

環境 DNA 解析業務 仕様書

1. 件 名 環境 DNA 解析業務
2. 目 的 大分県農林水産研究指導センター水産研究部（以下、大分県）が採取した海水試料の環境 DNA 解析（魚類の網羅的解析及びクロサバフグ、カマストガリザメの種特異的解析）を行い、豊後水道域の魚類相等の基礎的知見を得る。
3. 納入場所 〒879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦 194-6
大分県農林水産研究指導センター水産研究部
4. 履行期限 令和 9 年 3 月 31 日
5. 解析試料 豊後水道で採取した海水試料（終濃度 0.01%となるよう塩化ベンザルコニウムを添加）
6. 予定試料数 ①海水濾過・DNA 抽出 99 試料
（令和 8 年 4 月から令和 9 年 2 月まで原則として毎月 1 回、豊後水道域 5 定点×2 水深 [1 定点は 1 水深] で採取した海水各 1.0~1.5 リットル×11 月とするが、調査の状況により試料数が減少する可能性がある。また、一つの試料が 2 つの容器に分かれる場合がある。この場合でも、個々の容器は同一試料の一部として取り扱う）
②DNA 抽出 9 試料
（令和 8 年 3 月に豊後水道域 5 定点×2 水深 [1 定点は 1 水深] で採取した海水各 1.0 リットルとするが、調査の状況により試料数が減少する可能性がある）
7. 業務内容 大分県が採取した海水試料について、環境 DNA の網羅的解析及び種特異的解析を行う。網羅的解析では魚類を対象に得られたリード数を DNA コピー数に変換するものとし、種特異的解析ではクロサバフグ *Lagocephalus cheesemanii*、カマストガリザメ *Carcharhinus limbatus* を対象にデジタル PCR を用いた定量解析を行うものとする。以下の一連の作業は、Miya et al. (2015) 及び環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. (2024) を参照して実施する。

また、令和9年3月に豊後水道域の5定点（各定点2水深、ただし1定点は1水深）で採水した海水試料については、大分県農林水産研究指導センター水産研究部で濾過を行い、試料を保存するために必要な機材の貸出等すること。

1) 海水のろ過

- ・原則毎月1回、大分県から送付される海水試料を孔径0.22 μ m以下のフィルターを用いてろ過する（水の濁度が高い場合等、必要に応じてプレフィルターを使用する）

2) DNAの抽出・精製

- ・上記フィルターに捕集された物質からDNAを抽出する
- ・抽出DNAからPCR阻害物質を除去したのちDNA濃度を測定する

3) 魚類の網羅的解析（定量解析）

(1) ライブラリー調整

- ・上記で抽出・精製された環境DNAをテンプレートとして、12S rRNA領域等を対象とした2-step tailed PCRによりライブラリーを作製し、濃度と品質を確認する
- ・1stPCRは8反復以上で実施する

(2) シーケンシング解析

- ・Illumina社MiSeq等の次世代シーケンサーによりシーケンシング解析を行う
- ・2 \times 300bpのpaired-endリードを取得する

(3) データ解析

- ・得られたリードをDADA2法等によりamplicon sequence variant (ASV) にまとめる
- ・ASVごとにリード数及びDNAコピー数を算出する
- ・データベース配列と97%以上の相同性があるASVについて種名を割り当てる

4) クロサバフグ、カマストガリザメの種特異的解析（定量解析）

(1) クロサバフグ、カマストガリザメ特異的プライマー等の設計

- ・設計したプライマーの特異性及び増幅確認を行うこと

(2) デジタルPCR解析

- ・上記6-1)～2)により海水から得た環境DNAをテンプレートとして、デジタルPCRによる定量解析を実施する
- ・PCR解析は2反復以上で実施する

8. 成果物の納入

網羅的解析では、解析に係る報告書(excel, word等)、塩基配列データ(fastq形式)、DDBJへの登録に必要なデータ、代表配列データ及び代表塩基配列のリード数と一致率解析結果(excel等)、種特異的解析では、解析に係る報告書(excel, word等)及び

解析データ（データ確認に必要なソフトウェア等を提供すること）とし、いずれもセキュリティが保証されたサイトからのダウンロードによる電子納入とする。なお、成果物は原則毎月送付される海水試料毎に、分析が終了次第納入すること。

9. その他

- 1) 詳細については担当職員の指示に従うこと。特に作業中に疑義が生じた場合は、必ず担当職員と打ち合わせを行い、合意を得たうえで作業を進めること。
- 2) 業務で知り得た情報について、第三者への開示をしないこと。
- 3) 成果物の提出の際は必ずファイルのウィルスチェックを行うこと。
- 4) 解析結果について、必要に応じて大分県に説明を行うこと。
- 5) 全ての環境 DNA は、令和 9 年 2 月分の解析終了後、大分県あて返却すること。
- 6) 海水試料送付及び環境 DNA 返却に要する送料等は大分県負担とする。