CLC bioプラグインを用いた微生物ゲノム配列決定とアノテーション解析

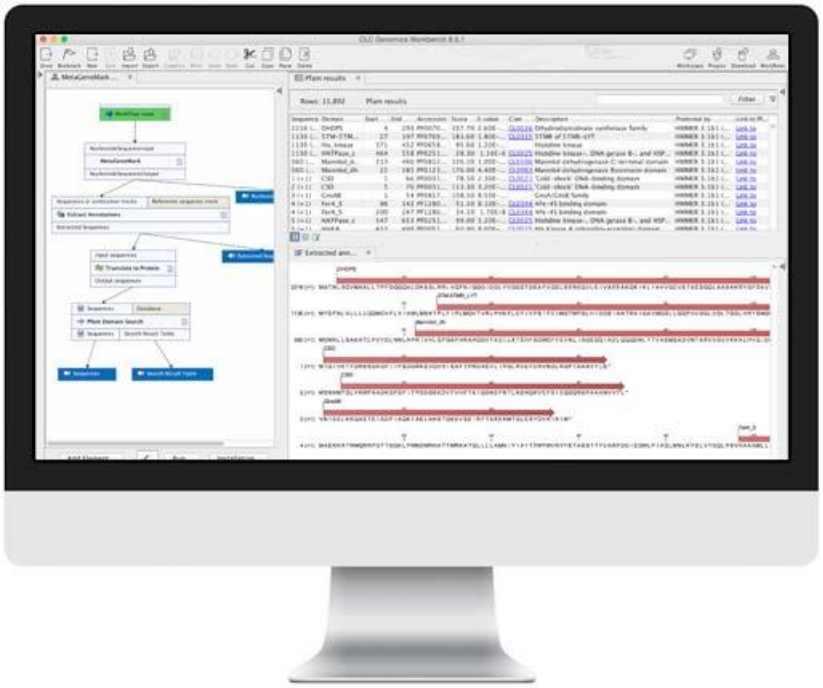
フィルジェン株式会社　バイオサイエンス部
(biosupport@filgen.jp)

はじめに

- 新規ゲノムの配列解析を行う場合、ゲノム全体の塩基配列決定に加えて、各遺伝子の配列やアノテーションなどの機能解析も行う必要がある。

- CLC Genomics Workbenchには、おもに微生物ゲノム解析用に開発された3種類の有償プラグインがあり、これらを活用することによって、配列決定やアノテーション解析を容易に行うことが可能になる。

- アノテーション解析まで行っておけば、今後そのデータをリファレンスゲノムとして利用して、SNPなどの変異解析や、RNA-Seq解析に応用できる。



3種類のプラグイン

CLC Genome Finishing Module

主にスモールサイズゲノムにおける、高品質な完全長ゲノム配列を得ることを目的としたGenome Finishingを行うためのプラグイン。PacBioロングリードを用いた、De Novo Assemblyが可能。

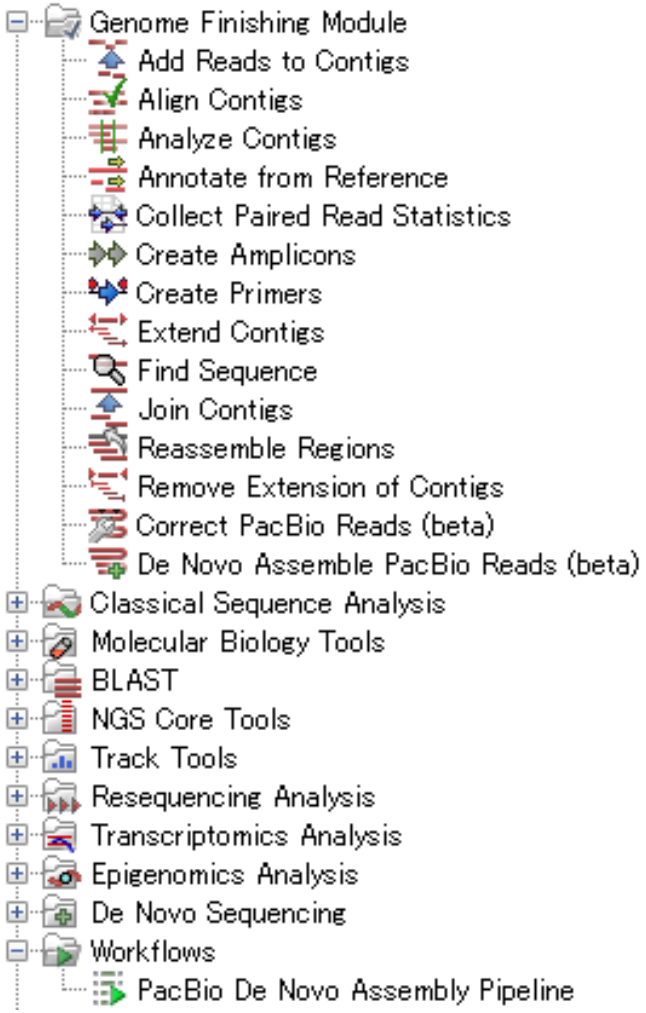
CLC Microbial Genomics Module

微生物ゲノム解析用の専用プラグイン。16S rRNA菌叢解析や病原菌タイピング・系統樹解析、全メタゲノム解析といった、多数の専用アプリケーションが使用可能になる。

MetaGeneMark

微生物のメタゲノム配列データに対して、遺伝子とタンパク質コード領域の検出を行うプラグイン。

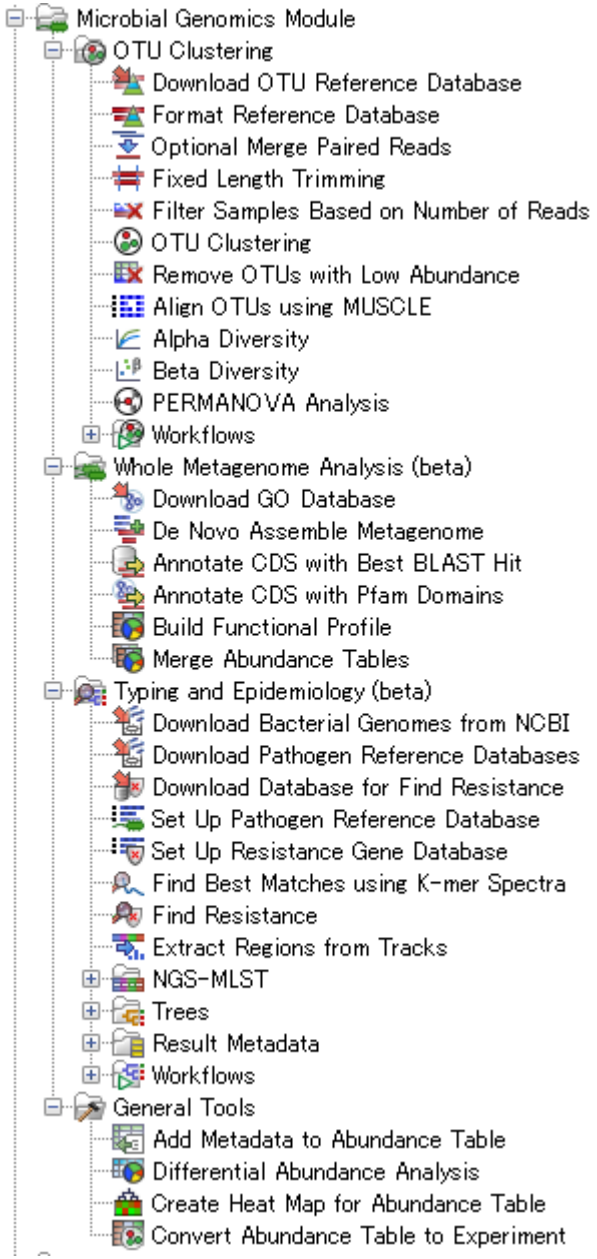
CLC Genome Finishing Module



使用可能になるアプリケーション

- コンティグ配列における、リファレンス配列またはコンティグ配列自身へのアライメント
- コンティグ配列同士の結合
- コンティグ配列におけるミスアセンブル、低カバレッジ領域、ペアリード配列のマッピング状況などの確認
- PCRプライマーの自動設計
- PacBioロングリード配列データのインポート
- PacBioロングリード配列データのエラー補正およびアセンブル（ベータ版）
- PacBio De Novoアセンブル用の解析パイプライン（ベータ版）

CLC Microbial Genomics Module



使用可能になるアプリケーション

OTU Clustering

- リード配列データの各種QCチェックおよびOTUクラスタリングの実行
- α多様性とβ多様性の計算
- Greengenes, SILVA, UNITEの各種データベースからのリファレンスデータの自動ダウンロード

Typing and Epidemiology（ベータ版）

- NGS-MLST（Multi Locus Sequence Typing）解析による病原菌のタイピングおよび薬剤耐性の確認
- K-mer Treeによる複数菌種のゲノム配列の類似度の比較
- SNP Treeによる分子系統樹の作成

Whole Metagenome Analysis（ベータ版）

（別途有償プラグイン「MetaGeneMark」が必要）

- メタゲノムシークエンスデータのDe Novoアセンブル
- BLAST検索、Pfamドメイン検索によるアノテーション付け

MetaGeneMark

使用可能になるアプリケーション

微生物ゲノムまたはトランスクリプトーム配列データに対して、遺伝子領域とタンパク質コード領域を予測し、アノテーションを付加する。

データ解析の流れ

手順1： Contig配列データの作成

- CLC Genome Finishing Moduleを用いた、PacBioロングリード配列データのDe Novo AssemblyによるContig配列データの作成

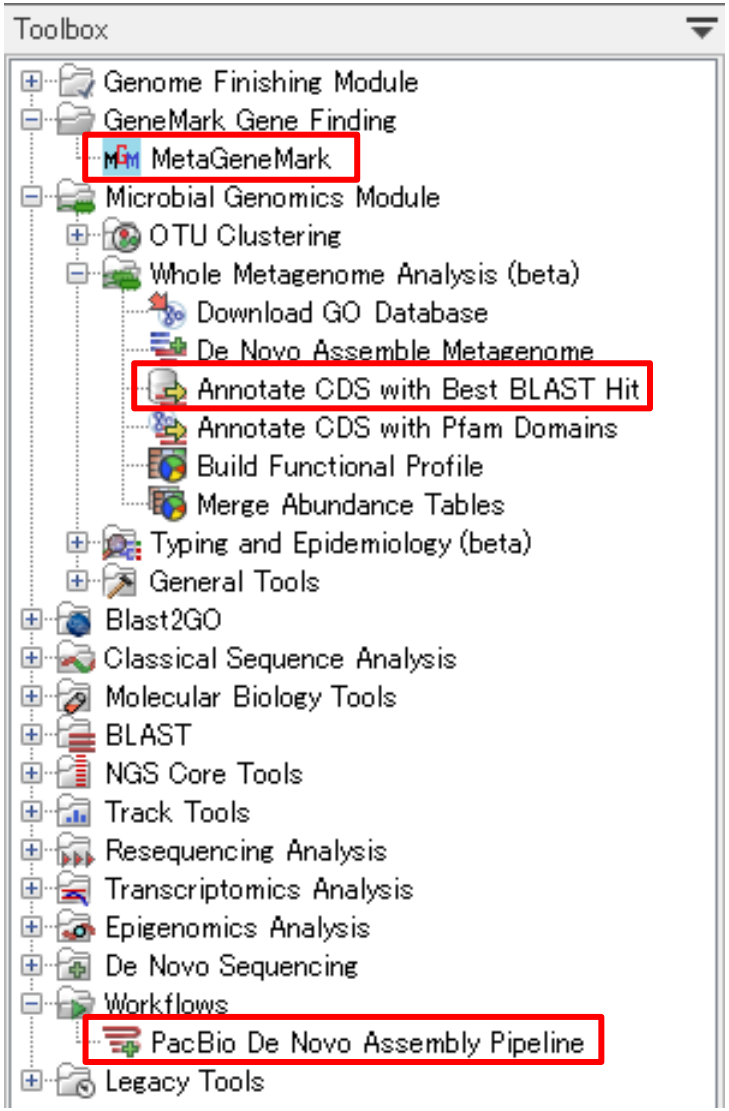
手順2： 遺伝子領域の予測

- MetaGeneMarkを用いた、Contig配列内の遺伝子・タンパク質コード領域の予測

手順3： 遺伝子機能アノテーションの付加

- CLC Microbial Genomics Moduleを用いた、Contig配列内の各遺伝子に対する機能アノテーション情報の付加

ツール使用の流れ



PacBio De Novo Assembly Pipeline

- PacBioロングリード配列データを使用した De Novo Assembly (CLC Genome Finishing Module)

MetaGeneMark

- Contig配列上の遺伝子領域の予測 (MetaGeneMark)

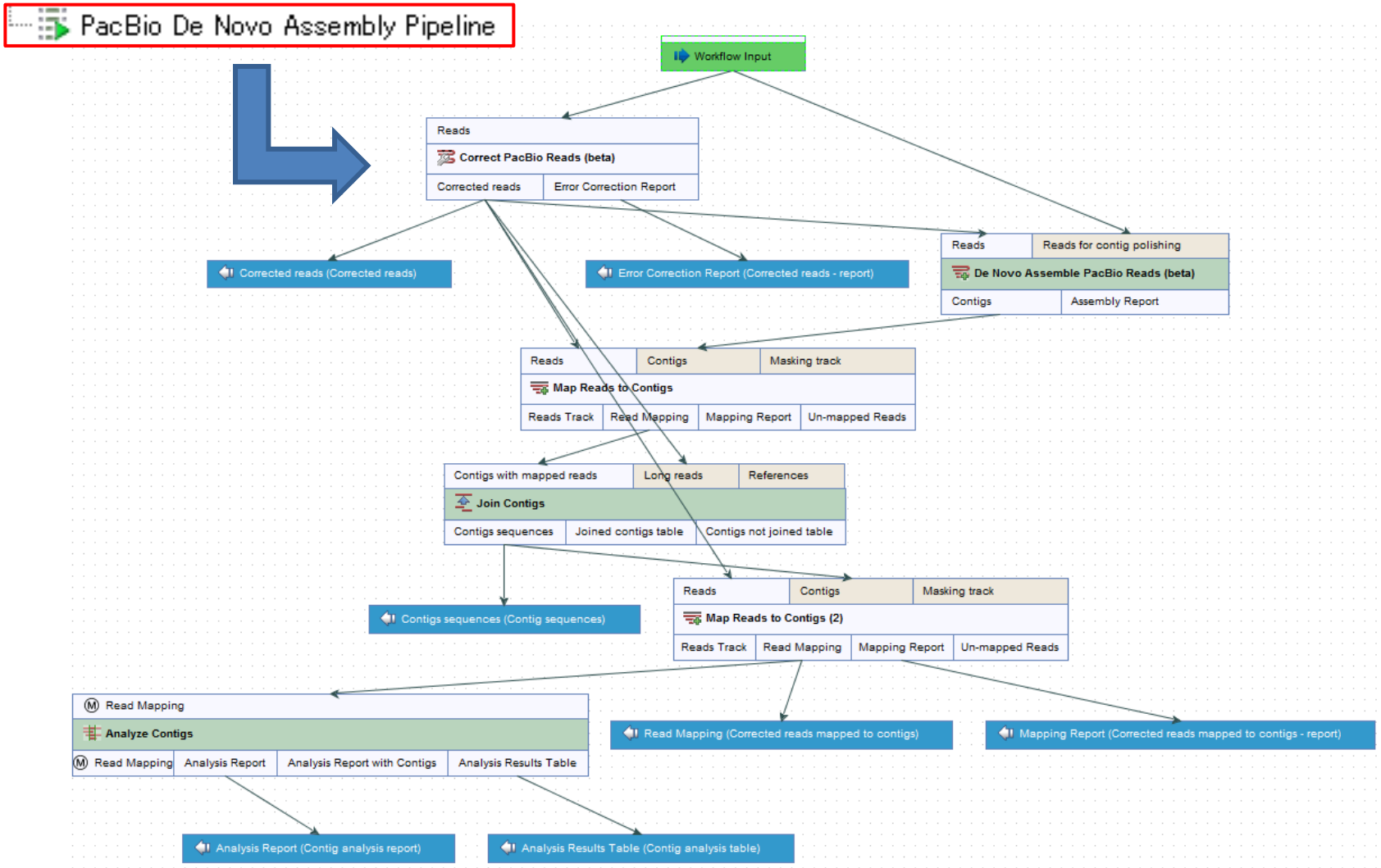
Annotate CDS with Best BLAST Hit

- CDS配列データへのアノテーション付け (CLC Microbial Genomics Module)

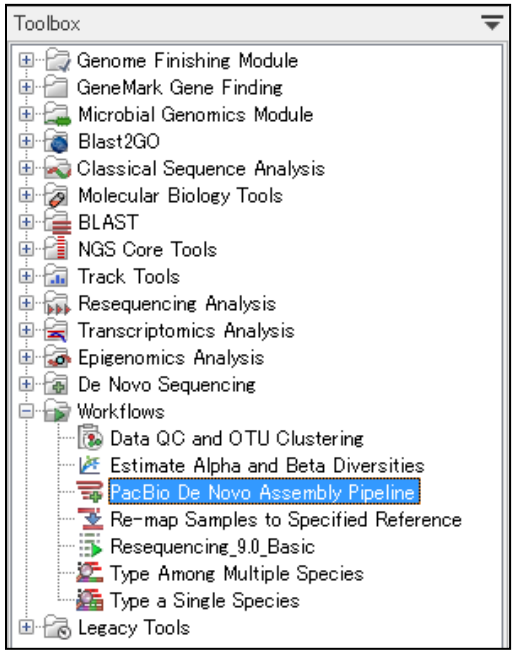
手順1：Contig配列データの作成

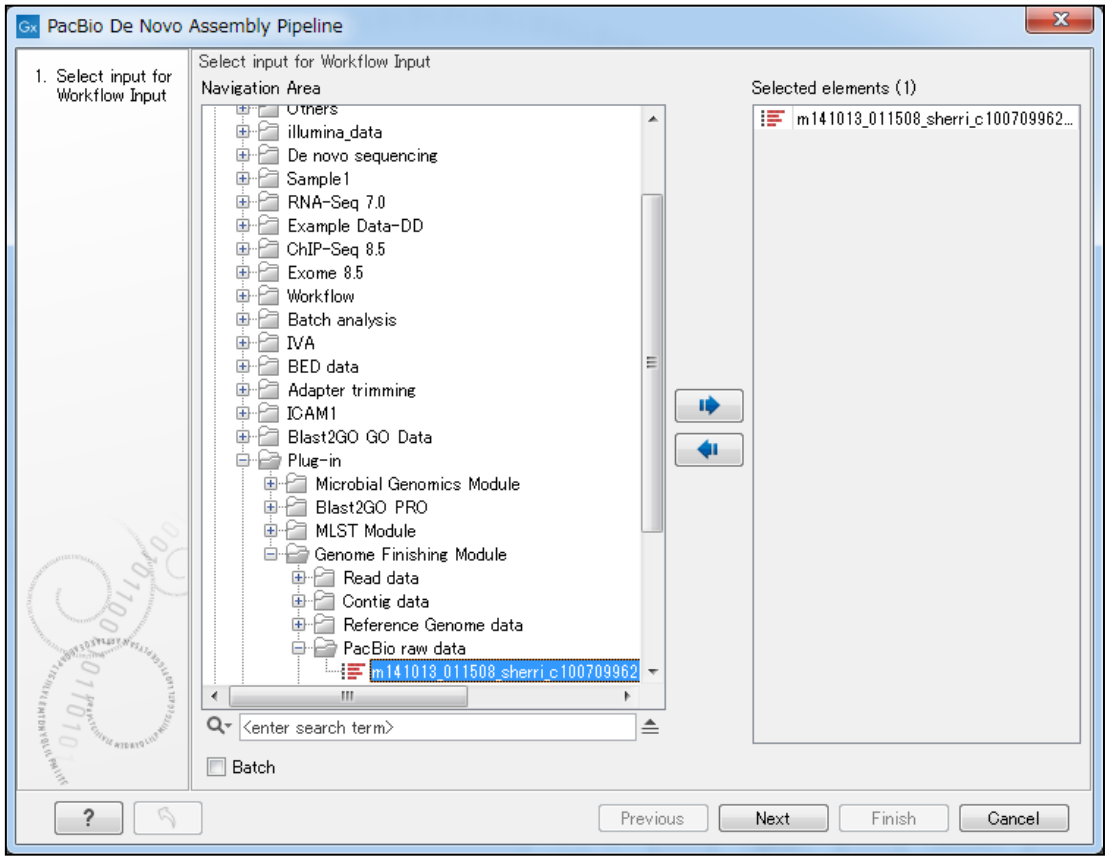
PacBio De Novo Assembly Pipeline

- 標準搭載の解析パイプラインを使用することで、PacBioロングリード配列データのエラー補正、アセンブル、レポート作成などをまとめて実行することができる。



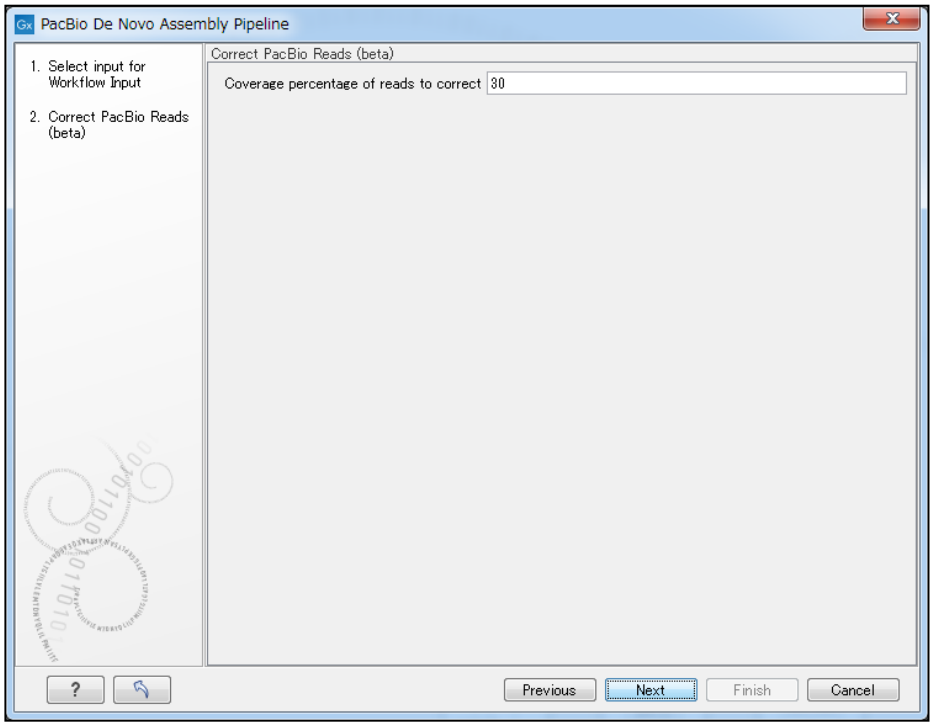
PacBio De Novo Assembly Pipeline

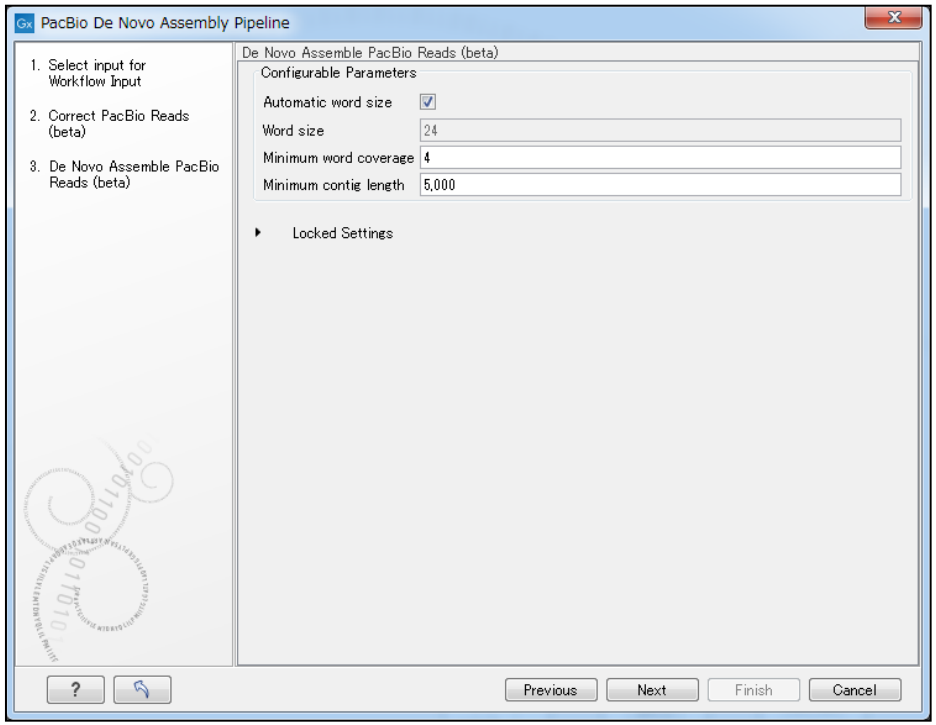




1. PacBio De Novo Assembly Pipelineを選択し、ダブルクリック。
2. PacBioロングリードデータを選択。

PacBio De Novo Assembly Pipeline

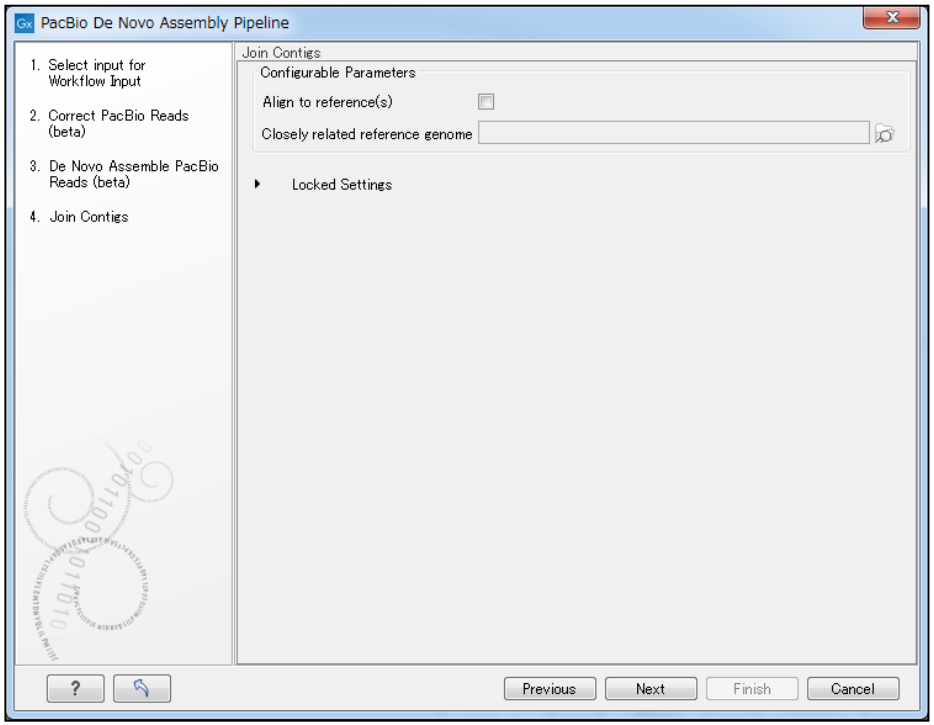


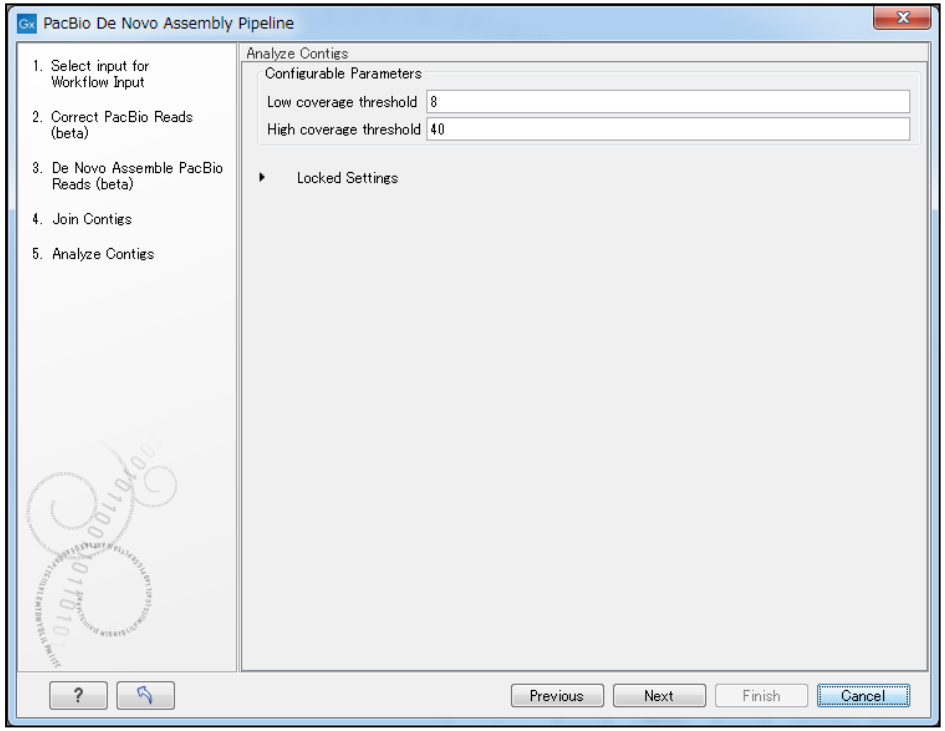


- Coverage percentage of reads to correct： 全リードのうち、配列長が大きい何%のリードを基準として、エラー補正を行うかを指定する。

- Automatic word size：自動で設定されたword sizeを使用するか、または任意の値を入力する。
- Word size：任意で設定する場合のword sizeを入力する。
- Minimum word coverage：リード配列中に、指定のwordが出現する最低の回数。
- Minimum contig length：コンティグの配列長の最小値。

PacBio De Novo Assembly Pipeline

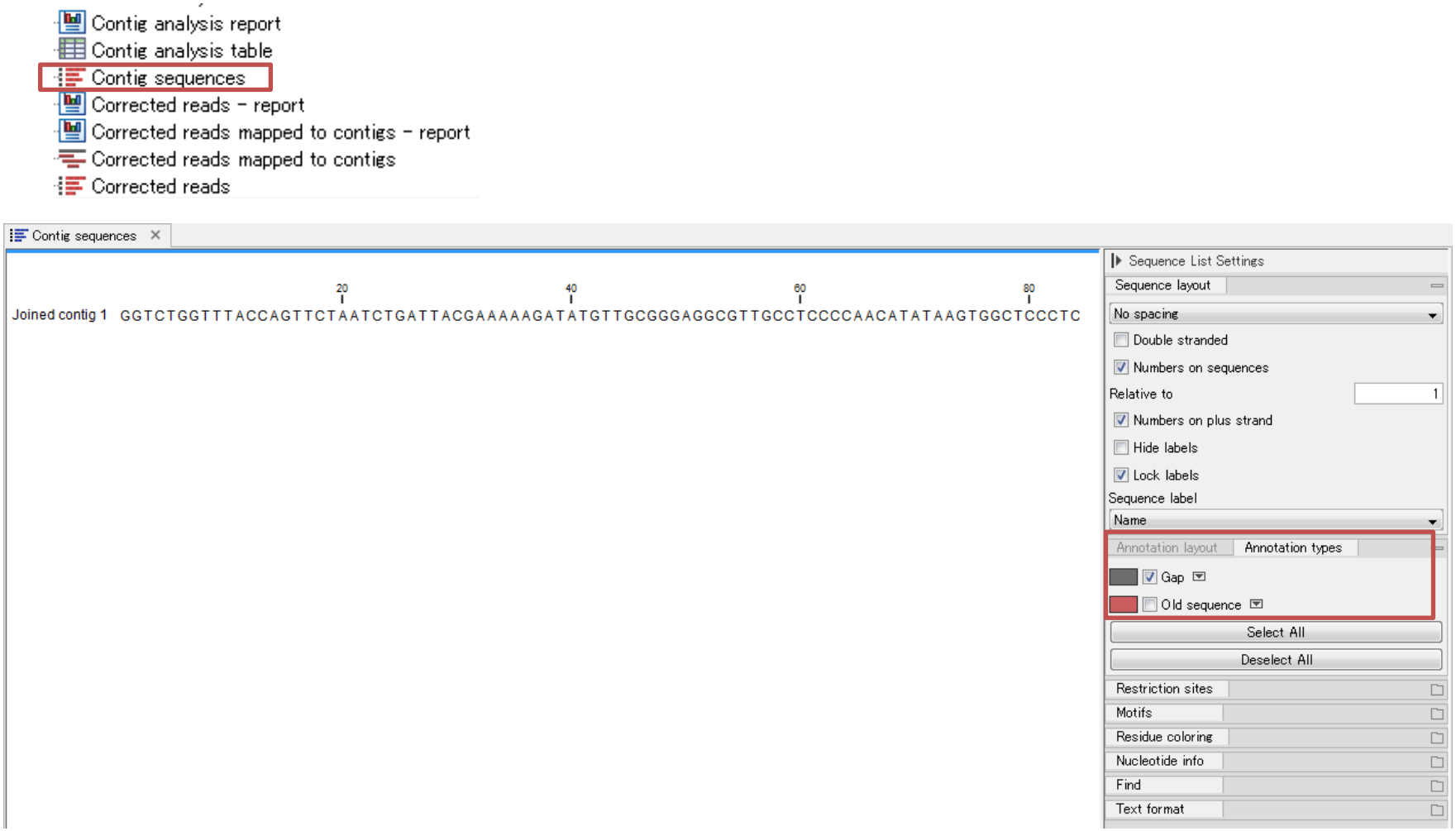




- Align to reference(s): 指定されたリファレンス配列データを使い、コンティグ同士を結合させる。
- Closely related reference genome：リファレンス配列データを指定する。

- Low coverage threshold：低カバレッジ領域の閾値。
- High coverage threshold：高カバレッジ領域の閾値。

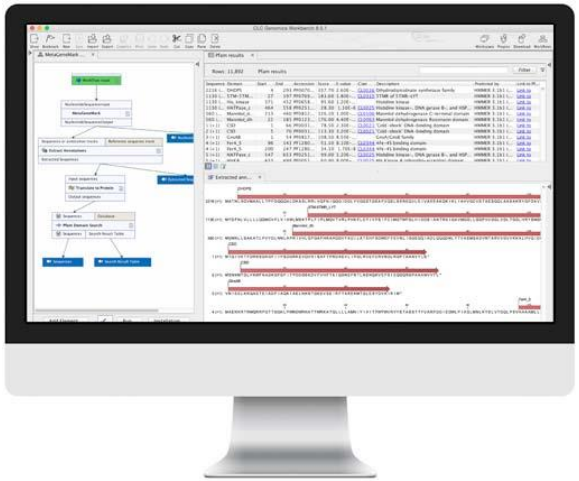
PacBio De Novo Assembly Pipeline



- 最終的に作成されたコンティグ配列と、アノテーションも同時に確認できる。

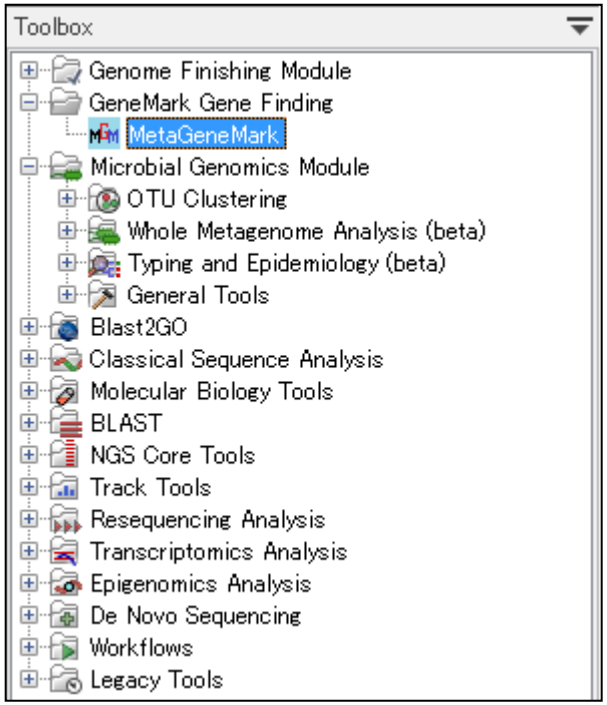
手順2：遺伝子領域の予測

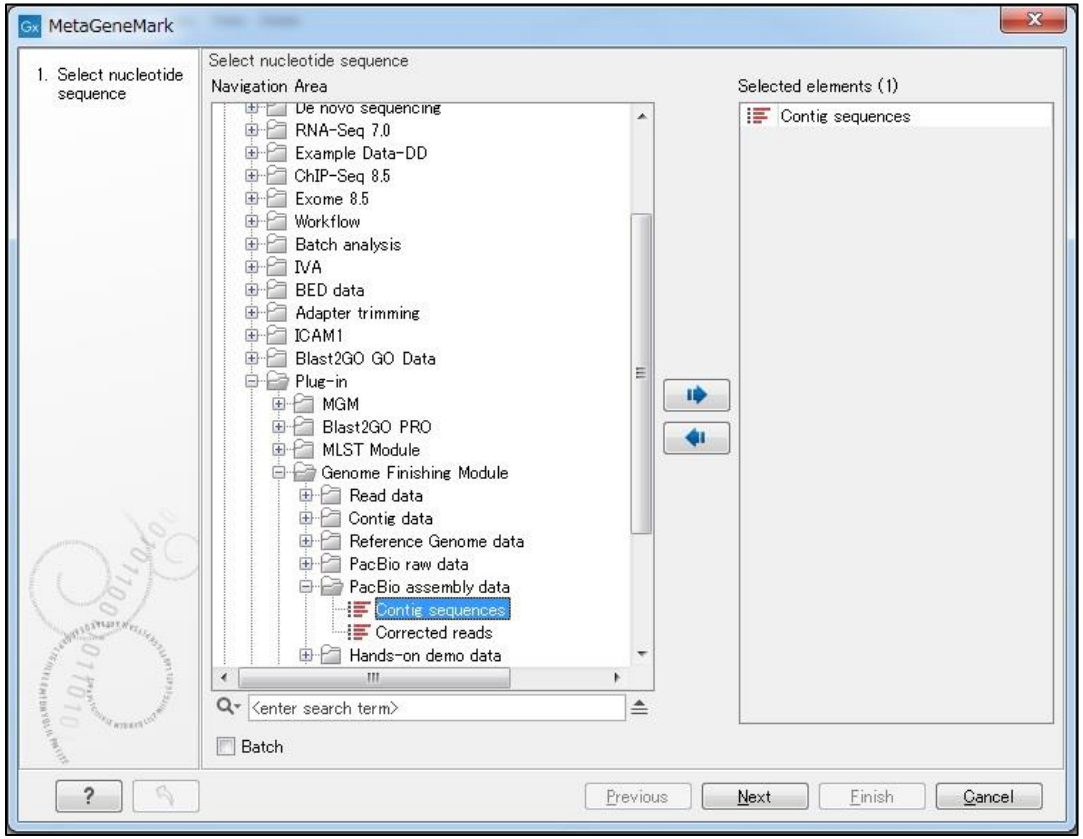
MetaGeneMark



- 微生物ゲノム配列データから、遺伝子CDS領域予測を行うのに必要な有償プラグイン。
- コンティグ配列データに、CDS領域のアノテーションを付加するために必要。
- 外部データリソースや細かいパラメータの設定なしに、高感度な予測が可能。

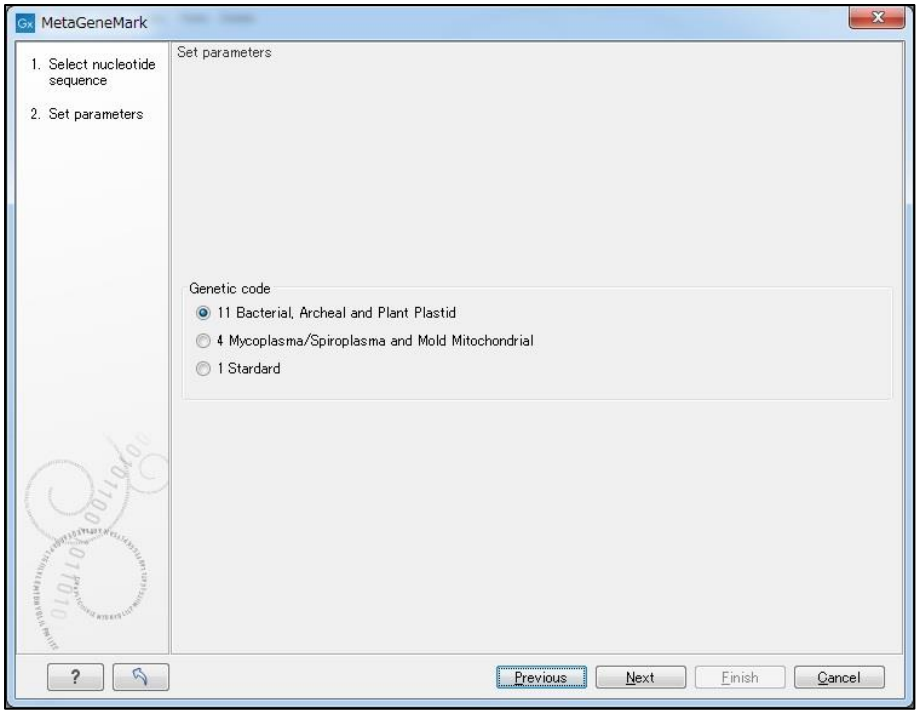
MetaGeneMark

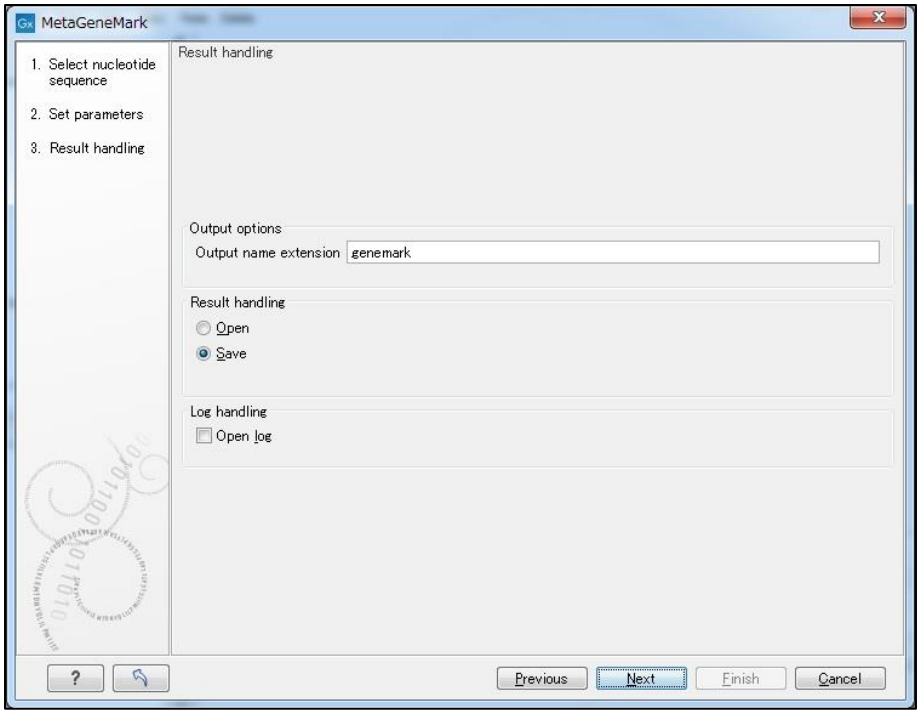




1. MetaGeneMarkを選択してダブルクリック。
2. コンティグ配列データを選択。

MetaGeneMark

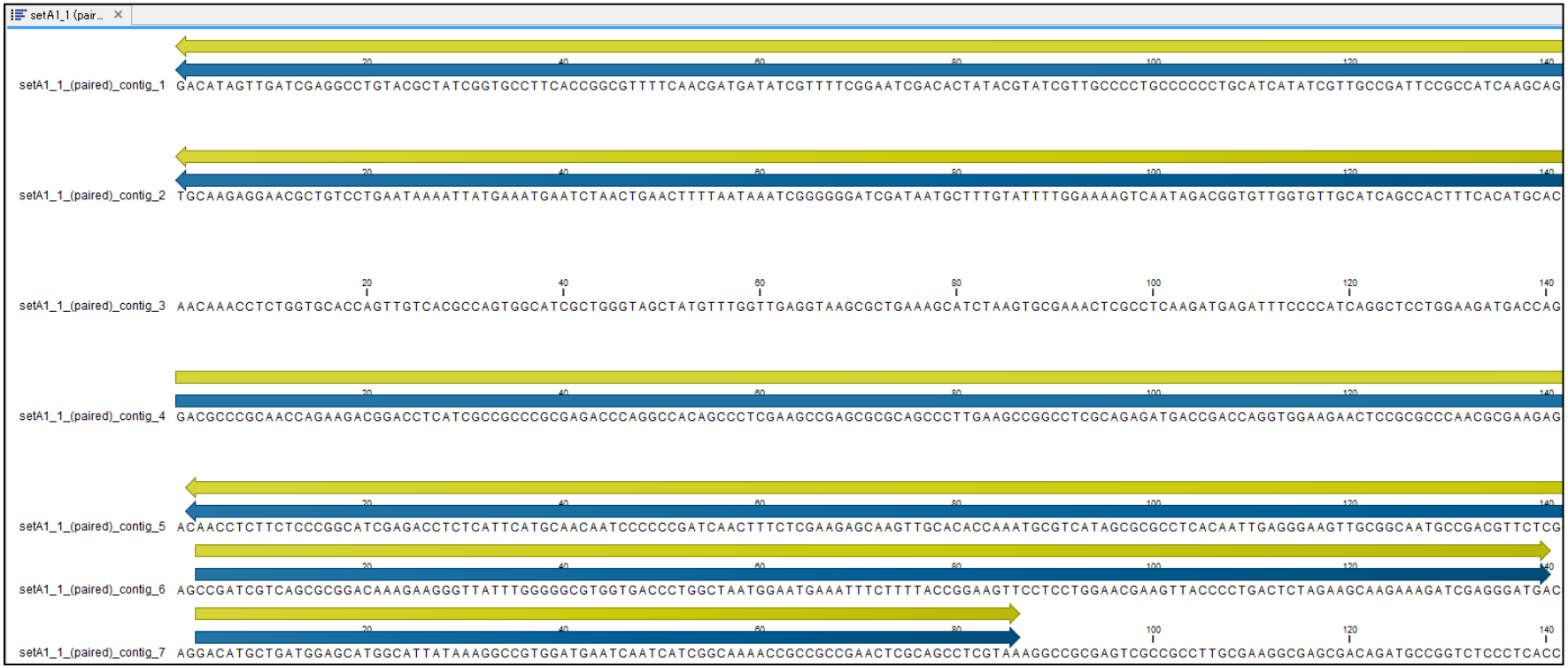




Genetic code:
- 解析データの生物種に応じて、CDS領域の塩基配列をアミノ酸に翻訳する際の翻訳テーブルを指定する。

Output options:
- Output name extension: 解析結果のデータ名に付加される文字列を指定する。

MetaGeneMark



- 遺伝子・CDS領域を表すアノテーションが、コンティグ配列に付加される。

手順3：遺伝子機能アノテーションの付加

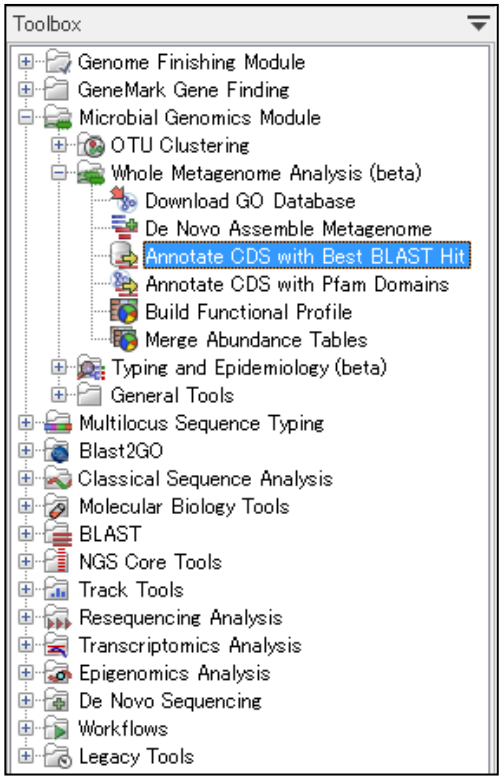
遺伝子機能情報の付加

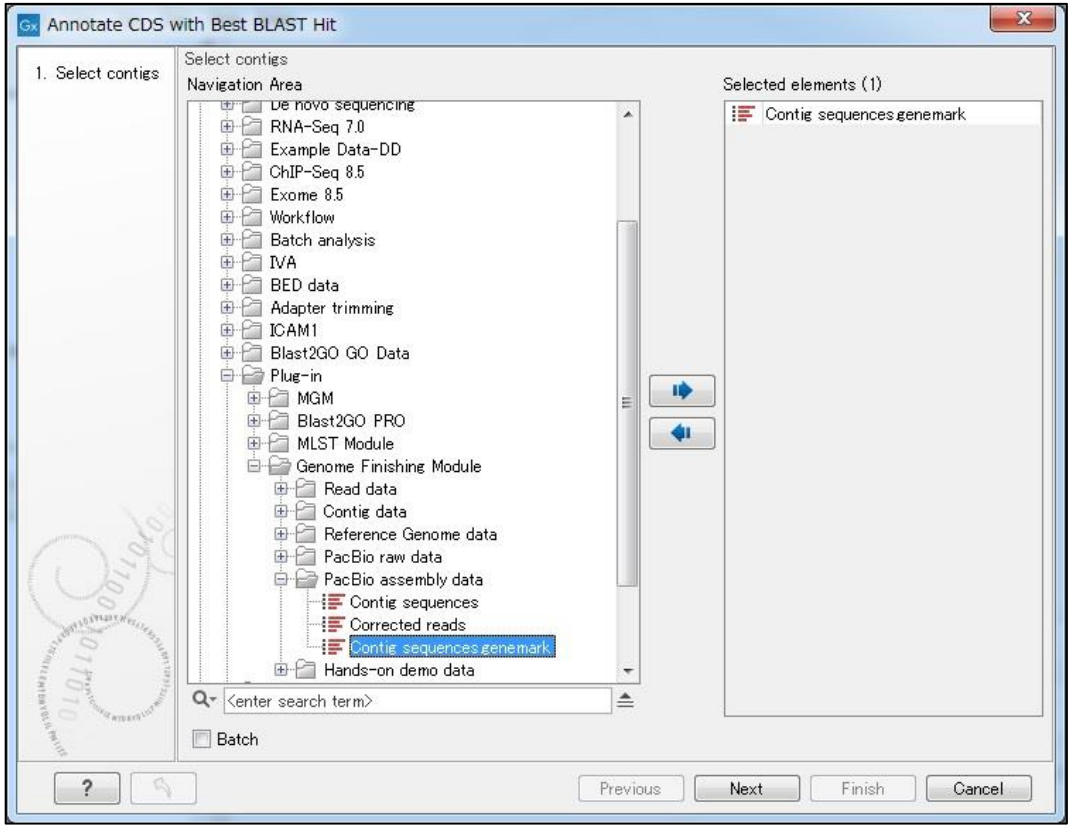
- MetaGeneMarkによって検出された各CDSデータに対して、配列の相同性比較や様々なデータソースから、遺伝子機能情報を付加する。
- どちらか一方のみの使用でもよい。

1. BLASTを利用した、配列データのターゲットデータベースとの相同性比較によるアノテーション付け
   （使用ツール：Annotate CDS with Best BLAST Hit）

2. PfamとGO (Gene Ontology)データベースを利用したアノテーション付け
   （使用ツール：Annotate CDS with Pfam Domains）

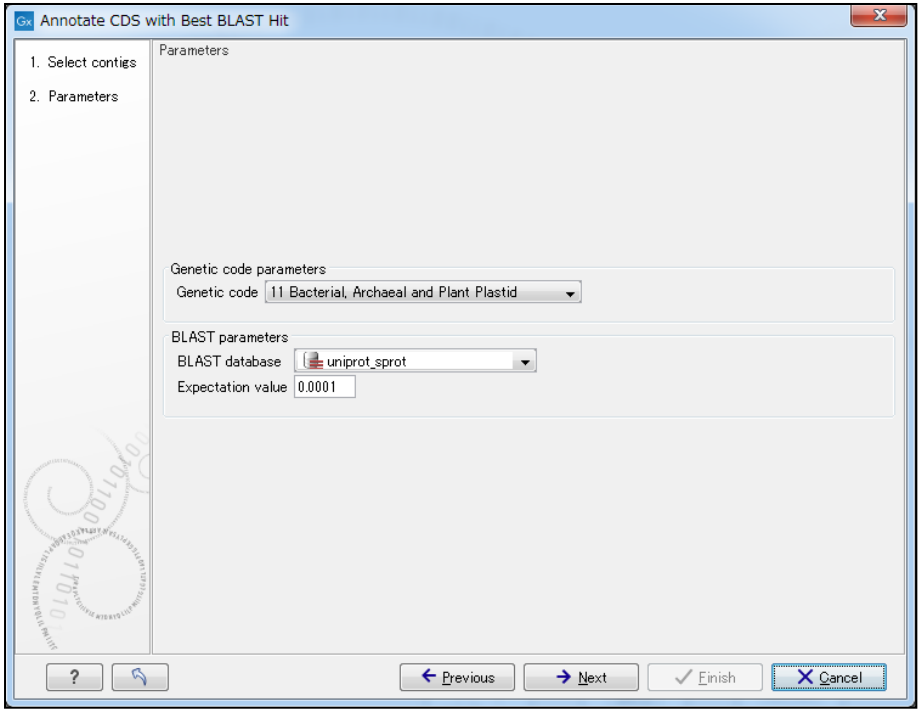
Annotate CDS with Best BLAST Hit

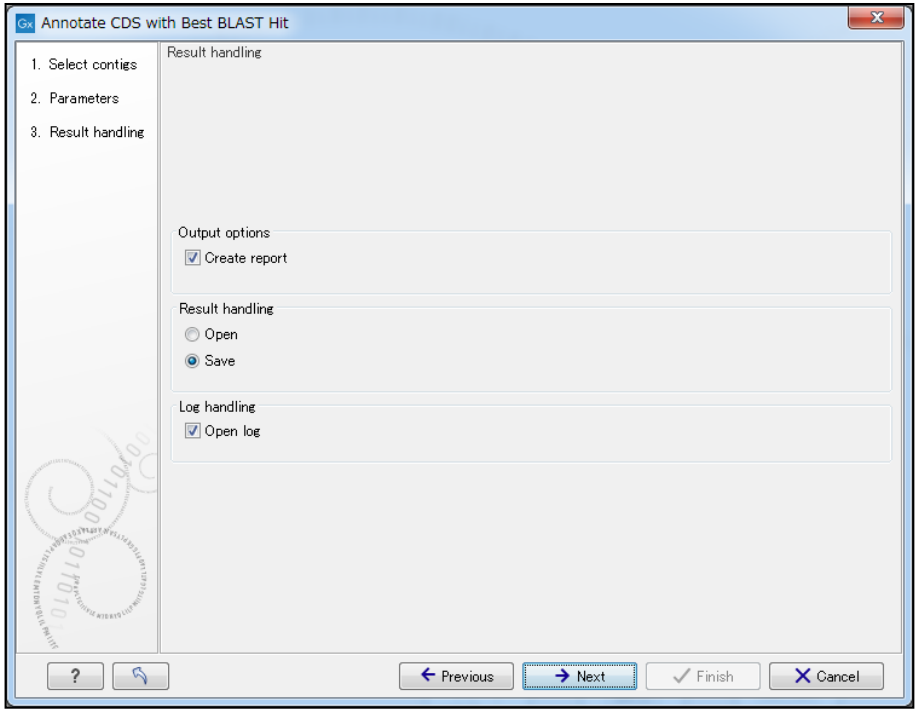




1. Annotate CDS with Best BLAST Hitを選択してダブルクリック。
2. CDSアノテーション付けされたコンティグ配列データを選択。

Annotate CDS with Best BLAST Hit



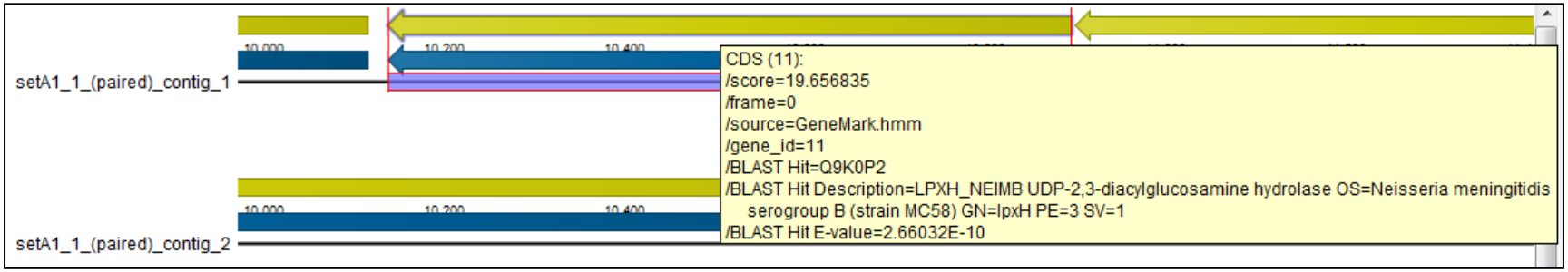


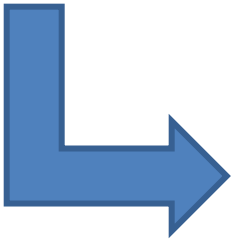
Genetic code parameters:
- Genetic code: 解析データの生物種に応じて、CDS領域の塩基配列をアミノ酸に翻訳する際の翻訳テーブルを指定する。

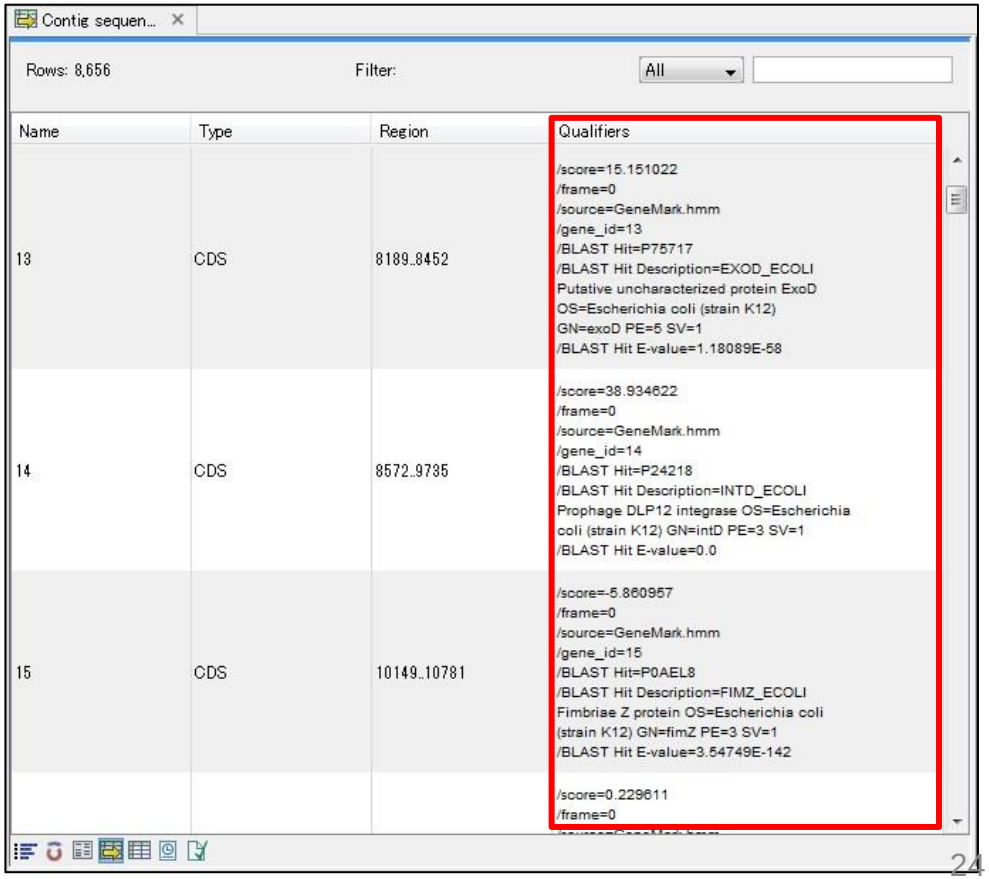
BLAST parameters:
- BLAST database: ターゲットデータベースを指定する。
（ターゲットデータベースの取得は、BLASTアプリケーションの「Download BLAST Databases」や「Create BLAST Database」から可能。）
- Expectation value: BLAST検索のE-valueの閾値。

Output options:
- Create report: 解析結果をまとめたレポートを作成する。

Annotate CDS with Best BLAST Hit



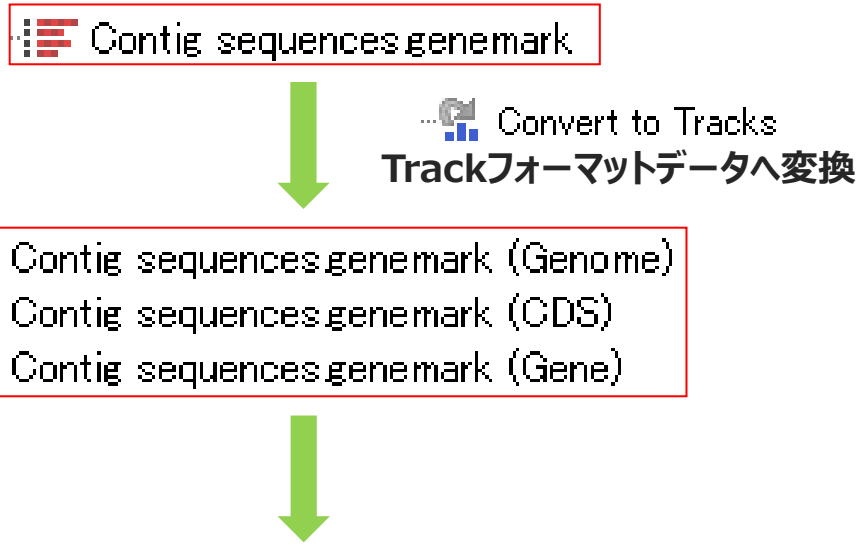




- 遺伝子機能情報がCDSアノテーションに付加される。

リファレンスゲノムデータの作成

リファレンスゲノムデータの作成



- リシークエンス解析
- RNA-Seq解析
- ChIP-Seq解析　　など

Chromosome	Region	Type	Reference	Allele	Zygosity	Count	Coverage	Frequency	Coding region change	Amino acid change	BLAST Hit ...	BLAST Hit Description (Contig sequences genemark (CDS))
Joined contig 1	4009847^4009848	Insertion	-	G	Homozygous	16	17	94.12	3738:c.293_294insG	3738:p.Asp100fs	P09154	YMFS_ECOLI Uncharacterized protein YmfS OS=Escherichia
Joined contig 1	4009968	SNV	T	T	Heterozygous	13	18	72.22			P09154	YMFS_ECOLI Uncharacterized protein YmfS OS=Escherichia
Joined contig 1	4010106^4010107	Insertion	-	-	Heterozygous	19	21	90.48			P09154	YMFS_ECOLI Uncharacterized protein YmfS OS=Escherichia
Joined contig 1	4011423	SNV	G	C	Heterozygous	28	44	63.64	3740:c.289C>G	3740:p.Leu97Val	P33227	STFE_ECOLI Putative protein StfE (Fragment) OS=Escherich
Joined contig 1	4011423	SNV	G	G	Heterozygous	16	44	36.36			P33227	STFE_ECOLI Putative protein StfE (Fragment) OS=Escherich

コンティグ配列に付加されたアノテーション由来のデータ

お問い合わせ先：フィルジェン株式会社

TEL 052-624-4388 (9:00～17：00)

FAX　052-624-4389

E-mail: biosupport@filgen.jp