

Claident を用いた定量メタバーコーディング解析

田辺晶史 (東北大学大学院生命科学研究科)

2024-05-10

1 Claident を用いた定量メタバーコーディング解析

Claident は、筆者が開発・メンテナンスしている、メタバーコーディングや DNA バーコーディングのための塩基配列データ解析プログラム集です。Claident の読みは「クライデン」です (末尾の t は発音しません)。名前の由来は「CLAssification」と「IDENTification」です。MiFish pipeline (Sato *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2023) との違いは、大まかには以下の通りです。

- MiFish プライマー (Miya *et al.* 2020, 2015) を用いた魚類メタバーコードデータだけでなく、全生物・ウィルスのあらゆる遺伝子座のデータに対応
- 非定量および定量メタバーコーディング (Ushio *et al.* 2018a) をサポート
- より柔軟で詳細な解析に対応
- Web サービスはなく、自前のコンピュータで解析を行う
- 使用のための前提知識・必要な物品は多い

ここでは、Claident のインストールから内部標準 DNA を利用した定量メタバーコーディングの方法を解説します。本章のサポートページを下記 URL に設置していますので、適宜ご参照下さい。

- <https://github.com/astanabe/eDNAManual>

サンプルデータ、サンプルファイル、本章の原稿ファイル等が置いてあります。

Claident の詳細については下記 URL をご参照下さい。

- <https://www.claident.org/>

以下では、Linux・macOS のターミナル環境での作業に習熟している方向けに解説を行っていきます。ターミナル環境での作業に不慣れな方は、予め習得しておく必要があります。

1.1 Claident の動作環境およびインストール方法

Claident は、以下の環境で動作するように作成されています。

- Debian 11 以降 (Windows 上の WSL 環境を含む)

- Ubuntu 20.04 以降 (Windows 上の WSL 環境を含む)
- Linux Mint 20 以降
- RedHat Enterprise Linux 8 以降
- AlmaLinux 8 以降 (Windows 上の WSL 環境を含む)
- Rocky Linux 8 以降
- Homebrew をインストールした macOS
- MacPorts をインストールした macOS

Windows をご使用の方は、下記の Microsoft 公式ページを参照して WSL と Ubuntu をインストールして下さい。

- <https://learn.microsoft.com/ja-jp/windows/wsl/install>

ただし、Windows 上にインストールした Ubuntu は、標準では最大 250GB 程度しかディスク容量を使用できません (執筆時点)。メモリも搭載しているうちの半分しか使用できません。大きなデータ解析にはディスクやメモリの容量が不足する可能性が高いので、専用の解析マシンを用意することをお勧めします。分子同定の際に大きな参照配列データベースを使用すると膨大なメモリを必要とするため、できるだけメモリを多く搭載したマシンが望ましいでしょう。ディスクアクセス速度がボトルネックになることも多いため、高速な SSD を搭載したマシンを用意して下さい。

なお、Anaconda や Miniconda など、環境を改変してしまうプログラムがインストールされていると、Claident を正常にインストールすることができません。一時的に無効化するか、それらのプログラムを一切使用していない別のユーザーアカウントでコンピュータにログインしてインストールする必要があります。

Debian ・ Ubuntu ・ Linux Mint および Windows 上にインストールした Ubuntu の場合、ターミナル上で以下のコマンドを実行することで Claident をインストールすることができます。

```
sudo apt install wget
mkdir temporary
cd temporary
wget https://www.claident.org/installClaident_Debian.sh
wget https://www.claident.org/installOptions_Debian.sh
wget https://www.claident.org/installUCHIMEDB_Debian.sh
wget https://www.claident.org/installDB_Debian.sh
sh installClaident_Debian.sh
sh installOptions_Debian.sh
sh installUCHIMEDB_Debian.sh
sh installDB_Debian.sh
cd ..
rm -rf temporary
```

macOS をご利用の方は、下記のページを参照して Homebrew をインストールして下さい。

- <https://brew.sh/>

Homebrew をインストールした macOS で Claident をインストールするには、ターミナル上で以下のコマンドを実行します。

```
brew install wget
mkdir temporary
cd temporary
wget https://www.claident.org/installClaident_macOSHomebrew.sh
wget https://www.claident.org/installOptions_macOSHomebrew.sh
wget https://www.claident.org/installUCHIMEDB_macOSHomebrew.sh
wget https://www.claident.org/installDB_macOSHomebrew.sh
sh installClaident_macOSHomebrew.sh
sh installOptions_macOSHomebrew.sh
sh installUCHIMEDB_macOSHomebrew.sh
sh installDB_macOSHomebrew.sh
cd ..
rm -rf temporary
```

なお、ファイアーウォールの内側など、プロキシサーバを通してしか外部ネットワークにアクセスできない環境では、以下のコマンドをターミナル上で実行してから前述のインストールコマンドを実行する必要があります。

```
export http_proxy=http://proxyaddress:portnumber
export https_proxy=http://proxyaddress:portnumber
export ftp_proxy=http://proxyaddress:portnumber
```

プロキシサーバがユーザー名とパスワードでの認証を要する場合、上記コマンドの代わりに以下のコマンドを実行します。

```
export http_proxy=http://username:password@proxyaddress:portnumber
export https_proxy=http://username:password@proxyaddress:portnumber
export ftp_proxy=http://username:password@proxyaddress:portnumber
```

前述のインストールコマンドでは、いずれの環境でも「/usr/local」以下にインストールされますが、インストール先を変更したい場合、インストールコマンド実行前に以下のコマンドを実行します。

```
export PREFIX=/home/tanabe/claident20240101
```

上記の例では、「/home/tanabe/claident20240101」以下に Claident はインストールされます。インストール先を変更した場合、実行コマンドが存在する「**インストール先/bin**」が環境変数 PATH に登録されていないため、Claident の解析コマンドが実行できません。そこで、Claident での解析を行う際には以下のコマンドを実行して環境変数 PATH に「**インストール先/bin**」を加えます。

```
export PATH=/home/tanabe/claident20240101/bin:$PATH
```

Claident での解析前に上記コマンドを毎回実行するのが面倒な場合、「~/.bashrc」の末尾などに上記コマンドを記述すると、ターミナル起動時に毎回自動的に実行されるようになります。

このようにインストール先を変更すれば、複数のバージョンの Claident を共存させることができます。ただし、Claident の各コマンドは設定ファイル「~/.claident」を参照していますので、使用する Claident を切り替えるには「~/.claident」も変更する必要があります。「~/.claident」のテンプレートは、「**インストール先/share/claident/.claident**」に存在していますので、このファイルを「~/.claident」に上書きコピーすれば Claident が完全に切り替わります。実際に複数のバージョンを 1 台のマシンにインストールして共存

させる場合、異なるユーザーを作成してそれぞれで Claident をユーザーの所有ディレクトリ内にインストールし、ユーザーを切り替えることで使用する Claident のバージョンを切り替えるようにするのが良いでしょう。

1.2 データ解析全体の流れと前提条件

Claident によるデータ解析は、以下の流れで行います。

1. デマルチプレックス
2. ペアエンド配列の連結
3. 低品質配列の除去 (Edgar & Flyvbjerg 2015)
4. デノイジング (Callahan *et al.* 2016)
5. キメラ除去 1 回目 (Edgar 2016; Edgar *et al.* 2011; Rognes *et al.* 2016)
6. 内部標準配列クラスタリング (Edgar 2010; Rognes *et al.* 2016)
7. キメラ除去 2 回目 (Edgar *et al.* 2011; Rognes *et al.* 2016)
8. インデックスホッピング除去 (Esling *et al.* 2015)
9. ネガティブコントロールを利用したデコンタミネーション
10. 分子同定 (Tanabe & Toju 2013)
11. OTU 組成表の作成・加工
12. カバレッジベースレアファクション (Chao & Jost 2012)
13. 内部標準 DNA リード数を利用した DNA 濃度の推定 (Ushio *et al.* 2018a)

最終的に得られた OTU 組成表を R やその他の統計解析環境で処理することで、作図や要約、仮説検証を行います。Claident 自体には統計解析機能はありません。

Claident は大抵のメタバーコードデータの解析に使用可能ですが、ここでは以下のようなデータを仮定して解説を進めます。下記を満たしていないデータを解析できないわけではありませんが、本章では説明の対象としません。

- 環境水を濾過して濾過フィルターから抽出した環境 DNA サンプルとネガティブコントロールとしてのフィールドブランクが含まれる
- 以下の方法でライブラリ調製
 - 濃度のわかっている複数の内部標準 DNA を添加して MiFish プライマーを使用して tailed PCR (1st PCR)
 - 1st PCR 産物を鋳型にしてインデックスプライマーを使用して tailed PCR (2nd PCR)
 - できあがるライブラリは、両端にインデックスがあるデュアルインデックスライブラリ
- 各サンプルの 2nd PCR 産物を混合して Illumina 社製シーケンサで **1 ランまたは 1 レーン専有**で解読
 - オーバーラップのある、つまり連結可能なペアエンドシーケンス
 - .bcl を含むランデータまたはインデックスシーケンス分も含めて未デマルチプレックス FASTQ が手元にある

したがって、サンプル・ブランクごとに以下の情報がわかっている必要があります。

- サンプル・ブランクのいずれなのか
- 濾過水量
- 抽出 DNA 溶液量 (回収液量ではなく、最後の溶出時に使用した液量)
- 内部標準 DNA 塩基配列
- 内部標準 DNA 濃度
- 1st PCR 時のプライマー配列のうち、シーケンサの読み始めになる部分配列
- 2nd PCR 時のプライマー配列のうち、インデックスとして読まれる部分配列

なお、シングルエンドシーケンスやオーバーラップのないペアエンドシーケンス、ライブラリ調製時に内部標準 DNA 添加をしていない、デマルチプレックス済の FASTQ しか手元にない、などのケースに関しては以下のページに掲載しているシェルスクリプトを参照して下さい。

- <https://github.com/astanabe/ClaidentTutorial>

フィールドブランクがない、または十分な数がない場合、抽出ブランクや 1st PCR ブランクを代わりに使用可能ですが、フィールドブランクとその他のブランクの両方を併せて利用することはできません。**ブランクの数は 10 以上必要**です。繰り返しますが、フィールドブランク、抽出ブランク、1st PCR ブランクの合計ではなく、いずれかが 10 以上です。

1st PCR 用のプライマーは、MiFish (Miya *et al.* 2020, 2015)、MiDeca (Komai *et al.* 2019)、MiMammal (Ushio *et al.* 2017)、MiBird (Ushio *et al.* 2018b)、Amph16S (Sakata *et al.* 2022)、MtInsects-16S (Takenaka *et al.* 2023) などが既に開発されており、対象とする生物群に応じて適宜選択できるようになります。新たに開発する場合は、対象とする生物群、遺伝子座を絞り込んだ上で公共のデータベース上から塩基配列を収集し、変異の多い領域を適度な長さで挟んでいる、変異のほとんどない領域を探して設計することになります。また、1st PCR 用プライマーには、シーケンサの読み始めとなる部分に N を 6 個程度付加することがよくあります。これは、Illumina 社製シーケンサでは読み始めの塩基多様度が低いと蛍光強度が飽和して正常に解読できなくなるためです。一部のプライマー合成業者では、N のほとんどが T になってしまうため、業者の選定に注意する必要があります。

2nd PCR 用のインデックスプライマーは、Illumina 社やサードパーティから既製品が販売されています。また、筆者が開発したものを下記 URL にて公開しています。

- <https://github.com/astanabe/TruSeqStyleIndexPrimers>
- <https://github.com/astanabe/NexteraStyleIndexPrimers>

インデックス部分も塩基多様度が低いと正しく解読することができないため、使用するインデックスの組み合わせは慎重に検討する必要があります。どの位置でも AC と GT の比が 1:1 に近いことが望ましいとされています。特に、混合するサンプルが少ないときに注意が必要です。また、Claident でインデックスホッピングの検出・除去を行うには、各サンプルごとに「片方のインデックスを共有する、未使用のインデックスの組み合わせ」が 10 以上必要です。

内部標準 DNA 溶液は、合成業者から受け取った内部標準 DNA を TE バッファーなどで溶解し、蛍光色素を使用した濃度測定やデジタル PCR によって絶対定量して意図した濃度になるように希釈、混合したものを使用します。二本鎖 DNA 合成サービスとしては、ThermoFisher 社の Strings DNA Fragments や Integrated DNA

Technologies 社の gBlocks といったものがあります。内部標準 DNA として使用する塩基配列は、使用するプライマーで解読できるインサート部分を公共のデータベースから収集し、変異が多い部分を GC 含量が変化しないようにしつつ無作為に 10% 以上変異させ、両端にプライマー配列を連結することで作成します。既知のどの生物からも 10% 以上、できれば 15% 以上異なるようになっていれば理想的です。MiFish プライマー用の内部標準 DNA 塩基配列であれば、Ushio *et al.* (2022) の Appendix S1 に掲載されています。

この先のデータ解析は、**1 ランまたは 1 レーン専有で解読したもの 1 ランまたは 1 レーン分**を仮定して説明します。複数ランまたは複数レーン分のデータがある場合は、後述するインデックスホッピング除去までは 1 ランまたは 1 レーン分のデータごとに解析を行い、それらの結果を `clcclassseqv` コマンドを使用して統合します。

1.2.1 Claident における「サンプル ID」について

ここで、Claident の内部処理におけるサンプル ID について説明しておきます。通常、サンプル ID はユーザーが任意に指定すればいいわけですが、メタバーコーディングでは、同一のサンプルの同一のプライマー増幅産物を複数の異なるシーケンスランでシーケンスしたり、同一のサンプルの異なる複数のプライマーの増幅産物を同一のシーケンスランでシーケンスしたりすることがあるため、これらを識別するために Claident では以下の形式でサンプル ID を記述します。

`RunID__MaterialID__PrimerID`

RunID は、後述する解析コマンドの実行オプションとして指定する任意の文字列です。シーケンスラン (またはレーン) を識別するために使用されますので、ご自分でわかりやすいものにして下さい。PrimerID は、後述するファイルの中で指定する任意の文字列です。こちらは使用したプライマーを識別するために使用されます。MiFish プライマーを使用したのなら、MiFish でいいでしょう。MaterialID は、通常はサンプル ID として扱われる、サンプル物質に対してユーザーが割り当てた任意の文字列です。RunID や PrimerID は異なるが MaterialID が一致する場合、現物、すなわち鋳型 DNA は同一である、ということがわかります。つまり、現物サンプルと Claident でのサンプルは必ずしも 1 対 1 対応ではないため、上記のようなサンプル ID を使用することで対応する現物サンプルがサンプル ID のみでわかるように設計されています。

サンプルにテクニカルレプリケートを設けていることがあると思いますが、DNA 抽出・ライブラリ調製・シーケンスの全ての段階で区別している場合は別サンプルとして扱い、どこかの段階で区別しなく・できなくなるのであれば、同一のサンプルとして扱います。別サンプルとして扱う場合は、MaterialID の末尾に -R1 や -R2 などと付加することで、テクニカルレプリケートであることがわかるようにしておくのが良いでしょう。

なお、RunID・PrimerID・MaterialID には __ (2 個以上連続するアンダーバー) を含めることはできません。また、使用できる文字列は英数字とハイフンとアンダーバーのみです。その他の文字列が使用されていた場合、予期しないエラーが起きる可能性があります。

1.2.2 OTU と ASV について

Amplicon Sequence Variant (ASV) あるいは Exact Sequence Variant (ESV) は、「完全一致する配列、および完全一致すると推定された配列をまとめた分類単位」です。それに対して、Operational Taxonomic Unit (OTU:

操作的分類単位) は、その名の通り、「分析者が任意に設定した分類単位」です。なお、OTU は「塩基配列の類似度でクラスタリングした分類単位」であるという誤解がよくありますが、明らかに語義に反しているので注意して下さい。分析者が ASV を分類単位として解析する、と決めたのであれば、その ASV は OTU です。Claident の中ではほとんどの場合 OTU は ASV になりますが、この先、OTU が ASV でない可能性がある処理では OTU と記述することがあります。

1.2.3 必要なファイル群とディレクトリ構造

ここでは、解析の前に用意する必要のあるファイル群を説明します。ファイル名は任意ですが、後述するコマンドの中で仮定しているファイル名を記してあります。

1.2.3.1 ブランクリスト (blanklist.txt) 1 行に一つのブランクのサンプル ID を記述したテキストファイルです。以下のような形式で記述する必要があります。

```
RunID__BlankMaterialID1__PrimerID
RunID__BlankMaterialID2__PrimerID
RunID__BlankMaterialID3__PrimerID
```

Claident は、このファイルに記載されているものをブランクとして認識します。なお、RunID と PrimerID を省略し、以下の形式で記述することもできます。

```
BlankMaterialID1
BlankMaterialID2
BlankMaterialID3
```

1.2.3.2 濾過水量表 (watervoltable.tsv) 1 行に一つのサンプル ID とタブ文字で区切って濾過水量の数値を記述したタブ区切りテキストファイルです。濾過フィルターが複数あって区別して記述したい場合、タブ文字で区切って複数記述します (濃度推定時は合算して処理されます)。

```
RunID__SampleMaterialID1__PrimerID 1000 1000
RunID__SampleMaterialID2__PrimerID 1000 500
RunID__SampleMaterialID3__PrimerID 1500
RunID__BlankMaterialID1__PrimerID 500
RunID__BlankMaterialID2__PrimerID 500
RunID__BlankMaterialID3__PrimerID 500
```

なお、RunID と PrimerID を省略し、以下の形式で記述することもできます。

```
SampleMaterialID1 1000 1000
SampleMaterialID2 1000 500
SampleMaterialID3 1500
BlankMaterialID1 500
BlankMaterialID2 500
BlankMaterialID3 500
```

この数値を使用して、元の環境水サンプル中における DNA 濃度が推定されます。単位は任意ですが、特段の

理由がない限り mL で記述しておくのが良いでしょう。末尾にタブ文字で区切って任意の文字列を付加することはできるので、単位を書きしておくことも可能です。ただし、単位の異なる数値を換算して単位を統一するような処理には対応していません。

1.2.3.3 抽出 DNA 溶液量表 (solutionvoltable.tsv) 1 行に一つのサンプル・ブランク ID とタブ文字で区切って抽出した DNA 溶液量の数値を記述したタブ区切りテキストファイルです。濾過フィルターが複数あり、抽出後の DNA 溶液も複数あって区別して記述したい場合、タブ文字で区切って複数記述します (濃度推定時は合算して処理されます)。

```
RunID__SampleMaterialID1__PrimerID 200 200
RunID__SampleMaterialID2__PrimerID 200 200
RunID__SampleMaterialID3__PrimerID 200
RunID__BlankMaterialID1__PrimerID 200
RunID__BlankMaterialID2__PrimerID 200
RunID__BlankMaterialID3__PrimerID 200
```

なお、RunID と PrimerID を省略し、以下の形式で記述することもできます。

```
SampleMaterialID1 200 200
SampleMaterialID2 200 200
SampleMaterialID3 200
BlankMaterialID1 200
BlankMaterialID2 200
BlankMaterialID3 200
```

この数値を使用して、抽出した DNA 溶液中の総 DNA コピー数が推定されます。単位は任意ですが、特段の理由がない限り μL で記述しておくのが良いでしょう。末尾にタブ文字で区切って任意の文字列を付加することはできるので、単位を書きしておくことも可能です。ただし、単位の異なる数値を換算して単位を統一するような処理には対応していません。

なお、「DNA 抽出で回収できた液量」ではなく、「DNA 溶出に使用した液量」であることに注意して下さい。つまり、スピナラムや磁気ビーズに $200\ \mu\text{L}$ の溶出バッファーを添加して、最終的に得られた DNA 抽出液が $190\ \mu\text{L}$ だった場合、回収できなかっただけで実際にはさらに $10\ \mu\text{L}$ の DNA 抽出液が存在するので、ここには $200\ \mu\text{L}$ と書くのが正しいことになります。ただし、DNA の溶出前に使用したウォッシュバッファーは完全に除去したと仮定しています。

1.2.3.4 内部標準 DNA 塩基配列 (standard.fasta) FASTA 形式の内部標準 DNA 塩基配列ファイルです。複数の配列を記述することができます。以下は 4 つの内部標準 DNA 塩基配列を含む FASTA ファイルの例です。

```
>MiFish_STD_01
CACCGCGGTTATACGACAGGCCCAAGTTGAACGCGAGTCGGCGTAAAGAGTGGTTAAAAG...
>MiFish_STD_02
CACCGCGGTTATACGACAGGCCCAAGTTGATCTTGAACGCGTAAAGAGTGGTTAGATT...
>MiFish_STD_03
CACCGCGGTTATACGACAGGCCCAAGTTGAAGCGACGCGCGTAAAGAGTGGTTATCAC...
```



```
>MiFish_STD_04-2
CACCGCGGTTATACGACAGGCCCAAGTTGAGATCCCACGGCGTAAAGAGTGGTTAGAAC...
```

この塩基配列に基づいて内部標準 DNA が識別されます。塩基配列は、合成サービスに対して注文時に使用したものと同一、つまりプライマーのアニールする部位を含んでいても構いませんし、含んでいなくても（つまり、インサートであっても）構いません。内部標準 DNA の配列名は、後述する内部標準 DNA 濃度表と一致している必要があります。

1.2.3.5 内部標準 DNA 濃度表 (stdconctable.tsv) サンプルごとに、1st PCR で添加した内部標準 DNA の濃度を記述したタブ区切りテキストファイルです。以下のような表形式にします。

samplename	MiFish_STD_01	MiFish_STD_02	MiFish_STD_03	MiFish_STD_04-2
RunID__SampleMaterialID1__PrimerID 5	10	20	40	
RunID__SampleMaterialID2__PrimerID 5	10	20	40	
RunID__SampleMaterialID3__PrimerID 5	10	20	40	
RunID__BlankMaterialID1__PrimerID 5	10	20	40	
RunID__BlankMaterialID2__PrimerID 5	10	20	40	
RunID__BlankMaterialID3__PrimerID 5	10	20	40	

なお、RunID と PrimerID を省略し、以下の形式で記述することもできます。

samplename	MiFish_STD_01	MiFish_STD_02	MiFish_STD_03	MiFish_STD_04-2
SampleMaterialID1 5	10	20	40	
SampleMaterialID2 5	10	20	40	
SampleMaterialID3 5	10	20	40	
BlankMaterialID1 5	10	20	40	
BlankMaterialID2 5	10	20	40	
BlankMaterialID3 5	10	20	40	

濃度の単位は 1 μ L 当たりのコピー数です。ただし、これはサンプル DNA 溶液と等量の内部標準 DNA 溶液を添加して 1st PCR を行ったと仮定しています。したがって、サンプル DNA 溶液の 2 倍の内部標準 DNA 溶液を添加した場合は数値を 2 倍に、サンプル DNA 溶液を 10 倍希釈して希釈液と等量の内部標準 DNA 溶液を添加した場合は数値を 10 倍に、サンプル DNA 溶液も内部標準 DNA 溶液もどちらも 10 倍希釈して混合して PCR した場合は 1 倍にします。内部標準 DNA の名前は、前述の内部標準 DNA 塩基配列の名前と一致している必要があります。

1.2.3.6 シーケンサの読み始めになる部分配列 (forwardprimer.fasta・reverseprimer.fasta) 1st PCR におけるフォワード側とリバース側のそれぞれのプライマー配列の一部を記述した FASTA 形式ファイルです。2nd PCR におけるインデックスプライマーがアニールする部位を取り除くことで、シーケンサの解読対象になる部分だけにします。つまり、1st PCR でフォワード側プライマーとして MiFish-U-F ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGTCGGTAAAACTCGTGCCAGC を使用した場合、NNNNNNGTCGGTAAAACTCGTGCCAGC を塩基配列として記述します。いずれのファイルにも複数のプライマー配列を記述することができますが、フォワード側プライマー配列ファイルの 1 本目のプライマー配列はリバース

側プライマー配列ファイルの 1 本目のプライマー配列とセットで検出されるため、リバーズ側プライマー配列ファイルの 2 本目以降のプライマー配列との組み合わせは検討されません。塩基配列には、R や Y や M や K や N などの、縮重塩基コードを使用可能です。MiFish のように僅かに異なる塩基配列のプライマーが提案されており、それらを複数混合して使用した場合、多重整列を行って縮重コンセンサス配列を記述します。例えば、MiFish-E-v2 と MiFish-U と MiFish-U2 を混合して使用した場合、フォワード側プライマー配列ファイル「forwardprimer.fasta」の内容は以下のようになります。

```
>MiFish
NNNNNNNGYYGGTAAAWCTCGTGCCAGC
```

上記の縮重コンセンサス配列の元になった配列は以下の通りです (見やすくするため整列してあります)。

```
>MiFish-E-F-v2
NNNNNNRGTTGGTAAATCTCGTGCCAGC
>MiFish-U-F
NNNNNGTCGGTAAACTCGTGCCAGC
>MiFish-U2-F
NNNNNGCCGGTAAACTCGTGCCAGC
```

リバーズ側プライマー配列ファイル「reverseprimer.fasta」は以下のようになります。

```
>MiFish
NNNNNNNCATAGKRGGGTRTCTAATCCYMGTTTG
```

上記の縮重コンセンサス配列の元になった配列は以下の通りです (見やすくするため整列してあります)。

```
>MiFish-E-R-v2
NNNNNNGCATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG
>MiFish-U-R
NNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
>MiFish-U2-R
NNNNNNCATAGGAGGGTGTCTAATCCCGTTTG
```

これらのファイルの塩基配列名は、Claident のサンプル ID における PrimerID として使用されますので、上述のファイル群における PrimerID と一致している必要があります。

1.2.3.7 インデックスとして読まれる部分配列 (index1.fasta・index2.fasta) 2nd PCR におけるインデックスプライマーのインデックスとして解読される部分のみを取り出した FASTA 形式のファイルです。index2 (i5 index) はフォワード側インデックスプライマー内のインデックスで、解読の向きは機種によって異なります。index1 (i7 index) はリバーズ側インデックスプライマー内のインデックスで、発注時のプライマー配列とは逆向きに解読されます。Illumina 社シーケンサで使用される「SampleSheet.csv」内のインデックス配列は、解読方向が標準化されたものになっているので、これを取り出せば良いはずで、リバーズ側インデックス配列ファイル「index1.fasta」の内容は以下のようになります。

```
>SampleMaterialID1
ACCTGCAA
>SampleMaterialID2
GTCCTTG
```

```
>SampleMaterialID3
CCAGATCT
>BlankMaterialID1
AAGTGTGA
>BlankMaterialID2
CCATGATC
>BlankMaterialID3
TCATGTCT
```

フォワード側インデックス配列ファイル「index2.fasta」も塩基配列が異なる以外は「index1.fasta」と内容は同じです。配列の名前が MaterialID と一致すること、配列の並び順が完全に同一であることが必要ですので注意して下さい。

なお、インデックスホッピング除去の機能を使用するためには、シーケンスランに投入された**全てのインデックスの情報が必要**です。「ライブラリ調製作業中やシーケンス後に問題が発覚して廃棄することになったサンプル」が存在した場合でも、そのサンプルのデータにはインデックスホッピング除去に使用する情報が含まれています。したがって、そのようなサンプルが存在した場合でも、インデックスホッピング除去が完了するまではデータを廃棄してはいけません。

1.2.3.8 未デマルチプレックス FASTQ 通常、受託解析業者に依頼すると「SampleSheet.csv」の内容に合わせてデマルチプレックス済みの FASTQ ファイルを納品されることが多いでしょう。しかし、Illumina 社製のデマルチプレックスプログラムはあまりに多くのサンプルを 1 シーケンスランや 1 レーンにマルチプレックスすると正常にデマルチプレックスできなかったり、インデックスの塩基の信頼性を考慮していなかったり、1 塩基の読み間違い (不一致) を許容する設定であったり、「未使用のインデックスの組み合わせ」の塩基配列は全て破棄されてインデックスホッピングの検出に対応できなくなるため、Claident では内蔵するデマルチプレックスプログラム clsplitseq でのデマルチプレックスを推奨しています。

clsplitseq でのデマルチプレックスを行うには、Linux マシンに Illumina 社が提供する BCL Convert というプログラムをインストールし、シーケンサのランデータからインデックス配列を含む未デマルチプレックス FASTQ を生成する必要があります。以下の作業における作業ディレクトリは、高速な SSD に設置することを強くお勧めします。

BCL Convert は下記 URL からダウンロードできます。

- https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/bcl-convert.html

執筆時点での最新版は v4.2.4 です。Debian・Ubuntu・Linux Mint および Windows 上にインストールした Ubuntu の場合、(Oracle 8) と書かれている配布ファイルをダウンロードして作業ディレクトリ「workingdirectory」に置き、ターミナルで以下のコマンドを実行することでインストールできます。

```
sudo apt install rpm2cpio cpio pstack
cd workingdirectory
mkdir temporary
cd temporary
rpm2cpio ../bcl-convert-4.2.4-2.el8.x86_64.rpm | cpio -id
```

```

sudo mkdir -p /usr/local/bin
sudo cp usr/bin/bcl-convert /usr/local/bin/
sudo mkdir -p /var/log/bcl-convert
sudo chmod 777 /var/log/bcl-convert
cd ..
rm -rf temporary bcl-convert-4.2.4-2.el8.x86_64.rpm

```

なお、このプログラムは macOS には対応していません。macOS 上で実行するには、仮想マシンプログラムをインストールして仮想マシン上に Linux をインストールし、その Linux 上に BCL Convert をインストールする必要があります。

BCL Convert で未デマルチプレックス FASTQ を生成するには、下記の内容の「Dummy.csv」をテキストエディタで作成します。

```

[Header]
FileFormatVersion,2
[BCLConvert_Settings]
OverrideCycles,Y150N1;I8;I8;Y150N1
CreateFastqForIndexReads,1
[BCLConvert_Data]
Lane,Sample_ID,index,index2
1,Dummy,CCCCCCCC,CCCCCCCC

```

ターミナルで下記のコマンドを実行すれば、テキストエディタがなくても「Dummy.csv」を作成できます。

```

echo '[Header]
FileFormatVersion,2
[BCLConvert_Settings]
OverrideCycles,Y150N1;I8;I8;Y150N1
CreateFastqForIndexReads,1
[BCLConvert_Data]
Lane,Sample_ID,index,index2
1,Dummy,CCCCCCCC,CCCCCCCC' > Dummy.csv

```

これは、8 塩基長のデュアルインデックスでフォワード側 151 サイクル (末尾 1 塩基破棄)、リバーズ側 151 サイクル (末尾 1 塩基破棄) の場合の設定ファイルですので、インデックス長やサイクル数が異なる場合は適宜変更する必要があります。ダミーのサンプルとして、index1 および index2 が共に CCCCCCCC の Dummy というサンプルの行があります。サンプル行が一つもないとエラーになるため、このような行を作成する必要があります。万が一、index1 および index2 が共に CCCCCCCC のサンプル、index1 が CCCCCCCC のサンプル、index2 が CCCCCCCC のサンプルのいずれかが実在する場合は適当な配列に書き換えて下さい。index1 および index2 が共に CCCCCCCC のサンプルが実在しないのにサンプル Dummy の FASTQ にいくらかデータが出力されることがありますが、index1 および index2 が共に CCCCCCCC のサンプルが本当に実在しないのなら、シーケンスエラーによるものなので問題はありません。なお、インデックスの長さが 8 塩基ではない場合は、OverrideCycles の行と CCCCCCCC は書き換える必要があります。例えば 10 塩基長のデュアルインデックスでフォワード側 301 サイクル (末尾 1 塩基破棄)、リバーズ側 301 サイクル (末尾 1 塩基破棄) の場合、OverrideCycles,Y300N1;I10;I10;Y300N1 および CCCCCCCCCC とします。

FASTQ 生成の際にこのファイルを --sample-sheet に指定することで、BCL Convert に内蔵されているデマルチプレックス機能を無効化し、未デマルチプレックス FASTQ を作成することができます。以下のコマンド

では、未デマルチプレックス FASTQ を「01_undemultiplexed」ディレクトリに出力することができます。

```
bcl-convert \  
--sample-sheet Dummy.csv \  
--bcl-input-directory RunDataDirectory \  
--output-directory 01_undemultiplexed
```

ここで、RunDataDirectory は、シーケンサ本体、またはシーケンサに付属の解析マシンに保存されている、シーケンスランのデータが保存されているディレクトリです。通常は「Data」というディレクトリが含まれているはずです。このディレクトリを予め BCL Convert をインストールしたマシンにコピーしておく必要があります。なお、使用する CPU 数はデフォルトで自動的に決定されます (搭載されている全 CPU を使用します)。

上記の例ではレーンが一つしかない機種を想定しています。レーンが複数ある機種のデータを扱う場合、「Dummy.csv」の [BCLConvert_Data] セクションに記述するサンプルは下記のようにレーン数に合わせて増やす必要があります。

```
[Header]  
FileFormatVersion,2  
[BCLConvert_Settings]  
OverrideCycles,Y150N1;I8;I8;Y150N1  
CreateFastqForIndexReads,1  
[BCLConvert_Data]  
Lane,Sample_ID,index,index2  
1,Dummy1,CCCCCCCC,CCCCCCCC  
2,Dummy2,CCCCCCCC,CCCCCCCC  
3,Dummy3,CCCCCCCC,CCCCCCCC  
4,Dummy4,CCCCCCCC,CCCCCCCC
```

また、--bcl-only-lane オプションを使用することで、特定のレーンのみのデータから未デマルチプレックス FASTQ を生成できます。1 番目のレーンのデータだけを未デマルチプレックス FASTQ にする場合、--bcl-only-lane 1 とします。このオプションを指定しない場合は全レーンのデータがレーンごとに異なるファイルに出力されます。

上述の通りに BCL Convert を実行すると、サンプル Dummy のファイル以外に以下の 4 ファイルが生成されます (第 1 レーンのみ出力した場合)。

Undetermined_S0_L001_I1_001.fastq.gz index1 の未デマルチプレックス FASTQ (長さ 8 塩基)
Undetermined_S0_L001_I2_001.fastq.gz index2 の未デマルチプレックス FASTQ (長さ 8 塩基)
Undetermined_S0_L001_R1_001.fastq.gz インサートのフォワード側リードの未デマルチプレックス FASTQ (長さ 150 塩基)
Undetermined_S0_L001_R2_001.fastq.gz インサートのリバーズ側リードの未デマルチプレックス FASTQ (長さ 150 塩基)

ファイル名のうち、「L001」がレーン番号を表していますので、第 2 レーン以降を出力した場合はファイル名が異なります。

1.2.3.9 ディレクトリ構造 Claident での解析開始前の作業ディレクトリ内のファイルとディレクトリは以下の通りです。

- 作業ディレクトリ
 - blanklist.txt
 - watervoltable.tsv
 - solutionvoltable.tsv
 - standard.fasta
 - stdconctable.tsv
 - forwardprimer.fasta
 - reverseprimer.fasta
 - index1.fasta
 - index2.fasta
 - 01_undemultiplexed (ディレクトリ)
 - * Undetermined_S0_L001_I1_001.fastq.gz
 - * Undetermined_S0_L001_I2_001.fastq.gz
 - * Undetermined_S0_L001_R1_001.fastq.gz
 - * Undetermined_S0_L001_R2_001.fastq.gz

1.3 塩基配列データ処理

ここから実際の塩基配列データ処理の方法を説明していきます。全てのコマンドはターミナル上で実行します。作業ディレクトリがカレントディレクトリになっていると仮定しています。コマンドのオプションに含まれている `NumberOfCPUcores` は処理中に使用する CPU コア数の整数値で置き換えて下さい。これ以前に説明済みのファイルに関しては改めて説明しません。また、いくつかの処理ではディスクに激しくアクセスするため、低速なディスクに作業ディレクトリを設置していると大きく影響を受けます。そのため、作業ディレクトリは高速な SSD に設置することを強くお勧めします。

1.3.1 clsplitseq によるデマルチプレックス

デマルチプレックスを行うには、以下のコマンドを実行します。

```
clsplitseq \  
--runname=RunID \  
--forwardprimerfile=forwardprimer.fasta \  
--reverseprimerfile=reverseprimer.fasta \  
--truncateN=enable \  
--index1file=index1.fasta \  
--index2file=index2.fasta \  
--minqualtag=30 \  
--compress=xz \  

```

```
--seqnamestyle=illumina \
--numthreads=NumberOfCPUcores \
01_undemultiplexed/Undetermined_S0_L001_R1_001.fastq.gz \
01_undemultiplexed/Undetermined_S0_L001_I1_001.fastq.gz \
01_undemultiplexed/Undetermined_S0_L001_I2_001.fastq.gz \
01_undemultiplexed/Undetermined_S0_L001_R2_001.fastq.gz \
02_demultiplexed
```

それぞれのコマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

```
--runname  任意の RunID を与える
--forwardprimerfile  フォワード側プライマー配列ファイル
--reverseprimerfile  リバース側プライマー配列ファイル
--truncateN  プライマー配列の一致度を算出する際にプライマー配列先頭の N 群を除外するか否か
--index1file  リバース側インデックス配列ファイル
--index2file  フォワード側インデックス配列ファイル
--minqualtag  インデックス配列の品質値下限
--compress  圧縮形式の指定 (GZIP | BZIP2 | XZ | DISABLE から選択)
--seqnamestyle  塩基配列名の形式 (ILLUMINA | MGI | OTHER | NOCHANGE から選択)
```

コマンドラインオプション後に入力ファイル群、出力フォルダ名を与えます。

なお、入力ファイルは以下の順で指定します。

1. インサートのフォワード側リードの未デマルチプレックス FASTQ
2. index1 の未デマルチプレックス FASTQ
3. index2 の未デマルチプレックス FASTQ
4. インサートのリバース側リードの未デマルチプレックス FASTQ

これは、Illumina 社シーケンサが解読する順になっています。

このコマンドでは、インデックス配列だけでなくプライマー配列も使用してデマルチプレックスを行うため、インデックス配列のみを使う場合よりも細かくデマルチプレックスすることが可能です。したがって、他のプライマーの増幅産物が混入しているデータでも、プライマー配列が十分異なっていればそれらを分けることができます。

このコマンドでは、「未使用のインデックスの組み合わせ」を MaterialID とするサンプルの塩基配列も出力されます。後述するインデックスホッピングの検出・除去処理においてそれらのサンプルが使用されます。

出力されたファイルからは、プライマー配列のマッチした部分は除去されています。これは、その部分はプライマーの塩基配列であって、実際の生物の塩基配列ではないからです。

データサイズが大きいと、この処理は非常に長い時間がかかります。

なお、未デマルチプレックス FASTQ が手元になく、デマルチプレックス済 FASTQ しかない場合、`cltruncprimer` が使用できます。--minqualtag オプションが無効 (書いても構わないが影響しない)、

入力はデマルチプレックス済 FASTQ を置いているフォルダにする、という点以外は `clsplitseq` コマンドと使用方法は同じです。ただし、インデックス配列ファイル内の `MaterialID` がデマルチプレックス済 FASTQ のファイル名に含まれている必要があります。デマルチプレックス済 FASTQ は「未使用のインデックスの組み合わせ」の塩基配列は全て破棄されているためインデックスホッピングの検出には対応できません。予め「未使用のインデックスの組み合わせ」の塩基配列を保存してあっても、`Claident` が「未使用のインデックスの組み合わせ」を「未使用のインデックスの組み合わせ」として認識させる方法が存在しませんので、対応は不可能です。

また、`clsplitseq` でデマルチプレックスを行った場合でも、各サンプルごとに「片方のインデックスを共有する、未使用のインデックスの組み合わせ」が 10 以上になるようなライブラリ調製を行っていない場合、インデックスホッピング除去は適用できません。インデックスホッピング除去を適用するには、各サンプルごとに「片方のインデックスを共有する、未使用のインデックスの組み合わせ」が 10 以上になるライブラリ調製と、1 ランまたは 1 レーン専有でのシーケンス、`clsplitseq` によるデマルチプレックスを行うこと、を全て満たす必要があります。

1.3.2 `clconcatpairv` によるペアエンド配列の連結

デマルチプレックスが終わったら、以下のコマンドでペアエンド配列を連結します。

```
clconcatpairv \  
--mode=ovl \  
--compress=xz \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
02_demultiplexed \  
03_concatenated
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

`--mode` Overlapped Paired-End か Non-overlapped Paired-End なのか (OVL | NON から選択)

`--compress` 圧縮形式の指定 (GZIP | BZIP2 | XZ | DISABLE から選択)

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

1.3.3 `clfilterseqv` による低品質配列の除去

以下のコマンドで連結した配列に対して品質値から予想される期待エラー数を算出し、低品質の配列を除去します (Edgar & Flyvbjerg 2015)。

```
clfilterseqv \  
--maxqual=41 \  
--minlen=100 \  
--maxlen=250 \  
--maxnee=2.0 \  
--maxnNs=0 \  
--compress=xz \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
03_concatenated \  
04_filtered
```


コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

```
--maxqual 品質値の上限 (超えた値はこの値になる)
--minlen 塩基配列長の下限
--maxlen 塩基配列長の上限
--maxnee 期待エラー数上限
--maxnNs 塩基配列中の N の数の上限
--compress 圧縮形式の指定 (GZIP | BZIP2 | XZ | DISABLE から選択)
```

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

ここで品質値の上限を指定しているのは、後述するデノイジングの際にあまりに品質値が大きい配列があるとエラーになることがあるためです。期待エラー数の多い配列や N を含む配列を除外しているのも同じ理由です。塩基配列長の上限下限は事前に予想されるインサート長に基づいて決定します。データから期待エラー数上限や塩基配列長の上限下限を決めたい場合、`clcalcfastqstatv` コマンドの出力を参考にすると良いかもしれません。

1.3.4 cldenoiseqseqd によるデノイジング

以下のコマンドで DADA2 (Callahan *et al.* 2016) によるデノイジング処理を適用します。

```
cldenoiseqseqd \
--pool=pseudo \
--numthreads=NumberOfCPUcores \
04_filtered \
05_denoised
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

```
--pool サンプルのプール方法を指定 (ENABLE | DISABLE | PSEUDO から選択)
```

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

サンプルのプールを有効化すると、デノイジング効率は向上しますが、サンプル数が多いほど計算量が膨大になります。無効化すればデノイジング効率が低下してしまうため、DADA2 開発者が用意している Pseudo-pooling 法をここでは使用しています (Prior は使用していません)。Pseudo-pooling 法に関しては DADA2 の公式 Web サイトをご参照下さい。

1.3.5 clremovechimev によるキメラ除去 1 回目

以下のコマンドで VSEARCH (Rognes *et al.* 2016) に実装されている UCHIME3 アルゴリズム (Edgar 2016) を使用したキメラ配列検出・除去を適用します。

```
clremovechimev \
--mode=both \
--uchimedenovo=3 \
--referencedb=cdu12s \
--addtoref=standard.fasta \
```

```
05_denoised \  
06_chimeraremoved
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--mode 動作モードを指定 (BOTH | DENOVO | REF から選択)
--uchimedenovo UCHIME de novo のバージョンを指定 (1 | 2 | 3 から選択)
--referencedb 参照配列データベース
--addtoref 参照配列データベースに追加する参照配列ファイル

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

--mode=both では、参照配列データベースを用いないキメラ除去と参照配列データベースを用いるキメラ除去の両方をそれぞれ実行して、どちらにおいてもキメラではないと判定された配列を残して、それ以外は除去します。参照配列データベースを用いないキメラ除去法である UCHIME de novo は異なる 3 つのバージョンがありますが、デノイズングした塩基配列に対して最適化されているのは UCHIME3 なので、--uchimedenovo ではそれを選択しています。参照配列データベースを用いたキメラ除去モードでは、参照配列データベースを指定してやる必要があります。Claident のインストーラで自動インストールされる参照配列データベースは以下の通りです。

cdu12s ミトコンドリア 12S 用
cdu16s ミトコンドリア 16S 用
cducox1 ミトコンドリア COX1(COI) 用
cducytb ミトコンドリア Cyt-b 用
cdudloop ミトコンドリア D-loop(調節領域) 用
cdumatk 葉緑体 matK 用
cdurbcl 葉緑体 rbcL 用
cdutrnhpsba 葉緑体 trnH-psbA 用

キメラ除去用参照配列データベースは「**インストール先/share/claident/uchimedb**」にあるため、このフォルダの内容を見ればインストールされている参照配列データベースがわかります。

手動でインストールする必要がありますが、細菌 16S には SILVA の SSURef や SSUParc、真菌 ITS には UNITE の Full UNITE+INSD dataset for eukaryotes を推奨します。MiFish で増幅されるのはミトコンドリア 12S 領域の一部なので、cdu12s を使用します。名前が cdu から始まるキメラ検出用参照配列データベースは、筆者が公共データベースの完全長または完全長に近い長さのミトコンドリアゲノム・葉緑体ゲノム配列から当該領域を切り出したものです。完全長または完全長に近いデータはキメラである可能性は低いだろうという仮定に基づいています。

内部標準 DNA を添加して行う PCR では、内部標準 DNA と内部標準 DNA 間のキメラや、内部標準 DNA と生物の DNA 間のキメラも形成されます。そこで、内部標準 DNA 配列 (「standard.fasta」に含まれている) を --addtoref で参照配列に追加することで、キメラの検出力向上を狙っています。

参照配列データベースに適したものがなく、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行っ

ている場合は、内部標準 DNA 配列 (「standard.fasta」に含まれている) を --referencedb に指定して --mode=both でキメラ除去を行って下さい。その際は --addtoref は不要です。

参照配列データベースに適したものがなく、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行っていない場合は --mode=both の代わりに --mode=denovo として参照配列データベースを用いないキメラ除去だけを実行します。この場合も --addtoref は不要です。ただし、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行ったことのあるラボでライブラリ調製を行っている場合、増幅された内部標準 DNA でラボが汚染されていて、PCR の際に混入する可能性があります。そのため、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行った場合と同様のデータ解析を念のため行っておいた方が良いでしょう。

1.3.6 clclusterstdv による内部標準配列クラスタリング

以下のコマンドで VSEARCH (Rognes *et al.* 2016) に実装されている UCLUST アルゴリズム (Edgar 2010) を使用して内部標準配列にマッチする塩基配列をひとまとめにします。

```
clclusterstdv \  
--standardseq=standard.fasta \  
--minident=0.9 \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
06_chimeraremoved \  
07_stdclustered
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--standardseq 内部標準 DNA 塩基配列ファイル
--minident 内部標準 DNA と判定する類似度の下限

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

内部標準 DNA と判定する類似度の下限は、内部標準配列と実在する生物の塩基配列の類似度最大値が低い (0.85 未満) 場合には 0.9 程度で問題ないでしょう。Ushio *et al.* (2022) の Appendix S1 に掲載されている MiFish 用内部標準配列はこの条件を満たしています。内部標準配列と実在する生物の塩基配列の類似度が高く (0.85 以上)、内部標準 DNA の合成エラー率が低いと期待できる場合は 0.97 程度まで値を大きくしても構いません。内部標準 DNA の合成エラー率が低いと期待できるかどうかは、合成業者の公称エラー率や合成方法などから判断します。判断が難しい場合は、値を 0.90~0.97 の範囲で 0.01 間隔で変化させ、内部標準 DNA と判定されるリード数が急激に変化するところを探し、変化点の小さい方に設定します。内部標準 DNA と判定されるリード数が急激に変化するところが見つからない場合、内部標準 DNA の合成エラー率が非常に高い、または内部標準配列に似た配列を持った生物の配列が含まれている、またはその両方であり定量は不可能と考えられるため、内部標準 DNA の合成を業者に依頼するところから全てやり直す必要があります。合成された内部標準 DNA と生物の DNA の区別ができないので、非定量メタバーコーディングとしてもデータを使用することはできません。

なお、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行っていない場合はこの処理は飛ばします。ただし、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行ったことのあるラボでライブラリ調製を行っている場合、増幅された内部標準 DNA でラボが汚染されていて、PCR の際に混入する可能性があります。その

ため、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行った場合と同様のデータ解析を念のため行っておいた方が良いでしょう。

1.3.7 clremovechimev によるキメラ除去 2 回目

以下のコマンドで VSEARCH (Rognes *et al.* 2016) に実装されている UCHIME アルゴリズム (Edgar *et al.* 2011) を使用したキメラ配列検出・除去を適用します。

```
clremovechimev \  
--mode=ref \  
--referencedb=cdu12s \  
--addtoref=07_stdclustered/stdvariations.fasta \  
--numthreads=NumberOfCPUCores \  
07_stdclustered \  
08_chimeraremoved
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--mode 動作モードを指定 (BOTH | DENOVO | REF から選択)
--referencedb 参照配列データベース
--addtoref 参照配列データベースに追加する参照配列ファイル

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

--mode=ref は参照配列データベースを用いたキメラ除去モードを指します。キメラ除去用参照配列データベースについてはキメラ除去 1 回目の節を参照して下さい。

内部標準 DNA を添加して行う PCR では、内部標準 DNA と内部標準 DNA 間のキメラや、内部標準 DNA と生物の DNA 間のキメラも形成されます。そこで、内部標準 DNA と判定された配列群 (「07_stdclustered/stdvariations.fasta」に含まれている) を --addtoref で参照配列に追加することで、キメラの検出力向上を狙っています。「standard.fasta」(合成業者に依頼した際の配列、すなわち合成エラーを一切含まない配列) ではなく「07_stdclustered/stdvariations.fasta」(不一致をある程度許容して内部標準配列と判定された配列、すなわち合成エラーを含む内部標準配列) を使用するの、合成エラーのある内部標準 DNA と合成エラーのある内部標準 DNA 間のキメラや合成エラーのある内部標準 DNA と生物の DNA 間のキメラをできるだけ検出するためです。

参照配列データベースに適したものがなく、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行っている場合は、内部標準 DNA と判定された配列群 (「07_stdclustered/stdvariations.fasta」に含まれている) を --referencedb に指定してキメラ除去を行って下さい。その際は --addtoref は不要です。

参照配列データベースに適したものがなく、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行っていない場合はこの処理は不要です。ただし、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行ったことのあるラボでライブラリ調製を行っている場合、増幅された内部標準 DNA でラボが汚染されていて、PCR の際に混入する可能性があります。そのため、内部標準 DNA を混合して PCR するライブラリ調製を行った場合と同様のデータ解析を念のため行っておいた方が良いでしょう。

1.3.8 clremovecontam によるインデックスホッピング除去

以下のコマンドで、Esling *et al.* (2015) の方法に基づくインデックスホッピング除去を適用します。

```
clremovecontam \  
--test=thompson \  
--ignoresamplelist=blanklist.txt \  
--index1file=index1.fasta \  
--index2file=index2.fasta \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
08_chimeraremoved \  
09_hoppingremoved
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--test 検定方法を指定 (THOMPSON | BINOMIAL から選択)

--ignoresamplelist インデックスホッピング除去の対象外にするサンプル ID リストを記したテキストファイル

--index1file リバース側インデックス配列ファイル (clsplitseq に与えたものと同じ)

--index2file フォワード側インデックス配列ファイル (clsplitseq に与えたものと同じ)

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

このコマンドは、各サンプルに対して、「片方のインデックスを共有する、未使用のインデックスの組み合わせ」(共有していない方のインデックスのインデックスホッピングによって生じたものである可能性がある) におけるその ASV のリード数に対して、サンプルにおける ASV のリード数が外れ値でないのであれば、それはインデックスホッピング由来であると判定して 0 に置換します。

なお、ブランクからインデックスホッピングを除去してしまうと、次節で行うネガティブコントロールを利用したデコンタミネーションの際に使用する情報が失われてしまい支障を来すため、**--ignoresamplelist** を使用して処理の対象外とします。

インデックスホッピング除去の要件を満たしていない場合はこの処理は飛ばします。

1.3.9 clremovecontam とネガティブコントロールを利用したデコンタミネーション

以下のコマンドでは、サンプルとフィールドブランクにおける環境水中の各 ASV の DNA 濃度を算出し、サンプルにおける DNA 濃度が外れ値でないならば、それはコンタミネーション由来であると判定して 0 に置換します。

```
clremovecontam \  
--test=thompson \  
--blanklist=blanklist.txt \  
--ignoreotuseq=standard.fasta \  
--stdconctable=stdconctable.tsv \  
--solutionvtable=solutionvtable.tsv \  
--watervtable=watervtable.tsv \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  

```

```
09_hoppingremoved \  
10_decontaminated
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--test 検定方法を指定 (THOMPSON | BINOMIAL から選択)
--blanklist ブランクのサンプル ID リストを記したテキストファイル
--ignoreotuseq デコンタミネーションの対象外にする OTU の塩基配列ファイル
--stdconctable 内部標準 DNA 濃度表のタブ区切りテキスト
--solutionvoltable 抽出 DNA 溶液量表のタブ区切りテキスト
--watervoltable 濾過水量表のタブ区切りテキスト

コマンドラインオプションに引き続いて、入力フォルダ、出力フォルダを指定します。

滅多に起きることはありませんが、内部標準配列が誤って除去されることを防ぐため、上記の例では内部標準配列をデコンタミネーションの対象外とするように --ignoreotuseq を使用しています。

なお、抽出 DNA 溶液量表と濾過水量表がなく、内部標準 DNA 濃度表のみが与えられた場合、環境水中の DNA 濃度の代わりに抽出 DNA 溶液中の DNA 濃度を算出し、その値に基づいてデコンタミネーションを行います。抽出 DNA 溶液量表も濾過水量表も内部標準 DNA 濃度表もない場合、リード数の値をそのまま使用してデコンタミネーションを行います。内部標準 DNA 濃度を使用した濃度推定値を使用する場合、ライブラリ調製において濃度均一化処理などを行っていても適用可能ですが、リード数の値をそのまま使用する場合、1) ライブラリ調製の過程で濃度均一化処理を一切行っていない、2) PCR の合計サイクル数は最小限に留めている (どのサンプルもプラトーに達していない)、必要があります。

もし、野外での採集から DNA 抽出およびライブラリ調製の過程で大量のコンタミネーションが起こっていた場合、フィールドブランクからも多くの DNA が検出され、結果としてサンプルから検出された DNA がごとくコンタミネーション由来であると判定されて 0 に置換される可能性があります。これは意図した動作なのですが、0 に置換される件数があまりにも多いと、群集生態学的な分析を一切行うことができなくなります。せっかく多くの費用と労力を費やして得たデータがコンタミネーションだらけで使用できない、ということがここで判明するのはあまりにも悲しいことですので、採集からライブラリ調製におけるコンタミネーション防止には細心の注意を払うようにしましょう。

塩基配列データ処理はここまでとなりますが、ここまでで得られた ASV をさらにクラスタリングしてまとめたい場合があると思います。そのような場合は、clclasseqv コマンドで追加のクラスタリングを行うことができます。また、複数のシーケンスランの結果をまとめて解析を行いたい場合にも、ここまでの結果を clclasseqv を用いて統合することができます。

デノイズング以降、以下のようなファイルが出力フォルダには作成されています (ただし～は 3 ファイルで共通)。

～.fasta この時点での ASV・OTU の塩基配列ファイル
～.otu.gz この時点での ASV・OTU の所属を記録したファイル
～.tsv この時点での ASV・OTU の各サンプルでのリード数表のタブ区切りテキスト

上記タブ区切りテキストの内容を追跡することで、各処理によって起きた変化がわかります。

1.4 分子同定

ここでは、QCauto 法と 95%-3NN 法 (Tanabe & Toju 2013) に基づく分子同定の手順を示します。QCauto 法は誤同定の非常に少ない方法ですが、その代わり種や属などの低レベル分類階層が「unidentified」になりやすい性質があります。95%-3NN 法は種や属などの低レベル分類階層まで同定できることが多いですが、参照配列データベースの整備状況次第では誤同定が多くなってしまう性質があります。MiFish によるメタバーコーディングを日本の淡水域や日本近海のサンプルで行う場合、千葉県立博物館のグループによって参照配列データベースがよく整備されているため、95%-3NN 法でもそれほど問題は生じません。しかし、それ以外の参照配列データベースの網羅度が十分でない状況では、QCauto 法の結果を使用することを推奨します。

この先に進む前に、以下のコマンドで作業ディレクトリに分子同定の出力ディレクトリを作成しておきます。

```
mkdir 11_taxonomy
```

1.4.1 分子同定用参照配列データベース

Claident では、標準で多数の分子同定用参照配列データベースが添付されています。Claident に添付されているデータベースは、以下の形式で命名されています。

分類群_遺伝子座_参照配列同定情報の分類階層

分類群_遺伝子座 には以下のものがあります。

```
overall  全生物全遺伝子座
animals_12S  動物 12S
animals_16S  動物 16S
animals_COX1  動物 COX1(COI)
animals_CytB  動物 CytB
animals_D-loop  動物 D-loop
animals_mt  動物ミトコンドリア DNA
eukaryota_LSU  真核生物 LSU(28S)
eukaryota_SSU  真核生物 SSU(18S)
fungi_all  真菌全遺伝子座
fungi_ITS  真菌 ITS
plants_cp  植物葉緑体 DNA
plants_matK  植物 matK
plants_rbcL  植物 rbcL
plants_trnH-psbA  植物 trnH-psbA
prokaryota_16S  原核生物 16S
prokaryota_all  原核生物全遺伝子座
```

参照配列同定情報の分類階層 には以下のものがあります。

class 綱以下の同定情報のある参照配列を含む (overall のみ)

order 目以下の同定情報のある参照配列を含む (overall のみ)

family 科以下の同定情報のある参照配列を含む (overall のみ)

genus 属以下の同定情報のある参照配列を含む

species_wsp 種以下の同定情報がある参照配列を含む。種名に「sp.」が含まれる参照配列は除外されていない

species 種以下の同定情報がある参照配列を含むが、種名の末尾に「sp.」が含まれる参照配列は除外されている

species_wosp 種以下の同定情報がある参照配列を含むが、種名に「sp.」が含まれる参照配列は除外されている

genus_man 属以下の同定情報があり、属名が空欄でない参照配列を含む

species_wsp_man 種以下の同定情報がある参照配列を含む。種名に「sp.」が含まれる参照配列は除外されていないが、属名が空欄の参照配列は除外されている

species_man 種以下の同定情報がある参照配列を含むが、種名の末尾に「sp.」が含まれる、または属名が空欄の参照配列は除外されている

species_wosp_man 種以下の同定情報がある参照配列を含むが、種名に「sp.」が含まれる、または属名が空欄の参照配列は除外されている

分子同定用参照配列データベースは「**インストール先**/share/claident/blastdb」にあるため、このフォルダの内容を見ればインストールされている参照配列データベースがわかります。

データベースの種類が多すぎて使い分けが難しいのですが、どれが最適なのかは分類群や研究目的によって異なります。MiFish によるメタバーコーディングを日本の淡水域や日本近海のサンプルで行う場合、動物以外の配列やミトコンドリアゲノム以外の配列も同定したいなら、overall_species_wsp を推奨します。しかし、overall 系データベースは巨大で、搭載しているメモリが少ないマシンではメモリ不足になってしまいます。そのような場合、動物以外の配列や対象外の配列は同定できなくなりますが、animals_12S_species_wsp や animals_mt_species_wsp が良いでしょう。真菌や細菌などで属レベルの同定が非常に重要なケースでは、～_species_wsp_man を使うと良いかもしれません。使い分けに悩んだ場合は、各データベースを使用して同定した結果をマージしていいところ取りすることができますので、全部やっしまえばいいでしょう。

1.4.2 clmakecachedb によるキャッシュデータベースの生成

最初に、以下のコマンドで分子同定に用いるキャッシュデータベースの生成を行います。

```
clmakecachedb \  
--blastdb=animals_mt_species_wsp \  
--ignoreotuseq=standard.fasta \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
10_decontaminated/decontaminated.fasta \  
11_taxonomy/cachedb_species_wsp
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--blastdb 使用する分子同定用参照配列データベース

--ignoreotuseq 指定した FASTA 配列ファイルに含まれる配列名と一致する OTU は無視する

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力フォルダを指定します。

大量のメモリを使用する可能性があるため、実行中はもう一つターミナルを起動して空きメモリ量を top コマンドなどを実行して監視し、もし空きメモリがなくなるようであれば Ctrl+C キーを押して強制終了して使用するデータベースを変更したりマシンにメモリを増設することを検討して下さい。

1.4.3 QCaution 法による分子同定

1.4.3.1 clidentseq による近隣配列群の取得 以下のコマンドで、QCaution 法に基づいて近隣配列をキャッシュデータベースから取得します。

```
clidentseq \  
--method=QC \  
--blastdb=11_taxonomy/cachedb_species_wsp \  
--ignoreotuseq=standard.fasta \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
10_decontaminated/decontaminated.fasta \  
11_taxonomy/neighborhoods_qcaution_species_wsp.txt
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--method 使用する分子同定アルゴリズム

--blastdb 使用する分子同定用参照配列データベースまたはキャッシュデータベース

--ignoreotuseq 指定した FASTA 配列ファイルに含まれる配列名と一致する OTU は無視する

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

1.4.3.2 classigntax による分類群の割り当て 以下のコマンドで、取得した近隣配列の同定情報から LCA アルゴリズム (Huson *et al.* 2007) を用いて各 OTU に分類群を割り当てます。

```
classigntax \  
--taxdb=animals_mt_species_wsp \  
11_taxonomy/neighborhoods_qcaution_species_wsp.txt \  
11_taxonomy/taxonomy_qcaution_species_wsp.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--taxdb 使用する参照配列の同定情報データベース (clmakecachedb の --blastdb と一致させる)

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

出力ファイルは、OTU ごとに 1 行の同定結果を記録したタブ区切りテキストになっています。

1.4.4 95%-3NN 法による分子同定

1.4.4.1 clidentseq による近隣配列群の取得 以下のコマンドで、95%-3NN 法に基づいて近隣配列をキャッシュデータベースから取得します。

```
clidentseq \  
--method=3,95% \  
--blastdb=11_taxonomy/cachedb_species_wsp \  
--ignoreotuseq=standard.fasta \  
--numthreads=NumberOfCPUcores \  
10_decontaminated/decontaminated.fasta \  
11_taxonomy/neighborhoods_95p3nn_species_wsp.txt
```

1.4.4.2 classigntax による分類群の割当 以下のコマンドで、取得した近隣配列の同定情報から LCA アルゴリズム (Huson *et al.* 2007) を用いて各 OTU に分類群を割り当てます。

```
classigntax \  
--taxdb=animals_mt_species_wsp \  
--minnsupporter=3 \  
11_taxonomy/neighborhoods_95p3nn_species_wsp.txt \  
11_taxonomy/taxonomy_95p3nn_species_wsp.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--minnsupporter 結果を支持する近隣配列数の下限

この方法では、OTU の塩基配列が 95% 以上一致する参照配列を類似度上位 3 位タイまで取得して近隣配列とし、LCA アルゴリズム (Huson *et al.* 2007) を用いて各 OTU に分類群を割り当てています。

1.4.5 clmakeidentdb による分子同定結果の再利用

以下のコマンドを使用して QCauto 法による分子同定結果データベースを作成することができます。

```
clmakeidentdb \  
--append \  
11_taxonomy/neighborhoods_qcauto_species_wsp.txt \  
11_taxonomy/qcauto_species_wsp.identdb
```

```
clmakeidentdb \  
--append \  
11_taxonomy/neighborhoods_95p3nn_species_wsp.txt \  
11_taxonomy/95p3nn_species_wsp.identdb
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--append 出力ファイルが既に存在している場合は結果を追加する

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

出力ファイル内には分子同定結果 (実際には `clidentseq` の結果) が記録されており、`clmakecachedb` と `clidentseq` の実行時に `--identdb` オプションで指定することで、このデータベース内に結果が既にある OTU において参照配列データベースの検索を飛ばし、無駄な計算を省きます。なお、手法やデータベースが異なれば分子同定結果は当然ながら異なり得ます。したがって、`clmakeidentdb` を `--append` 付きで実行する際は同定手法やデータベースの異なる分子同定結果を混ぜてしまわないように注意が必要です (コマンド側で検証はしていません)。`clmakecachedb` で `--identdb` が指定されると、既に結果が存在するかどうかの確認にしか使用されませんが、`clidentseq` で `--identdb` が指定された場合、その分子同定結果データベース内の結果が使用されるため、同定手法やデータベースが一致していなくてはなりません (コマンド側で検証はしていません)。

1.4.6 `clmergeassign` による複数の分子同定結果のマージ

ここまでの解析によって、OTU ごとに少なくとも `QCauro` 法による分子同定結果と 95%-3NN 法による分子同定結果が得られているはずです。複数のデータベースでそれぞれ分子同定を行い、同一の OTU に対してより多くの分子同定結果が得られている場合もあるでしょう。そのような場合、それらの結果から OTU ごとに「最も低レベルの分類階層まで同定できているものを採用する」という形で同定結果をマージすることができます。下記コマンドを実行すると、より保守的で誤同定が少ないと考えられる `QCauro` 法の結果を優先しつつ、95%-3NN 法で `QCauro` 法の結果と矛盾せず、より低レベルの分類階層まで同定できていたら採用する、という形で結果をマージできます (95%-3NN 法の結果がより低レベルの分類階層まで同定できていても、`QCauro` 法の結果と矛盾するなら却下します)。

```
clmergeassign \
--preferlower \
--priority=descend \
11_taxonomy/taxonomy_qcauro_species_wsp.tsv \
11_taxonomy/taxonomy_95p3nn_species_wsp.tsv \
11_taxonomy/taxonomy_merged.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

`--preferlower` より低レベルの分類階層まで同定できている結果を優先的に採用する
`--priority` 入力ファイルの優先順位 (ASCEND | DESCEND | EQUAL | 式による指定から選択)
式は、入力ファイルに 0 から始まる数値を割り振り、「 $0 < 1 = 2 < 3 < 4$ 」という風に指定します。
この優先順位は `--preferlower` よりも優先されます

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル群、出力ファイルを指定します。

`--priority=descend` を指定している場合、入力ファイル群は後の方よりも最初の方が優先されます。

1.4.7 `clfillassign` による分子同定結果の穴埋め

`classigntax` の出力は、そのままでは同定情報のない分類階層は空欄のままとなっています。そこで、以下のコマンドでそのような空欄を全て埋めることができます。

```
clfillassign \
--fullfill=enable \
11_taxonomy/taxonomy_merged.tsv \
11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--fullfill ファイル中に存在しない分類階層も含めて Claident がサポートしている全分類階層を穴埋めするか否か (ENABLE | DISABLE から選択)

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

穴埋めは、より低レベルの分類階層の結果が存在する場合はその値で、より低レベルの分類階層の結果が存在しない場合は最も低レベルの分類階層の結果に「unidentified」を付加たもので行います。つまり、order が「Foo」で infraorder が「Bar」、その中間の suborder が空欄の場合、suborder は「Bar」になり、parvorder 以下の分類階層が全て空欄ならそれらは「unidentified Bar」となります。

1.5 OTU 組成表の作成

ここで言う OTU 組成表とは、各サンプルにおける各 OTU のリード数の表のことを指します。以下のような形式で表せるものです。

samplename	OTU1	OTU2	OTU3	OTU4
Sample1	3813	130	1949	34959
Sample2	18389	19	194	1948
Sample3	18	1	148	184

この表を元データとして、統計的な解析を行うことになります。ここでは、実際に統計的な解析に入る前に必要な前処理について説明します。

その前に、以下のコマンドで作業ディレクトリに OTU 組成表の出力ディレクトリを作成しておきます。

```
mkdir 12_community
```

また、加工の出発点となる OTU 組成表は実は既に「10_decontaminated/decontaminated.tsv」として存在しているため、以下のコマンドでこれを先程作成したディレクトリにコピーしておきます。

```
cp \
10_decontaminated/decontaminated.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_all.tsv
```

1.5.1 clfiltersum による OTU 組成表の加工

以下のコマンドで、内部標準 OTU のみの表を作成することができます (他の OTU は除外される)。

```
clfiltersum \
--otuseq=standard.fasta \
12_community/sample_otu_matrix_all.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_standard.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--otuseq 指定した FASTA 配列ファイルに含まれる配列名と一致する OTU のデータを取り出す

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

以下のコマンドを実行すると、分子同定結果に基づいて、--includetaxa で指定した分類群 (ここでは魚類) の OTU の表を作成することができます。

```
clfiltersum \  
--negativeotuseq=standard.fasta \  
--taxfile=11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv \  
--includetaxa=class,Hyperoartia,class,Myxini,class,Chondrichthyes \  
--includetaxa=superclass,Actinopterygii,order,Coelacanthiformes \  
--includetaxa=subclass,Dipnomorpha \  
12_community/sample_otu_matrix_all.tsv \  
12_community/sample_otu_matrix_fishes.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--negativeotuseq 指定した FASTA 配列ファイルに含まれる配列名と一致する OTU のデータを除外する

--taxfile 分子同定結果のタブ区切りテキストファイル (classigntax の出力フォーマットのもの)

--includetaxa 該当する分類群名の OTU のデータを取り出す

分類群名を検索する分類階層を限定することも可能

複数指定可能

下記のように --includetaxa を --excludetaxa に置き換えることで、魚類以外の OTU の表を作成できます。

```
clfiltersum \  
--negativeotuseq=standard.fasta \  
--taxfile=11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv \  
--excludetaxa=class,Hyperoartia,class,Myxini,class,Chondrichthyes \  
--excludetaxa=superclass,Actinopterygii,order,Coelacanthiformes \  
--excludetaxa=subclass,Dipnomorpha \  
12_community/sample_otu_matrix_all.tsv \  
12_community/sample_otu_matrix_nonfishes.tsv
```

同じことを別のやり方でやってみます。下記のコマンドでは、魚類の OTU の表から OTU 名だけを取り出して「12_community/fishotus.txt」に保存しています。

```
head -n 1 12_community/sample_otu_matrix_fishes.tsv \  
| perl -ne '@row=split(/\t/);shift(@row);print(join("\n",@row)."\n");' \  
> 12_community/fishotus.txt
```

clfiltersum には、与えたテキストファイルに名前が含まれていない OTU を取り出すオプションがあるので、先程作成したファイルを使用して下記のように魚類以外の OTU の表を作成することができます。

```
clfiltersum \  
--negativeotuseq=standard.fasta \  
--negativeotulist=12_community/fishotus.txt \  

```

```
12_community/sample_otu_matrix_all.tsv \  
12_community/sample_otu_matrix_nonfishes2.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--negativeotulist 除外する OTU 名のリストを記したテキストファイル

1.5.2 clrarefysum による OTU 組成表のカバレッジベースレアファクション

OTU 組成表があれば群集生態学解析はできますが、このままではサンプル間のカバレッジ (サンプリング調査の網羅具合) にばらつきがあるため、本来種数の少ない高カバレッジのサンプルの方が本当は種数が多い低カバレッジのサンプルよりも種数が多いと誤判定してしまいかねません。そこで、サンプル間でカバレッジを揃えることで、このような問題を回避する処理がカバレッジベースレアファクションです (Chao & Jost 2012)。なお、レアファクションが「レアファクションした OTU 組成表を得る」ことを指す場合と「レアファクションカーブを得る」ことを指す場合がありますが、本章では前者を指すものとお考え下さい。

カバレッジベースレアファクションを行う手法としては、「そのサンプルで一度しか観測されていない OTU (シングルトン) の数」と「そのサンプルで二度しか観測されていない OTU (ダブルトン) の数」に基づいてカバレッジを推定して行う方法があります (Chao & Jost 2012)。しかし、メタバーコードデータではシーケンスエラーが大量に存在するために、これらの数が十分信用できるものとは考えられていません (Chiu & Chao 2016)。デノイズングしたデータなら問題ないのではとも思えるかもしれませんが、その証拠も十分でないのが現状です。Chiu & Chao (2016) はそのようなシーケンスエラーのあるデータでもシングルトン数を修正する方法を提案しており、metagMisc という R パッケージの `phyloseq_coverage_raref()` 関数で `correct_singletons` を有効にしてレアファクションすることで、この方法が適用できます。

ただし、Chiu & Chao (2016) の方法は未デノイズングデータを前提とした方法です。デノイズングを適用すると、リード数の少ない ASV (シングルトンを含む) は、処理過程で捨てられたり近隣のリード数がより大きい ASV のシーケンスエラー由来とみなされ、未デノイズングデータから激減します。このため、Chiu & Chao (2016) の方法をデノイズングしたデータにそのまま適用することは問題があると考えられます。

ここで、 $(1 - \text{レアファクションカーブの傾き})$ はカバレッジそのものと捉えることができます (Chao & Jost 2012)。これに基づいて、Claident ではレアファクションカーブの端点の傾きをサンプル間で揃えるレアファクションをサポートしています。シングルトン数の影響が薄くなるレアファクションカーブの傾きを使用しているため、シングルトン数とダブルトン数からカバレッジを推定する方法よりもシーケンスエラーに対して頑健であると期待できます。ただし計算量は多くなるため、並列化を用いた最適化を行っています。

以下のコマンドは、リード数 1000 未満のサンプルを除去し、残ったサンプルでそれぞれカバレッジを計算し、カバレッジが最も低いサンプルと同じカバレッジに揃うように全サンプルでレアファクションを行います。ただし、カバレッジが最も低いサンプルのカバレッジが 0.99 未満だった場合は 0.99 に揃え、カバレッジが 0.99 未満のサンプルは除去します。レアファクションの際には無作為にリードを捨てることになるため、反復すれば結果が変動する可能性があります。そこで、レアファクションを 10 反復行い、それぞれ結果を保存します。

```

clrarefysum \
--minpcov=0.99 \
--minntotalseqsample=1000 \
--nreplicate=10 \
--numthreads=NumberOfCPUcores \
12_community/sample_otu_matrix_all.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_all_rarefied

```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

--minpcov 揃えるカバレッジの下限 (下回るサンプルは捨てる)
 --minntotalseqsample レアファクション前のリード数下限 (下回るサンプルは捨てる)
 --nreplicate レアファクションの反復数

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルの接頭辞を指定します。

実行後に生成される出力ファイルは以下の通りです。

出力ファイルの接頭辞 **-r 数字.tsv** レアファクションされた OTU 組成表のタブ区切りテキスト
 出力ファイルの接頭辞 **_inputpcov.tsv** 入力された各サンプルのカバレッジ推定値のタブ区切りテキスト
 出力ファイルの接頭辞 **_inputnseq.tsv** 入力された各サンプルの合計リード数のタブ区切りテキスト
 出力ファイルの接頭辞 **_outputpcov.tsv** 出力された各サンプルのカバレッジ推定値のタブ区切りテキスト
 出力ファイルの接頭辞 **_outputnseq.tsv** 出力された各サンプルの合計リード数のタブ区切りテキスト

レアファクションが終わったら、以下のコマンドにより 10 反復全てで内部標準 OTU のみを取り出します。

```

for n in `seq -w 1 10`
do clfiltersum \
--otuseq=standard.fasta \
12_community/sample_otu_matrix_all_rarefied-r$n.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_standard_rarefied-r$n.tsv
done

```

以下のコマンドでは魚類 OTU のみを取り出します。

```

for n in `seq -w 1 10`
do clfiltersum \
--negativeotuseq=standard.fasta \
--taxfile=11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv \
--includetaxa=class,Hyperoartia,class,Myxini,class,Chondrichthyes \
--includetaxa=superclass,Actinopterygii,order,Coelacanthiformes \
--includetaxa=subclass,Dipnomorpha \
12_community/sample_otu_matrix_all_rarefied-r$n.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_fishes_rarefied-r$n.tsv
done

```

以下のコマンドでは魚類以外の OTU を取り出します。

```

for n in `seq -w 1 10`
do clfiltersum \
--negativeotuseq=standard.fasta \
--taxfile=11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv \
--excludetaxa=class,Hyperoartia,class,Myxini,class,Chondrichthyes \

```

```
--excludetaxa=superclass,Actinopterygii,order,Coelacanthiformes \
--excludetaxa=subclass,Dipnomorpha \
12_community/sample_otu_matrix_all_rarefied-r$n.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_nonfishes_rarefied-r$n.tsv
done
```

上記の例では全分類群の OTU 組成表を用いてカバレッジベースレアファクションを行い、レアファクション後に魚類 OTU と魚類以外の OTU に分けていますが、最初から魚類以外に興味がない場合や、事前知識により魚類以外はコンタミネーションの可能性が高いと思われる場合、魚類のみの OTU 組成表を用いてカバレッジベースレアファクションを行う方が良いかもしれません。

metagMisc にしろ Claident にしろ、これらのカバレッジベースレアファクションで行えるのはあくまで「群集に対するシーケンシングカバレッジの均一化」に過ぎないことは注意が必要です。「採水した水の、群集に対するカバレッジの均一化」や「濾過フィルター上に捕集した DNA の、群集に対するカバレッジの均一化」や「PCR に投入する DNA 溶液の、群集に対するカバレッジの均一化」はなされていません。メタバーコーディングではサンプリング、つまり「一部を取り出す」ステップが多数存在するため、均一性が問題になるのはシーケンシングカバレッジだけではありません。しかし、それらは全て飽和している (カバレッジがほぼ 1.0) という仮定のもとでこの先の解析は行われます。もし何か異常な結果が得られた際には、この仮定が満たされていない可能性について検討すべきかもしれません。

1.5.3 cestimateconc と内部標準 DNA リード数を用いた DNA 濃度の推定

以下のコマンドでは、予め濃度がわかっている内部標準 DNA リード数に基づいて他の OTU の環境水サンプル中の DNA 濃度を推定します。

```
cestimateconc \
--stdtable=12_community/sample_otu_matrix_standard.tsv \
--stdconctable=stdconctable.tsv \
--solutionvtable=solutionvtable.tsv \
--watervtable=watervtable.tsv \
--numthreads=NumberOfCPUcores \
12_community/sample_otu_matrix_fishes.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_fishes_concentration.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

```
--stdtable  内部標準 OTU リード数表のタブ区切りテキスト (入力ファイルに内部標準 OTU リード数が含まれている場合は不要)
--stdconctable  内部標準 DNA 濃度表のタブ区切りテキスト
--solutionvtable  抽出 DNA 溶液量表のタブ区切りテキスト
--watervtable  濾過水量表のタブ区切りテキスト
```

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

10 反復のレアファクションを行ったデータでもそれぞれ DNA 濃度を推定するには、以下のコマンドを実行します。


```
for n in `seq -w 1 10`
do cestimateconc \
--stdtable=12_community/sample_otu_matrix_standard_rarefied-r$n.tsv \
--stdconctable=stdconctable.tsv \
--solutionvoltage=solutionvoltage.tsv \
--watervoltage=watervoltage.tsv \
--numthreads=NumberOfCPUcores \
12_community/sample_otu_matrix_fishes_rarefied-r$n.tsv \
12_community/sample_otu_matrix_fishes_rarefied-r$n_concentration.tsv
done
```

カバレッジの揃っていないデータでは、推定される DNA 濃度の信頼性がサンプル間でばらつきます。DNA 濃度情報しかないデータからは値の信頼性のばらつきを考慮した解析を行うことはできないので、DNA 濃度を利用した分析の際にはレアファクションしてから推定した DNA 濃度データを使用の方が良いことが多いのではないのでしょうか。ただ、分析方法によってはレアファクション前の元データから推定した DNA 濃度データの方が適している場合もあるかもしれません。

1.5.4 OTU 組成表からの種組成表の作成

OTU 組成表は群集生態学解析には適していますが、作図などの際には種組成表や属組成表の方がわかりやすいことがあります。そのような場合、OTU 組成表と分子同定結果から、種組成表や属組成表を作成することができます。以下のコマンドでは、魚類の OTU 組成表から種組成表を作成しています。

```
clsumtaxa \
--taxfile=11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv \
--targetrank=species \
--taxnamereplace=enable \
--fuseotu=enable \
--numbering=enable \
--sortkey=abundance \
12_community/sample_otu_matrix_fishes.tsv \
12_community/sample_species_matrix_fishes.tsv
```

コマンドラインオプションの意味は以下の通りです。

- taxfile 分子同定結果のタブ区切りテキストファイル (classigntax の出力フォーマットのもの)
- targetrank 指定した分類階層の情報を使用する
- taxnamereplace 出力 OTU 名内で使用されているスペースやコロンをアンダーバーに置換 (ENABLE | DISABLE から選択)
- fuseotu 分類群名が同じ OTU をまとめるか否か (ENABLE | DISABLE から選択)
 まとめない場合は出力 OTU 名を「**入力 OTU 名: 分類群名**」とし、組成の内容は維持する
 ただし --taxnamereplace が有効の場合は出力 OTU 名は「**入力 OTU 名_分類群名**」となる
- numbering 出力 OTU 名にソート順で番号を接頭辞として付加するか否か (ENABLE | DISABLE から選択)
 出力 OTU が 100 ある場合は 001~100 という風に幅を揃えた番号をコロン「:」で区切って付加する
 --taxnamereplace が有効の場合はコロンではなくアンダーバー「_」で区切って付加する
 --fuseotu と --taxnamereplace が有効の場合は「**番号_分類群名**」となる

--fuseotu が有効、--taxnamereplace が無効の場合は「番号: 分類群名」となる
--fuseotu が無効、--taxnamereplace が有効の場合は「番号_入力 OTU 名_分類群名」となる
--fuseotu と --taxnamereplace が無効の場合は「番号: 入力 OTU 名: 分類群名」となる
--sortkey ソート順を決めるキー (ABUNDANCE | RANKNAME から選択)
RANKNAME は「familyname」、「classname」、「"species group name"」(スペースが含まれる場合はクォートする) などとする

コマンドラインオプションに引き続いて、入力ファイル、出力ファイルを指定します。

以下のコマンドでは、DNA 濃度を値とする OTU 組成表から種組成表を作成しています。

```
clsومتaxa \  
--taxfile=11_taxonomy/taxonomy_merged_filled.tsv \  
--targetrank=species \  
--taxnamereplace=enable \  
--taxranknamereplace=enable \  
--fuseotu=enable \  
--numbering=enable \  
--sortkey=abundance \  
12_community/sample_otu_matrix_fishes_concentration.tsv \  
12_community/sample_species_matrix_fishes_concentration.tsv
```

なお、--fuseotu を有効化した場合、分類群名だけで OTU がまとめられてしまうため、--targetrank=species であっても「unidentified 高次分類群名」という種が存在し、これには多数の種がまとめられてしまう可能性があります。これは、低レベルの分類階層が同定できなかった OTU を clfillassign で「unidentified 高次分類群名」としたためです。したがって、複数の種が誤ってまとめられた OTU を含む種組成表となってしまいます。このような種組成表は作図に使用することはできますが、統計的分析には ASV や配列の類似度に基づいてクラスタリングを行った OTU を単位とする OTU 組成表を使用するようにしましょう。

1.6 OTU 組成表を用いた群集生態学解析に向けて

ここまでの内容で群集生態学解析に必要な OTU 組成表が得られますが、未レアファクションのリード数データ、レアファクション済リード数データ、未レアファクションの DNA 濃度データ、レアファクション済 DNA 濃度データの少なくとも 4 種類があるはずです。これらは目的や解析手法に応じて適宜使い分ける必要があります。ここでは OTU 組成表を使用して R (R Core Team 2023) で群集生態学解析を行う際に役立つパッケージを簡単に紹介します。

まず、レアファクションカーブやヒル数 (有効種数) (Chao *et al.* 2014) の推定・描画には未レアファクションのリード数データを用います。以下の R パッケージが役に立つでしょう。

- vegan <https://github.com/vegandevs/vegan>
- iNEXT <https://github.com/JohnsonHsieh/iNEXT> (Hsieh *et al.* 2016)

レアファクション済リード数データはサンプル間での定量性を必要としないほとんどの分析 (クラスター分析・NMDS・PerMANOVA・群集系統学解析) に利用できます。以下の R パッケージについて調べることをお勧めします。

- vegan <https://github.com/vegandevs/vegan>
- picante <https://cran.r-project.org/web/packages/picante/> (Kembel *et al.* 2010)
- MicEco <https://github.com/Russel88/MicEco>
- iNEXT.beta3D <https://github.com/KaiHsiangHu/iNEXT.beta3D> (Chao *et al.* 2023)
- bipartite <https://github.com/biometry/bipartite>
- pvclust <https://github.com/shimo-lab/pvclust> (Suzuki & Shimodaira 2006)
- mpmcorrelogram <https://cran.r-project.org/web/packages/mpmcorrelogram/>
- boral <https://cran.r-project.org/web/packages/boral/> (Hui 2016)
- gllvm <https://github.com/JenniNiku/gllvm> (Niku *et al.* 2019)

DNA 濃度データはサンプル間での定量性が必要な解析方法に使用することができます。その代わり、整数値を要求する手法を適用することができません。以下の R パッケージでは時系列因果推論を行うことができます。

- rEDM <https://ha0ye.github.io/rEDM/> (Ye & Sugihara 2016)
- rUIC <https://github.com/yutakaos/rUIC> (Osada *et al.* 2023)

空間を対象とした場合、結合種分布モデリング (Joint Species Distribution Modeling) によって多種の生息適地の同時推定や多様性の高い重要地域の推定が可能です。下記の R パッケージではそのような複雑なモデルの当てはめに対応しています。

- jSDM <https://ecology.ghislainv.fr/jSDM/> (Warton *et al.* 2015)
- HMSC <https://github.com/hmsc-r/HMSC> (Tikhonov *et al.* 2020)

OTU 組成から OTU 間関係のネットワークを推定する手法も近年活発に開発されています。下記は OTU 間関係ネットワークの推定と描画をサポートした R パッケージです。

- SpiecEasi <https://github.com/zdk123/SpiecEasi> (Kurtz *et al.* 2015)
- NetCoMi <https://github.com/stefpeschel/NetCoMi> (Peschel *et al.* 2021)
- ggClusterNet <https://github.com/taowenmicro/ggClusterNet> (Wen *et al.* 2022)

ここで紹介した R パッケージとそれらに実装されている手法は新しいものも多く、筆者も十分に把握できているとは言えません。特に、それぞれの手法の前提として要求するデータの性質 (在不在か、整数値か小数値か実数値か、サンプル内定量性やサンプル間定量性があるかなど) を論文やマニュアルでよく検討して使用するようにして下さい。

最後に、土居・岡村 (2011)、門脇 (2016) および Kadowaki (2023) では R 上での群集生態学分析の入門的な解説がなされていますので、一読をお勧めします。

引用文献

Callahan, Benjamin J., McMurdie, Paul J., Rosen, Michael J., Han, Andrew W., Johnson, Amy Jo A. & Holmes, Susan P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Chao, Anne, Gotelli, Nicholas J., Hsieh, T. C., Sander, Elizabeth L., Ma, K. H., Colwell, Robert K. & Ellison, Aaron M. (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* 84, 45–67. <https://doi.org/10.1890/13-0133.1>
- Chao, Anne & Jost, Lou (2012) Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* 93, 2533–2547. <https://doi.org/10.1890/11-1952.1>
- Chao, Anne, Thorn, Simon, Chiu, Chun-Huo, Moyes, Faye, Hu, Kai-Hsiang, Chazdon, Robin L., Wu, Jessie, Magnago, Luiz Fernando S., Dornelas, Maria, Zelený, David, Colwell, Robert K. & Magurran, Anne E. (2023) Rarefaction and extrapolation with beta diversity under a framework of Hill numbers: The iNEXT.beta3D standardization. *Ecological Monographs* 93, e1588. <https://doi.org/10.1002/ecm.1588>
- Chiu, Chun-Huo & Chao, Anne (2016) Estimating and comparing microbial diversity in the presence of sequencing errors. *PeerJ* 4, e1634. <https://doi.org/10.7717/peerj.1634>
- Edgar, Robert C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, Robert C. (2016) UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing., 074252.
- Edgar, Robert C. & Flyvbjerg, Henrik (2015) Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 31, 3476–3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Edgar, Robert C., Haas, Brian J., Clemente, Jose C., Quince, Christopher & Knight, Rob (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Esling, Philippe, Lejzerowicz, Franck & Pawlowski, Jan (2015) Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research* 43, 2513–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv107>
- Hsieh, T. C., Ma, K. H. & Chao, Anne (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7, 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Hui, Francis K. C. (2016) boral – Bayesian Ordination and Regression Analysis of Multivariate Abundance Data in R. *Methods in Ecology and Evolution* 7, 744–750. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12514>
- Huson, Daniel H., Auch, Alexander F., Qi, Ji & Schuster, Stephan C. (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* 17, 377–386. <https://doi.org/10.1101/gr.5969107>
- Kadowaki, Kohmei (2023) A primer of community ecology using the R language. *Population Ecology* 65, 240–256. <https://doi.org/10.1002/1438-390X.12158>
- Kembel, Steven W., Cowan, Peter D., Helmus, Matthew R., Cornwell, William K., Morlon, Helene, Ackerly, David D., Blomberg, Simon P. & Webb, Campbell O. (2010) Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26, 1463–1464. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq166>

- Komai, Tomoyuki, Gotoh, Ryo O., Sado, Tetsuya & Miya, Masaki (2019) Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3, e33835. <https://doi.org/10.3897/mbmg.3.33835>
- Kurtz, Zachary D., Müller, Christian L., Miraldi, Emily R., Littman, Dan R., Blaser, Martin J. & Bonneau, Richard A. (2015) Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLOS Computational Biology* 11, e1004226. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004226>
- Miya, Masaki, Gotoh, Ryo O. & Sado, Tetsuya (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science* 86, 939–970. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01461-x>
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2, 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Niku, Jenni, Hui, Francis K. C., Taskinen, Sara & Warton, David I. (2019) gllvm: Fast analysis of multivariate abundance data with generalized linear latent variable models in R. *Methods in Ecology and Evolution* 10, 2173–2182. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13303>
- Osada, Yutaka, Ushio, Masayuki & Michio, Kondoh (2023) A unified framework for nonparametric causality detection., 2023.04.20.537743.
- Peschel, Stefanie, Müller, Christian L, von Mutius, Erika, Boulesteix, Anne-Laure & Depner, Martin (2021) NetCoMi: network construction and comparison for microbiome data in R. *Briefings in Bioinformatics* 22, bbba290. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa290>
- R Core Team (2023) R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>
- Rognes, Torbjørn, Flouri, Tomáš, Nichols, Ben, Quince, Christopher & Mahé, Frédéric (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Sakata, Masayuki K., Kawata, Mone U., Kurabayashi, Atsushi, Kurita, Takaki, Nakamura, Masatoshi, Shirako, Tomoyasu, Kakehashi, Ryosuke, Nishikawa, Kanto, Hossman, Mohamad Yazid, Nishijima, Takashi, Kabamoto, Junichi, Miya, Masaki & Minamoto, Toshifumi (2022) Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. *Metabarcoding and Metagenomics* 6, e76534. <https://doi.org/10.3897/mbmg.6.76534>
- Sato, Yukuto, Miya, Masaki, Fukunaga, Tsukasa, Sado, Tetsuya & Iwasaki, Wataru (2018) MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1553–1555. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy074>
- Suzuki, Ryota & Shimodaira, Hidetoshi (2006) Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22, 1540–1542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>

- Takenaka, Masaki, Yano, Koki, Suzuki, Tomoya & Tojo, Koji (2023) Development of novel PCR primer sets for DNA barcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species. *Limnology* 24, 121–136. <https://doi.org/10.1007/s10201-022-00710-5>
- Tanabe, Akifumi S. & Toju, Hirokazu (2013) Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A Benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants. *PLOS ONE* 8, e76910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076910>
- Tikhonov, Gleb, Opedal, Øystein H., Abrego, Nerea, Lehikoinen, Aleksi, de Jonge, Melinda M. J., Oksanen, Jari & Ovaskainen, Otso (2020) Joint species distribution modelling with the r-package Hmsc. *Methods in Ecology and Evolution* 11, 442–447. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13345>
- Ushio, Masayuki, Fukuda, Hisato, Inoue, Toshiki, Makoto, Kobayashi, Kishida, Osamu, Sato, Keiichi, Murata, Koichi, Nikaido, Masato, Sado, Tetsuya, Sato, Yukuto, Takeshita, Masamichi, Iwasaki, Wataru, Yamanaka, Hiroki, Kondoh, Michio & Miya, Masaki (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources* 17, e63–e75. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12690>
- Ushio, Masayuki, Furukawa, Saori, Murakami, Hiroaki, Masuda, Reiji & Nagano, Atsushi J. (2022) An efficient early-pooling protocol for environmental DNA metabarcoding. *Environmental DNA* 4, 1212–1228. <https://doi.org/10.1002/edn3.337>
- Ushio, Masayuki, Murakami, Hiroaki, Masuda, Reiji, Sado, Tetsuya, Miya, Masaki, Sakurai, Sho, Yamanaka, Hiroki, Minamoto, Toshifumi & Kondoh, Michio (2018a) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* 2, e23297. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>
- Ushio, Masayuki, Murata, Koichi, Sado, Tetsuya, Nishiumi, Isao, Takeshita, Masamichi, Iwasaki, Wataru & Miya, Masaki (2018b) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* 8, 4493. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22817-5>
- Warton, David I., Blanchet, F. Guillaume, O'Hara, Robert B., Ovaskainen, Otso, Taskinen, Sara, Walker, Steven C. & Hui, Francis K. C. (2015) So Many Variables: Joint Modeling in Community Ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 30, 766–779. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.09.007>
- Wen, Tao, Xie, Penghao, Yang, Shengdie, Niu, Guoqing, Liu, Xiaoyu, Ding, Zhexu, Xue, Chao, Liu, Yong-Xin, Shen, Qirong & Yuan, Jun (2022) ggClusterNet: An R package for microbiome network analysis and modularity-based multiple network layouts. *iMeta* 1, e32. <https://doi.org/10.1002/imt2.32>
- Ye, Hao & Sugihara, George (2016) Information leverage in interconnected ecosystems: Overcoming the curse of dimensionality. *Science* 353, 922–925. <https://doi.org/10.1126/science.aag0863>
- Zhu, Tao, Sato, Yukuto, Sado, Tetsuya, Miya, Masaki & Iwasaki, Wataru (2023) MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in 10 Years. *Molecular Biology and Evolution* 40, msad035. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad035>

土居秀幸・岡村寛 (2011) 生物群集解析のための類似度とその応用: R を使った類似度の算出、グラフ化、検定.
日本生態学会誌 61, 3–20. https://doi.org/10.18960/seitai.61.1_3

門脇浩明 (2016) メタゲノムデータを用いた群集統計解析法：レアファクションから仮説検定まで. 日本生態学会第 63 回大会講演資料. <https://www.fifthdimension.jp/wiki.cgi?page=%BC%AB%CD%B3%BD%B8%B2%F12016%A1%A7%A5%E1%A5%BF%A5%D0%A1%BC%A5%B3%A1%BC%A5%C7%A5%A3%A5%F3%A5%B0%A1%A6%B4%C4%B6%ADDNA%A5%D0%A1%BC%A5%B3%A1%BC%A5%C7%A5%A3%A5%F3%A5%B0%B2%F2%C0%CF%A4%CE%B5%BB%CB%A1>