



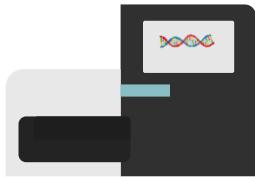
種の識別に優れた 16S rRNA メタゲノム解析

フィルジエン株式会社 バイオインフォマティクス部
(biosupport@filgen.jp)

16S rRNA菌叢解析

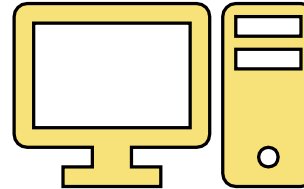
土壌や腸内などの様々環境サンプルから16S rRNAの配列情報をシーケンスし菌種組成を解析

土壌や腸内などの
マイクロバイオームサンプル



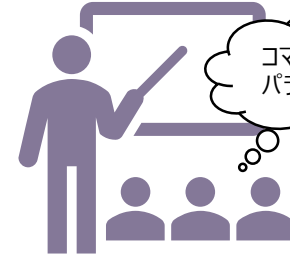
Microbiome
Sequencing

高価なPCが必要



Sequence data
Analysis

コマンドライン
パラメータ設定



バイオインフォマティクス
知識が必要

種までの同定は困難



EzBioCloud-MTPはこれらの課題を解決！！

EzBioCloud-MTPとは？

次世代シーケンサーより出力された16SrRNAの菌叢解析結果より
生物学的意義のあるデータをWebベースで作成

土壌や腸内などの
マイクロバイオーームサンプル



Microbiome
Sequencing

クラウドで高速計算！
高スペックPCなしで解析可能



Sequence data
Upload



Analysis
the cloud



結果の閲覧

ファイルのインポートで簡単解析
バイオインフォマティクスの知識がなくてもOK！

業界で評価されたデータベース



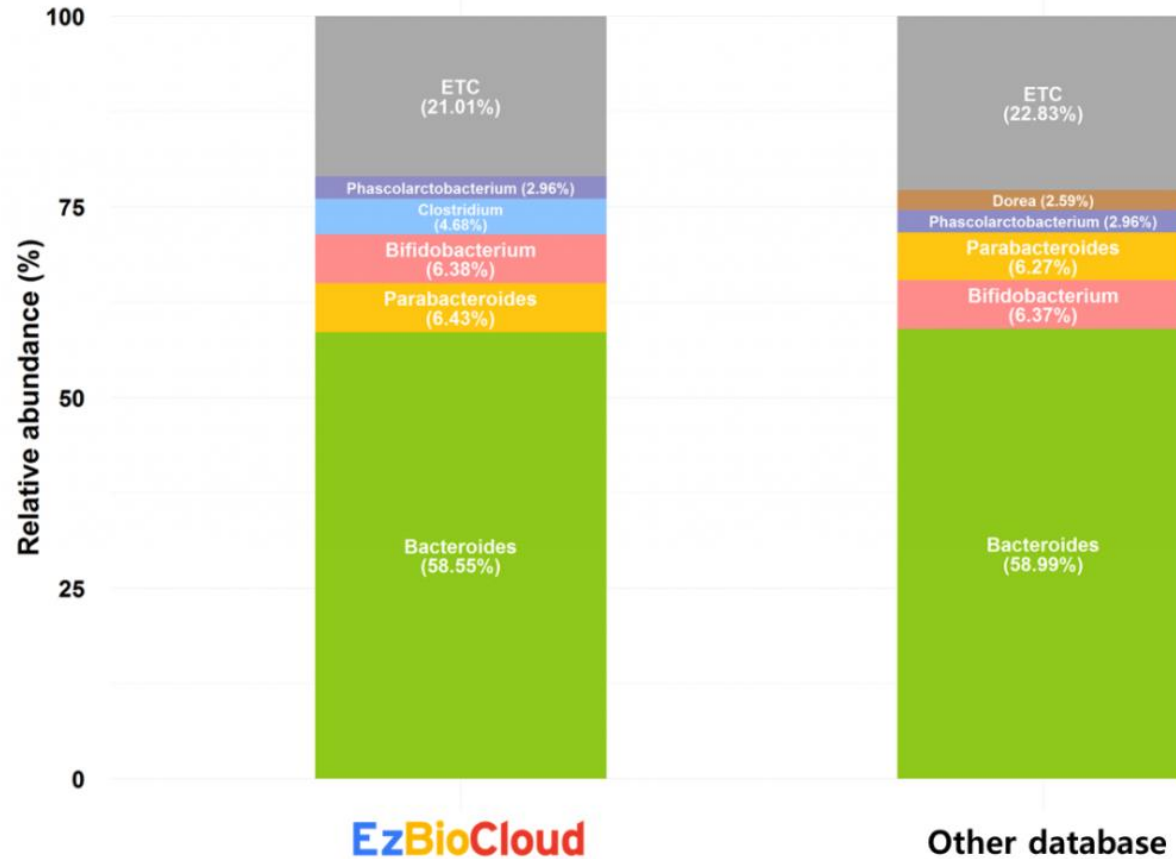
EzBioCloudはChunLab社の公開データと分析ポータルで、分類学、生態学、ゲノミクス、メタゲノミクス、細菌と古細菌の微生物学に焦点を当てています。

EzBioCloudネットワークは、学界、非営利団体、医療界、政府機関、グローバル企業など、22,000人以上のユーザーが50カ国以上で利用されています。

	EzBioCloud	Other Databases
Taxonomic rank assignment (From phylum to species)	Complete (Taxonomy based on Maximum Likelihood Trees)	Incomplete
Inclusion of in house generated data	>2,000 full-length, high-quality, chimeric-free PacBio sequences from human and mouse microbiome	No
Up-to-date taxonomic information	Yes	Yes/No (Depending on databases *)
Taxonomic name changes (basynoms) are followed	Yes	No
Optimized for species-level identification	Yes	No
Reference data used for PICRUSt functional prediction	> 9,000 genomes with >12,000 KEGG Orthologs	2,590 genomes with 6,909 KEGG Orthologs

*Last update EzBioCloud MTP DB: April 2018 / SILVA: Dec 2017 / RDP: Sep 2016 / Greengenes: Aug 2013

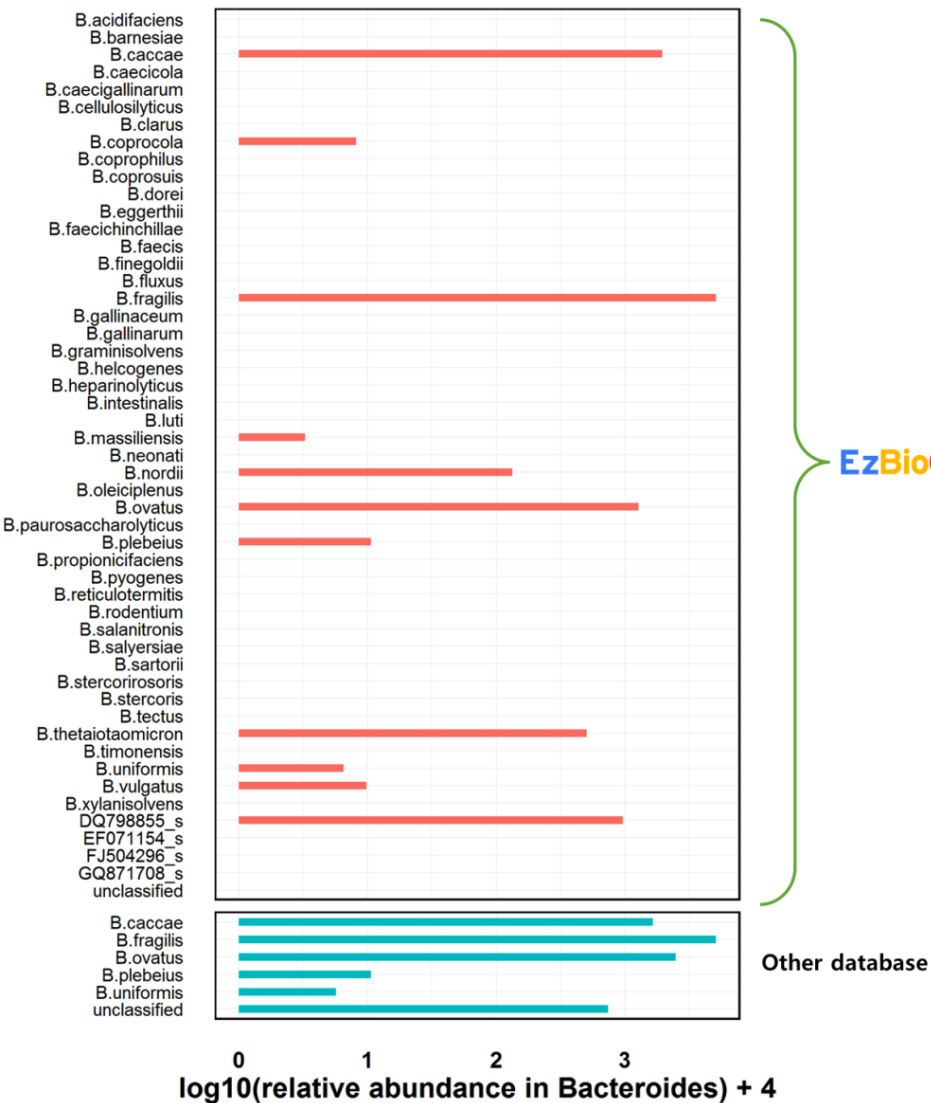
- ✓ 最も広く使用されているタクソノミー中心のデータベース
(2018年5月時点で5,008件の引用、2017年に「Microbiology」カテゴリで最も引用された論文)
- ✓ 種レベル分類に最適化
- ✓ 最新かつ正確な16Sデータベース
- ✓ 異なる16S領域（例えば、V1V3およびV4）について生成されたNGSデータ間の適合性を提供する16S遺伝子のすべての可変領域を含む。



ヒト糞便試料中の属レベルに着目

✓属レベルの組成物は類似している。

業界で評価されたデータベース



EzBioCloud

ヒト糞便試料中の種レベルに着目

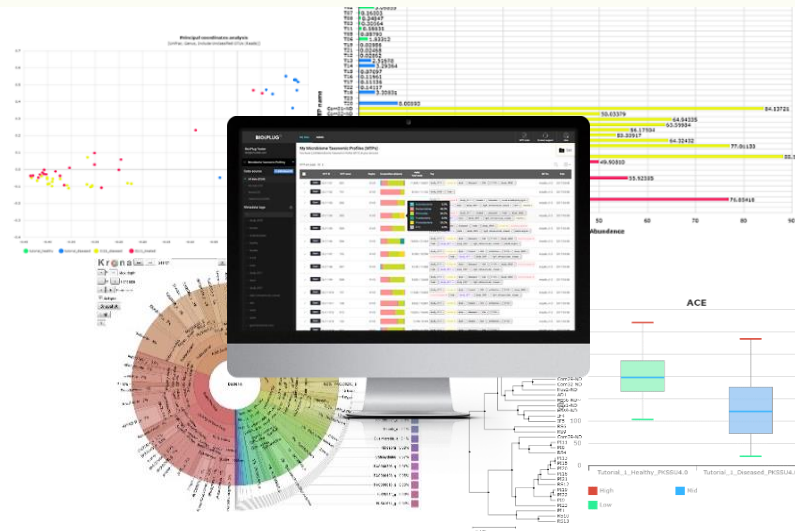
種レベルの組成は
2つのデータベース間の結果とは大きく異なり、
EzBioCloudには、最近発表された種
DQ798855_sのような未培養の種があります。

✓種レベル分類に最適化

グラフィカルなデータの視覚化

- ✓ 各種クオリティーチェックデータのボックスプロットなどの、様々なグラフ表示機能を搭載
- ✓ 16S rRNAメタゲノムデータでは、門～種までの各分類レベルの菌種組成データの表示が可能

多角的な視点からデータを確認することができ、解析結果を資料などにまとめる際にも役立ちます。



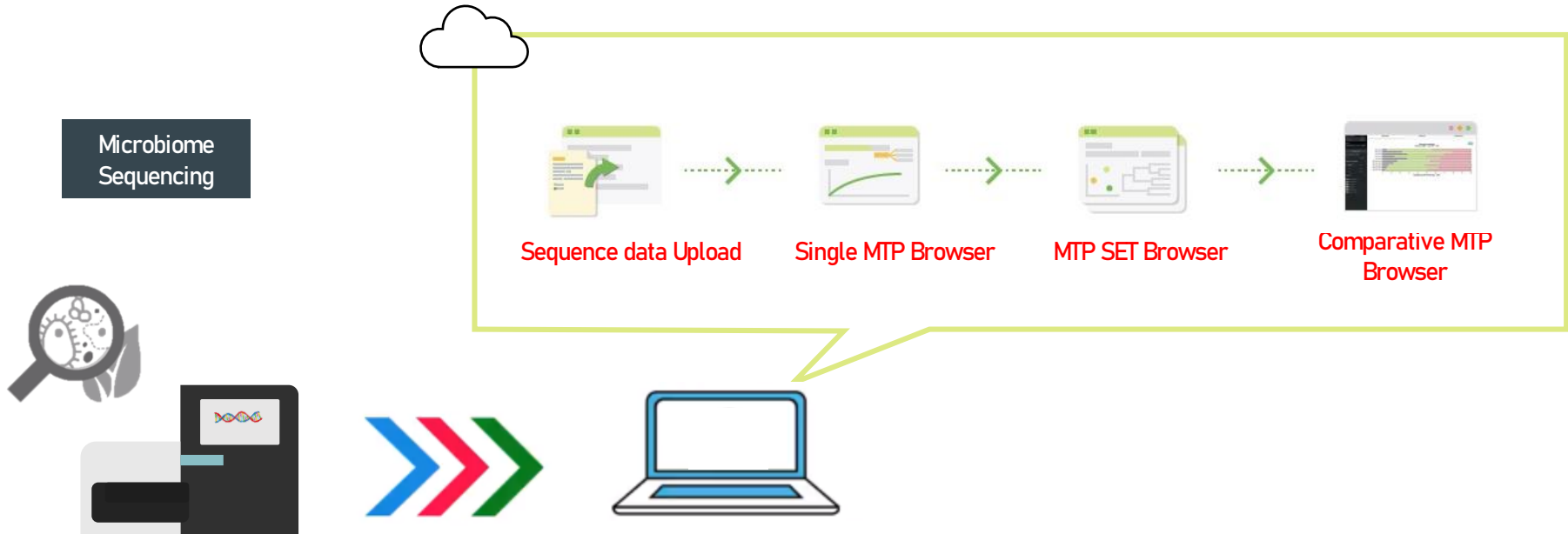
ビッグデータ解析とバイオマーカー探索

- ✓ 16S rRNAメタゲノムデータのリードカウントデータの正規化を行い、様々な統計アルゴリズムを用いた、サンプル間の比較解析を行うことが可能です。

大量のサンプルデータをまとめて比較し、バイオマーカーの探索などに役立てることができます。



データ解析の流れ



- ✓ EzBioCloud-MTPは
メタゲノムサンプルのNGS解析後のデータを視覚化・データセットごとの比較が可能です。

Microbiome Taxonomic Profiling (MTP) とは何ですか？

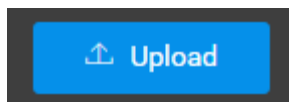
MTPパイプラインはデータを自動的に処理し、MTPというデータユニットに変換されます。
MTPは、単一のメタゲノムまたはマイクロバイオームのサンプルを表します。



EzBioCloud-MTPアクセス インポート画面表示方法

https://www.ezbiocloud.net/mtp/view_myMTPListにアクセス

EzBioCloud-MTPへログイン
(未登録の場合は[こちらを参照](#))



画面上部のUploadを選択





Microbiome Taxonomic Profiling

[Learn more about the pipeline](#)

16S rRNA gene-based [Quota: 488](#)



Run Status

Please fill out the form below to upload/analyze your 16S rRNA gene data.

Options

a NGS platform Illumina paired-end data as 2 FASTQ files **c** Target taxon Bacteria Archaea

b Database PKSSU4.0 **d** Primers Forward: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
Reverse: CGGTTACCTTGTACGACTT

Inputs (Upload up to 10 samples at once)

Forward file Reverse file

Drag & drop files here

e Drag & drop files
or
Select FASTQ/FASTA files
(Maximum upload file size: 1 GB)

This device Google Drive Dropbox pCloud

[Request MTP pipeline](#)

a データの生成に使用されるNGSプラットフォームを選択します。

b 分類データベースを選択します。現在、3つのデータベースから選択できます。

PKSSU4.0	原核生物16Sデータベース（細菌+古細菌）の最新バージョンです。
mtpdb_v1.5	古いデータとの互換性のために提供されている原核16Sデータベースの以前のバージョンです。
ATCCSTD1.0	ATCC [®] Microbiome Standardsを分析するための16Sデータベースです。



Microbiome Taxonomic Profiling

[Learn more about the pipeline](#)

16S rRNA gene-based [Quota: 488](#)



Run Status

Please fill out the form below to upload/analyze your 16S rRNA gene data.

Options

a NGS platform Illumina paired-end data as 2 FASTQ files **c** Target taxon Bacteria Archaea

b Database PKSSU4.0 **d** Primers Forward: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
Reverse: CGGTTACCTTGTACGACTT

Inputs (Upload up to 10 samples at once)

Forward file	Reverse file
Drag & drop files here	

e Drag & drop files
or
Select FASTQ/FASTA files
(Maximum upload file size: 1 GB)

[Request MTP pipeline](#) →



c

対象の分類群を選択します。

d

PCRプライマー配列除外またはトリミングします。プリセットからトリミングするプライマー情報を選択するか、「カスタム」をチェックして独自のプライマーシーケンスを入力します。トリミングしたくない場合、またはすでにプライマー配列をトリミングしている場合は「なし」を選択します。

Primers Select/enter primers to be trimmed. [Minimize](#)

None Custom V3V4 V4 Full Length

Forward primer: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG Reverse primer: CGGTTACCTTGTACGACTT



EZ BioCloud
 [UPLOAD CENTER](#)
 [View MTP results](#)
 [HELP CENTER](#)
 [SUPPORT](#)

Microbiome Taxonomic Profiling

Learn more about the pipeline [↗](#)

16S rRNA gene-based Quota: 488

f Run Status

● Please fill out the form below to upload/analyze your 16S rRNA gene data.

Options

a **NGS platform** Illumina paired-end data as 2 FASTQ files

b **Database** PKSSU4.0

c **Target taxon** Bacteria Archaea

d **Primers** Forward: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
Reverse: CGGTTACCTTGTACGACTT

Inputs (Upload up to 10 samples at once)

Forward file	Reverse file
Drag & drop files here	

This device
Google Drive
Dropbox
pCloud

e **Drag & drop files**
or
Select FASTQ/FASTA files
(Maximum upload file size: 1 GB)

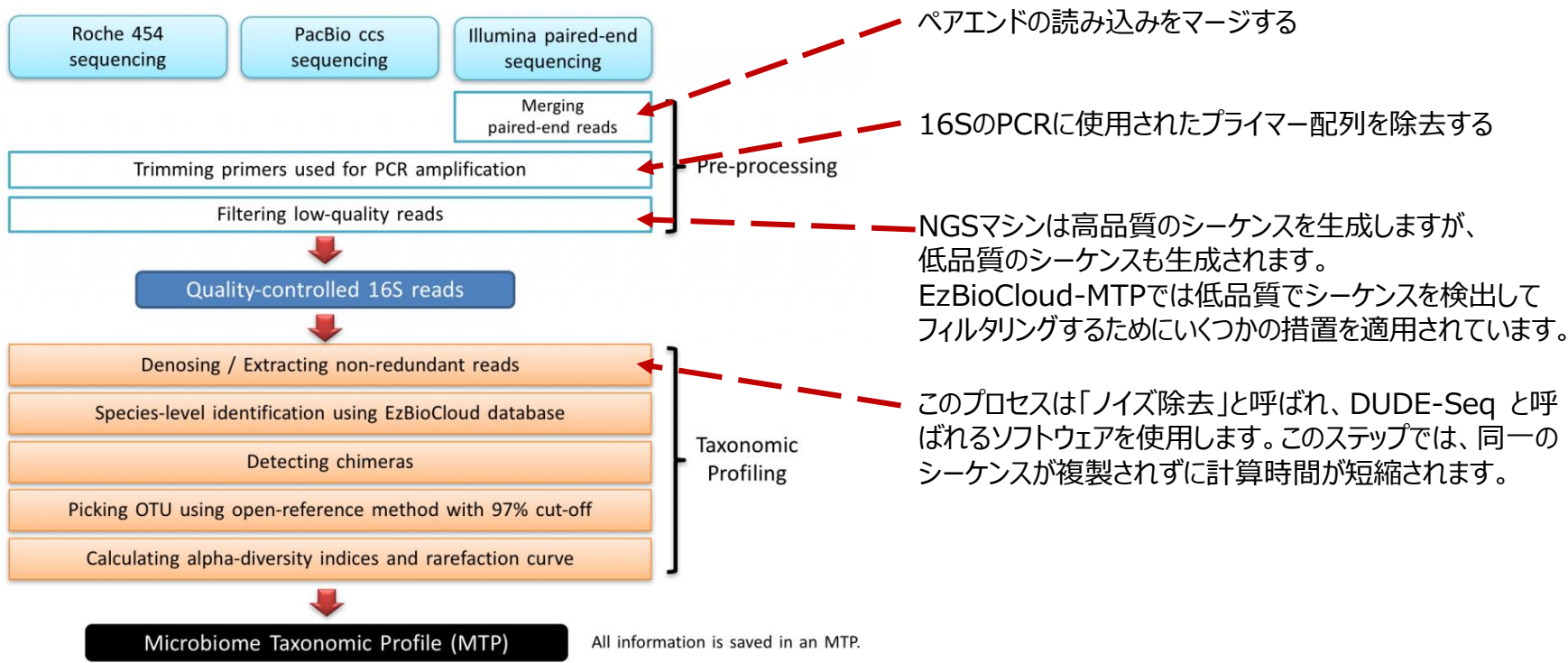
Request MTP pipeline →
✕

e ここにNGSファイルをアップロードします。ファイルを直接アップロードするか、「Googleドライブ」、「Dropbox」、「pCloud」などのリンクを介してデータをアップロードできます。PacBioの ccs データについては、処理済みのFASTAデータをアップロードしてください。

f パイプライン実行のステータス情報を表示します有料ユーザーのMTPの一般的な実行時間は30分未満です。

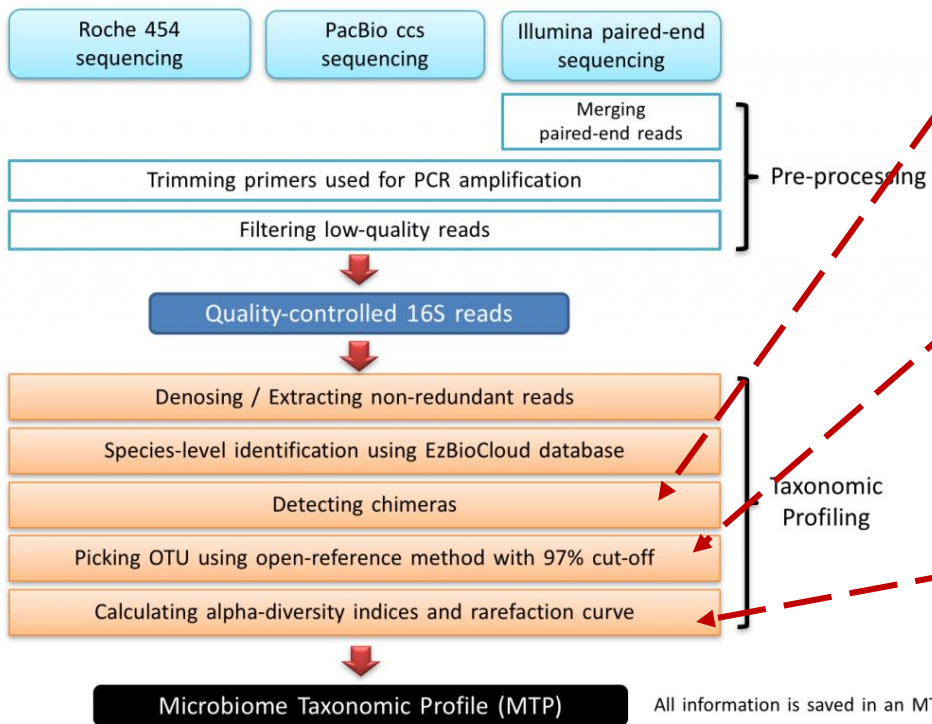


MTPに変換されるまでのパイプライン





MTPに変換されるまでのパイプライン



キメラ検出

EzBioCloudデータベース内の参照配列と一致するNGS配列決定読み取りはキメラではないと仮定する。UCHIMEプログラムを使用して、残りの読み取りのみがキメラに対してチェックされます。

OUTピッキング

OTU (operational taxonomic unit) は、マイクロバイオームの研究で広く使われている用語であり、"種"とみなすことができます。サンプルのすべてのシーケンスは、さまざまなアルゴリズムとソフトウェアツールを使用して多数のOTUにクラスタ化できます。

OTU情報 (OTUの数および各OTUのシーケンス) を使用して、様々なアルファダイバーシティインデックスを計算することができます。

すべての計算が実行されると、そのサンプルに関するすべての情報がMicrobiome Taxonomic Profile (MTP) という名前のオブジェクトとして保存されます。



About MTP (meta data)

MTP / Sample name

ATCC_Microbiome_Standards_V1V9

Tag

tutorial_4

pacbio

V1V9

ATCC_Microbiome_Standards_MSA-1002

Memo

-

Target taxon

Bacteria

Database version

[ATCCSTD1.0](#)

解析情報の表示



QCを通過した後のデータ分析に使用された読み込みの数。

除去された配列の詳細。

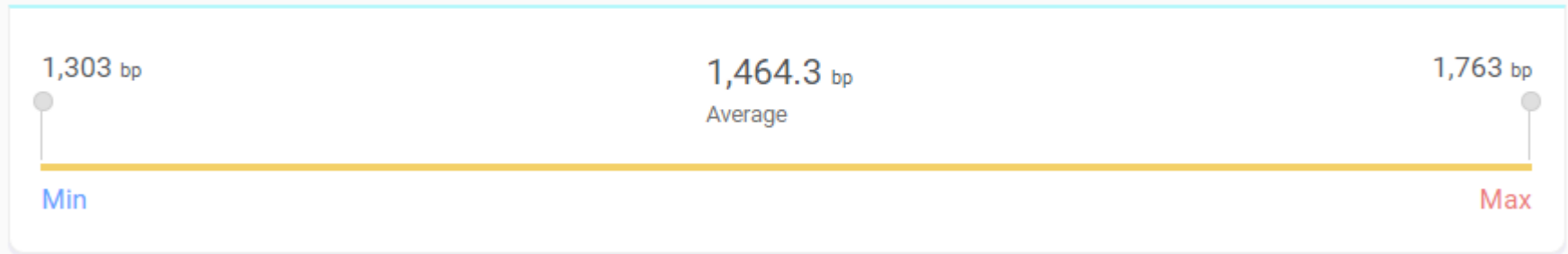


生のNGSデータから、低品質の配列を除去した配列数（プレフィルター後）。

配列数について



About read lengths



有効な読み取りの長さに関する統計情報（最小、最大、平均）

About taxonomic assignment

No. of reads identified at the species level 

13,187 (100.0%)

No. of species found 

20

種レベルで割り当てられた品質管理シーケンシングリードの割合

MTPで実際に検出された種の数



About MTP

Alpha diversity

Taxonomic hierarchy

Taxonomic composition

Selected taxa

Krona

Word Cloud

OTU-picking

Method ⓘ

CL_OPEN_REF_UCLUST_MC2

Cutoff ⓘ

97%

No. of OTUs found in the sample ⓘ

21

Good's coverage of library(%) ⓘ

100.0

OTUピッキング解析条件

Diversity indices ⓘ

ACE ⓘ

21.0	21.0	21.0
LCI	Value	HCI

Chao1 ⓘ

21.0	21.0	21.0
LCI	Value	HCI

Jackknife ⓘ

21.0	21.0	21.0
LCI	Value	HCI

Shannon ⓘ

2.843	2.851	2.859
LCI	Value	HCI

Simpson ⓘ

0.062	0.063	0.064
LCI	Value	HCI

NPS Shannon ⓘ

2.851
Value

Phylogenetic diversity ⓘ

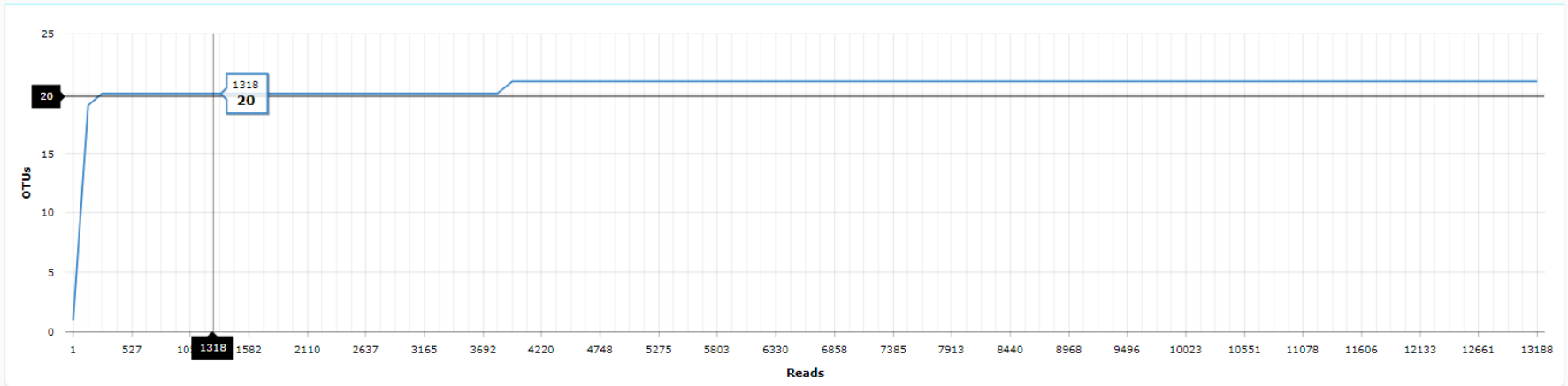
85.0
Value

MTPの生物多様性を説明するために、さまざまなアルファ多様性指標を使用できます。



Rarefaction curve ⓘ

Save as PNG



Rarefaction curve

サンプルデータのサイズとOTUの数との間の相関をプロットすることによって種の多様性を表すグラフ



MTP name: [ATCC_Microbiome_Standards_V1V9](#)

Navigation: About MTP | Alpha diversity | Taxonomic hierarchy | Taxonomic composition | Selected taxa | Krona | Word Cloud

Species: Expand

- Root [13189]
 - Bacteria [13189]
 - Actinobacteria [590]
 - Actinobacteria_c [590]
 - Actinomycetales [41]
 - Actinomycetaceae [41]
 - Actinomyces [41]**
 - Actinomyces odontolyticus ATCC 17982 [41]**

Actinomyces odontolyticus ATCC 17982

[Go to taxonomy](#)

[Download sequences](#)

Contig ?

Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	100%	Count 6

Clone ?

Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.93%	
Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.93%	
Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.86%	
Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.79%	
Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.45%	
Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.93%	
Top Hit	Actinomyces odontolyticus ATCC 17982	Copy seq.
Similarity	99.93%	

サンプルデータの分類学的階層

MTPの分類構造を階層的にブラウズしたり
シーケンスをFASTAフォーマットとしてダウンロードしたり、個々のシーケンスをクリップボードにコピーすることができます。



About MTP

Alpha diversity

Taxonomic hierarchy

Taxonomic composition

Selected taxa

Krona

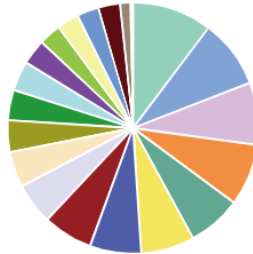
Word Cloud

Species

Save as PNG

Excel

Filter :



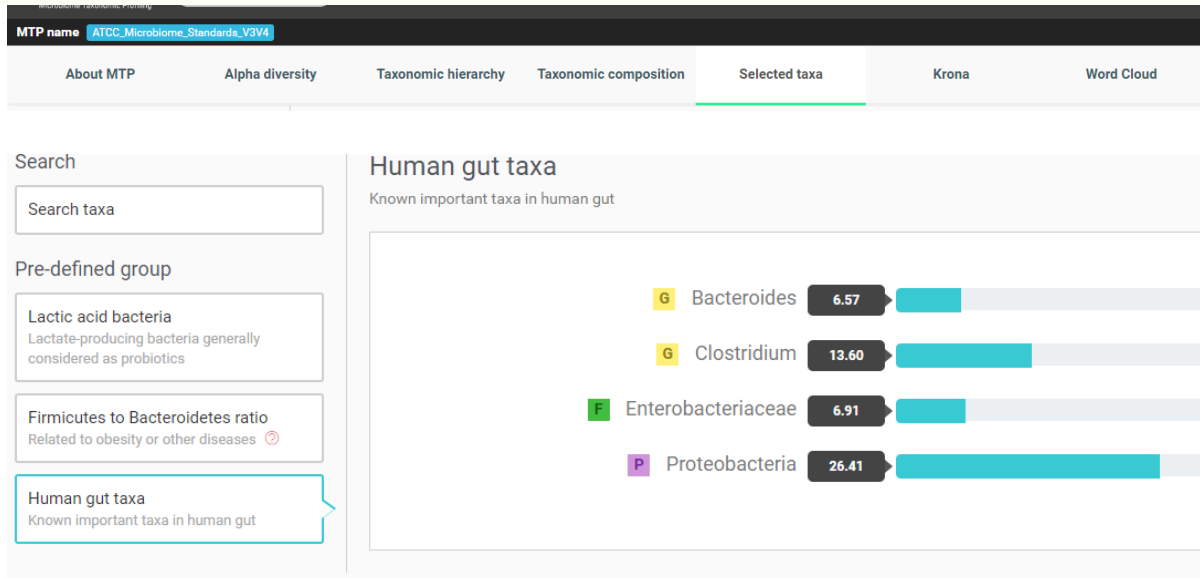
Taxon name	Count	Proportion(%)
Clostridium beijerinckii ATCC 35702	1,355	10.2737
Streptococcus agalactiae ATCC BAA-611	1,166	8.8407
Lactobacillus gasseri ATCC 33323	1,060	8.0370
Streptococcus mutans ATCC 700610	1,053	7.9839
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	913	6.9224
Escherichia coli ATCC 700926	911	6.9073
Acinetobacter baumannii ATCC 17978	870	6.5964
Neisseria meningitidis ATCC BAA-335	845	6.4069
Staphylococcus aureus ATCC BAA-1556	708	5.3681
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	605	4.5872

< 1 2 >

Clostridium beijerinckii ATCC 35702	1,355	Streptococcus agalactiae ATCC BAA-611	1,166
Lactobacillus gasseri ATCC 33323	1,060	Streptococcus mutans ATCC 700610	1,053
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	913	Escherichia coli ATCC 700926	911
Acinetobacter baumannii ATCC 17978	870	Neisseria meningitidis ATCC BAA-335	845
Staphylococcus aureus ATCC BAA-1556	708	Bacteroides vulgatus ATCC 8482	605
Deinococcus radiodurans ATCC BAA-816	536	Enterococcus faecalis ATCC 47077	518
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	506	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	428
Helicobacter pylori ATCC 700392	377	Bacillus cereus ATCC 10987	376
Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029	370	Propionibacterium acnes ATCC 11828	370
Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703	179	ETC [<1.0]	41
Unclassified	2		

サンプルデータの分類学的構成

門から種までの分類学的構成が円グラフと表として示されています。
 グラフや表をエクスポートまたはダウンロードして、レポートや出版物ですぐに使用することができます。



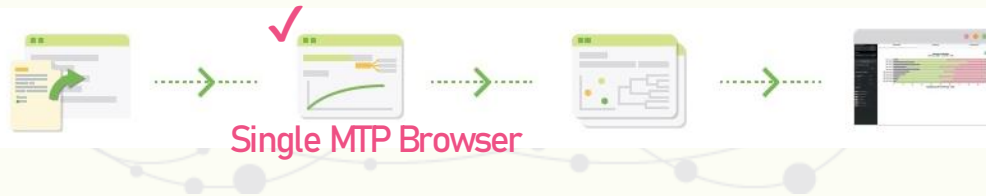
分類の選択

任意の分類群の存在比を調べることができます。
また手入力での検索も可能です。

乳酸菌（LAB）：乳酸を産生することができる細菌を指すため、分類学的ではない。
LABは、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Lactococcus*、*Weissella*属、
および*Bifidobacterium*属に分類されるプロバイオティクス菌株に使用される。

*Firmicutes*に対する*Bacteroidetes*比： *Firmicutes*および*Bacteroidetes*は、ヒト腸内微生物叢における2つの主要な門である。
*Firmicutes*から*Bacteroidetes*比（F / B）は、人の健康状態を示す
バイオマーカーとして用いられてきた。F / Bは、多くの研究において肥満と関連することが示されている。

ヒトの腸の分類：ヒトのマイクロバイオームの研究のために、様々なランクのいくつかの分類が予め定義されている。



Single MTP Browser



Kronaチャート

分類学的組成データがKronaツールにロードされます。
多層構造を円グラフで表示できます。

ワードクラウド

門から種までで主要な分類群を視覚化できる
ワードクラウドが作成できます。





My Microbiome Taxonomic Profiles (MTPs) ?

You have 22 MTPs in your account.

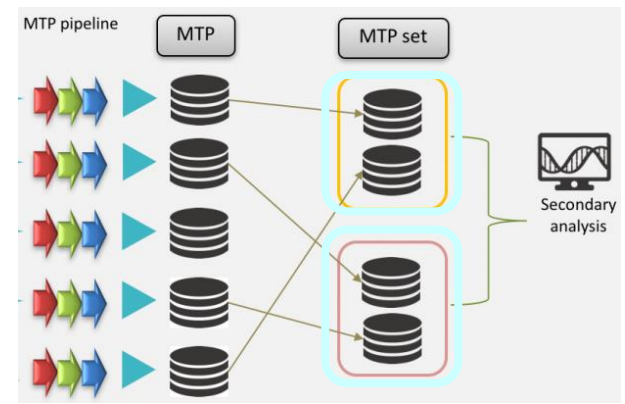
MTPs per page 20 ▾

	MTP name	Region	Composition (phylum)	Valid reads	Tag	Clear tag(s)
✓	Open ATCC_Microbiome_Standards_V1V9	V1V9		13,189	tutorial_4 x pacbio x	
✓	Open ATCC_Microbiome_Standards_V3V4	V3V4		500,326	tutorial_4 x miseq x	

My MTP sets (3) Create new MTP set

- JAX
PKSSU4.0
10 MTPs
- TAC
PKSSU4.0
10 MTPs
- ATCC
ATCCSTD1.0
2 MTPs

前述のMTPを統合したMTPセットを作成できます。
2つ以上のMTPで構成され、1組のマイクロバイオームサンプルを表し単一のMTPを比較することができます。



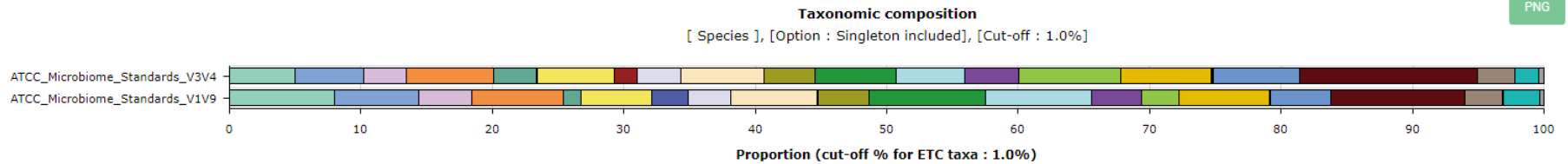


MTP List **Composition** Alpha-diversity Beta-diversity

Stacked bar

Double pie

Selected taxa



Taxonomic Rank ▼

- ✓ Phylum ✓ Class
- ✓ Order ✓ Family
- ✓ Genus ✓ **Species**

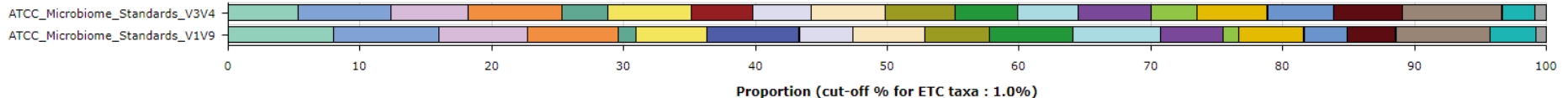
Options ✕

Normalization

- None
- Read count ()
You should enter the value range from 1000 to 13189.
- Gene copy number

Apply

Taxonomic composition [Species], [Option : Copy number, Singleton included]



MTPセット内のサンプルの棒グラフによる比較

門から種までの表示が可能

再サンプリングされた読み取り値または遺伝子コピー数を使用して組成データを正規化または修正することができます。



MTP List Composition Alpha-diversity Beta-diversity

Stacked bar Double pie Selected taxa

Average composition of selected communities



ダブルパイチャートは、サンプル内に2つの分類ランクの組成を同時に表示する特別なインタラクティブなチャートです。

Microbiome_Standards_Microbiome_Standards





Options

Normalization Copy number

Export excel

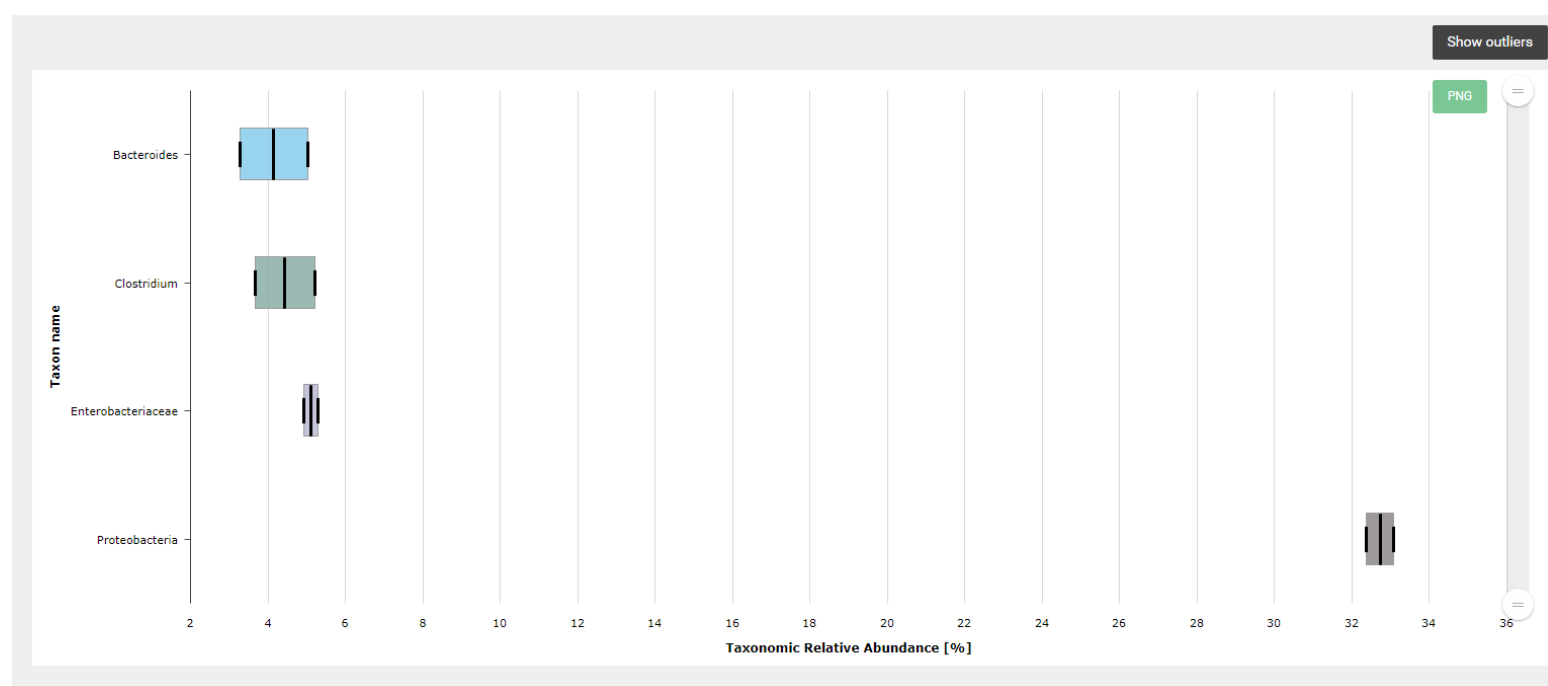
Search

Search taxa

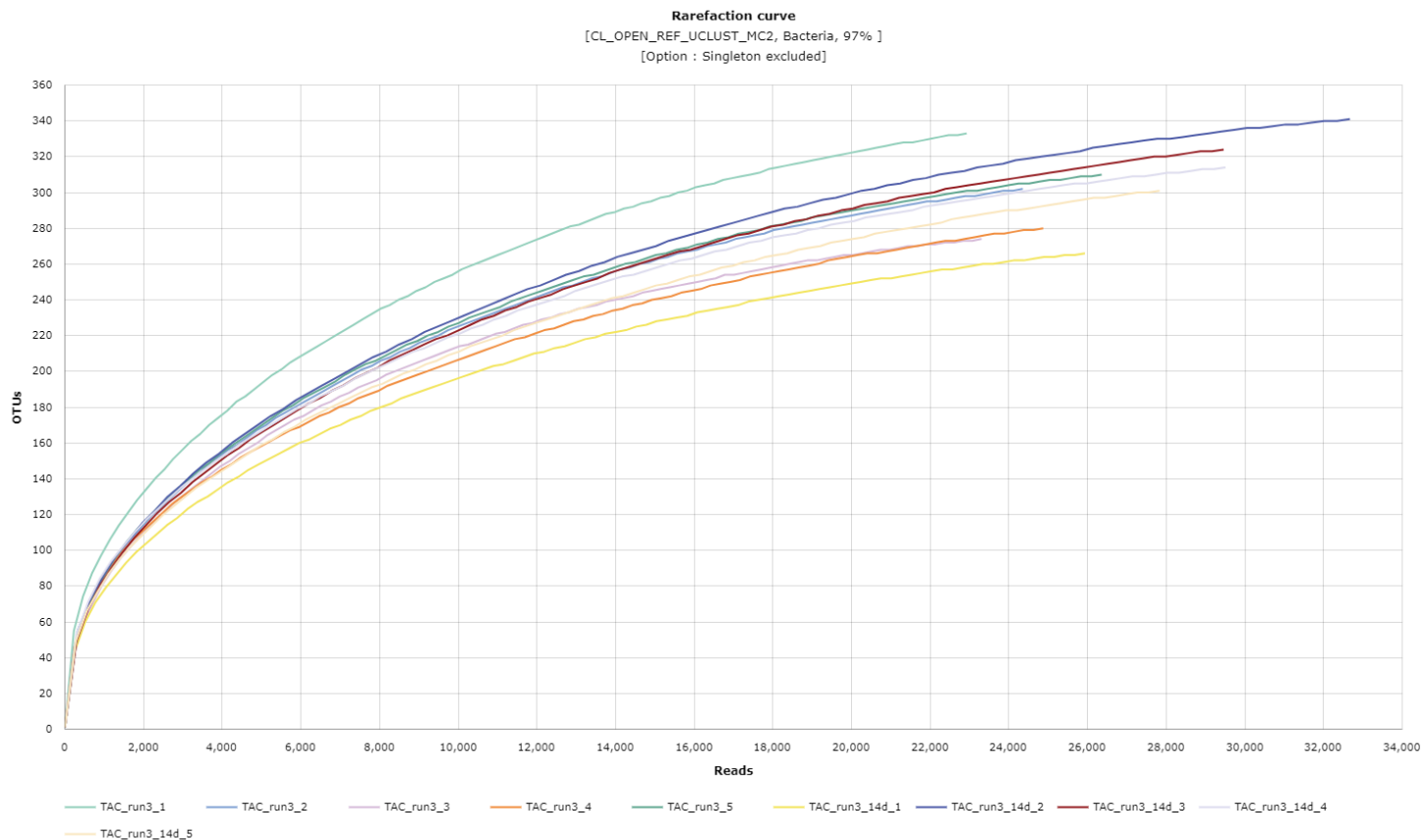
Pre-defined group

- Lactic acid bacteria
Lactate-producing bacteria generally considered as probiotics
- Firmicutes to Bacteroidetes ratio
Related to obesity or other diseases
- Human gut taxa**
Known important taxa in human gut

Human gut taxa
Known important taxa in human gut



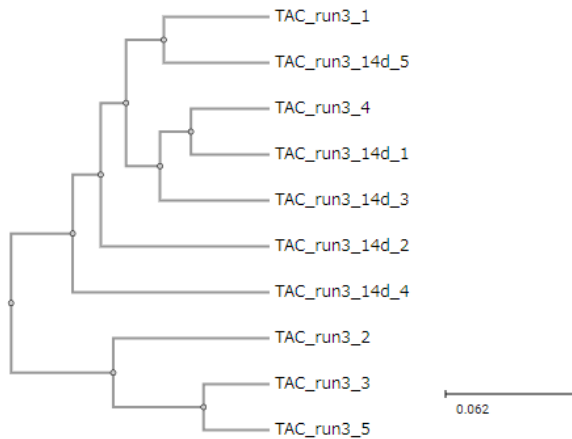
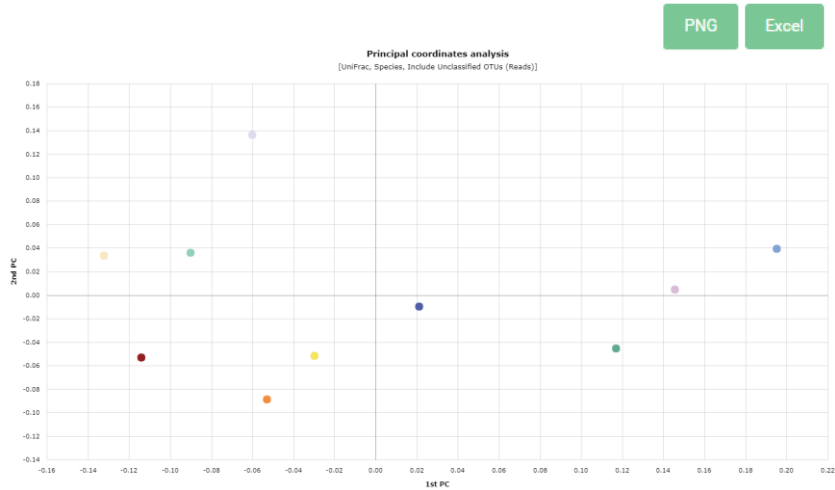
選択した分類群の構成をボックスプロットとして表示できます。
さらに、構成情報をすばやく参照できるように、事前定義されたセットが用意されています。



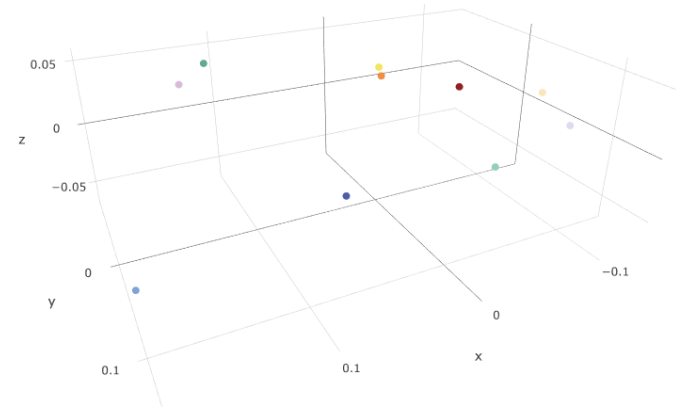
アルファ多様性は基本的に、各MTPについてアルファダイバーシティインデックスが計算されます。このビジュアライゼーションでは、それらの値はすべて、すぐに比較できるように並べて表示されます。



MTP SET Browser



Principal coordinates analysis [3D]
[UniFrac, Species, Include Unclassified OTUs (Reads)]



- ベータ多様性分析により、複数のMTPに保存されている微生物群集の関係を理解することができます。
- 主成分分析 (PCoA) やUPMGAアルゴリズムを使用して階層的クラスタリングを実行することができます。



Comparative MTP
Browser

Comparative Analyzer for MTP sets

Microbiome/Metagenomics

- Microbiome Taxonomic Profiling
- Comparative MTP Analyzer**

Genomics

MTPセット間の比較も可能です。

Select at least two sets for comparison

JAX
PKSSU4.0 10 MTPs ✓

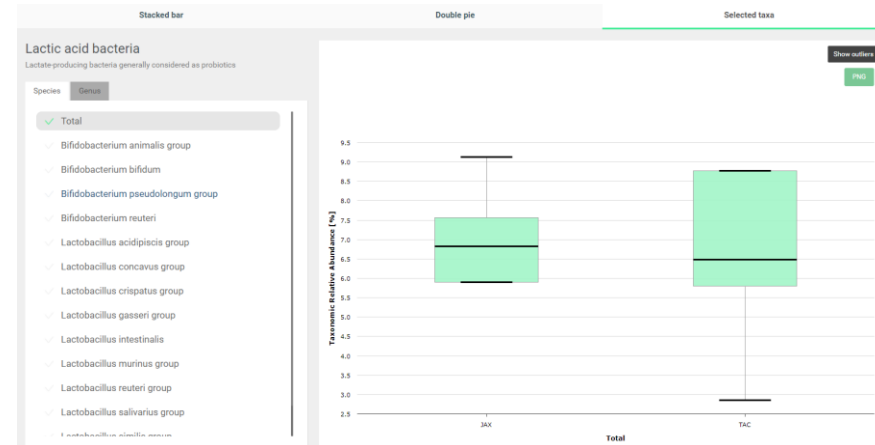
TAC
PKSSU4.0 10 MTPs ✓

Run a comparative module

Compare taxonomic compositions

Run

Averaged taxonomic compositions of the MTP sets



相対的な分類学上の存在量をセット間で比較、アルファ多様性、ベータ多様性、バイオマーカー発見などの解析結果の閲覧出力ができます。

EzBioCloud-MTP

- ✓ illumina、PacBio その他FASTQ/FASTAファイルなどの様々な次世代シーケンスデータに対応しています。
- ✓ MTP (Microbiome Taxonomic Profiling) 解析により解析をコマンドを組むことなく簡単にデータの視覚化ができます。
また、これらの解析はWebベースで行うため安定したインターネット接続環境があれば解析が可能です。
- ✓ Chunlab社独自の16S rRNA専用データベースを利用することでより高速かつ包括的に生物種を予測可能です。
- ✓ 微生物の長期管理と追跡が必要な機関。
プロバイオテックまたはマイクロバイーム関連製品を生産する企業、
病原性原核生物を調査する病院または診療所、
微生物の大規模なデータ解析と管理に関心のある研究者など様々なユーザーに対応しています。



弊社のHPにはEzBioCloud-MTPの情報がございます。

<https://filgen.jp/Product/BioScience21-software/Chunlab/index.html>

デモライセンスを取得して実際にご自身のデータ解析を行うことも可能です。

https://filgen.jp/Product/BioScience21-software/Chunlab/EzBioCloud-MTP_trialLicense.pdf

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