



RIKEN CBS  
脳神経科学研究センター

RESEARCH  
RESOURCES  
DIVISION  
研究基盤開発部門

# RRD

## 研究技術支援案内

外部連携用



本冊子の引用や転載を禁止します。

# 脳神経科学研究センター研究基盤開発部門(RRD)

## 概要

研究基盤開発部門 (RRD) は、脳神経科学研究センター (CBS) を中心に研究技術開発・支援を行う組織である。現在、当部門は組織構成図 (ページ4) に示すように4つの支援ユニットから構成され、担当する技術分野は多岐にわたる。

各支援ユニットの業務内容については、下記のウェブサイトおよび本支援案内を参照いただきたい。

<https://cbs.riken.jp/jp/faculty/rrd/>

### ※注意※

外部の方への支援提供は、現段階では本支援案内の一部であることをご了承ください。支援項目は、将来拡充する予定です。



研究基盤開発部門 部門長  
上口 裕之(M.D., Ph.D.)

## 支援業務の区分け

RRDが行う主な研究支援業務は、以下のように区分される。

### ・研究技術支援

理研内外の研究室等(ラボ)からの依頼を受けて試料を預かり、十分な知識と経験をもったRRDの技術者が最適な条件でこれを解析し、あるいは試料を基に有体物を作製する。支援項目は組織構成図(ページ4)に示す。

### ・テクニカルパーソネルサポートセクション(TPSS)によるカスタマイズ技術支援

TPSSは、ラボにより密着してサポートを行う、ラボの人手不足時に実働する、ラボが保有しない技術を提供するなど、ラボのニーズにカスタマイズしてこたえる技術支援である。また、ラボが新規開拓した先端技術の移転を受けて、他のラボに提供する。

### ・共用実験施設の管理業務支援

RRDに設置された共用実験施設、およびその施設内の共用研究機器の維持・管理を行う。ラボのメンバー(所属長、研究員、テクニカルスタッフ、パートタイマー、研修生など)は適宜利用者登録の上、事前予約を行うことでこれらを自ら使用することができる。

### ・技術普及支援

RRDが新規研究機材の展示会や既有機器の講習会などを企画し、神経科学をはじめとする種々の研究に必要な最新技術を理研メンバーに普及支援する。

### ・外部連携

共同研究やTRIP外部共用収入事業制度を用いて、RRDの一部の研究技術支援を理研外にも普及する。

## RRDの利用者

RRDはCBS内の組織であるため、主な利用者はCBSメンバーであるが、施設、機器、人員等の状況が許す限り、全理研メンバーを対象とする。また一部の研究技術支援は、理研外からの利用も可能とする。

## 実験動物、試料・データの所有権

研究支援業務としてRRDがラボから預かる実験動物、試料、ならびに支援業務の結果から得られた有体物およびデータの所有権は、別途取り決めがない限り、依頼者のラボに属する。上記の試料等ならびに紙・電子媒体などのあらゆるデータは、一定期間RRDにおいて保管した後、または依頼元ラボが閉鎖された場合には、それらを廃棄抹消する（但し、ヒトゲノム・遺伝子解析をはじめヒト由来試料に関するデータは別扱いとする）。

## 外部の方がご利用の場合は、「TRIP外部共用収入事業」の制度を利用

最先端研究プラットフォーム連携(TRIP)事業推進室が行うTRIP外部共用収入事業制度を用います。下記URLにアクセスいただき、詳細をご確認ください。

<https://trip-r-coms-openfacility.riken.jp/guide.html>

### ※注意※

手続きには一定の時間がかかりますので、予めご了承ください。

### ・利用料について

理研の規程により後払いで、基本料金に間接経費（一般管理費）を加算した金額を利用料とする。基本料金は、支援実施のための実費（消耗品費、器材の維持・管理費、および技術費（人件費））より算出している。これとは別に、試料、成果（データ、有体物など）の授受に要する費用（荷造り料、送料等）は全て依頼者負担となる。

### ・流れについて

1. 問い合わせフォームより依頼  
<https://riken-cbs.form.kintoneapp.com/public/rrd-contact>
2. RRDより依頼内容について確認後に、打ち合わせ等を行って支援実施の可否を判断
3. 支援可能と判断された依頼者は、以下のサイトの「利用案内」にあります「申込書類」より必要書類をダウンロードして、TRIP外部共用収入事業事務局 宛へ提出  
<https://trip-r-coms-openfacility.riken.jp/guide.html>
4. TRIP外部共用収入事業事務局の利用審査を受けて結果が可能な場合、RRDにて支援実施
5. RRDより依頼者へ詳細データ等の返却
6. TRIP外部共用収入事業事務局より、納品書・請求書・外部共用利用確認書を受け取り、指定口座へ入金

## 成果の発表にあたってのお願い

今後もRRDの研究技術支援を継続するためには、研究成果への貢献が求められる。  
各ユニットの研究技術支援、共用実験施設、および共用機器を用いて得られた研究成果を発表する際には、「方法」、「謝辞」などにその旨を記載していただきたい。共同研究として技術支援を受けた場合は、共著としていただきたい。

センター、部門、および、各ユニットの英語名は下記のとおりである。

脳神経科学研究センター (CBS)  
RIKEN Center for Brain Science

研究基盤開発部門 (RRD)  
Research Resources Division

動物資源開発支援ユニット (ARD)  
Support Unit for Animal Resources Development

生体物質分析支援ユニット (BMA)  
Support Unit for Bio-Material Analysis

機能的磁気共鳴画像測定支援ユニット (fMRI)  
Support Unit for Functional Magnetic Resonance Imaging

電子顕微鏡技術支援ユニット (EMT)  
Support Unit for Electron Microscopy Techniques

(記入例)

註) ユニット名 (###) には上記の英語名を記載。

### 1. Materials and Methods [スペースに余裕がある場合]

XXX was analyzed using the YYY at the Support Unit for ### in RIKEN Center  
For Brain Science, Research Resources Division (RRD).

### 2. Acknowledgments [必ず記述]

#### i) Methodsに利用したユニットの記載がない場合

We are grateful to the Support unit for ###, RIKEN CBS Research Resources Division, for technical help with XXX service.

We thank the Support Unit for ###, RIKEN CBS Research Resources Division, with special thanks to Ms. YY and Mr. ZZ for XXX analysis.

#### ii) Methodsに利用したユニットの記載があり、担当スタッフの貢献度が高い場合

We thank Ms. XX for technical assistance with YYY.

#### iii) RRDのいくつかのユニットを利用した場合

We thank the staff of Research Resources Division, RIKEN Center for Brain Science, for generation of AAA mice and analysis of ZZZ.

### 3. 利用したユニットのスタッフが共著者となる場合

所属は、Support Unit for ###, Research Resources Division, RIKEN Center for Brain Science

# 研究基盤開発部門(RRD)

部門長 上口裕之 (M.D., Ph.D.)

※現段階で外部へ提供できる支援は、☆印のみとなります。

生体物質分析支援ユニット(BMA)		ユニットリーダー 宮坂信彦(Ph.D.)
研究技術支援	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ DNA配列解析(プラスミド抽出, 前処理, 配列解析)</li> <li>★ 遺伝子微量定量解析                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- FANTOM3クローンの分与</li> </ul> </li> <li>★ ペプチド合成                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 実験器具洗浄</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 遺伝子多型解析</li> <li>★ 次世代シーケンス解析</li> <li>★ アミノ酸分析</li> <li>★ 自動細胞分取分析</li> </ul>
テクニカル パーソナルサポート セクション(TPSS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 分子生物学実験                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- ウイルス作製実験</li> </ul> </li> <li>★ 組織学実験</li> <li>★ バイオイメージング実験</li> </ul>	
共用実験施設	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 放射線管理区域 ラジオアイソトープ実験棟CBS共用実験室</li> <li>- 共用機器コーナー                             <ul style="list-style-type: none"> <li>・分子生物学実験室</li> <li>・組織標本作製室</li> <li>・クロマト分析室</li> </ul> </li> <li>- フリーザールーム(レンタル)</li> <li>・遺伝子定量解析室</li> <li>・画像撮影・解析室#1, #2</li> <li>・生化学実験室</li> <li>・P2/レベル2実験室</li> <li>・超解像顕微鏡室#1, #2</li> <li>・フローサイトメトリー室</li> </ul>	
技術普及支援	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RRD研究用機器展示</li> <li>- 研究技術教育セミナー(BMAクラス)</li> </ul>	

※現段階では、遺伝子組換え生物とヒト由来のサンプルは対象外。

機能的磁気共鳴画像測定支援ユニット(fMRI)		ユニットリーダー 岡田 知久 (M.D., Ph.D.)
研究技術支援 (指導並びに補助)	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ ヒト用MRIを用いたヒトを被検体とする測定                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 生体情報計測(呼吸・脈波・視線など)や刺激提示(視聴覚、痛みなど)の支援</li> <li>- fMRI測定予備実験</li> <li>- 倫理審査の支援</li> </ul> </li> </ul>	
共用実験施設	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Focus Ion Beam-SEM</li> <li>- FE-SEM</li> <li>- 高圧凍結装置</li> <li>- ウルトラマイクローム</li> <li>- 画像解析用PC</li> </ul>	

動物資源開発支援ユニット(ARD)		ユニットリーダー 新美君枝 (D.V.M, Ph.D.)
動物実験施設	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 哺乳動物実験施設(マウス, ラット, ウサギ, マカクサル, マーモセット, 特殊動物)</li> <li>- 水生動物実験施設(ゼブラフィッシュ)</li> </ul>	
研究技術支援	<p>受託:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 胚操作</li> <li>- コンジェニックマウス作製</li> <li>- トランスジェニックマウス作製</li> <li>- CRISPR/Casシステムを用いた遺伝子改変マウス作製</li> <li>- ES細胞樹立</li> <li>- ノックアウトマウス作製</li> <li>- マウス・ラットのSPF化</li> <li>★ 抗体作製</li> <li>- 子宮内エレクトロポレーション</li> <li>- 動物健康管理</li> </ul> <p>指導並びに補助:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 動物実験の実施に関わる指導・補助</li> </ul>	

2024.10.1

## 生体物質分析支援ユニット

生体物質分析支援ユニット(BMA)では、ラボから依頼された細胞および生体物質(タンパク質・核酸・アミノ酸など)の分析・解析やペプチド合成などを研究技術支援として、またテクニカルパーソネルサポートセクション(TPSS)のスタッフによる分子生物学実験、組織学実験、バイオイメージング、ウィルスベクター作製などをカスタマイズ技術支援として提供する。さらに理研のメンバーがいつでも利用できる共用実験施設の維持・管理および技術指導を担当している。共用機器コーナー(CUE)には、種々の研究に利用できる汎用性の高い研究機器、利用に専門技術が必要な研究機器、およびラボでは購入が難しい高額研究機器などを用途ごとに分けて設置している。これらの共用機器を円滑に利用するため、また生体物質分析についての基礎技術普及のために、保有の研究機器の原理とその応用や関連解析ソフトウェアについての講習会や最新の研究機器および器材などの展示会も開催している。

## 研究技術支援業務

### BMAにおける研究技術支援の利用に際して

**☆印のみが、外部へ提供できる支援であり、現段階では、遺伝子組換え生物とヒト由来のサンプルは対象外。**

#### 稼働日

理化学研究所の就業日に稼働する。機器のメンテナンス、公式行事、年末年始などで稼働を停止する場合は、適時連絡する。

#### 解析データの保存

解析データは、原則として解析終了後5年間保管する(例外:一部の技術支援においては、ヒト由来試料の解析結果は保管しない。また5年以内でもラボが閉鎖する場合は、保管データの全てを消去する)。

#### 成果発表にあたって

BMAによる研究技術支援で得られたデータなどを研究論文などに公表する際には、「方法」や「謝辞」に当ユニットを利用した旨を記述する。また特殊な分析・解析や合成を行うなど支援の貢献度が高い場合は、担当スタッフへの謝辞や共著者とする事も考慮すること。

## ★ DNA配列解析(プラスミド抽出・前処理反応・配列解析)

### 1. 支援の内容

#### プラスミド抽出

植菌済の培地容器を受領し、一晚培養後にプラスミド抽出作業を行う。

抽出はBiomek i7 (Beckman Coulter) を用い、NucleoSpin Plasmid抽出キット (Macherey-Nagel) によるアルカリ-SDS法およびシリカメンブレン法で行う。抽出フォーマットは96-wellタイプと8-wellタイプの2種類である。また、384 wellから96 wellへの分注作業も受けている。



Biomek i7  
(Beckman Coulter)

#### 前処理反応 (サイクルシーケンス反応)

プラスミドやPCR productなどをテンプレートとしてサイクルシーケンス反応を行う。GCリッチ・高次構造をもつ配列を含むサンプルの処理 (アルカリ処理) やPCRプロダクトの精製処理 (ExoSAP酵素処理) も受けている。

#### DNA配列解析 (サンガー法)

サイクルシーケンス反応後のサンプルから、過剰なBigDye Terminatorを磁気ビーズCleanSEQ (Beckman Coulter) を用いて除去する。その後、DNAアナライザ 3730xl (Applied Biosystems) を用いて泳動を行う。

3730xl  
(Applied Biosystems)

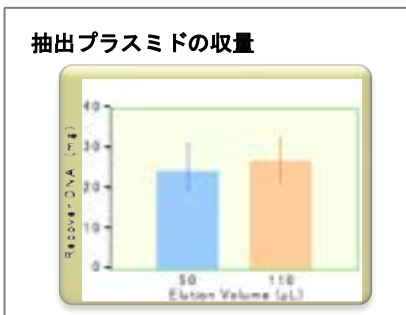


DNA配列解析業務として、プラスミド抽出からDNA配列解析までの依頼が可能である。

### 2. 支援の流れ:方法・結果

**プラスミド抽出方法**

- ① 植菌された培地を37°C、17時間培養。
- ② 遠心により集菌。
- ③ 菌体をResuspension Bufferに懸濁。
- ④ Lysis Bufferを加え溶菌。
- ⑤ Neutralization Bufferを加え中和。  
アルカリおよびSDSにより変性した大腸菌ゲノムDNAおよびタンパク質は不溶物となる。(アルカリ-SDS法)
- ⑥ 除去フィルターにより溶解液から不溶物を除去。
- ⑦ シリカメンブレンフィルターにプラスミドDNAを吸着。
- ⑧ Wash Bufferでシリカメンブレンフィルターを洗浄後、Elution BufferによりプラスミドDNAを溶出。



**抽出プラスミドの用途**

- ・ DNA配列解析: 約800 bpの解析が可能
- ・ 培養細胞へのトランスフェクション

例)  
大腸菌 DH5α株から96-wellキットを用いて蛍光タンパク発現プラスミドpmCyan-N1を抽出。Lipofectamine 2000 (インビトロジェン) を用いてHEK293細胞へトランスフェクションした (右図)。

HEK293細胞

蛍光顕微鏡写真



**前処理反応（サイクルシーケンス反応）**

[反応液組成]

Sample (Template DNA + Primer)	5.0 $\mu$ l
BigDye Terminator v3.1	1.0 $\mu$ l
5 x Sequencing Buffer	3.5 $\mu$ l
Deionized Distilled Water	10.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20.0 <math>\mu</math>l</b>

[サイクルシーケンス反応条件]



**DNA配列解析**

[サイクルシーケンス反応物の精製]

サイクルシーケンス反応により未反応BigDye TerminatorをCleanSEQを用いて除去する。

[泳動結果]

```

ACGCCGGACTTGTG
CCTTGC CGGAACG
TAGAGGAG~

```

泳動図 (ABI3730xl)

解析データ (解析ソフト : 4 Peaks)

## ★バイオアレイ解析(バイオアナライザ)

### 1. 支援の内容

Agilent 2100バイオアナライザを使用して、各種サンプルのDNA、RNA解析を行う。  
次世代シーケンス解析用のサンプルの品質チェック(QC)にも用いる。

### 2. 支援の流れ:方法・結果

各ウェルにサンプルを1 $\mu$ L加える。

**サンプル濃度**

RNA Nano Chip: 25-500 ng/ $\mu$ l,  
 RNA Pico Chip: 200-5,000 pg/ $\mu$ l  
 DNA1000 Chip: 0.1-50 ng/ $\mu$ l  
 高感度DNA Chip: 5-500 pg/ $\mu$ l

バイオアナライザーで泳動する。

**結果 : Total RNAチェック**

自動的に18S、28S等からRIN(RNA Integrity Number: RNA品質の指標)を算出。  
通常7以上(Max10)で実験に用いる。

## ★遺伝子多型解析

### 1. 支援の内容

#### フラグメント解析 \*

蛍光ラベルされた対象となるDNA断片をジェネティックアナライザ 3130x1 (Applied Biosystems) を用いて電気泳動し、移動度やサイズを検出する。

#### ジェノタイピング

##### ①前処理 (ゲノムDNA抽出)

Agencourt DNAdvance Kit (ベックマン・コールター) を使用し、マウスあるいはラットの尾または耳からゲノムDNA抽出を行う。その他のサンプル (セブラフィッシュの尾やヒトの爪など) のジェノタイピングにも対応している。

##### ②前処理 (PCR) \*

蛍光標識プライマーを用い、目的DNA断片を増幅する。

##### ③サイジング \*

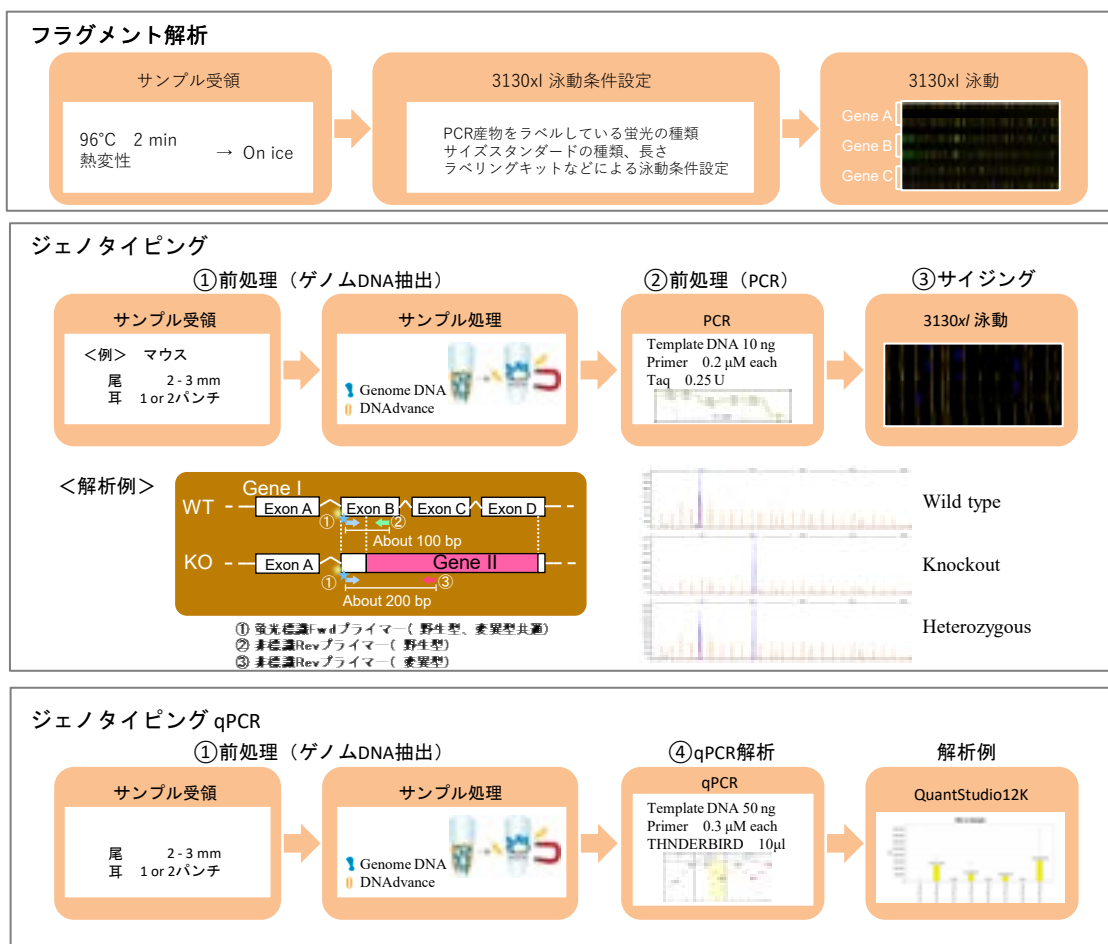
3130x1 により増幅DNA断片の泳動を行う。

##### ④ジェノタイピング qPCR

マウステイルなどの生体試料から抽出したゲノムDNAをテンプレートとし、リアルタイムPCR装置を使用してジェノタイピングを行う。

\* 解析条件が定まっていない場合は条件検討も行なっている。(有償)

### 2. 支援の流れ:方法・結果



# ★遺伝子微量定量解析

## 1. 支援の内容

### • 標的遺伝子の発現量を定量

cDNAサンプル、プライマー、プローブ (TaqMan Assayの場合)、Master Mixを混合した後、PCR反応で発現値を算出する。TaqMan Assay、SYBR Green Assayに対応。

### • SNPのジェノタイピング

cDNAサンプル、プライマー、2種類のプローブ、Master Mixを混合した後、PCR反応でSNPを検出。

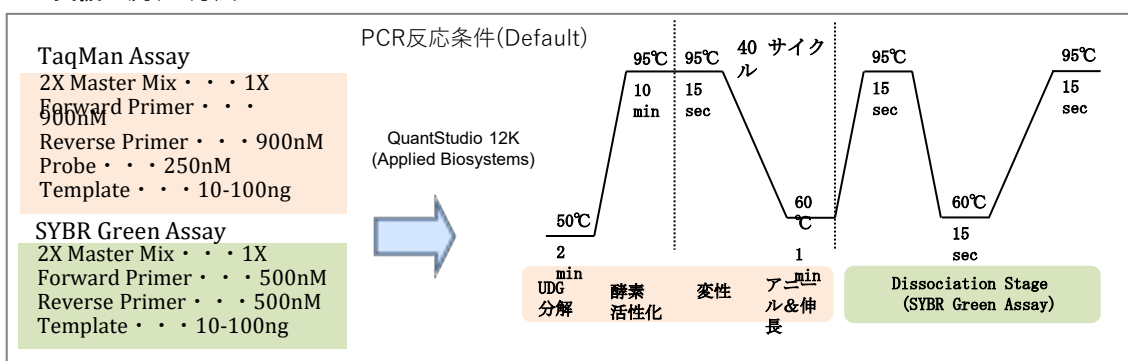
### • マウスジェノタイピング

gDNAサンプル、プライマー、プローブ (TaqMan Assayの場合)、Master Mixを混合した後、PCR反応で発現値を算出する。TaqMan Assay、SYBR Green Assayに対応。

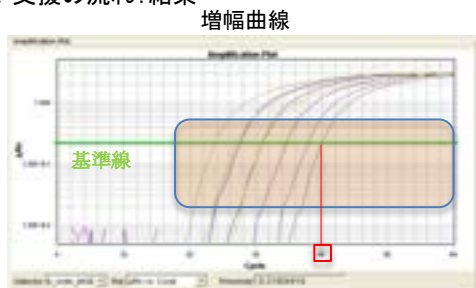
### • SYBR Green Assayの条件検討

ユーザーの作製したプライマーセットの非特異的産物の有無、濃度条件を検討する。

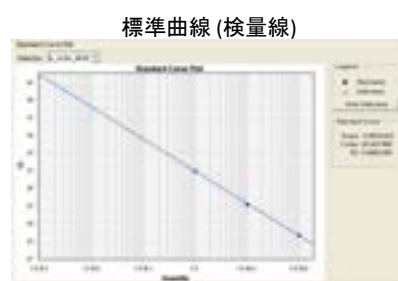
## 2. 支援の流れ:方法



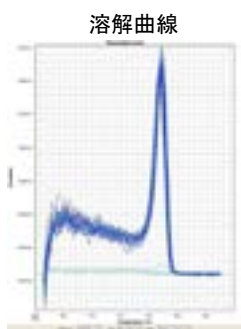
## 3. 支援の流れ:結果



対数増殖期の中に引いた基準線との接点時のサイクル数をもとにCt値を算出する。



検量線は、増幅曲線より得られたCt値とQuantityに入力した標準サンプルの定量値の値を使用して作成する。



反応後のPCR産物を熱処理し解離させ、その後冷却しアニールさせる。ゆっくり温度を上げてゆき、その間の蛍光をモニタリングする。非特異的な産物が含まれると複数のピークが生じるので、産物の特異性を確認することができる。(SYBR Green Assayのみ)

Result Table

Well	Sample Name	Detector Name	Reporter	Task	Ct	Quantity
1	Control_1/100	GAPDH_MGB	VIC	Standard	25.7	1
2	Control_1/10	GAPDH_MGB	VIC	Standard	28.02	10
3	Control_1	GAPDH_MGB	VIC	Standard	31.68	100
4	Sample A	GAPDH_MGB	VIC	Unknown	28.37	11.02
5	Sample B	GAPDH_MGB	VIC	Unknown	30.27	2.924
6	Sample C	GAPDH_MGB	VIC	Unknown	28.02	10

増幅曲線より算出されたCt値をもとに検量線から各サンプルのQuantityを計算。

解析例

	GAPDH		Probe A		Probe Aの相対値
	測定結果	相対値(X)	測定結果(Y)	補正した定量結果(Y/X)	
Sample A	6384	1	0.981	0.981	1
Sample B	8584	1.34	44.2	33	33.6
Sample C	7430	1.16	1.93 X 10 <sup>4</sup>	1.66 X 10 <sup>4</sup>	1.69 X 10 <sup>4</sup>

1. GAPDH (内部標準) の定量結果からRNA量の誤差を求める。
2. ProbeAの定量結果を1で求めた誤差で補正する。
3. 補正されたProbeAの定量結果をもとに、サンプル間の相対値を計算する。

## ★次世代シーケンス解析 (前処理・シーケンス解析)

### 1. 支援の内容

#### ・前処理

Agilent社製SureSelectなどを用いて Genome DNA からExonなど解析に必要な部分を濃縮し、次世代シーケンス用ライブラリー (Illumina用) を作製する。他のアプリケーションにも対応している。  
(実績例: Whole Genome、ChIP-Seq、Methyl-Seq、RNA-Seq、1細胞シーケンス [Quartz-Seq2] 等)

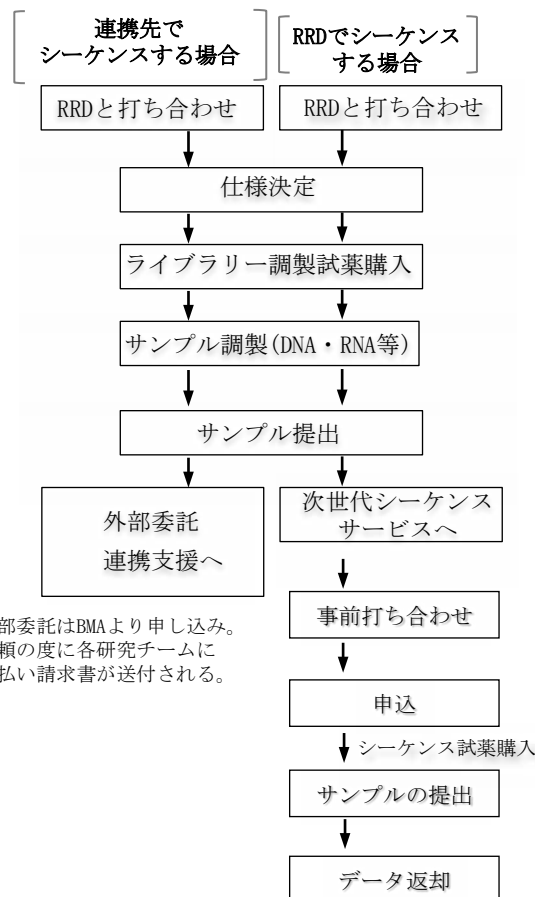
#### ・MiSeqを用いたシーケンス解析

BMAでは、MiSeqを用いたシーケンスのみを行う。Illumina用シーケンスライブラリーをMiSeqでクラスター形成、シーケンス、FASTQファイル作成をする。

#### ・連携支援 次世代シーケンス解析支援

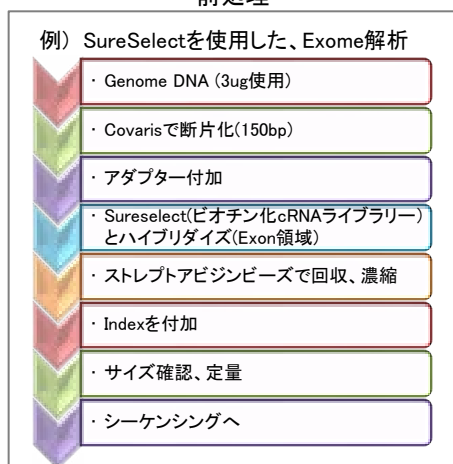
打ち合わせからQCまでをRRDで行い、シーケンスは外部委託する。NovaSeq、HiSeq Xに対応している。

### 2. 支援の流れ:ユーザーの手順



### 3. 支援の流れ:方法・結果

#### ・前処理



断片化装置 (Covaris)



次世代シーケンサー MiSeq

#### ・シーケンス解析 (BMAでシーケンスする場合)



#### ・シーケンス解析 (連携支援でシーケンスする場合)

- ・ 打ち合わせ時に使用するキット等を決める。
- ・ BMAでライブラリー調整。各種アプリケーションに対応。  
(Exome、RNA-Seq、ChIP-Seq、Methyl-Seq等)
- ・ QCはBioanalyzer、MiSeqを使用して行う。
- ・ 定量にはKAPAを使用。
- ・ 外部委託先でQC後にシーケンス

## ★質量分析

### 1. 支援の内容

#### 各種化合物の質量測定

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法あるいはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いて、質量測定または精密質量測定を行う。

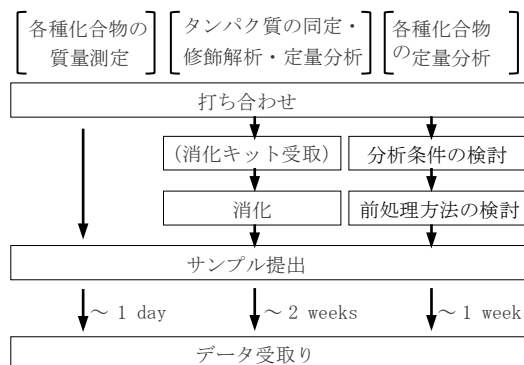
#### タンパク質の同定・修飾解析

タンパク質の酵素消化断片を nanoLC により分離し、ESI 法を用いて MS/MS 測定をすることによりタンパク質同定または修飾解析を行う。四重極-Orbitrap 型質量分析計を用いた高精度同定・修飾解析および網羅的比較定量 (安定同位体ラベル法、ラベルフリー法) も行う。

#### ターゲットタンパク質・低分子化合物の定量分析

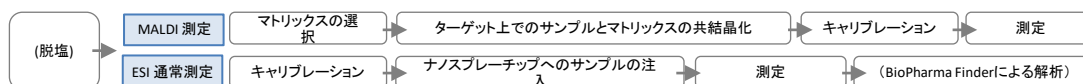
三連四重極型質量分析計を用いた Multiple Reaction Monitoring (MRM) 測定によるターゲットタンパク質および各種低分子化合物の高感度定量を行う。絶対定量には、安定同位体ラベルした内部標準物質を用いることを推奨している。

### 2. 支援の流れ:ユーザーの手順

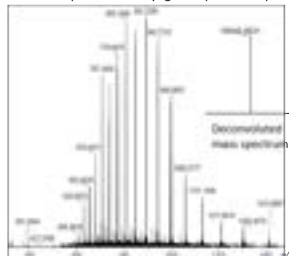


### 3. 支援の流れ:方法・結果

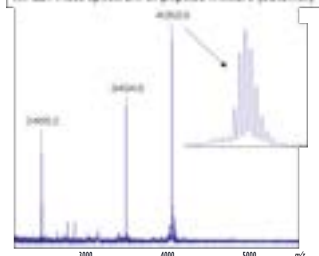
#### 各種化合物の質量測定



ESI mass spectrum of Myoglobin (QExactive)



MALDI mass spectrum of peptide mixture (autoflex)

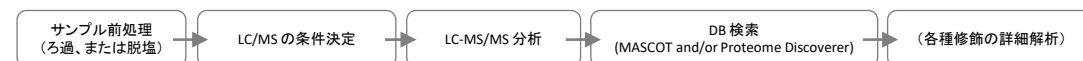


QExactive

autoflex

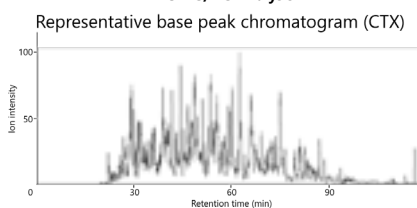
- ・検出感度は、fmol-pmol オーダーが目安である。
- ・塩、界面活性剤等の使用は極力避ける。必要に応じて、濃縮脱塩チップによる処理を行う場合がある。

#### タンパク質の同定・修飾解析

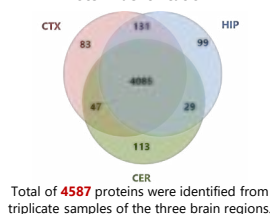


#### Comparison of Specific and Ubiquitous Protein Expressions among Mouse Brain Regions, Cerebral Cortex (CTX), Hippocampus (HIP), and Cerebellum (CER)

##### LC-MS/MS Analysis



##### Protein Identification



Vanquish Neo + QExactive

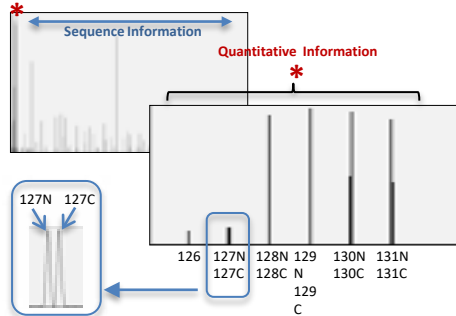
- ・酵素処理は専用の実験スペース (N005) の利用が望ましい。
- ・データベース検索を行う際に、サンプルの由来や生物種情報が必要となる。

## タンパク質の網羅的比較定量分析



-Stable isotope labeling method-

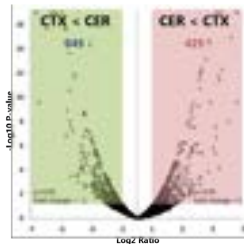
MS/MS spectrum (TMT labeling)



-Label-free method (LFQ)-

Comparison of Protein Expression between CTX and CER

Volcano Plots



Vanquish Neo + QExactive

- ・iTRAQ/TMT, SILAC,  $^{18}\text{O}$  などを用いた各種安定同位体ラベル化法、ラベルフリー法を用いることで、多検体間の網羅的比較定量分析が可能である。

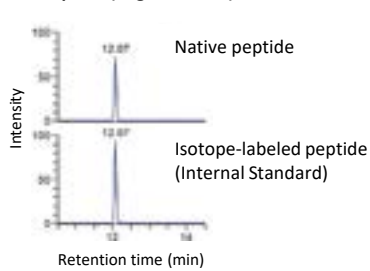
## ターゲットタンパク質・低分子化合物の定量分析

-Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法-

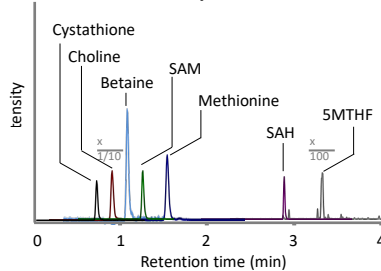


- Quantitation using MRM method -

Peptide (angiotensin-II)\*



Methionine cycle metabolites



Vanquish UHPLC + TSQ Altis



Easy-nLC 1200 + TSQ Vantage

- ・定量対象ペプチド・化合物のみを選択的に検出をするため、大変感度の高い手法である。
- ・タンパク質定量の場合、BMAにおいてTransitionリストを作成済みのものはメソッド開発をせず、すぐに定量可能。
- ・新規化合物の定量を行う際には、ユーザーによる試料の前処理方法の検討やBMAによるUHPLCとTSQの条件検討 (Transitionの決定を含むMethod 開発など)が必要である。

\* Modified from user's publication: *Mol Cell*. 2015 Jun 18;58(6):1015-27.



## ★ペプチド合成

### 1. 支援の内容

#### ペプチド合成

自動ペプチド合成装置を用いて固相合成法によりペプチドを合成する。品質は逆相液体クロマトグラフィーおよび質量分析(MALDI-TOF/MS)により測定する。粗ペプチドまたは凍結乾燥した精製ペプチドを依頼者に提供する。ペプチド精製のみの依頼も可能。

#### 修飾

キャリアタンパク質(KLHまたはBSA)を架橋する事により、抗原ペプチドを作製する。

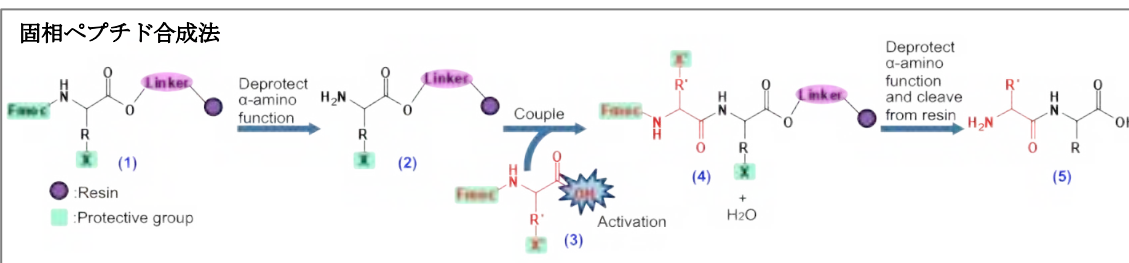
N末端：Free, Ac, Fmoc 等

C末端：Free, NH<sub>2</sub>, Resin 等

#### 特殊合成

31残基以上の長鎖ペプチド、250 μmol合成、ペプチドのビオチン化、蛍光化、環状化、または非天然アミノ酸、リン酸化アミノ酸などを多数含むペプチドを合成する。

### 2. 支援の流れ: 方法・結果



#### 合成

自動ペプチド合成装置を使用し、C末端側から順番にアミノ酸を伸長して、ペプチドを合成する。合成スケールや配列により装置を使い分ける。



433A



Liberty Blue



MultiPep CF & MicroColumn

#### ペプチド分析

目的のペプチドは、HPLCで分離・分取して精製品とする。粗ペプチドおよび精製ペプチドの品質は、HPLCとMALDI-TOF/MSを用いて確認する。



Chromaster

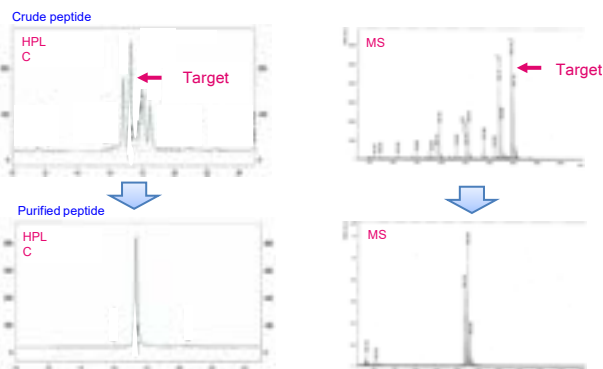


microflex

#### HPLC conditions:

Column, Inertsil ODS-3 (250 x 4.6 mm I.D.)  
 Mobile phase, 1-51% CH<sub>3</sub>CN (contg. 0.1% TFA)  
 Flow rate, 1.0 mL/min

Column temp., 25°C  
 Analytical time, 50 min  
 Detection, UV at 215nm



## ★タンパク質精製

### 1. 支援の内容

#### 抗体精製

AKTA (Cytiva (旧GEヘルスケア)) を用いて、ペプチド抗体の精製を行う。

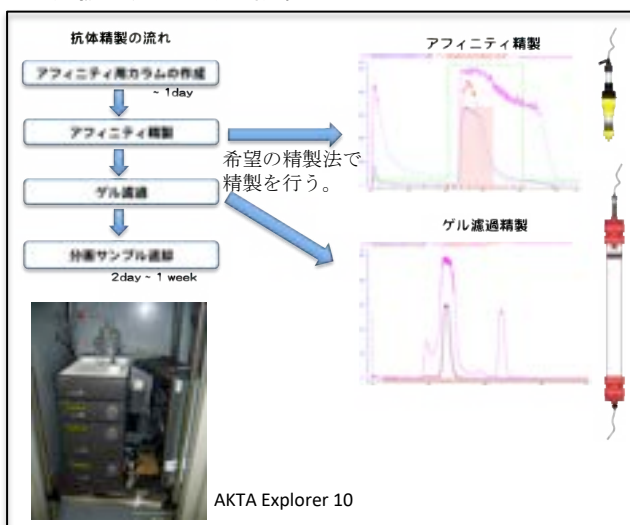
#### 生体内タンパク質の精製

生体試料（脳、細胞、血清など）から特定のタンパク質精製を行う。タンパク質は精製データと共に返却する。

#### 標的タンパク質の精製

組み換えタンパクの分離、His-tag融合タンパク、GST融合タンパク、IgG抗体、セリンプロテアーゼ精製も可能である。

### 2. 支援の流れ: 方法・結果



## ★アミノ酸分析

### 1. 支援の内容

アミノ酸組成分析や神経伝達アミノ酸およびモノアミンの定量分析を高速液体クロマトグラフ装置とそれぞれに最適な手法と検出器を組み合わせる。クロマトグラムと分析結果を返却する。脳透析液中のアミノ酸やモノアミン測定にも対応する。

#### ・ニンヒドリン法- アミノ酸成分分析

ポストカラム法を用いて、遊離アミノ酸、アミノ糖、タンパク質の加水分解物の分析を行う。

#### ・蛍光法-神経伝達アミノ酸分析 (OPA法, カラムスイッチング法)

プレカラム法を用いて、脳組織抽出液、髄液、血液、および脳透析液からグルタミン酸、アスパラギン酸およびGABAなどアミノ酸の定量分析を行う。

#### ・電気化学検出法-モノアミン分析

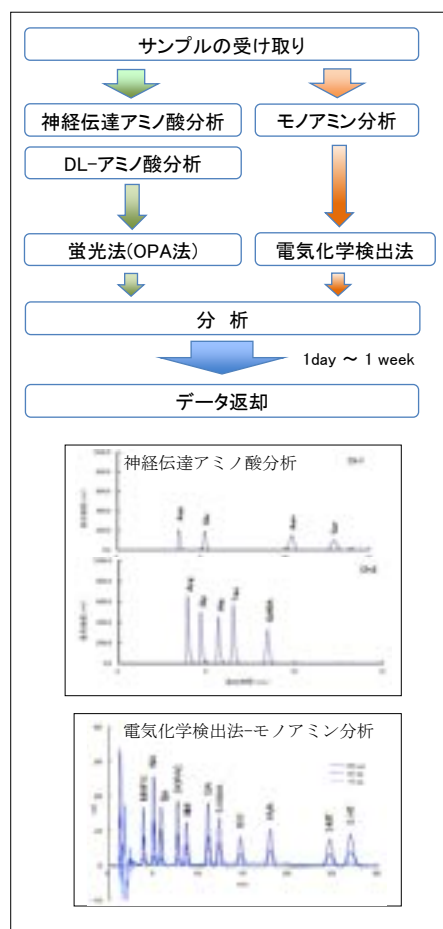
電気化学検出法を用いて、脳組織抽出液、髄液、血液、および脳透析液からモノアミン（ノルアドレナリン、ドーパミン、セトロニン）とその代謝物などの定量分析を行う。

#### ・神経修飾物質の分析

新規な化合物の分析メソッド開発を行い、定量分析を行う。

### 2. 支援の流れ

蛍光法-神経伝達アミノ酸分析  
電気化学検出法-モノアミン分析



ニンヒドリン法  
アミノ酸成分分析



蛍光法 神経伝達アミノ酸分析  
(OPA法, カラムスイッチング法)



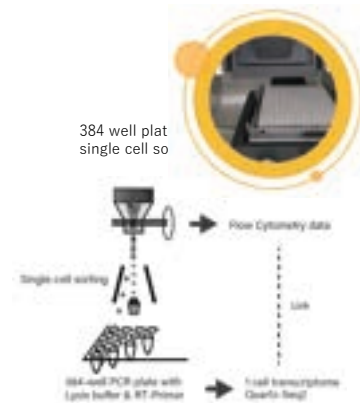
電気化学検出法 モノアミン分析



## ★自動細胞分取分析

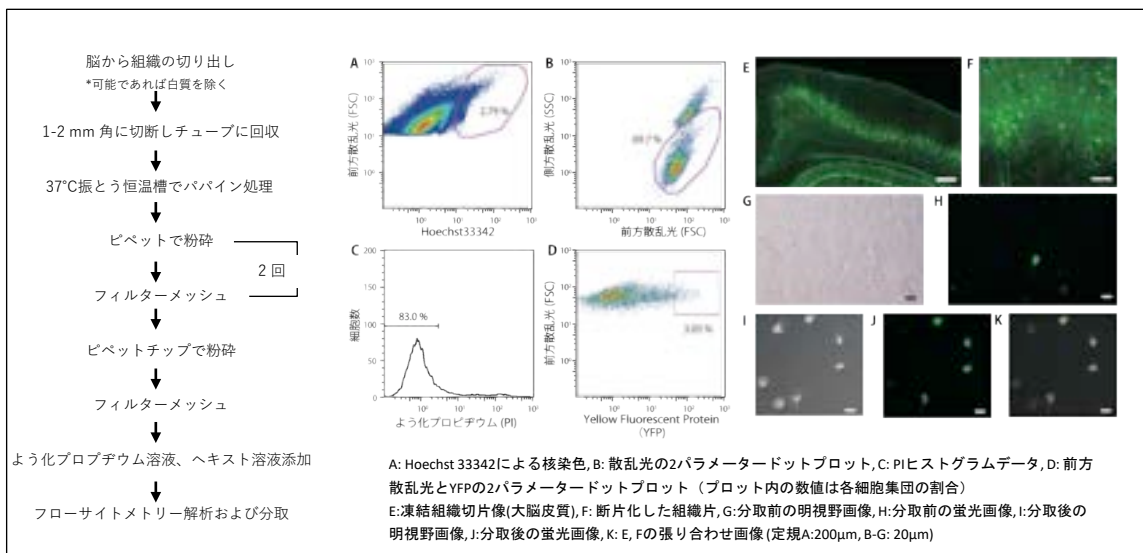
### 1. 支援の内容

- ・ 混在した細胞群の中から、蛍光標識された特定の細胞をセルソーター FACS Aria (BD社製) を用いて分取分析し、分取した細胞を返却する (必要に応じ、蛍光顕微鏡で撮像した画像データも返却する)。1度に4種類の細胞集団を分取することが可能である。
- ・ 一細胞解析に有用なインデックスソーティングに対応可能。
- ・ 分取後の純度など得られたデータは、フローサイトメトリー (FCM) 解析専用ソフトウェア FlowJo (BD社製) にて解析する。



### 2. 支援の流れ:方法・結果

脳組織を用いたFCM用サンプル調整の流れとYFP発現マウスを用いたFCM分取分析例 (文献より転載)



文献) 生体の科学 62(2) 165-170, 2011

## 実験器具洗浄

### 1. 支援の内容

- ・ CBS脳中央棟:  
研究に使用したガラス器具の洗浄を行う。  
実験をよりスムーズに進められるように乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌 (オートクレーブ) も行う。
- ・ CBS全棟:  
ピペットのチップ詰め替えおよび高圧蒸気滅菌 (オートクレーブ) を行う。

### 2. 支援の流れ:方法・結果

- ① 洗剤液を用いて超音波洗浄を行う。洗剤には、無リン中性洗剤 (2%スキヤット20X-N) を使用する。
- ② 手作業 (市水) に続き、自動洗浄機による流水水洗 (市水→セントラル純水\*) を行う。  
\*セントラル純水とは、活性炭→逆浸透膜 (ROモジュール)  
→イオン交換 (EDI装置) 処理した純水である。
- ③ 洗浄した器具類を乾燥させ、アルミホイルで口栓をする。
- ④ 乾燥後、以下の何れかの条件で滅菌を行う。  
註: 熱処理を必要としない場合は、申込時に知らせてください。

生体物質分析支援業務において使用している主要機器

2024年7月1日現在

機器名	メーカー	型番	設置室
DNA配列解析			
DNAシーケンサー	アプライドバイオシステムズ	3730x1	脳中央棟 N011
自動分注ロボット	ベックマン・コールター	Biomek i7	脳中央棟 N010
遺伝子微量定量解析			
リアルタイムPCRシステム	アプライドバイオシステムズ	7900HT, QuantStudio 12K	脳中央棟 C011
遺伝子多型解析			
遺伝子解析システム	アプライドバイオシステムズ	3130x1	脳中央棟 N011
バイオアレイ解析			
バイオアナライザ	アジレント	Agilent 2100 Bioanalyzer	脳中央棟 S004
次世代シーケンス解析			
次世代シーケンサー	イルミナ	MiSeq	脳中央棟 C011
質量分析			
MALDI TOF/TOF型質量分析装置	ブルカーダルトニクス	autoflex	脳中央棟 S002
三連四重極型質量分析装置	サーモフィッシャー サイエンティフィック	TSQ Altis/Vantage	脳中央棟 S002/N008
Orbitrapフーリエ変換質量分析装置		Q Exactive	
微量分析用高速液体クロマトグラフ		EASY nLC1200/Vanquish Neo	
超高速液体クロマトグラフィー		Vanquish UHPLC	
ペプチド合成			
ペプチド合成機	サーモフィッシャー サイエンティフィック	433A Peptide Synthesizer	脳中央棟 S003
		Liberty Blue	
	CEM Corporation	MultiPep CF	
高速液体クロマトグラフ	日立ハイテクノロジーズ	L-7450他	脳中央棟 S003
	GLサイエンス	Chromaster, UV702他	
MALDI TOF型質量分析装置	ブルカーダルトニクス	microflex	脳中央棟 S003
タンパク質精製システム	Cytiva	AKTA explorer10S Frac-950, AKTA prime	脳中央棟 C013
アミノ酸分析			
高速アミノ酸分析計	日立ハイテクノロジーズ	L-8900	脳中央棟 C013
高速液体クロマトグラフ	島津製作所	LC-10Avp	
	エイコム	700 シリーズシステム	脳中央棟 N004
エイコム	HITEC-500		
自動細胞分取分析			
フローサイトメトリーシステム	ベクトン・ディッキンソン	FACSAria II SORP, FACSAria SORP, FACSymphony A3	脳中央棟 S008

## テクニカルパーソナルサポートセクション (TPSS)

BMAでは、2018年10月より新たにカスタマイズ技術支援を提供するテクニカルパーソナルサポートセクション (TPSS) を発足し、専門技術員を配置した。本支援では、従来の研究技術支援よりもさらにラボの要望に寄り添った技術サポートを目指している。例えば、ラボにおけるルーティン実験では、ラボの実験プロトコルを用いて実験を代行する。また、ラボに備えがない実験技術ではアドバンスド技術支援として、その実験技術に精通したTPSSスタッフが実験および測定装置のオペレーターなどを行う。さらに、ラボが新たに開発した技術を他のラボへ普及するために、ラボから技術移転を受けた新規の支援を他のラボへ提供することも試みる。

### TPSSによるカスタマイズ技術支援の利用に際して

**☆印のみが、外部へ提供できる支援であり、現段階では、遺伝子組換え生物とヒト由来のサンプルは対象外。**

#### 稼働日

完全登録制で、理化学研究所の就業日に稼働する。

#### 解析データの保存

解析データは、原則として解析終了後5年間保管する。但し一部の技術支援においては、ヒト由来試料の解析結果は保管しない。また5年以内でもラボが閉鎖する場合は、保管データの全てを消去する。

#### 成果発表にあたって

TPSSを用いて得られたデータなどを研究論文に公表する際には「方法」や「謝辞」に当支援を利用した旨を記述する（ページ3参照）。また研究成果への貢献度が高い場合は、担当スタッフへの謝辞や共著者とする事も考慮すること。

### 技術支援業務項目

#### 分子生物学実験

- 新規プラスミドの作製と増幅

#### 組織学実験

- 脳定位固定下でのAAVマイクロインジェクション
- 組織染色および画像撮像  
灌流固定、包埋、  
免疫染色、in situハイブリダイゼーション、  
LacZ、Nissl、CO、Hematoxylin染色など
- デジタルスキャナおよび顕微鏡を用いた観察

#### バイオイメージング

- TissueCyteを用いたマルチセクション画像撮影

#### ウイルスベクター作製

- アデノ随伴ウイルスベクター作製
- レンチウイルスベクター作製
- 狂犬病ウイルスベクター作製

## ★ TPSS: 分子生物学実験 (プラスミドの作製と増幅)

### 1. 支援の内容

#### ・プラスミド作製

新規プラスミドの構築をサポートする。元になるプラスミドDNAを提出してもらい、希望の方法で遺伝子の組換え、再構築をおこなう。デザインからの相談も受け付ける。

#### ・プラスミド増幅

大腸菌からプラスミドDNAを必要量増幅・精製する。

精製はQIAGENのキットを使用。カラムサイズ別の収量の目安は以下の通り。

Miniprep : ~20  $\mu$ g Midiprep : ~100  $\mu$ g Maxiprep : ~500  $\mu$ g

### 2. 支援の流れ:方法・結果

<手順>

依頼者から提出してもらった挿入遺伝子とベクターを依頼者の希望した組換え方法で組換える

↓

依頼者の希望した方法でセレクションをおこなう

↓

必要に応じてシーケンス解析をおこなう (BMA技術支援DNA配列解析に依頼)

↓

希望した収量に増幅・精製する

↓

希望があればグリセロールストックを作製する

↓

DNA濃度を測定

↓

作業報告書と最終産物の受け渡しをする

## ★ TPSS: 組織学実験 (組織染色および画像撮像)

### 1. 支援の内容

#### 1. 灌流固定

#### 2. 切片作製 (凍結サンプル、未凍結サンプル)

#### 3. 各種染色

(免疫染色、In situ ハイブリダイゼーション、Nissl, Hematoxylin/Eosin染色など)

#### 4. スライドガラスへのマウンティング

#### 5. 観察、撮影 (RRD CUE デジタルスライドスキャナー等使用)

### 2. 支援の流れ:方法・結果

<切片作製時の様子>



YAMATO  
リトラトーム  
REM-700

フリージングマイクロトーム

<手順>

依頼者から受け取ったサンプル、試薬、プロトコールを使用し、中央棟C005で実験、もしくは依頼を受けた研究室で実験。

<染色例>



Nissl 染色

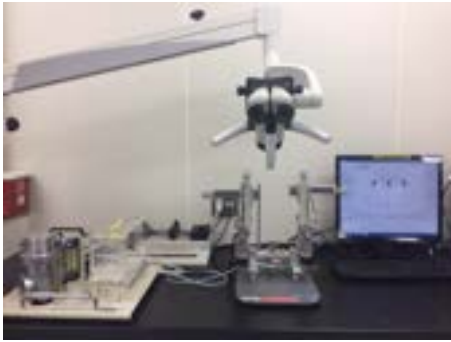


HE 染色

## TPSS: 組織学実験(AAVマイクロインジェクション)

### 1. 支援の内容

Angle Two Dual Stereotaxic/ Mouse (Leica) を使用し、マウスの脳内に AAVインジェクションを行う。( AAV 以外のウイルスベクター、神経トランスフェクター、薬物などの注入も可能)



Leica Angle Two Dual Stereotaxic/ Mouse

### 2. 支援の流れ:方法・結果

<手順>

ガラスキャピラリー作製 (Sutter, Micropipette puller P-97)  
↓  
テフロンチューブ片側にガラスキャピラリーを装着し、Angle Twoのアームにセット。反対側をハミルトンシリンジに装着し、シリンジポンプにセットする  
↓  
マウスを麻酔にかけ、脳定位固定装置に固定  
↓  
マウスの頭部を切開し、頭蓋骨を露呈  
↓  
Angle Two を起動する  
↓  
顕微鏡下で確認しながら、脳の高さを調節  
↓  
Targetの位置を確認し、頭蓋骨に穴を開ける  
↓  
AAVをキャピラリー先端から吸い上げ、Targetに合わせる  
↓  
AAV注入  
↓  
キャピラリーを引き抜き、縫合  
↓  
麻酔を止め、固定装置から外し、ケージに戻す

## ★TPSS: バイオイメージング(TissueCyteを用いたマルチセクションング画像撮影)

### 1. 支援の内容

TissueVision社 TissueCyte 1400FC を使用し、マウス、ゼブラフィッシュなどの小動物の脳を高性能ビブラトームでXY方向に自動セクションングしながら、各断面を二光子レーザー顕微鏡で広範囲の蛍光画像として撮像を行う。

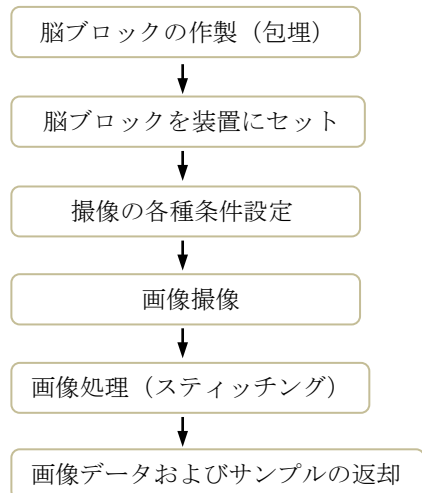
Ragan, T., et al. (2012). Serial two-photon tomography for automated *ex vivo* mouse brain imaging. *Nat. Methods* 9, 255–258.



TissueCyte 1400FC

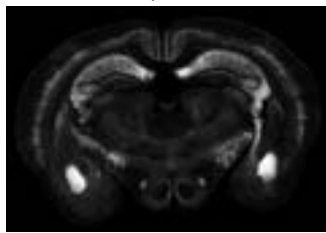
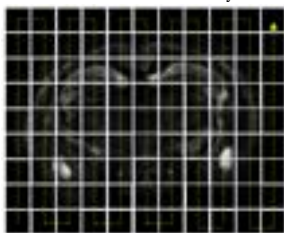
### 2. 支援の流れ:方法・結果

<手順>



<撮像例 : B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)HJrs/J >

TissueCyteステッチングソフトウェア



3D 構築(Image J)

## TPSS: ウイルス作製実験

### ・アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)

#### 1. 支援の内容

- ・カスタムメイドのAAVを提供する (P1レベル)。
- ・AAV作製に関する技術相談に応じる。

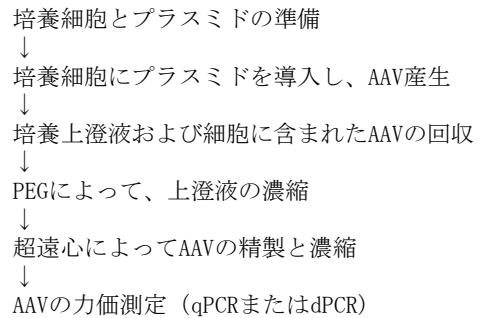
依頼者が希望するAAVの受託作製を行う。

- a. AAVのセロタイプ
- b. AAVに発現させる遺伝子
- c. 力価 (gc/mL) と分量 (μL)

※AAVに発現させる遺伝子を持つプラスミドは、依頼者が用意する。  
希望するセロタイプによっては、必要なプラスミドを依頼者が用意する。

#### 2. 支援の流れ: 方法・結果

AAV作製実験は、安全キャビネット内で操作を行う。



### ・狂犬病ウイルスベクター (RV)

#### 1. 支援の内容

- ・カスタムメイドのRVを提供する (P2レベル)。
- ・RV作製に関する技術相談に応じる。

RV作製支援を行うために、依頼者の状況を確認

- A. 希望しているRVを作製するために必要なプラスミドと細胞を取得しているか
- B. RVを使用する実験の承認を得ているか
  - 理研所内の遺伝子組換え実験申請書
  - 承認済みの大臣確認実験申請書 (または上記と同等の資格の取得)

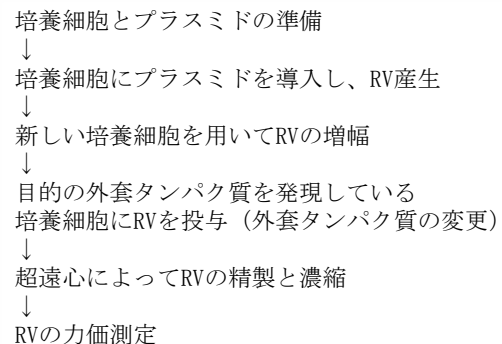
依頼者が希望するRVの受託作製を行う。

- a. RVの株および外套タンパク質
- b. RVに発現させる遺伝子
- c. 力価 (IU/mL) と分量 (μL)

※全ての培養細胞とプラスミドは、依頼者が用意する。

#### 2. 支援の流れ: 方法・結果

RV作製実験は、安全キャビネット内で操作を行う。



### ・レンチウイルスベクター (LV)

#### 1. 支援の内容

- ・カスタムメイドのLVを提供する (P2レベル)。
- ・LV作製に関する技術相談に応じる。

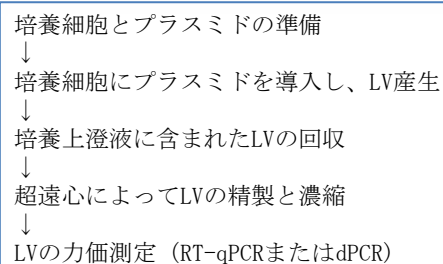
依頼者が希望するLVの受託作製を行う。

- a. LVの外套タンパク質
- b. LVに発現させる遺伝子
- c. 力価 (gc/mL) と分量 (μL)

※全てのプラスミドは、依頼者が用意する。

#### 2. 支援の流れ: 方法・結果

LV作製実験は、安全キャビネット内で操作を行う。



## 共用実験施設

BMAでは共用実験施設として、共用機器コーナーの維持・管理、および施設と共用機器利用に関する初期教育や利用説明を行っている。

### 共用機器コーナー(CUE)

#### 1. 支援の内容

脳中央棟に共用機器コーナー(CUE)が設置されている。ここには汎用あるいは専門性の高い共用機器がその用途によりまとめられ、整備されている。利用はオンラインによる予約制であり、利用者登録をするとこれらの実験室にアクセスし、共用機器と作業スペースを利用できる。作業スペースには、シェーカー、パーソナル遠心機、ボルテックスミキサーなど汎用小型機器も用意されている。

#### 2. 実験室名

##### ・分子生物学実験室(N002)

超微量分光光度計、バイオシェーカー、安全キャビネットが整備され、生細胞イメージング装置や遺伝子導入装置などを用いたP1、P1A(C. elegansに限る)、P2レベルの遺伝子組換え実験が可能である。

##### ・遺伝子定量解析室(C011)

リアルタイムPCRシステムをはじめ遺伝子を微量定量するための装置や卓上型次世代シーケンサーが整備されている。

##### ・P2/レベル2実験室(S009)

遺伝子組換え実験P1、P2レベルおよび微生物等取扱レベル1、レベル2のサンプル調整ができる。また、組み換え体やウイルス産生細胞などの長期培養が可能である。

##### ・組織標本作製室(C004)

自動あるいは手動でパラフィン包埋から切片作製まで行なえる。凍結マイクロームや遺伝子銃も整備されている。

##### ・画像撮影・解析室 #1(N003)

ベンチトップ型の蛍光顕微鏡と共焦点顕微鏡やスライドスキャナーなど汎用な画像解析装置が整備されている。ゲルやメンブレンなどのUV、蛍光、および化学発光を検出するイメージング装置もある。

##### ・画像撮影・解析室 #2 (C107, 1F)

高倍率の撮像やタイリングが可能な共焦点レーザー走査型顕微鏡が整備されている。NeuroLucidaもここで利用できる。

##### ・超解像顕微鏡室 #1(N005-1)

STED光による超解像イメージングが可能な共焦点レーザー顕微鏡が整備されている。高感度検出器(HyD)と自由な波長で励起できるホワイトライトレーザーなどが利用できる。

##### ・超解像顕微鏡室 #2(C012-1)

高速ライブセルイメージングが可能なスピニングディスク型超解像共焦点顕微鏡と格子構造照明超解像顕微鏡が整備されている。CO<sub>2</sub>インキュベータとクリーンベンチも利用できる。

##### ・クロマト分析室(N004)

各種液体クロマトグラフィーが整備されている。神経伝達モノアミン一斉分析、高感度ドーパミン・セロトニン分析、アミノ酸(グルタミン酸、GABA)およびアセチルコリンの分析ができる。タンパク質やペプチドの分取・分析も可能である。



・生化学実験室(N005)

マイクロプレートリーダー、凍結乾燥機、濃縮遠心機など、生化学研究に必要な汎用機器が整備されている。Biacore、NanoSightなどの目的が特殊な装置もある。

・フローサイトメトリー室(S008)

フローサイトメーター (FCM)と解析ソフトウェア、FCM用のサンプル前処理が可能な自動磁気細胞分離装置が設置されている。室内には、BMAの技術支援専用の機器もある。

・その他利用可能な機器

CBS共用機器として質量分析室 (C308-2)、マイクロダイアリシスサンプリング機器など、共用機器コーナー以外で利用可能な機器もある。

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
分子生物学実験室 (N002)	WC0735	生細胞解析システム*	Sartorius	Incucyte® SX5 HD/3CLR
	WC0739	CO2インキュベーター	Thermo FisherSCIENTIFIC	Forma Steri-Cycle i160
	WC0730	安全キャビネット	Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific 1300
	WC0731	オートクレーブ	TOMY	LBS-245
	WC0095	冷却遠心機	Thermo Fisher Scientific	Solva   Legend X1R
	WC0072	低速多本架遠心機	TOMY	LC122
	WC0031	サーマルサイクラー	Applied Biosystems	GeneAmp® PCR System9700
	WC0732	微量分光光度計	Thermo Fisher Scientific	NanoDrop One <sup>e</sup>
	WC1174	蛍光顕微鏡(倒立)	EVIDENT(OLYMPUS)	IX71
	WC0037	培養顕微鏡(倒立)	Leica Microsystems	DMIL
	WC0038	実体顕微鏡(可視光)	Leica Microsystems	MZ95
	WC0043	レーザーマイクロセクションシステム	Leica Microsystems	LMD7
	WC0096	マルチシェーカー-オープン	TAITEC	HB-100
	WC0039	バイオシェーカー (卓上)	TAITEC	M,BR-024
	WC0572	バイオシェーカー (大型)	TAITEC	BR-180LF
	WC0098	振盪恒温槽	TAITEC	パーソナル-11 EXセット
	WC0040	超音波遺伝子導入装置	NEPA GENE	Sonitron2000
	WC0041	微生物用エレクトロポレーター	Bio-Rad	MicroPulser
	WC0042	エレクトロポレーションシステム	Bio Rad	Gene Pulser Mxcell
	WC0668	MALDIイメージングマス用自動前処理装置*	Bruker Daltonics	ImagePrep
	WC0958	微量高速遠心機	TOMY	MX-301
	WC0241	SDS-PAGE用電気泳動槽	Invitrogen, ATTO	Xcell   SureLock Midi-Cell  , AE-6500
	WC1055	デジタルPCRシステム	QIAGEN	QIAcuity One Digital PCR system
	-	予約不要: 超音波洗浄器	AS ONE	VS-100III
	-	予約不要: 電子レンジ	PHC	NE-S30
	-	4℃ 冷蔵庫	NIHON FREEZER	GS-5203AF311E

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
遺伝子定量解析室 (C011)	WC0649	リアルタイムPCRシステム (1号機)*	Applied Biosystems	ABI7900HT
	WC0347	リアルタイムPCRシステム*	Applied Biosystems	QuantStudio 12K
	WC0345	次世代シーケンサ*	Illumina	MiSeq
	-	予約不要: 卓上遠心機	TOMY	LC121



CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
P2/レベル2実験室 (S009)	WC0158	安全キャビネット*	DALTON	ClassII TypeA2B (NSE-1500)
	WC0644	安全キャビネット (室内循環型) *	PHC	ClassII TypeA2 (MHE-1301A2-PJ)
	WC0220	マルチインキュベータ	PHC	MCO-170MUV-PJ
	WC0059	バイオハザードタイプ超遠心機	Beckman Coulter	Optima XE-100
	WC0217, WC0710-WC0712	CO2インキュベータ Thermo (No.1)	Thermo Fisher Scientific	370 T/C sensor
	WC0705, WC0713-WC0715	CO2インキュベータ Thermo (No.2)	Thermo Fisher Scientific	370 T/C sensor
	WC0130, WC0707-WC0709	CO2インキュベータ PHC (No.1)	PHC	MCO-170AICUVD-PJ
	WC0704	CO2インキュベータ PHC (No.2)	PHC	MCO-170AICUVD-PJ
	WC0140	予約不要: 微量高速遠心機	TOMY	CAX-571
	WC0142	予約不要: 小型多本架低速遠心機	Sakuma	SL-IV
	WC0141	予約不要: 倒立型蛍光顕微鏡	EVIDENT(OLYMPUS)	CKX53
	WC0155	予約不要: オートクレーブ	TOMY	BS-325
	WC0156	卓上型振とう恒温槽	TAITEC	Personal 11-SD set
	WC0208	予約不要: アストロン超音波細胞破碎装置	Mizonix	XL2020
	WC0214	予約不要: サンプル密閉式超音波細胞破壊装置Bioruptor	Cosmo Bio	UCD-200TM
	WC0723	予約不要: 超低温フリーザー(-80℃)	Revco	RL5E0086D-81
WC0724	予約不要: バイオメディカルフリーザー (-30℃)	PHC	MDF-MU500H-PJ	
WC0725	予約不要: バイオメディカルクーラー (4℃)	Japan Freezer	UKS-5410DHC	

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
組織標本作製室 (C004)	WC0080	パラフィン包埋ブロック作製装置 (1号機)	Sakura Finetek	TEC-IV
	WC0622	パラフィン包埋ブロック作製装置 (2号機)	Sakura Finetek	TEC-IV
	WC0623	密閉式自動固定包埋装置 (1号機) *	Sakura Finetek	VIP6
	WC0081	密閉式自動固定包埋装置 (2号機) *	Sakura Finetek	ETP-150C
	WC0182	滑走式マイクローム (パラフィン固定用)	Leica Microsystems	SM2010R
	WC0726	滑走式マイクローム (パラフィン固定用)	Thermo Fisher Scientific	HM400
	WC0332	滑走式マイクローム (凍結切片用)	YAMATO	ROM-380
	WC0189	クライオスタットマイクローム (凍結切片用)	Thermo Fisher Scientific	HM525 NX
	WC0163	遺伝子銃システム (Gene Gun)	Bio-Rad	Helios Gene Gu
	WC0193	ピブトーム (ホルマリン/PFA固定用)	D.S.K	DTK-1000
	WC0716	ドラフトスペース (ニッソル染色など)	DALTON	DFV-115K-75ALT
	WC0160	クライオスタットマイクローム (凍結切片用)	Thermo Fisher Scientific	CryoStar NX70
	WC0924	簡易式グリーンベンチ	ASONE	CT-900AD
	-	予約不要: 光学顕微鏡	Nikon	ECLIPS E200
	-	予約不要: 生物顕微鏡 (正立)	EVIDENT(OLYMPUS)	BX50
	-	予約不要: 実体顕微鏡	EVIDENT(OLYMPUS)	SZ60
	-	予約不要: 実体蛍光顕微鏡	Leica Microsystems	MZFLIII
-	予約不要: 超純水装置	ORGANO	PURELAB Ultra Genetic	
-	予約不要: 超音波洗浄器	VELVO-CLEAR	VS-25	

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
画像撮影・解析室 #1 (N003)	WC0058	卓上超遠心機	Beckman Coulter	Optima MAX-XP
	WC0574	NanoZoomer*	Hamamatsu Photonics	NanoZoomer S60
	WC0741	リサーチスライドスキャナー*	EVIDENT(OLYMPUS)	SLIDEVIEW VS200
	WC0733	画像解析ソフトウェア/NDP.view2 Plus	Hamamatsu Photonics	NDP.view2 Plus
	WC0573	オールインワン蛍光顕微鏡	KEYENCE	BZ-X700
	WC0928	ルミノイメージアナライザー	Bio-Rad	ChemiDoc Touch MP
	WC0626	ルミノイメージアナライザー	FUJII FILM	LAS-3000
WC2829	ペンチトップ型共焦点顕微鏡	Oxford Instrument	BC43	
画像撮影・解析室 #2 (C107)	WC0019	共焦点レーザー顕微鏡 (正立) *	EVIDENT(OLYMPUS)	FV3000
	WC0020	共焦点レーザー顕微鏡 (倒立) *	EVIDENT(OLYMPUS)	FV3000
	WC0021	画像解析ソフトウェア	MBF	NeuroLucida
	WC0022	画像解析ソフトウェア	Molecular Devices	MetaMorph
	WC0522	画像解析ソフトウェア	Leica Microsystems	LAS X
	WC0627	画像解析ソフトウェア	MBF	NeuroLucida360
	WC0628	画像解析ソフトウェア	MBF	BrainMaker
	WC0629	画像解析ソフトウェア	MBF	NeuroInfo
WC0631	画像解析用パソコン	Supermicro	Viento Xeon Single CPU Model	
WC0632	画像解析用パソコン	DELL	Precision 5820	

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
超解像顕微鏡室 #1 (N005-1)	WC0521	超解像顕微鏡*	Leica Microsystems	TCS SP8 STED ONE
超解像顕微鏡室 #2 (C012-1)	WC0023	SpinSR10_スピニングディスク型共焦点超解像顕微鏡*	EVIDENT(OLYMPUS)	SpinSR10
	WC0719-WC0722	CO2インキュベータ	PHC	MCO-170AICUV
	WC0035	バイオクリーンベンチ	PHC	MCV-B161F
	-	予約不要：卓上遠心機	TOMY	LC120
	WC0034	格子構造化照明超解像顕微鏡システム*	Carl Zeiss	Elyra 7 type S (Lattice SIM <sup>2</sup> )

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
クロマト分析室 (N004)	WC0578	HPLC (蛍光検出) *	GL Science, Eicom	EP-700他
	WC0055	HPLC (電気化学検出_ECD500) *	Eicom	HTEC-500他
	WC0625	AKTApurifier10*	Cytiva	AKTApurifier
	WC0102	PDA検出器付HPLC分散分析システム*	JASCO	PU-4180-LPG他
	WC0056	卓上超遠心機	Beckman Coulter	Optima MAX-TL
	WC0235	高速冷却遠心機	KUBOTA	3K30C
	WC0240	予約不要：超音波ホモジナイザー	SMT	UH-50
	-	予約不要：pHメーター	METTLER TOLEDO	SevenEasy
	-	予約不要：天秤(Max 6,100g)	METTLER TOLEDO	PG6002-S
	-	予約不要：天秤(Max 220g)	METTLER TOLEDO	AB204-S
-	予約不要：超音波洗浄機	BRANSON	5510J-DTH	
-	予約不要：蒸気圧法オズメーター	Wescor	Vapor5520	

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
生化学実験室 (N005)	WC0579	血球計数器 (動物用)	NIHON HOHDEN	MEK-6358
	WC0580	血液生化学分析器 (動物用)	FUJIFILM	3500V
	WC0520	分子間相互作用測定装置*	Cytiva	Biacore X 100 Plus Package
	WC0078	マルチチャンネルカウンタ	PerkinElmer	Wallac 1420 ARVO MX-2
	WC0079	多機能マイクロプレートリーダー	Thermo Fisher Scientific	Varioskan Flash
	WC0970	マルチモードマイクロプレートリーダー	Thermo Fisher Scientific	Varioskan LUX
	WC0057	凍結乾燥機 (1号機)*	EYELA	FDU-830
	WC0624	凍結乾燥機 (2号機)*	EYELA	FDU-830
	WC0581	遠心エバポレーター (1号機)	TOMY	CC-105
	WC0621	遠心エバポレーター (2号機)	TOMY	CC-105
	WC0577	超遠心機	Beckman Coulter	Optima XL-100K
	WC0859	ナノ粒子解析システム	Malvern Panalytical	NanoSight
	WC0239	クリーンベンチ	AS ONE	CT-1200AD
		遠心エバポレーター	TAITEC	VC-15s
		インキュベータ	TAITEC	Multi-Shaker Oven HB
		アルミブロック恒温槽	TAITEC	DTU-1B
WC0240	マイクロプレートリーダー	Bio-Rad	Model 550	

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式
フローサイトメトリー室 (S008)	WC0643	フローサイトメトリー解析ソフトウェア*	BD	FlowJo
	WC0997	自動磁気細胞分離装置	Miltenyi Biotec	autoMACS Pro Separator
	WC2775	ハイパラメーターフローサイトメーター*	BD	FACSSymphony A3

CUE実験室名 (部屋番号)	機器ID#	機器名	メーカー	型式	
その他利用可能な機器	WC0301	Orbitrap型質量分析装置(QExactive)*	Thermo Fisher Scientific	QExactive	
	WC0302	イオンモビリティ搭載型QTRAP質量分析システム	SCIEX	QTRAP 6500+ and others	
	WC0674	貸し出し(予約不要)：マイクロダイアリスサンプリング機器			
		-マイクロフラクションコレクター	Univender	820 Microsampler	
		-マイクロフラクションコレクター	BAS	CMA140	
		-マイクロシリンジポンプ	BAS	CMA/100	
		-マイクロシリンジポンプ	BAS	CMA/142	
		-架台	Eicom		
		-アクリルケース	Eicom		
		-リキッドスイッチ	BAS	CMA/110	
-リキッドスイッチ	Eicom	SI-60			

## 機能的磁気共鳴画像測定支援ユニット

機能的磁気共鳴画像測定支援ユニットは7テスラと3テスラのヒト用磁気共鳴画像装置を備え、脳神経科学研究センター（CBS）を始めとする理研内のラボに対して、ヒト及び動物を非侵襲的に計測する実験の技術支援を行っている。MRI実験施設では主に行われているfMRI実験に加えて、DTI, MRA, MRSなどの測定を行うことができ、EEGとの同時計測も可能である。各種刺激提示装置（プロジェクター、イヤフォン、電気刺激など）が導入されており、多様な要求に応え得る実験環境を提供している。必要に応じて、被験者の状態（心拍や呼吸、両眼の眼球運動及び瞳孔径、筋電位、ボタン押し反応など）および刺激提示タイミングと傾斜磁場波形を、MRI装置が発生する撮像タイミング信号と合わせて1つのデータとして記録し、MRIデータの後処理に活用することができる。当ユニットは、パルスシーケンス、解析方法、実験補助装置などについて独自に開発を行っており、高空間分解能実現のためのマルチショットEPI撮像法、呼吸や拍動の信号への影響の除去、バイトバーによる頭の動きの抑制などが既に利用可能である。特に未処理データであるk空間データを起点としてベンダーの処理に寄らない補正処理及び画像化処理を行うソフトウェア、各種データ可視化ソフトウェアの開発を進めており、利用者は、目的に応じた最新の技術を使った実験を実施することができる。また理研外部の研究者によるMRI装置を使った実験を可能にするため、TRIP外部共用収入事業制度を設けている。

### MRI装置仕様

項目	3T MRI	7T MRI
製品名	MAGNETOM Prisma	SIGNA™ 7.0T
製造元	Siemens	GE
静磁場(T)	2.89	7
最大傾斜磁場強度(mT/m)	80	100
最大スルーレート(T/m/s)	200	200
受信RFチャンネル数	64	64
送信RFチャンネル数	2	8
ボディRFコイル	有	無
ヘリウム消費(L/month)	0	0
導入時期	2015年3月	2023年4月

### 周辺機器

- プロジェクター WUX5000 (Canon)
- LCDゴーグル NNL社
- 音声刺激装置
- 生体信号測定装置 (心拍、呼吸、他)
- MRI対応EEG装置
- ボタン応答装置
- 光ファイバ温度計
- MRI室内用メガネ
- バイトバー頭部固定装置
- 刺激提示用コンピュータ
- アナログ信号記録用コンピュータ

## **共同研究とTRIP外部共用収入事業制度**

理研外部ユーザーが利用する手段は2つある。理研内部の研究室との共同研究契約を締結した上で理研内部の実験計画として計測を行うか、TRIP外部共用収入事業制度を利用して計測を行うかのいずれかである。後者の場合はデータ取得のみのサービスとなる。特にヒトを対象とするTRIP外部共用収入事業制度の場合、理研外部で倫理審査を受けていただく必要がある。また、すでに備わっていない実験器具を利用する場合は、安全性の審査が必要になる。

### **共同研究の手順**

当ユニットを含む理研内のラボと実験について話し合いを行い、双方の合意が取れた上で、双方の施設にて共同研究計画を立ち上げる。ヒトを対象とする計測の場合、理研内部の倫理審査を受けることになる。予算の種類によってはご利用いただけない場合があるので、使用料支払いについて明確にしておくことが重要である。

### **TRIP外部共用収入事業制度利用の手順**

まず当ユニットにご相談ください。計測内容によってはご利用できない場合があり、プロジェクトが実施可能と判断された場合は、TRIP外部共用収入事業申請を行っていただく。計画内容に従い料金を支払い、実験開始、計画された全ての実験後、計測データをお渡しした時点で終了となる。

## 電子顕微鏡技術支援ユニット

電子顕微鏡技術支援ユニットは、電子顕微鏡を主な解析ツールとしており、シナプス結合や細胞内小器官の微細構造に関する研究を支援するための研究環境を提供している。専門知識と技術を持ったスタッフは、研究チームの要望を事前に議論・相談することで十分理解し、最適な研究方法の提案や、技術的なアドバイスを行う。また共用実験施設の研究機器の維持・管理や、研究技術の普及支援として、教育セミナーを開催している。

### 研究技術支援業務

電子顕微鏡技術支援ユニットは以下の技術支援を行っている。

#### ★電子顕微鏡

##### 支援の内容

電顕観察用組織作製：脳や臓器などの生物試料を、化学固定し、金属染色を施し、樹脂に包埋する。また、微細構造保持をよりよくするため、生の組織をHigh-Pressure Freezingし、樹脂置換し、包埋する手法も可能である。事前打ち合わせを行い、研究プロジェクト毎に、最適な組織処理方法の選択や支援などのサポートを展開する。

##### 電子顕微鏡

###### a) FIB-SEM (Focus Ion Beam-走査型電子顕微鏡)

FIBで薄くミリングして現れた新しいブロック表面をSEMで画像撮影する。この作業を繰り返し、自動で連続電顕画像データを獲得する。作業は全自動で、切削厚が薄く設定できることから (> 4 nm) 高精細な再構築画像が得られる。効果的にミリングできる深さは100 μm程度であるため、100 x 100 μm程度のエリアの撮影が可能である。観察部位の試料は観察と同時に消失する。

###### b) FE-SEM

ウルトラマイクロトームで切削した連続超薄切片を、連続性を保ったままウエハーあるいはテープに回収し、SEMでROIを連続撮影する。観察できる領域が広く、視野を変えて何度でも再観察できる。切片の厚さは> 40 nmである。

連続超薄切片画像の解析：NIH-image、VAST-Lite、Amiraなどを使い3次元再構築法などの画像解析法を指導する。

### 共用実験施設

電子顕微鏡技術支援ユニットは、共用実験施設として、脳中央棟B1Fおよび1Fに設置した共用機器の維持・管理、および施設と共用機器利用に関する初期教育や利用説明を行っている。

#### 機器リスト

機器名	メーカー	型番
FIB-SEM	ThermoFisher	Helios 5
FE-SEM	日本電子	IT-800
Ultramicrotome	Leica	ARTOS-3D
ATUM	RMC	ATUM
Ultramicrotome	Leica Microsystems	UC-6, FC-6
高圧凍結装置	Leica Microsystems	EM ICE
光・電気刺激ユニット	Leica Microsystems	

## 動物資源開発支援ユニット

動物資源開発支援ユニット（ARD）は、信頼度が高く、質の良い実験動物を研究者に提供するために、動物実験施設の維持管理を行っている。また、その施設を利用して、動物実験に関わる諸技術や材料を研究者に提供している。動物実験に関わる様々な事務手続きに関しても支援を行う。

### 哺乳動物実験施設

#### 動物の飼育管理

動物実験施設においてはマウス、ラット、ウサギ、マカク属サル、マーモセットを飼育している。マウスおよびラット、マカク属サル、マーモセットについては微生物コントロールを行っている。なお、原則として動物の所有者はラボである。

#### 動物の健康管理

動物実験施設における動物の健康管理には、動物個体の体調を毎日見とどけるほか、動物の搬入、検疫、飼育管理など様々な角度からの注意が必要である。この観点から、ARDでは実験動物健康管理セクションを設けている。このセクションには現在獣医師4名が配置され、以下の業務を担当している。

##### 動物実験施設の獣医学的管理

マウス・ラットの健康モニタリング、マカク属サル・マーモセットの定期的健康診断、動物の疾病診断と治療・予防、動物の国内・外からの搬入並びに購入に当たっての健康証明書等の事前調査、搬入動物の検疫、動物の搬出（輸出を含む）のための健康証明書作成などを行う。

##### 動物実験施設の整備・維持・管理

飼育・実験施設の整備・管理、飼育管理面の監督、ラボの施設利用調整および利用許可（動物ケージの割り振りを含めて）、施設訪問者の資格審査などを行う。

##### マウス・ラットの健康モニタリング

ARDが実施しているマウス・ラットの健康モニタリング方法は以下の通りである。モニタリングはマウス・ラットの健康維持のために極めて重要である。また、この方式はマウス・ラットを搬出する場合、搬出先に問われることがある。

マウス：各飼育室に、モニタリング用ケージを3～7個置き、各ケージに1～3匹のマウスを飼育している。モニタリングケージには、同室で飼育していた複数のケージから床敷を入れ、2週間毎に行われるケージ交換の時も同様に汚染床敷を入れる。検査には、各飼育室で3ヶ月以上飼育されたマウスを使用する。

ラット：各飼育室に、モニタリング用ケージを3～6個置き、各ケージに1～3匹のラットを飼育している。モニタリングケージには、同室で飼育していた複数のケージから床敷を入れ、毎週行われるケージ交換の時も同様に汚染床敷を入れる。検査には、各飼育室で3ヶ月以上飼育されたラットを使用する。

##### モニタリング動物の検査：

内部検査はARDが3ヶ月毎に行い、外部検査は（公財）実験動物中央研究所（International Council for Laboratory Animal Science Monitoring Center）に依頼し、6ヶ月毎に行う。

飼育室毎のモニタリングマウス、ラット数を以下に示す。

<b>内部検査:</b>	<p>マウス：各飼育室の2個のモニタリングケージから2匹ずつのマウスをモニタリングする。</p> <p>ラット：各飼育室の2個のモニタリングケージから1匹ずつのラットをモニタリングする。</p>
<b>外部検査:</b>	<p>飼育室のモニタリング用ケージで6ヶ月以上飼育されたマウス、ラットから無選択的に1匹を選んで検査に供する。</p>

### 健康モニタリング検査成績の判定

モニタリング成績については、ARDの実験動物健康管理セクションの獣医師が検討して判定結果を出す。問題があれば飼育管理者をはじめ、関係者に指示を与えて対策を講じる。

## 研究技術支援業務

ARDは以下の技術支援を行っている。 **☆印のみが、外部へ提供できる支援。**

### マウスの胚操作

**体外受精**：成熟精子と未受精卵を培地内で受精させる。受精卵は、凍結胚にして保存または仮親に移植して産仔を得ることに用いる。

**顕微授精**：約4週齢の幼若マウスから取り出した未成熟精子を未受精卵に顕微鏡下で注入して受精卵を得る。精子の運動能に障害がある場合でも受精が可能である。

**受精卵移植**：産仔を得る為に仮親の卵管内に受精卵を移植する。これにより、SPF化や多数の個体を計画的に得ることが可能となる。

**胚の凍結保存**：個体で維持繁殖する必要がなくなった系統から得た受精卵を凍結保存する。

**精子の凍結保存**：個体で維持繁殖する必要がなくなった系統の精子を凍結保存する。

**凍結胚の個体化**：凍結保存している胚または他機関より送られてきた凍結胚を融解し、仮親へ移植して産仔を得る。

**凍結精子の個体化**：凍結保存している精子または他機関より送られてきた凍結精子を融解し、体外受精により得られた受精卵を仮親へ移植して産仔を得る。

### コンジェニックマウス作製

遺伝子改変マウスの遺伝的背景をB6/J系統などに置き換えたい場合に、体外受精を行うことで自然交配の場合よりも短時間で次世代の産仔を得ることができる。依頼者の希望する世代数分の戻し交配を行うことが可能である。

### トランスジェニックマウス作製

依頼者は、キアゲン社plasmid kitと同等以上の精製度で抽出したプラスミドを制限酵素で消化後、アガロースゲルで泳動し、導入遺伝子（トランスジーン）のみを切り出す。導入遺伝子は、キアゲン社のQIAquick Gel Extraction kitで精製しelution bufferで溶出し、最終濃度が20~50ng/μlとした溶液50μl（BACトランスジーンの場合は、1~10ng/μl濃度の溶液50μl）を用意する。ARDスタッフは、導入遺伝子を受精卵雌性前核へ顕微注入して仮親へ移植し、得られた2~3週齢仔の尾片を依頼者へ届ける。依頼者によるgenotypingの結果を受け、陽性個体を依頼者に提供する。導入遺伝子の受け取りから陽性個体の引渡しまで、おおよそ2ヶ月である。

## CRISPR/Casシステムを用いたゲノム編集マウス作製

---

依頼者が作製した標的配列と相補的なguide RNAとCas9 mRNA（あるいはCas9タンパク質）をマウス前核期受精卵にインジェクションし、これを偽妊娠マウスへ移植する。これにより得られた2週齢仔の尾片を依頼者に渡す。依頼者によるgenotypingの結果を受け、陽性個体を依頼者に渡す。guide RNAとCas9 mRNAの受け取りから陽性個体の引き渡しまで、おおよそ2ヶ月である。

## ノックアウトマウス作製

---

依頼者が作製したターゲッティングベクターをES細胞へ導入し、約300個のES細胞コロニーのピックアップを行う。依頼者が判別した相同組換え陽性ES細胞を胚盤胞に顕微注入して仮親に移植し、離乳したキメラマウスを依頼者に提供する。約300個のES細胞コロニーから1～30程度の相同組換えES細胞のラインを得ることができ、6ラインを顕微注入すると約2ラインが次世代へ遺伝子を伝達する。ターゲッティングベクターの受け取りからキメラマウスの引渡しまで、おおよそ3～4ヶ月である。

## ES細胞樹立

---

依頼者から提供されたマウスを用いて胚盤胞を得たのち、約3週間でES細胞を樹立する。遺伝的背景がC57BL/6の場合、雄と過排卵誘起して交配させた雌マウス2匹から、少なくとも2ラインのES細胞を樹立する。

## マウスのSPF化

---

**受精卵移植によるSPF化:** SPF化を行う系統の受精卵をSPFの仮親に移植し離乳まで哺育させる。

**帝王切開によるSPF化:** 無菌的に子宮から摘出した胎児齢18～19日の胎仔をSPFの里親のもとで離乳まで哺育させる。

## ラットのSPF化

---

**帝王切開によるSPF化:** 無菌的に子宮から摘出した胎児齢21～22日の胎仔をSPFの里親のもとで離乳まで哺育させる。

## 子宮内エレクトロポレーション

---

子宮内エレクトロポレーションは、in vivoで神経前駆細胞に外来遺伝子を導入するための有力な方法である。電極をあてる脳部位および胎児の発生時期のどのタイミングでエレクトロポレーションを行うかに応じて、特定のサブセットの神経細胞を標的とすることが出来る。

## ★ポリクローナル抗体作製

---

依頼者によって調製された抗原を用い、ウサギ・マウス・ラットのいずれかの動物種でポリクローナル抗体を作製する。動物種や免疫計画などは、依頼者と協議の上決定するが、免疫期間、試験採血日程など、依頼者の希望に沿うよう柔軟に対応する。オプションでELISAでの抗体価チェックを行っている。





RIKEN  
**Center for Brain Science**  
脳神経科学研究センター