

令和7年度

遺伝子解析に基づいた魚類の網羅的及び定量的把握補助業務

仕 様 書

令和7年8月

国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所

1. 業務概要

本業務は、東京湾において採取された海水を分析して魚類の遺伝子情報を取得し、魚類の網羅的及び定量的な把握の補助を行うものである。

2. 履行場所

受注者施設

3. 履行期間

契約締結日より令和8年2月13日までとする。なお、履行期間中の土曜日、日曜日、休日、及び年末年始休暇は、休日として設定している。

4. 業務仕様

4-1. DNA 抽出

- (1) 受注者は、調査職員から冷凍で送付される GF/F ろ過フィルターから DNA 抽出を実施する。DNA 抽出を実施する試料は、計 58 試料（試料あたり約 2L）である。海水サンプルの採取時期については、調査職員から事前に連絡する。

4-2. 種特異的解析

- (1) 受注者は、4-1 で抽出したサンプルの一部（40 試料）及び調査職員が別途冷凍で送付するサンプル（40 試料）について、種特異的解析及びそのコピー数の算出（PCR は 4 回繰り返し）を実施するものとする。実施する試料は、計 80 試料である。
- (2) 種特異的解析及びそのコピー数の算出は、リアルタイム PCR を用いて実施する。サンプルの採取時期については、調査職員から事前に連絡する。
- (3) 受注者は、定量分析を行うにあたって、人工合成遺伝子を用いた品質管理を行う。なお、人工合成遺伝子による品質管理では、4 段階の濃度レベルの検量線を引くことを想定している。
- (4) 受注者は、抽出した DNA について、再分析の可能性を考慮して 1 か月程度保管する。破棄にあたっては、事前に調査職員の確認を得る。
- (5) 種特異的解析は、*Acanthopagrus schlegelii* 及び *Engraulis japonicus*（別表参照）を想定しているが、詳細は調査職員と協議するものとする。

4-3. 魚類の網羅的な定量解析

- (1) 受注者は、4-1 で抽出したサンプル（58 試料）及び調査職員が別途冷凍で送付するサンプル（40 試料）について、魚類の網羅的解析を目的としたメタバーコーディング解析を実施するものとする。実施する試料は、計 98 試料である。
- (2) 分析においては、1st PCR は 8 回繰り返しを行う。また、MiFish プライマーセット（MiFish-U, MiFish-Ev2, MiFish-U2）を用いる。
- (3) 受注者は、魚類の網羅的な検出において、MiFish のデータベース（<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>）、NCBI（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）などで照合し、可能な限り種を特定する。
- (4) 受注者は、対象サンプル内にふくまれる DNA と区別できるように工夫された定量に使用する検量線作成用の DNA（以下、内部標準 DNA）を用意する。内部標準 DNA に用いる魚種は 3 種程度とし、それぞれの濃度は異なること。なお、受注者は、内部標準 DNA によって作成する検量線が、リード数からコピー数を算出するために適切に使用できることを少なくとも 1 度確認した上で試料を分析する。
- (5) サンプルのデータ解析は Ushio et al. (2018)※に従って行うこと。

※Ushio, M. *et al.* Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* **2**, (2018).

5. 成果物

5－1. 成果物

本業務における業務完成図書は、電子納品によるものとする。

- (1) 電子納品とは、解析データ等すべての最終成果(以下「業務完成図書」という)を電子データで作成し、納品するものである。
- (2) 「業務完成図書」は、作成した電子データを電子媒体(CD-R 又は DVD-R)で2部提出するものとする。なお、「業務完成図書」の詳細内容及び電子化については、調査職員と協議のうえ、決定するものとする。

5－2. 提出先

神奈川県横須賀市長瀬 3 丁目 1 番 1 号
国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所 港湾空港技術研究所

6. 検 査

本仕様書のとおり実施されたことの確認をもって検査とする。

7. その他

- (1) 本仕様書に明記なき事項及び本業務の遂行上疑義が生じた場合は、両者が協議のうえ、決定するものとする。
また、業務内容の変更により、契約金額に変更が生じる場合は、両者が協議のうえ、履行期間末日までに、契約変更を行うものとする。
- (2) 本業務により得られた成果は、当所に帰属するものとする。
- (3) 本業務の遂行上過程では、調査職員と綿密な連携を保ち、進捗状況を報告するものとする。
- (4) 本業務により得られた情報および成果は、当所の許可なく公表したり、他に転用してはならない。

以 上

別 紙

DNA 抽出 (GF/F フィルター)

採取場所	採取時期	数量
東京湾	2025 年 3 月 (冷凍保管中), 契約後直ぐに発送可	18
東京湾	2025 年 10 月上旬頃	10
東京湾	2025 年 10 月下旬頃	10
東京湾	2025 年 11 月上旬頃	10
東京湾	2025 年 11 月下旬頃	10

種特異的解析

採取場所	採取時期	数量	対象種
東京湾	2025 年 10 月上旬頃	20	<i>Engraulis japonicus</i>
東京湾	2025 年 10 月下旬頃	20	<i>Engraulis japonicus</i>
東京湾	2025 年 11 月上旬頃	20	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
東京湾	2025 年 11 月下旬頃	20	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>

魚類の網羅的な定量解析

採取場所	採取時期	数量
東京湾	2025 年 3 月 (冷凍保管)	18
東京湾	2025 年 10 月上旬頃	20
東京湾	2025 年 10 月下旬頃	20
東京湾	2025 年 11 月上旬頃	20
東京湾	2025 年 11 月下旬頃	20

種特異解析に関する対象種のプライマー

Acanthopagrus schlegelii

Takahashi S, Sakata MK, Minamoto T, Masuda R (2020) Comparing the efficiency of open and enclosed filtration systems in environmental DNA quantification for fish and jellyfish. PLoS ONE 15(4): e0231718.

Engraulis japonicus

Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing.

Metabarcoding and Metagenomics 2: e23297.