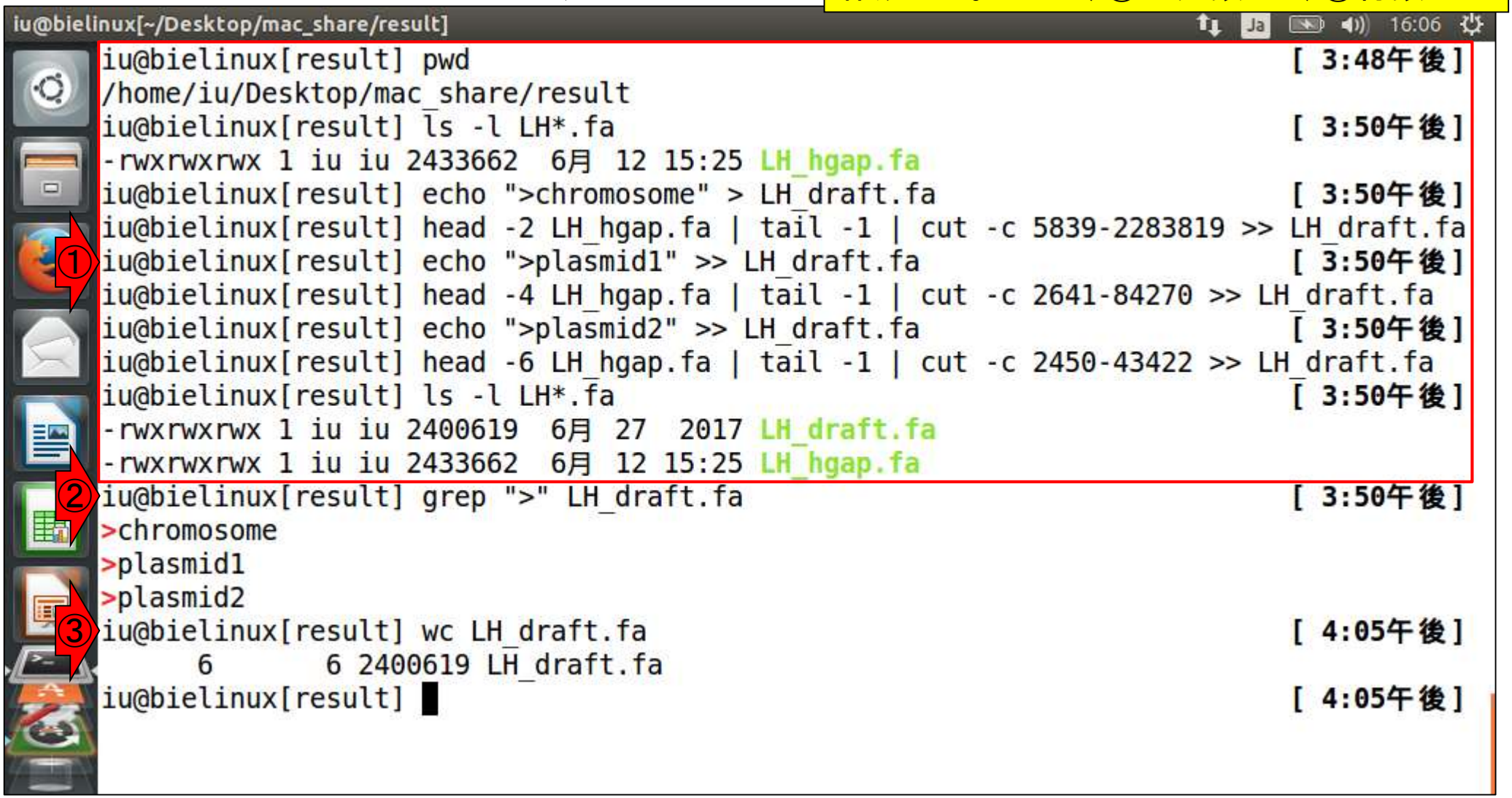
- W2:DDBJの登録用アカウント作成
- W3:DDBJにログイン
- W4:NSSSとMSSの説明など(今回はMSSでの登録)
- W5とW6:BioProjectの登録。Locus tag prefixのおさらいなど
- W7とW8:BioSampleの登録。サンプル属性のテンプレートファイルの解説
- W9:アクセッション番号取得とDDBJによる編集結果の確認
- W10:MSS (Mass Submission System)での申込
- W11:DFAST上でDDBJ登録用ファイルを作成
- W12:DDBJとのメールのやりとり
- W13:公開

Contents（主に第8回）

- W4：ゲノムアノテーション（DFAST）
- W5：dotterの実行（sequence4）
- W6：Blastの実行（DB配列はLH_hgap.fa、query配列はsequence1）
- W7：BlastViewerでBlast実行結果を眺める（W7-4まで）
- W7：lessとgrepでも確認（W7-6まで）
- W8：Blast実行結果のsequence1 vs. sequence4を眺める
- W9～W10：sequence1を詳細に調べる（Blastとアノテーション結果を併用）
- W11：乳酸菌ゲノム概要配列の作成
- この後の展開（第8回のW12以降と第9-10回の概要）
- W3：シェルスクリプト

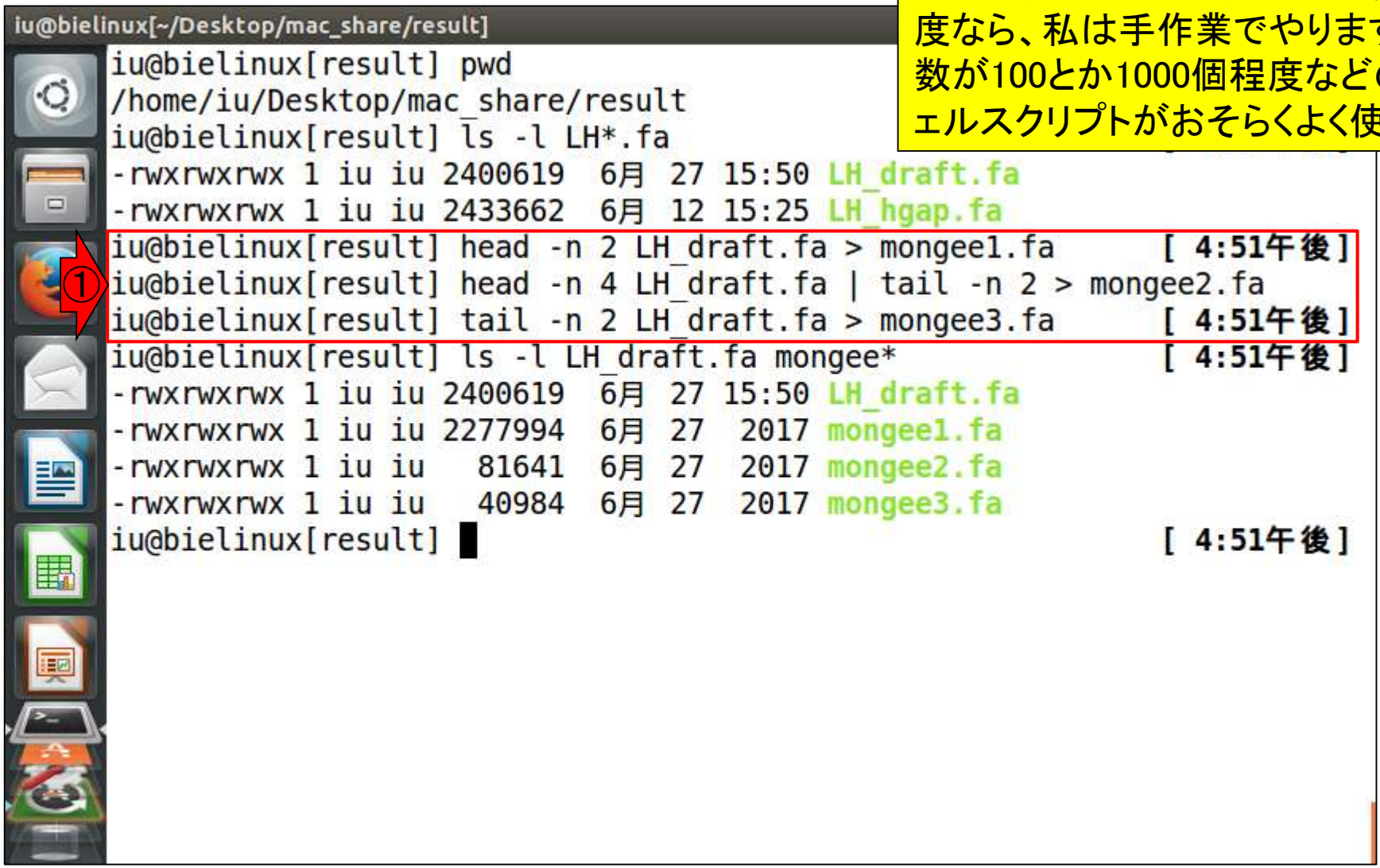
W3-0：ファイル分割1

①第8回W11-2(スライド273)では、3つの配列からなるmulti-FASTAファイル(LH_draft.fa)を作成した。よって、②配列数は3、③行数は6



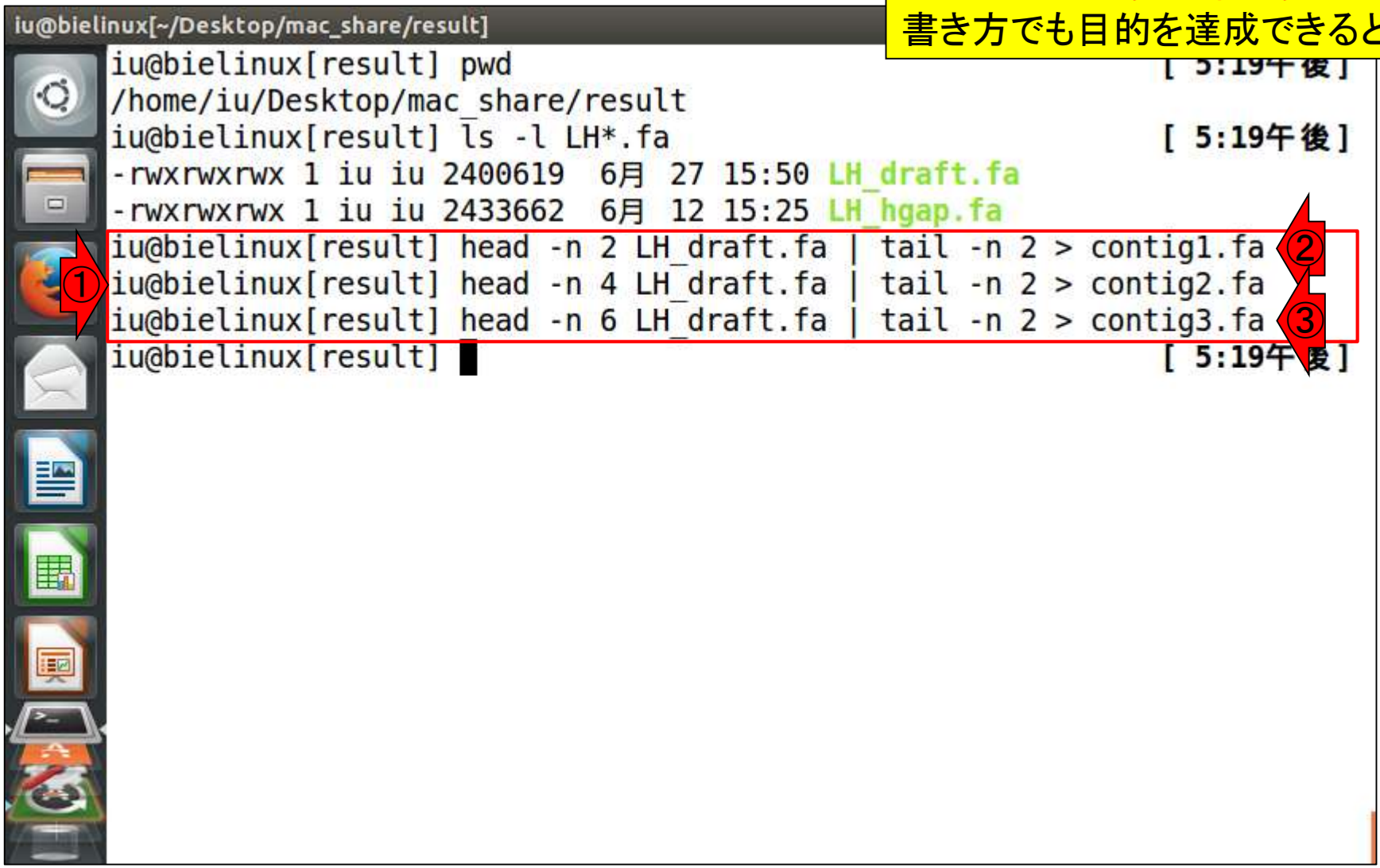
W3-0：ファイル分割2

第7回W10-3からW10-4（スライド56-58）と同じようなファイル分割方法だと、①こんな感じになる。この例のように配列数が10個以下程度なら、私は手作業でやります。しかし、配列数が100とか1000個程度などの局面では、シェルスクリプトがおそらくよく使われます



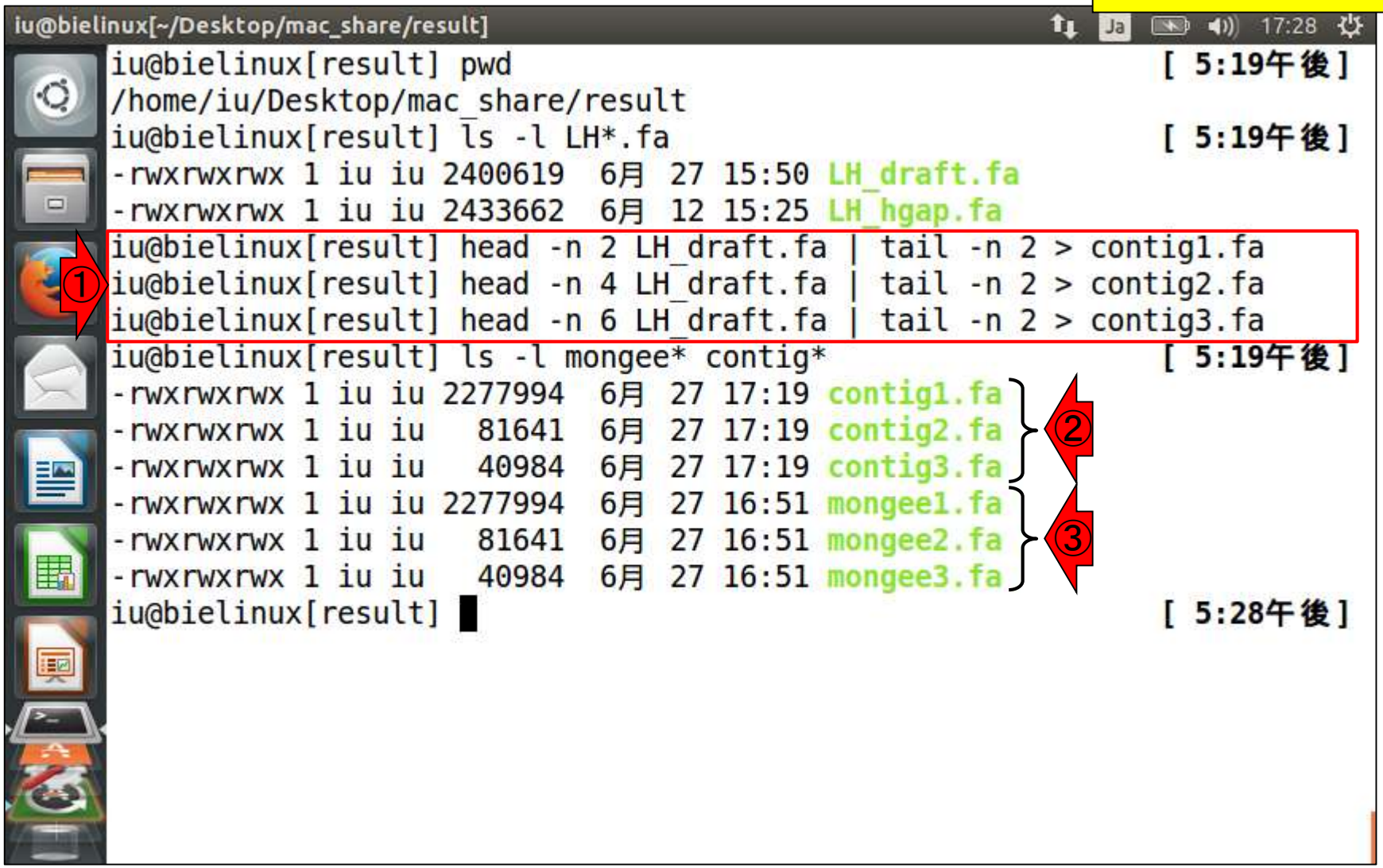
W3-1：シェルスクリプト

先程とは異なり、①contig[0-9].fa作成のためのスクリプトを統一的に記述している。②や③の記述法は一見無駄に見えるが、このような書き方でも目的を達成できるところがポイント



W3-1：シェルスクリプト

①で作成した、②contig[0-9].faと、先に作成したmongee[0-9].faのファイルサイズは確かに同じ



W3-1：シェルスクリプト

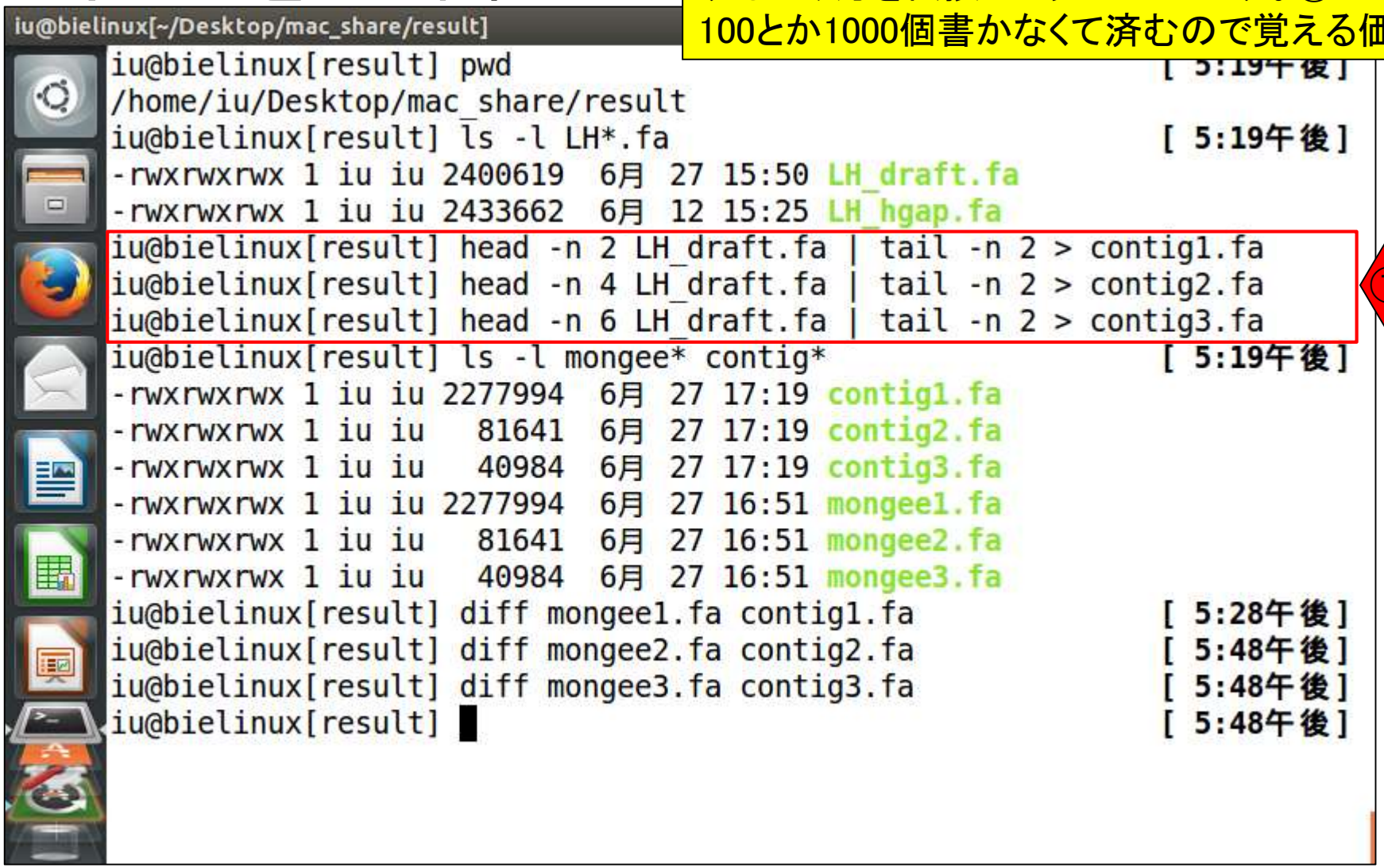
①ファイルサイズだけでなく、中見も完全に同じであることがわかります

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  17:48
iu@bielinux[result] pwd                                          [ 5:19午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] ls -l LH*.fa                                 [ 5:19午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2400619  6月 27 15:50 LH_draft.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2433662  6月 12 15:25 LH_hgap.fa
iu@bielinux[result] head -n 2 LH_draft.fa | tail -n 2 > contig1.fa
iu@bielinux[result] head -n 4 LH_draft.fa | tail -n 2 > contig2.fa
iu@bielinux[result] head -n 6 LH_draft.fa | tail -n 2 > contig3.fa
iu@bielinux[result] ls -l mongee* contig*                        [ 5:19午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2277994  6月 27 17:19 contig1.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu   81641  6月 27 17:19 contig2.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu   40984  6月 27 17:19 contig3.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu 2277994  6月 27 16:51 mongee1.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu   81641  6月 27 16:51 mongee2.fa
-rwxrwxrwx 1 iu iu   40984  6月 27 16:51 mongee3.fa
iu@bielinux[result] diff mongee1.fa contig1.fa                   [ 5:28午後]
iu@bielinux[result] diff mongee2.fa contig2.fa                   [ 5:48午後]
iu@bielinux[result] diff mongee3.fa contig3.fa                   [ 5:48午後]
iu@bielinux[result]                                              [ 5:48午後]
```

①

目的を再確認

ここでは、配列数が100とか1000個程度からなるmulti-FASTAファイルの分割を想定して、シェルスクリプトで記述するやり方を伝授しようとしています。①のようなコマンドを100とか1000個書かなくて済むので覚える価値があります



W3-2：参考資料

参考資料は、例えば①平成27年度NGSハンズオン講習会の、②7/24の講義資料（のスライド58以降）です

平成27年度NGSハンズオン講習会 ①

平成27年度は、平成26年度の実績を踏まえ、講義内容の改善等を行い、ハンズオンに特化した、より効果的なNGS講習会を開催しました。

H27年度概要

H27年度講義日程・参考資料

H26年度講習会の情報についてはこちらをご覧ください。

H27年度実施報告書・講義資料・動画等

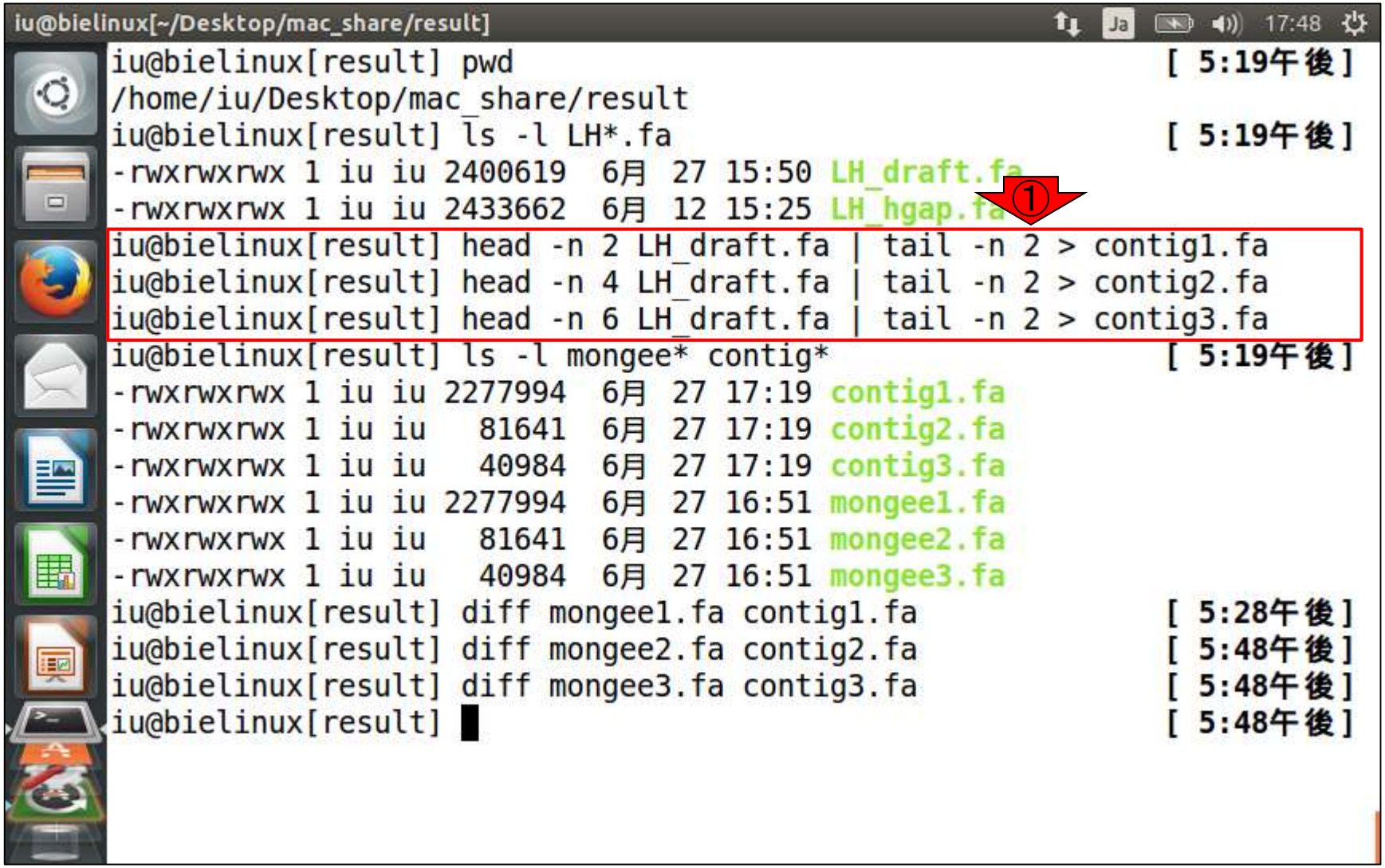
● 講習会実施報告書（PDF：2.17MB）および受講者アンケート集計結果（データ集）（PDF：662KB）

● 講義資料・動画　*講義資料一覧のファイル名をクリックすると資料ファイル（PDF等）がダウンロードできます。

実施日	実施時間	大項目	項目	レベル	習得技術	担当講師(敬称略)	講義資料・動画(統合TV)
7月22日（水）	10:30-12:00	PC環境の構築	Bio-Linux8とRのインストール状況確認		・Linux導入 ・R導入 ・NGS解析に必要な環境構築技術	門田 幸二（東京大学） 寺田 透（東京大学）	事前予習資料一覧（PDF:52KB） 講義資料一覧（PDF:108KB）
	13:15-14:45						
	15:00-16:30						
	16:45-18:15						
7月23日（木）	10:30-12:00	UNIX/Linuxとスクリプト言語	Linux基礎	初級	UNIXの基礎の理解	門田 幸二（東京大学）	講義資料一覧（PDF:32KB） 統合TV
	13:15-14:45			中級			
	15:00-16:30						
	16:45-18:15						
7月24日（金）	10:30-12:00		スクリプト言語	中級	シェルスクリプト	服部 恵美（アメリエフ）	講義資料（PDF:1.8MB）②
	13:15-14:45						
	15:00-16:30						統合TV

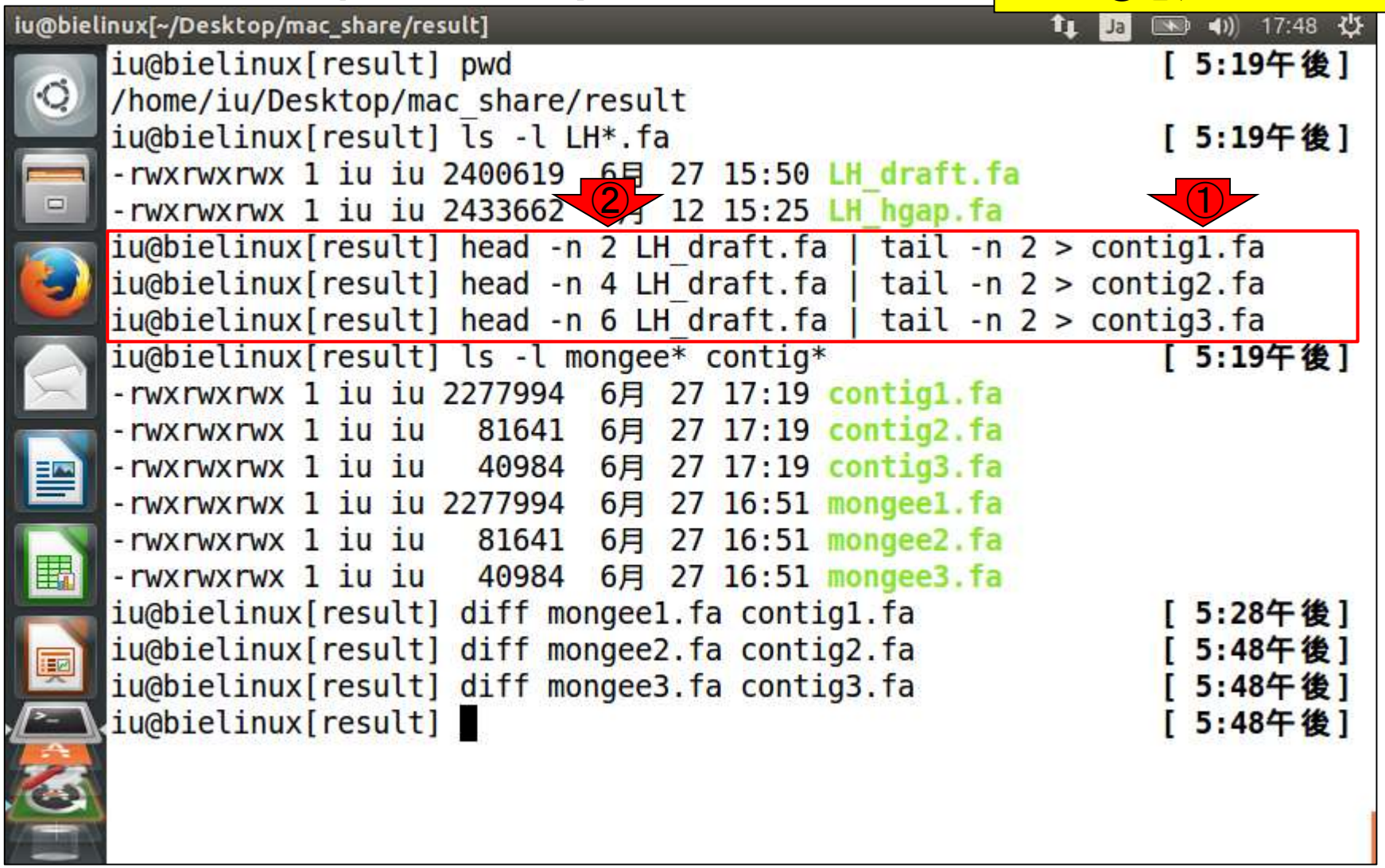
W3-3：戦略を練る

まず、①の部分は2で固定。理由は、出力ファイルがsingle-FASTA形式だから



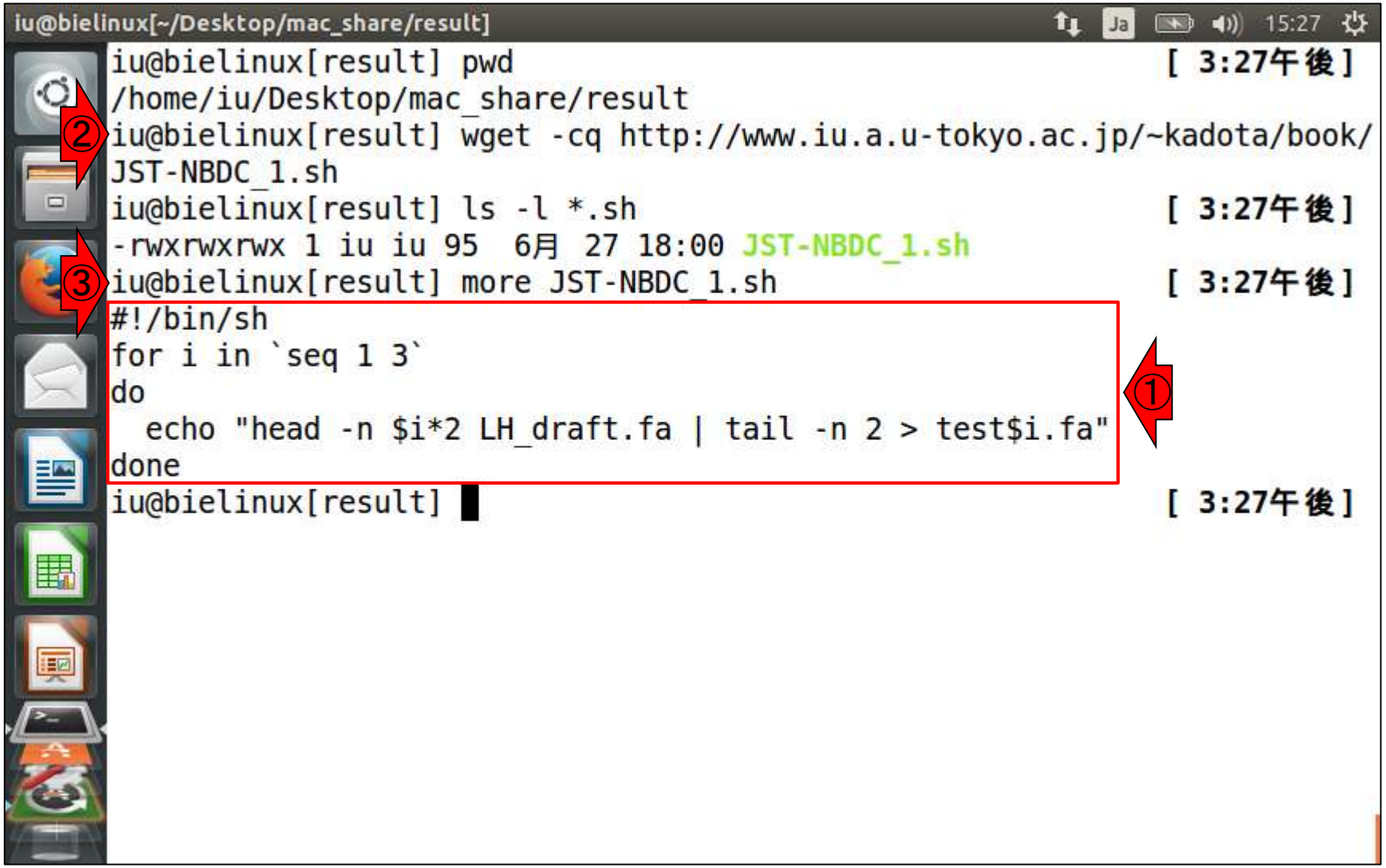
W3-3：戦略を練る

変わっているのは①と②の部分。①1-3までのループを回して、その2倍の値として②を表現できるだろうと妄想する



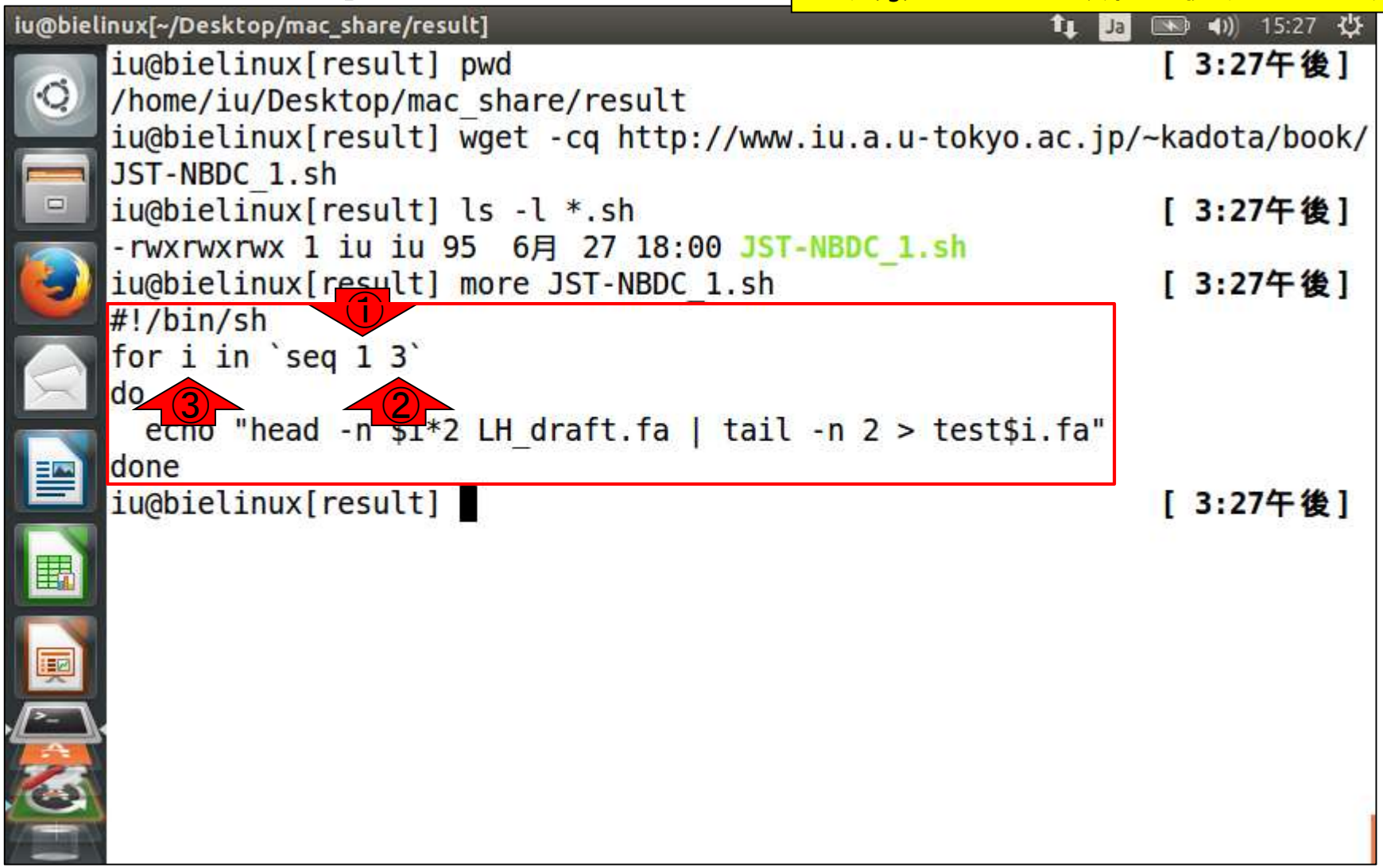
W3-4：基本形

①シェルスクリプトの基本形ファイルJST-NBDC_1.shを、②wgetし、③moreで確認



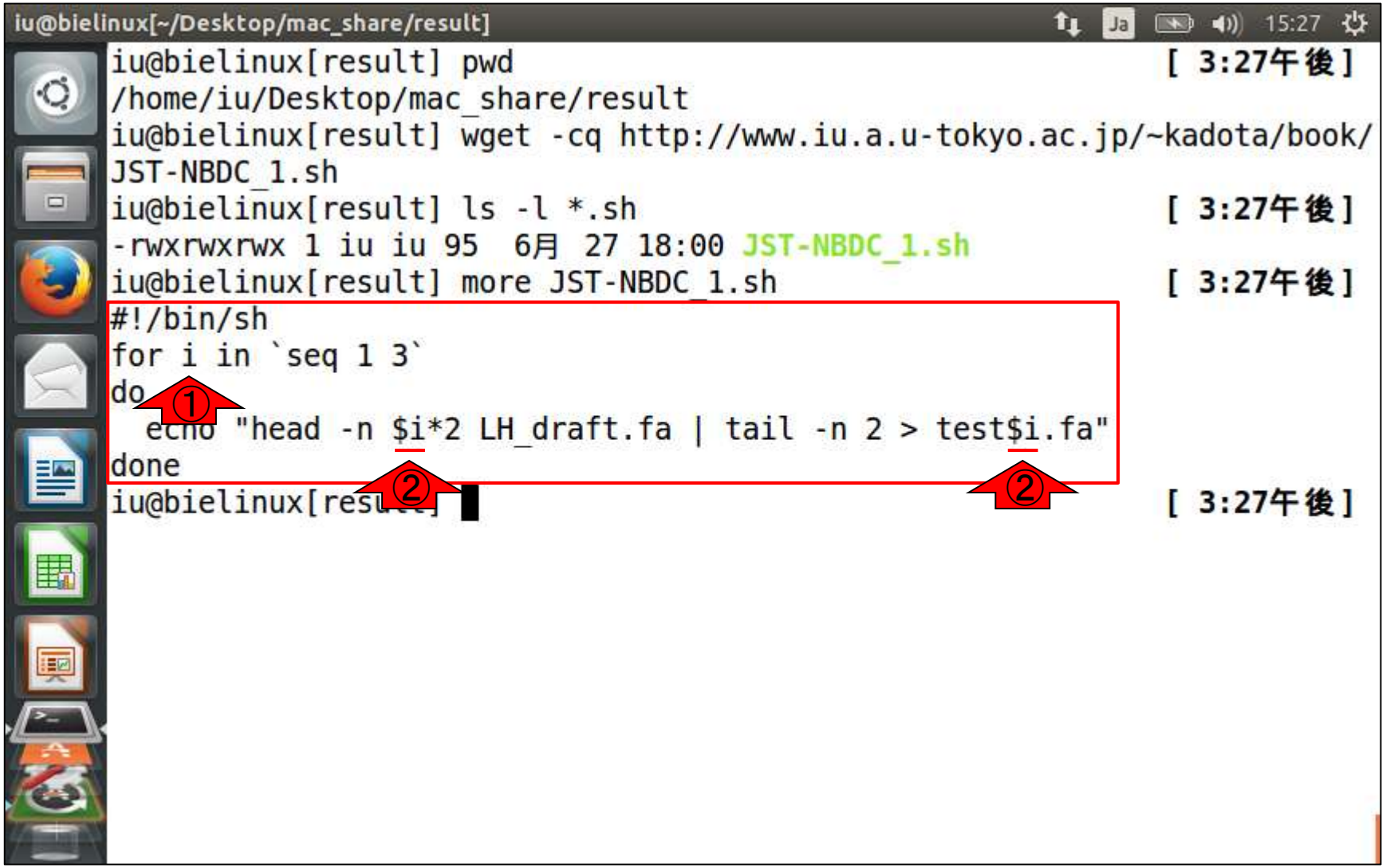
W3-5：解説

①1から②3までの1刻みのループを回し、③iという変数で取り扱う。別にiでなくてもよいが、変数名として、i, j, kといった順番で使うヒトも一定数存在する



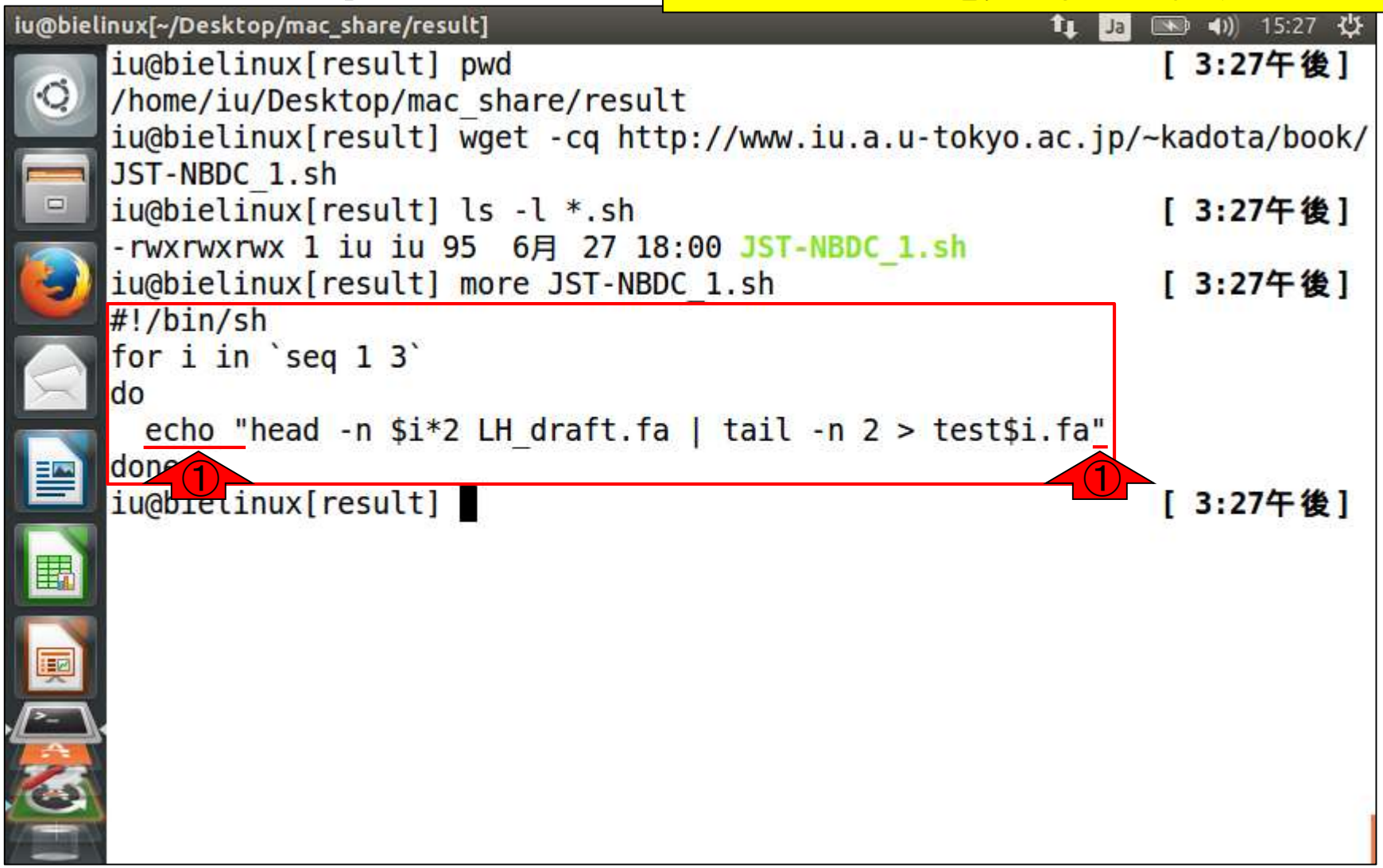
W3-5：解説

①変数iは、②$iとして取り扱う。つまり$を追加する。なぜ?という類のものではなく、お約束です



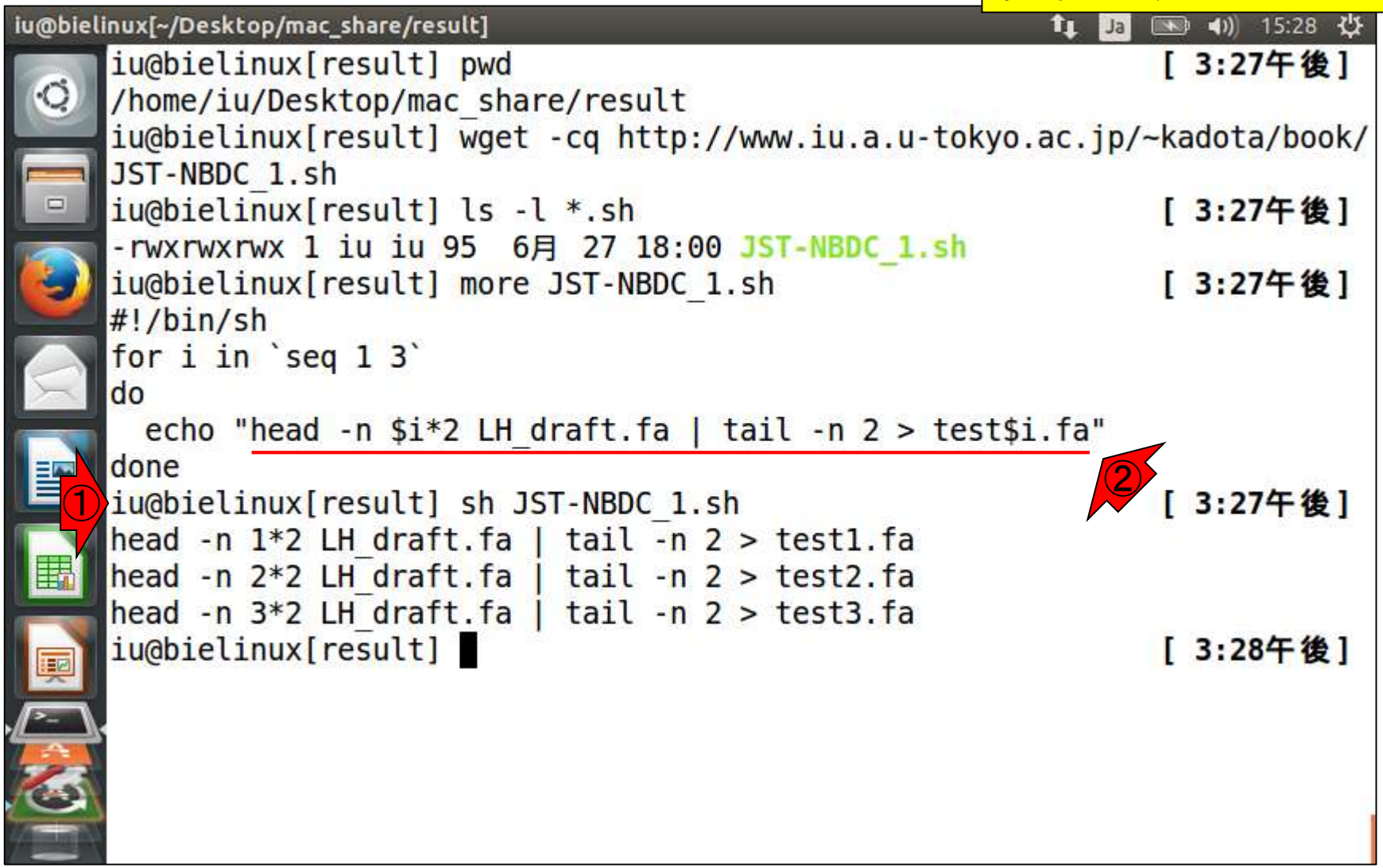
W3-5：解説

①「echo “…”」で囲んでいますが、これはLinuxコマンドのechoであり、“”内部の実際に実行したいコマンドがどんな感じになっているかを実行前に確認するためにつけています



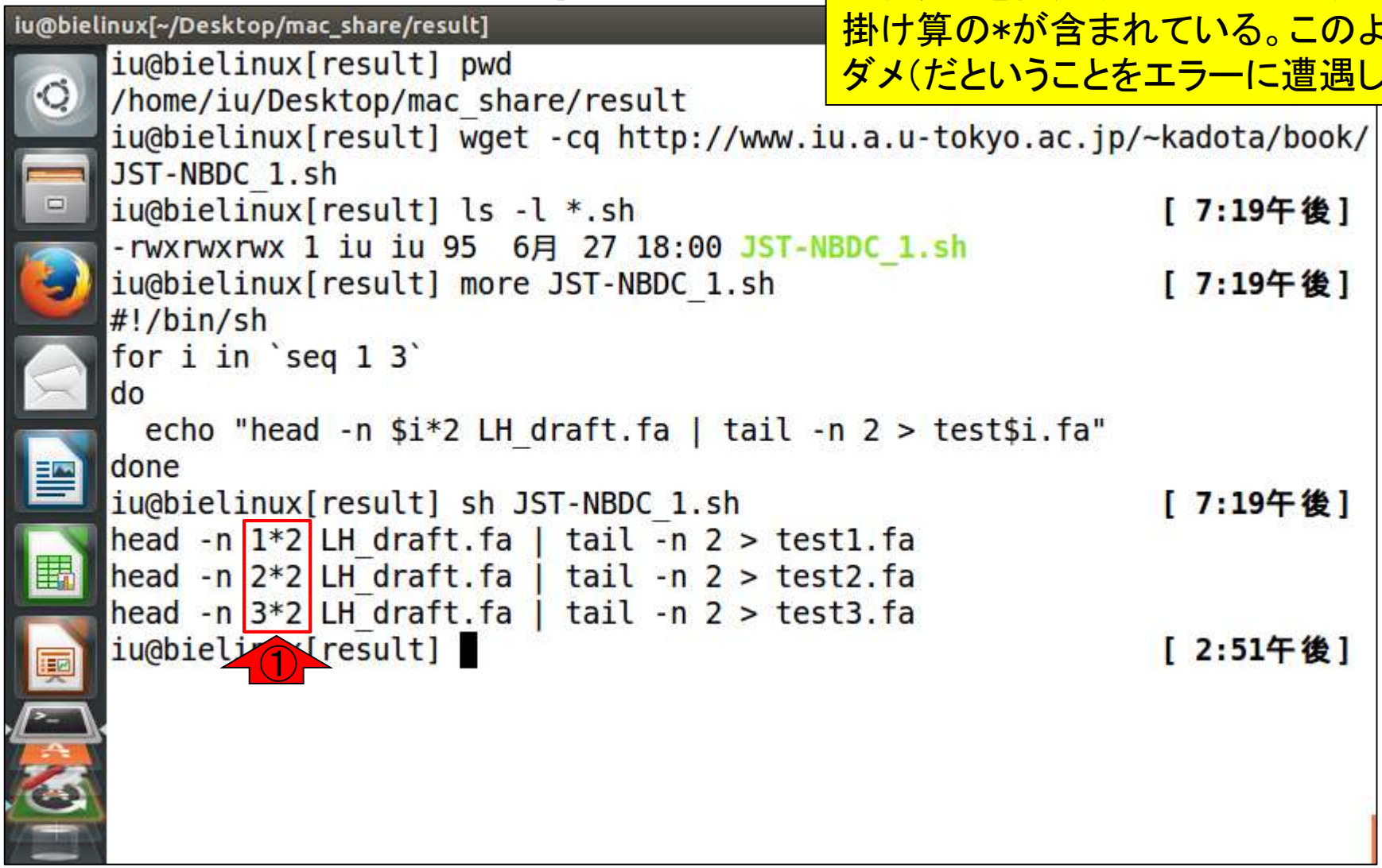
W3-6：echoで確認

①shコマンドでJST-NBDC_1.shを実行。
②echoで囲った中身に相当する、赤下線部分が表示されていることがわかる



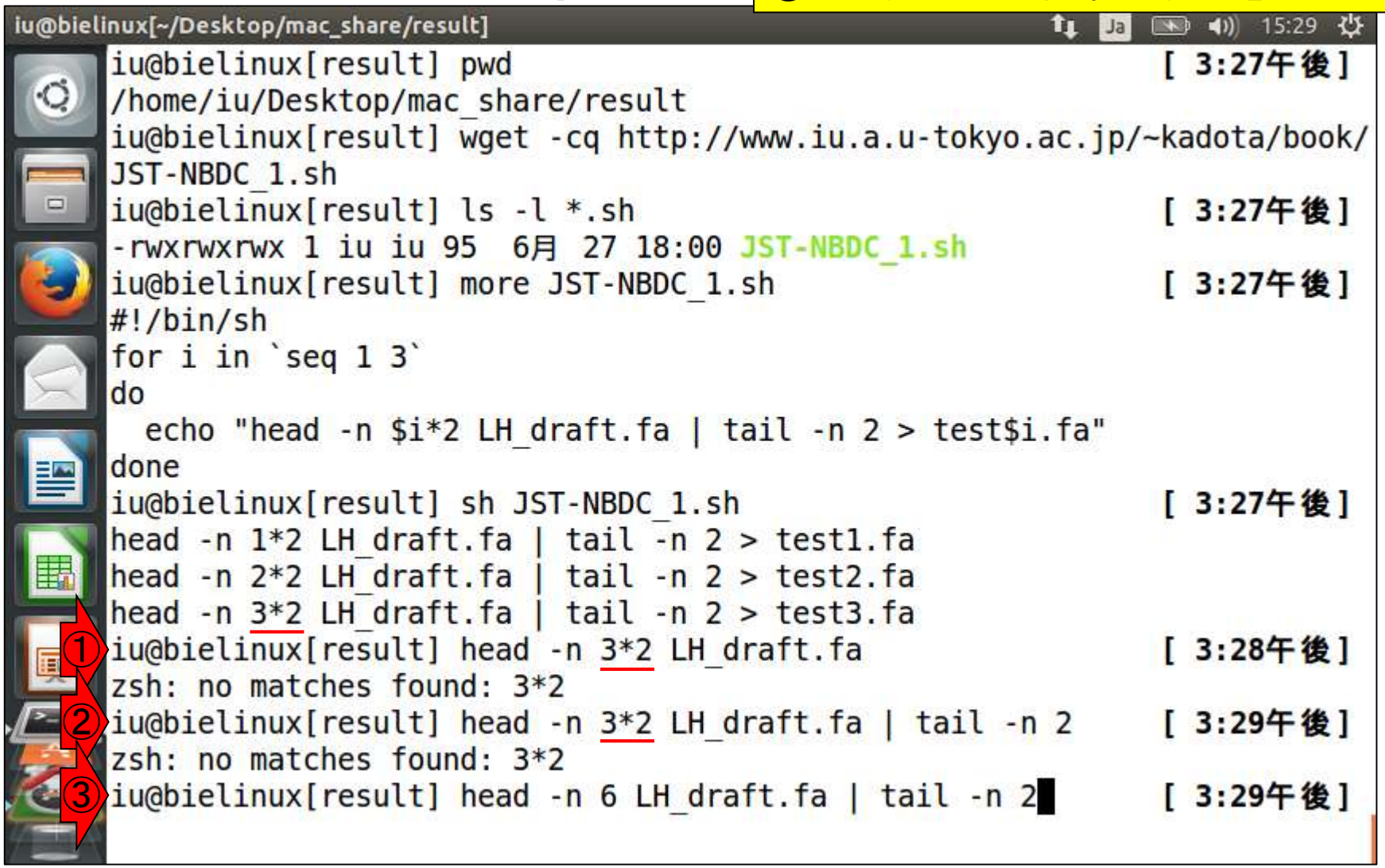
W3-7：head部分

実際に全体を実行してエラーに遭遇してもよいが一応説明。headコマンド部分の①は最初のy行という数値を指定するところだが、1*2とか3*2という掛け算の*が含まれている。このような指定法はダメ（だということをエラーに遭遇して学習する）



W3-7：head部分

①や②を実際に実行してみても、赤下線部分が原因でエラーが出ます。エラーが出ないようにするには、③のように3*2の結果である6を与える必要があります

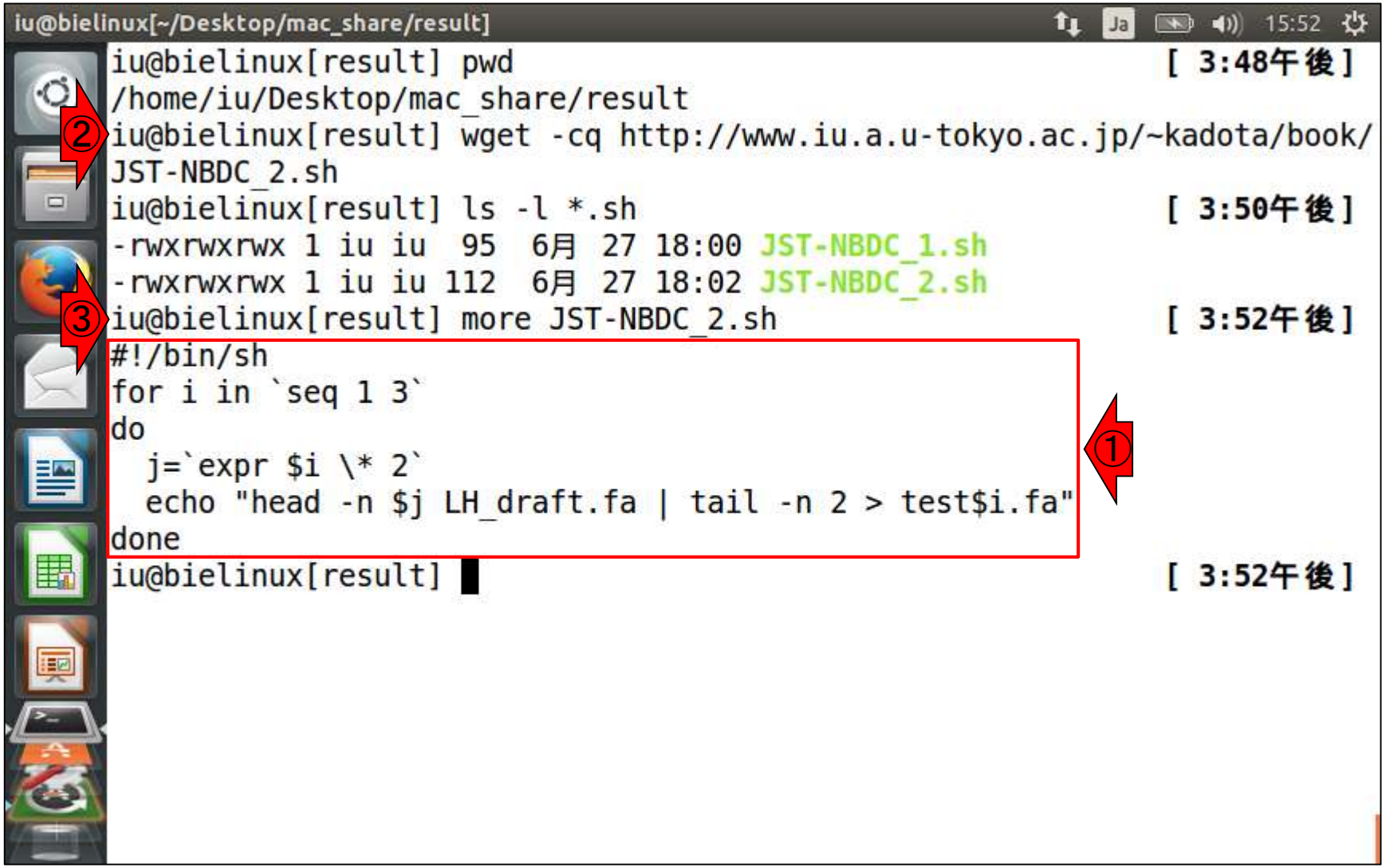


リターンキーを押した後の状態

W3-7：head部分

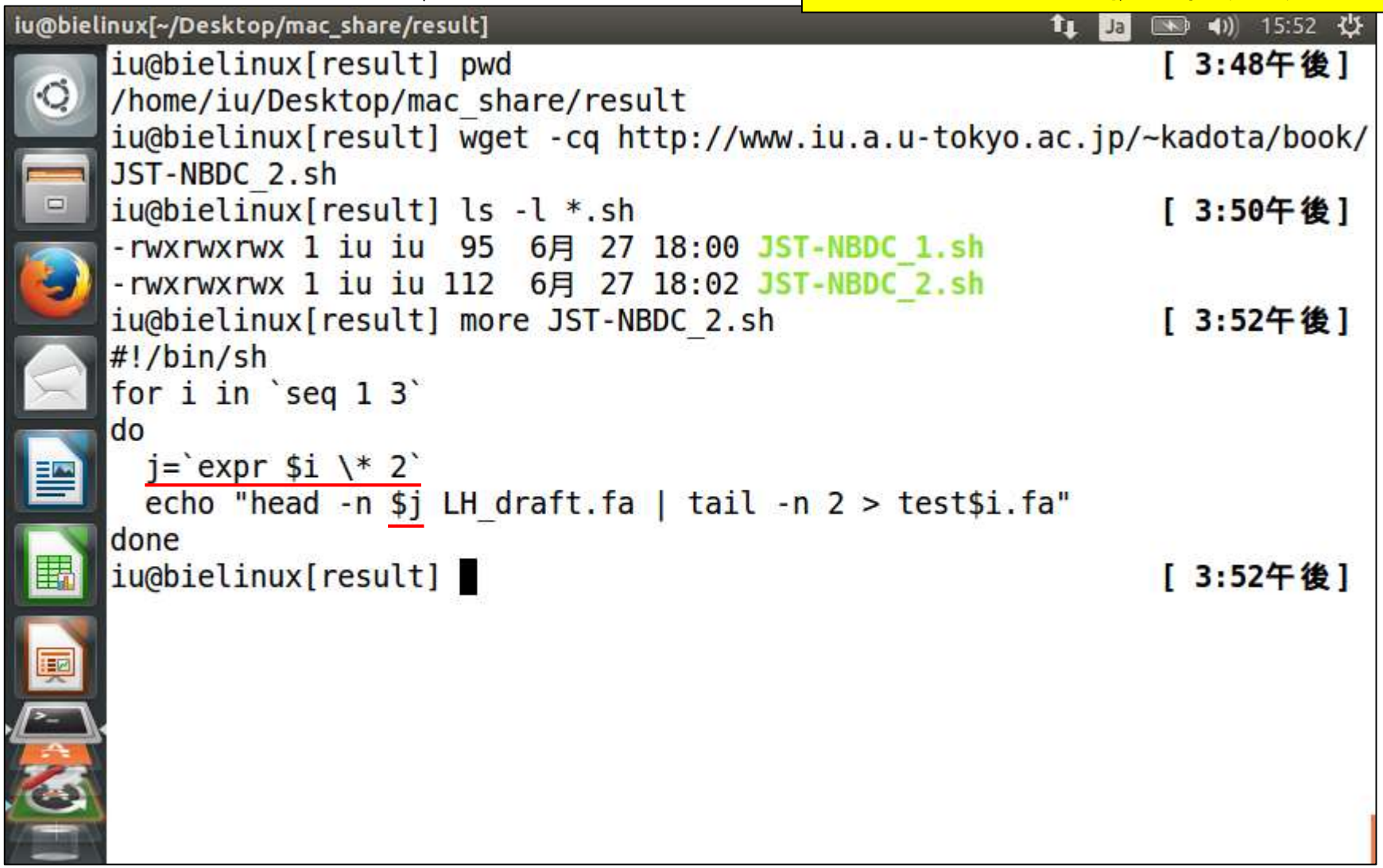
W3-8：発展形

①シェルスクリプトの発展形ファイルJST-NBDC_2.shを、②wgetし、③moreで確認



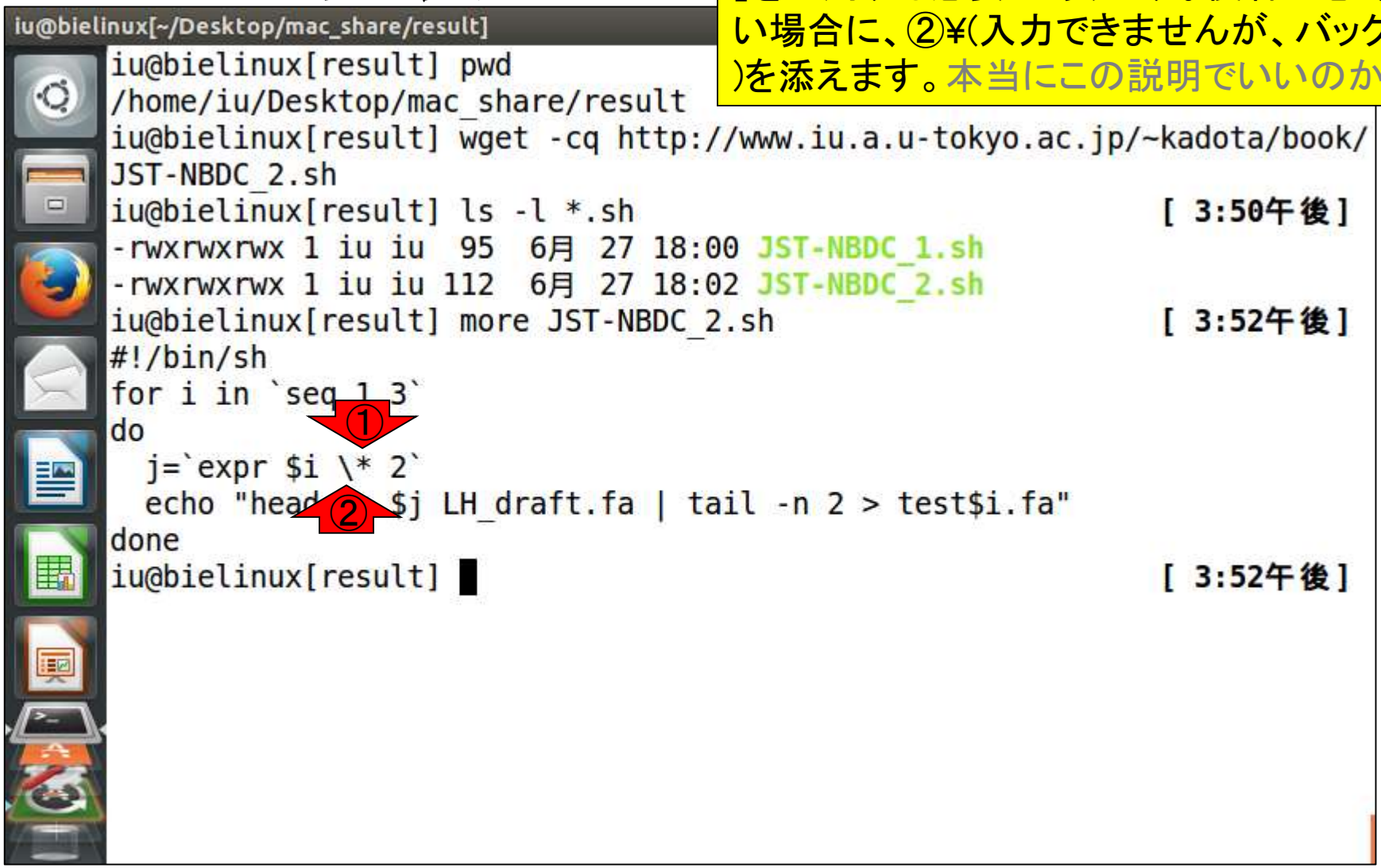
W3-8：発展形

JST-NBDC_1.shとの違いは、赤下線部分のみ。jという別の変数を用いて$i*2を表現したいだけだが、シェルスクリプトの掟に従うと、このようになります



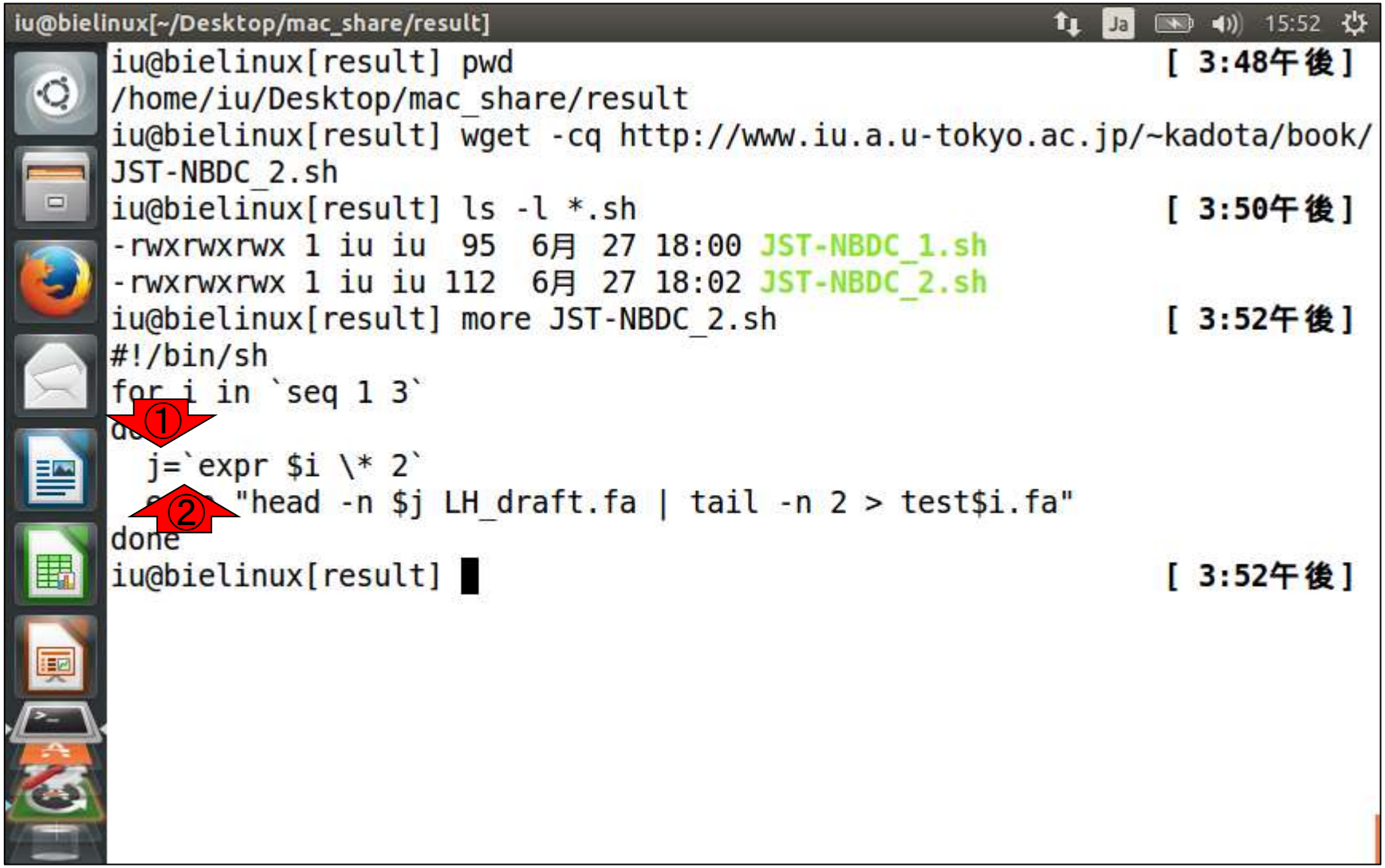
W3-8：発展形

①は$i*2の*に相当する部分ですが、「なんでもよい、という意味でのワイルドカードの*」と「掛け算の意味での*」を区別する必要があります。後者の意味として用いたい場合に、②¥(入力できませんが、バックスラッシュです)を添えます。本当にこの説明でいいのかは怪しいです



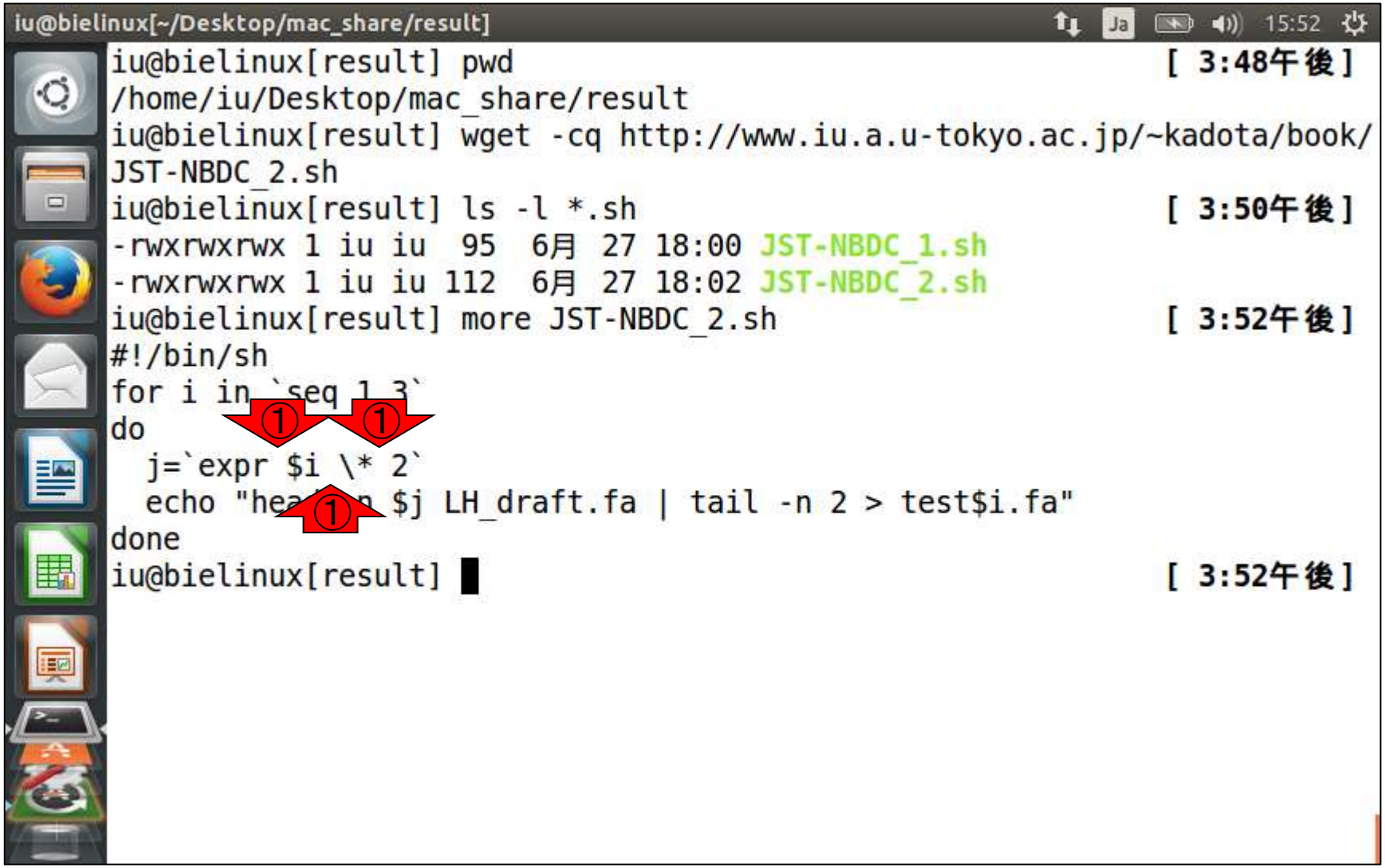
W3-8：発展形

掟の続き。①や②のところにスペースを入れてはいけません



W3-8：発展形

掟の続き。①のところにはスペースを入れないといけません



W3-8：発展形

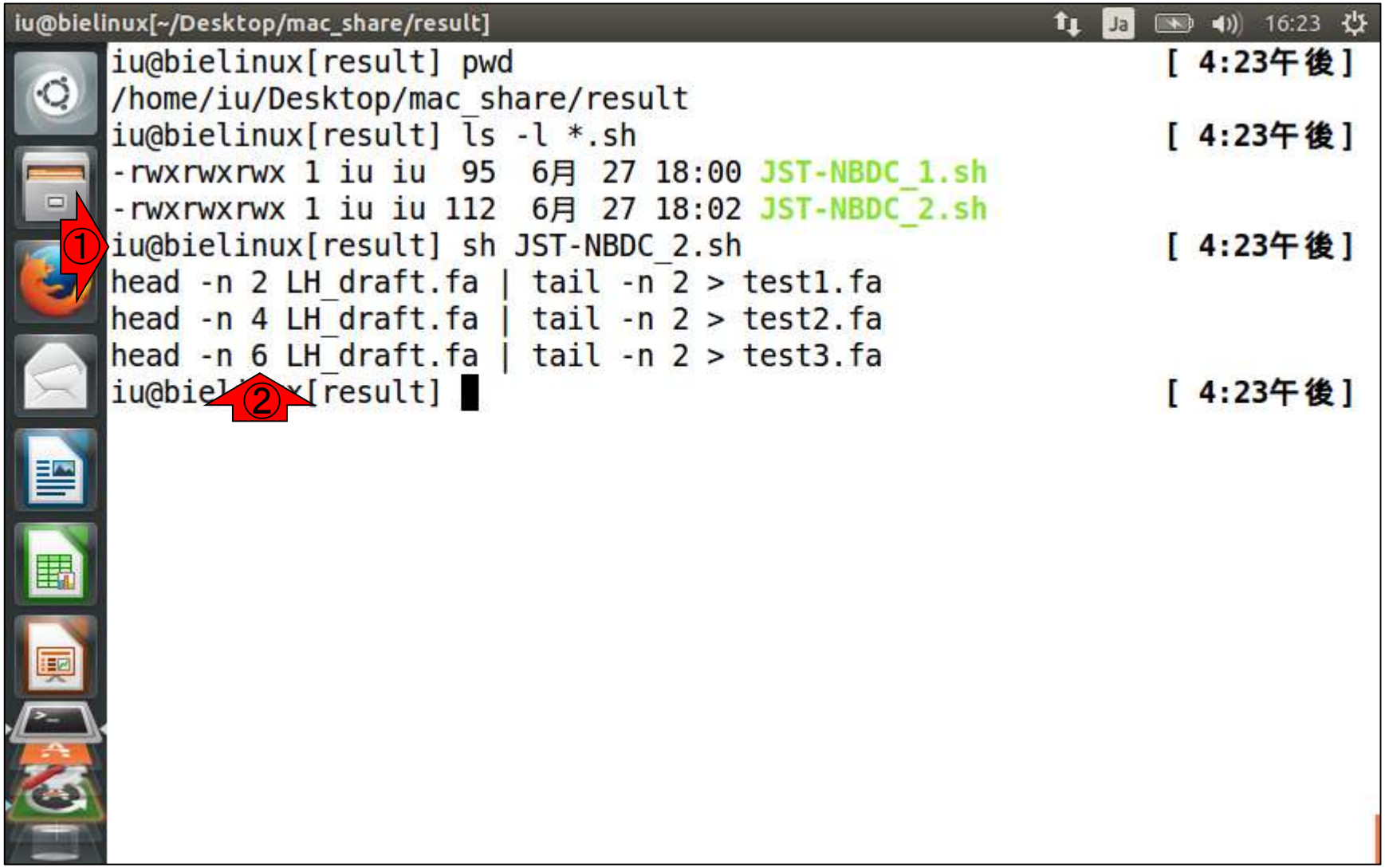
①の記号は、②Shiftキーを押しながら、③@のキーを押すと出ます

```
iu@bielinux[~/Desktop/mac_share/result]                    Ja  15:52
iu@bielinux[result] pwd                                    [ 3:48午後]
/home/iu/Desktop/mac_share/result
iu@bielinux[result] wget -cq http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/book/
JST-NBDC_2.sh
iu@bielinux[result] ls -l *.sh                             [ 3:50午後]
-rwxrwxrwx 1 iu iu  95  6月 27 18:00 JST-NBDC_1.sh
-rwxrwxrwx 1 iu iu 112  6月 27 18:02
iu@bielinux[result] more JST-NBDC_2.s
#!/bin/sh
for i in `seq 1 3`
do
  j=`expr $i \* 2`
  echo "head -n $j LH_draft.fa | tail
done
iu@bielinux[result]
```

①　①

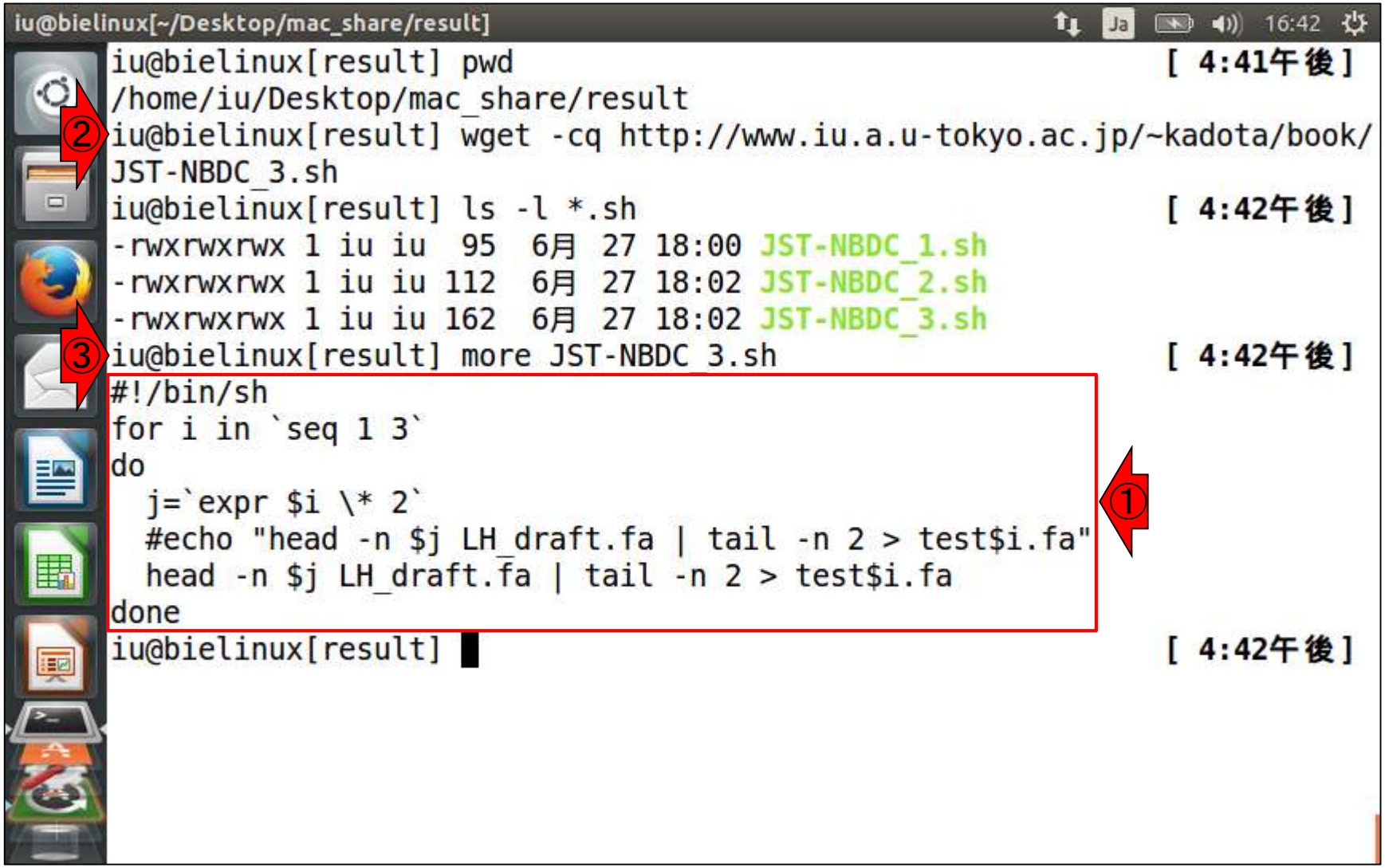
W3-9：echoで確認

①shコマンドでJST-NBDC_2.shを実行。②意図通りになっていることがわかる



W3-10：発展形2

①シェルスクリプトの発展形2のファイル
JST-NBDC_3.shを、②wgetし、③moreで確認

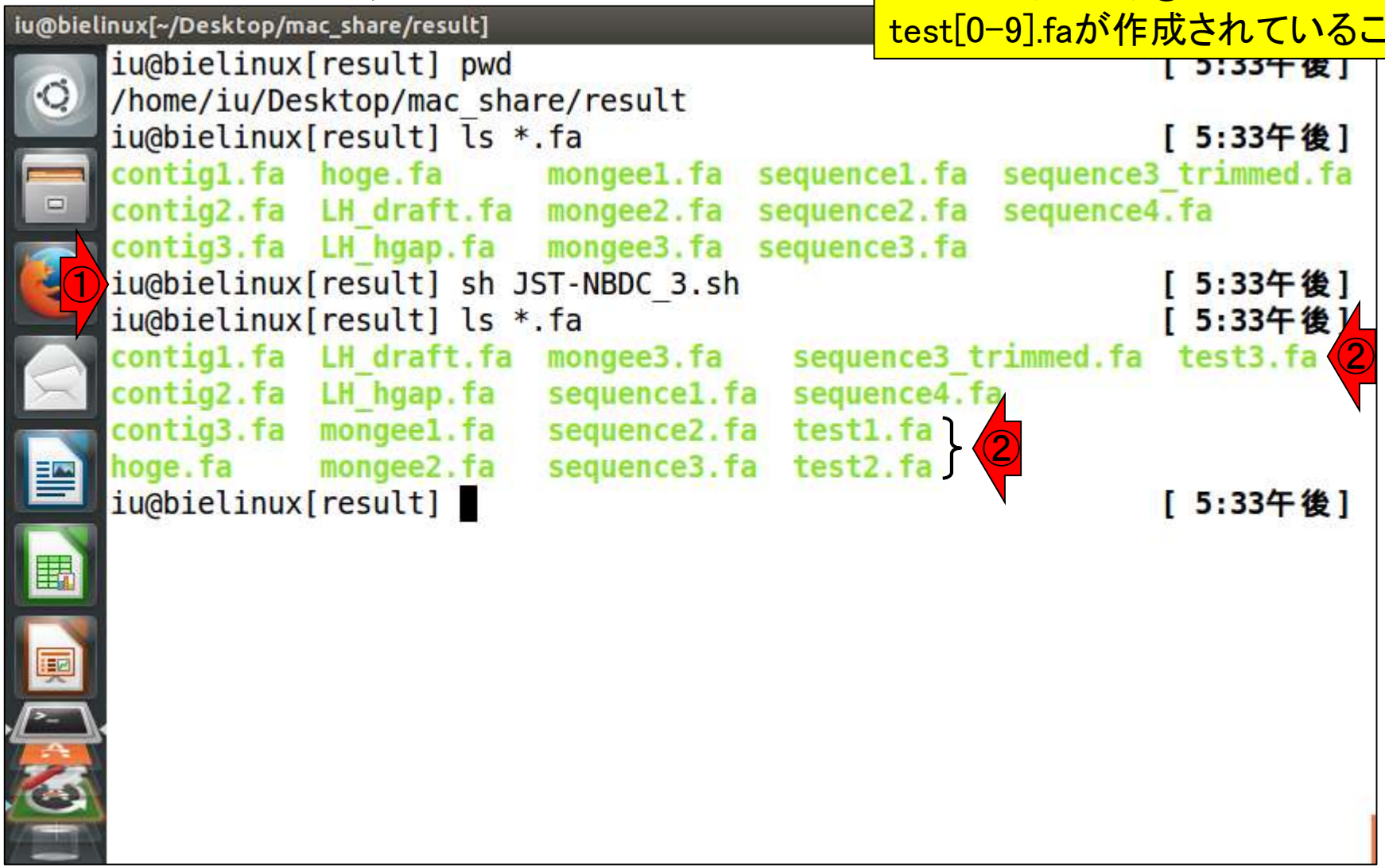


W3-10：発展形2

JST-NBDC_2.shとの違いは、①と②の行の部分。①のecho行頭に#を入れてコメントアウト（実行されないように）している。削除するのと同じだが、エラーなど問題が起こったときの対処用などの目的で#をつけたまま残しておくことはよくやる。②は①の赤下線部分と同じもの。ここが実際に実行される部分

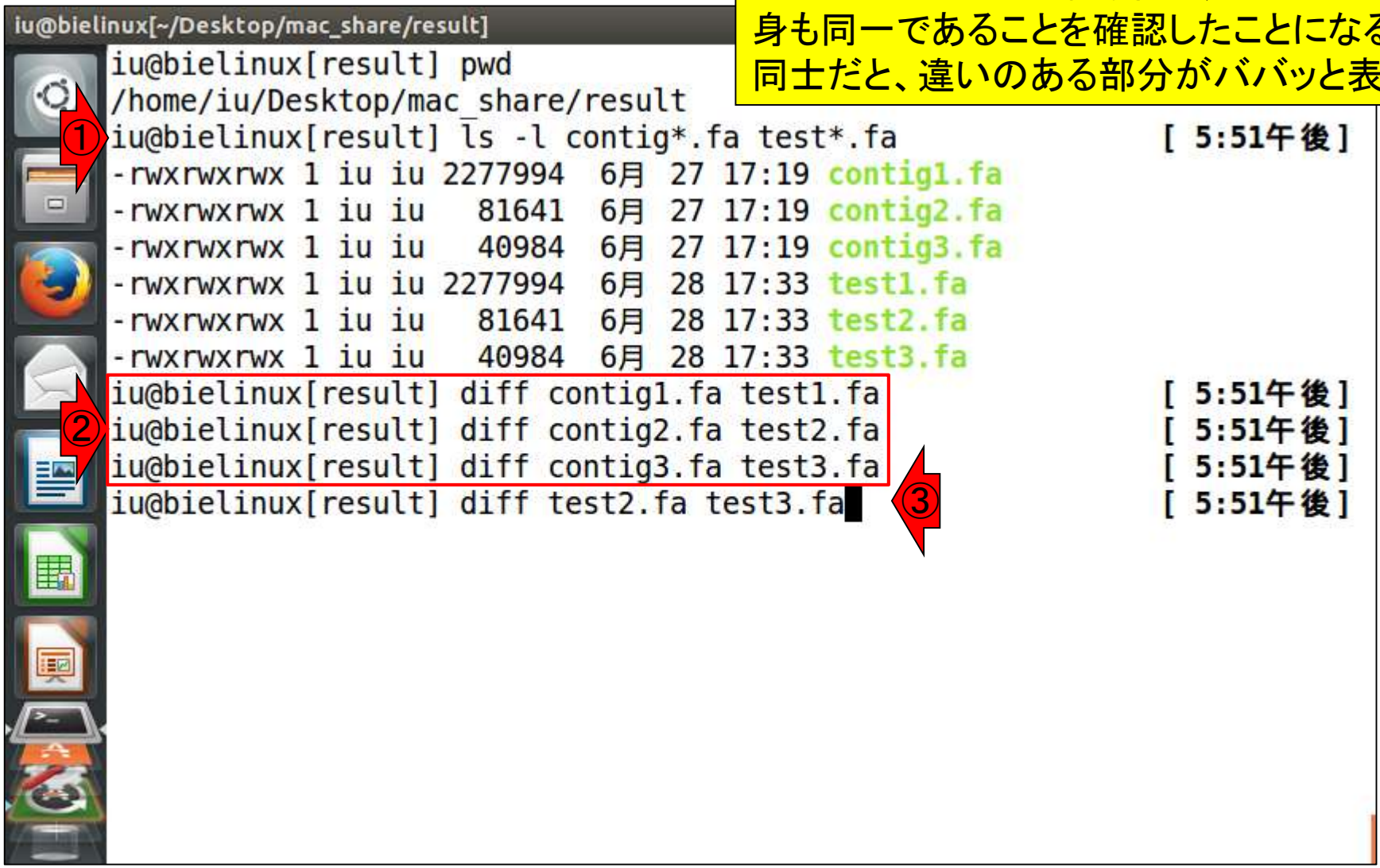
W3-11：実行

①shコマンドでJST-NBDC_3.shを実行。echoをコメントアウトしているので、意図通り何も表示されない。また、②イメージ通りの出力ファイルtest[0-9].faが作成されていることがわかる



W3-12：確認

①「ls -l」で詳細情報を表示。ファイルサイズの観点からは、contig[0-9].faとtest[0-9].faは全く同じ。②念のためdiffコマンドでも確認。何も表示されていないので中身も同一であることを確認したことになる。③違うもの同士だと、違いのある部分がババッと表示されます



W3-12：確認

リターンキーを押して、ババッと表示された後の状態です。diffコマンドの挙動については、自分で納得できるようなファイルを用意して確認するのが一番ですので、ぜひやってみてください

W3-13：発展形3

「expr シェル 遅い」などでググればわかりますが、JST-NBDC_3.sh内で使われているexprは遅いらしいです。赤下線のように書くといいらしい。①高速版のJST-NBDC_4.shを②wgetし、③more。後は省略