



Geneious Prime でシークエンス解析



第12回 アンプリコンメタゲノミクス(その4)

メタゲノミクスは、環境サンプルから直接回収された遺伝物質の研究です。前回(<u>第 11 回 アンプリコ</u> <u>ンメタゲノミクス(その 3)</u>)から引き続き、発酵プロセスに関連する細菌群をプロファイルするため、自 然発酵したザワークラウトから PCR 増幅された 16S rRNA 遺伝子配列を解析する手法をご紹介し ます。

今回は batch-BLAST 結果から分類データベースを作成する手法についてです。

前回のステップで返ってきた BLAST 結果を、Sequence Classifier ツールのデータベースとして 使用できる形式にするための処理として、以下のステップを実行します。

- A. Duplicates の除去
- B. BLAST ヒットのダウンロード
- C. BLAST ヒット領域の抽出
- D. Sequence Classifier ツール用データベースの作成

今回の de novo アセンブリは厳密な設定のため、いくつかの OTU は同じ BLAST ヒット結果になっている可能性があります。そのため重複する配列をチェックし削除する必要があります。

BLAST ヒットを含むフォルダで返された BLAST ヒットをすべて選択し、Edit メニュー  $\rightarrow$  Find Duplicates で以下のように設定します。

Find(検索対象): Document with the same name(同じ名前のドキュメント) Search Scope(検索範囲): current folder(現在のフォルダ) What to Do(やること): Select most recently modified duplicates(最近更新された重 複を選択)

	Find Duplicates
Find:	Documents with the same name
Search Scope:	current folder
What to Do:	Select most recently modified duplicates ᅌ
*	Cancel OK

これで重複しているファイルがすべて選択されますので、Delete で重複ファイルを削除できます。

また、この段階で表示されている BLAST のヒットはまだサマリーのみなので、Document Table で全ての配列を選択し、Download Full Sequence/s ボタンをクリックして、完全な配列をダウン ロードします。 完了までに数分かかる場合があります。

	Name	Description A Modified	Sequelt
	NR_044358	Lactococcus plantarum strain DSM 20686 165 ribosomal RNA27 Sep 2018 1:11 pm	252
<	NR_114327	Lactococcus taiwanensis strain 0905C15 16S ribosomal RNA 27 Sep 2018 1:11 pm	252
	NR_133769	Leuconostoc gelidum subsp. aenigmaticum strain POUF4d 16 27 Sep 2018 1:11 pm	253
<	NR_074997	Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum strain TB 1-10 1 27 Sep 2018 1:11 pm	253
<	NR_075014	Leuconostoc kimchii strain IMSNU 11154 16S ribosomal RNA, 27 Sep 2018 1:11 pm	256
<	NR_113255	Leuconostoc lactis strain JCM 6123 16S ribosomal RNA gene,27 Sep 2018 1:11 pm	253
	NR_157602	Leuconostoc mesenteroides subsp. jonggajibkimchii strain DR27 Sep 2018 1:11 pm	253
	NR_117881	Loriellopsis cavernicola strain LF-B5 16S ribosomal RNA gene 27 Sep 2018 1:11 pm	260
$\checkmark$	NR_108243	Methylobacterium gossipiicola strain Gh-105 16S ribosomal 27 Sep 2018 1:11 pm	253
<	NR_075062	Micrococcus luteus strain NCTC 2665 165 ribosomal RNA, pa 27 Sep 2018 1:11 pm	227
✓	NR_144616	Muribaculum intestinale strain YL27 16S ribosomal RNA, parti27 Sep 2018 1:11 pm	252
<	NR_074119	Phenylobacterium zucineum strain HLK1 165 ribosomal RNA, 27 Sep 2018 1:11 pm	163
	NR_156986	Pseudomonas lactis strain DSM 29167 165 ribosomal RNA, p 27 Sep 2018 1:11 pm	253
	NR_117825	Pseudomonas viridiflava 165 ribosomal RNA gene, partial seq27 Sep 2018 1:11 pm	253
✓	NR_147771	Serratia aquatilis strain 2015-2462-01 16S ribosomal RNA, 27 Sep 2018 1:11 pm	253
<	NR_148818	Stenotrophomonas tumulicola strain T5916-2-1b 165 riboso 27 Sep 2018 1:11 pm	247
<	NR_133881	Thermogemmatispora carboxidivorans strain PMS 16S riboso 27 Sep 2018 1:11 pm	117
<	NR_136437	Weissella bombi strain R-53094 165 ribosomal RNA, partial 27 Sep 2018 1:11 pm	253
	NR_029041	Weissella koreensis strain S-5623 16S ribosomal RNA gene, 27 Sep 2018 1:11 pm	253
	NR_114312	Weissella oryzae strain SG25 16S ribosomal RNA, partial seq 27 Sep 2018 1:11 pm	253
0			
			8 Hide
		Selected sequences are only summaries Download Full Sequence(s)	
		Sequence View Virtual Gel Text View Download Info	

次に、データベースを小さく保ち、分類作業を高速化するために、ダウンロードした BLAST ヒット配列の中からアンプリコンに関連する領域のみを抽出します。Document Table で全ての配列を選択して、Annotations タブをクリックし、Type で BLAST Hit を選択します。一度テーブル内をクリックし、control/command+A で全てを選択してから、Extract ボタンをクリックすると、全てのBLAST ヒット領域を配列リストファイルに抽出することができます。

Image: Constraint of the second sec									
			Sequ	Jence View	Annotations	Annotations Virtu	al Gel 🛛 Text View	Info	
$\langle$	Type: BLAST	Hit Bui Track 11	Columns 🛃 Expor	t table 🚳 Edit	Annotations	Extract 💱 Translate 📗	Save	Q	
S	equence Name	Name	Minimum v	Maximum	Length				
N	R_113289	BLAST Hit	550	802	253				
N	R_158030	BLAST Hit	541	793	257				
N	R_074997	BLAST Hit	541	793	253				
N	R_075014	BLAST Hit	5.4.1	793	253				
N	R_157602	BLAST Hit	Click, then	- 793	253				
N	R_136437	BLAST Hit	select all	792	253				
N	R_029041	BLAST Hit	539	791	253				
N	R_125575	BLAST Hit	538	790	253				
N	R_041509	BLAST Hit	537	789	253				
N	R_104976	BLAST Hit	537	789	253				
N	R_113821	BLAST Hit	537	789	253				
N	R_114327	BLAST Hit	536	787	252				
N	R_075062	BLAST Hit	535	761	227				
		AND A CORE AND	6.9.4	700	252				

作成されるリストファイルは、デフォルトでは「Extraction of 47 annotations」のような名前に なります。 次に、Sources パネル上で適当な場所を右クリックしてメニューから New Folder を選択し、 SRR7140083\_16S\_database のような名前をつけてフォルダを作成します。この作成したフォ ルダの中に、抽出したリストファイルをドラッグ&ドロップで移動します。

4	•		<b>P</b>	7	1	FE	4	C	$\sim$	3	<b>9</b>	?
Bac	k	Forward	BLAST	Workflows	Align/Assemble	Tree	Primers	Cloning	Detect Recomb.	Back Up	Support	Help F
			Sou	irces		Dra	ag an	d dro	p			
v 📁	Loc	al (0):			_	-	11	Name	A.		Desc	ription
		Metagen	omics (5)	)			- 4	Extract	tion of 47 annota	tions		
		SRR7	140083	165 databa	se (0)		• 🎾	NR_02	9041		Weis	sella k
	SRR7140083_50000 (trimmed) (merged)				· 9	NR_04	1509		Lact	obacill		
	-	🣁 B:	atch sear	ch of 144 -	16SMicrobial Me		· 0	NR_04	2194		Lact	obacill
v		Sample I	Documen	ts (0)			• 0	NR_04	2456		Lact	obacill
		De Align	ments (8	)			• 0	NR 04	4289		[Clo	stridiu
		Cloni	ng (12)				. 0	NR 04	4358		Lact	ococcu
		Conti	g Assem	bly (7)			0	NR 07	4119		Pher	vlobact
	•	E Geno	mes (23 Janner F	5) eatures (31,	4)		• 9	NR_07	4997		Leuc	onosta

今回最後のステップでは、抽出した BLAST ヒットの名前をアクセッション番号から生物名にします。 データベースフォルダ内のリストを選択し、Edit → Batch Rename メニューで、以下の設定を使 用します。 Replace with 設定の最初のドロップダウンリストを選択すると、Organism が 2 つ表 示されています。1 つ目はリストファイルに関連するメタデータを指し、2 つ目はリスト内の個々の配 列に関連するメタデータを指していますので、2 つ目の Organism を選択します。適切な設定を選択 したら、OK をクリックします。 プレビューウィンドウが表示され、リネーム操作によって各配列名がア クセッション番号から生物名に変更されることを確認することができます。

		Batch Re	name					
Rename Method								
	Aspect to R	ename: Sequences in Sec	juence List 🔤					
	Property	to rename: Name of Sequ	ience					
		Choose the secon	id "organism" o	ption fro	om the c	Irop	down	list
Replace with	Organism	🜔 None 📴 Non	e 📴 No	ine ᅌ	None		0	
Add						to	end	0
O Remove	1 C charae	cter(s) from end 0						
🕸 😸 More Optio	105				Cance	a	OK	

次回は Sequence Classifier ツールを用いて全アンプリコンデータセットを分類する手法をご紹 介する予定です。

Geneious 製品概要については<u>こちら</u>

『Geneious Prime でシークエンス解析』の過去の記事は<u>こちらでチェック!</u>