



一般研究用キット

Tau Aggregation Assay Kit

タウ凝集アッセイキット

Cat. No. TAU01

※本製品は大阪公立大学大学院 医学研究科 神経疾患制御学 松本 弦 准教授より技術提供を、公益財団法人 東京都医学総合研究所より特許使用ライセンスを受けて製品化しております。

2024年8月8日作成

www.cosmobio.co.jp

【I】背景

認知症は物忘れや認知機能の低下により日常生活に支障きたす疾患で、神経細胞が脱落していくことにより進行します。認知症の6割以上をアルツハイマー型認知症が占めていますが、未だに効果的な治療法は見つかっていません。アルツハイマー病は、老人斑と呼ばれるアミロイドβ蛋白質の蓄積と、線維化したタウタンパク質の細胞内蓄積による神経原線維変化の出現により定義されています。線維化したタウタンパク質の蓄積は、前頭側頭型認知症 (FTD) の原因の一つにもなっています。

タウタンパク質は神経細胞の軸索に局在して、軸索内の微小管の安定化に寄与しているということが知られています。非常に安定な構造をもつタンパク質であるのに、なぜ線維化してしまうのかということとはよくわかっていませんが、プリオンタンパク質と同様に、線維化したタウタンパク質が線維化のための凝集核（シード）となり、正常構造のタウタンパク質を異常構造に変えることで凝集し線維化していくという説が有力だと考えられています。

本キットは、タウ凝集体形成を細胞内で再現するモデルであり、線維化タウのシードを細胞に導入することにより、細胞内のタウタンパク質の凝集を引き起こします。ヒトのタウタンパク質は6つのアイソフォームが存在することが知られています。本キットでは家族性タウオパチー変異である P301L 変異を導入した最長のアイソフォーム (2N4R) の発現プラスミドを P301L 変異が入った線維化タウタンパク質とともに細胞に導入することで、タウ凝集体を細胞内に形成させます。

細胞内で凝集したタウタンパク質はリン酸化されるので、AT8 などの代表的な抗リン酸化タウ抗体 (S202/T205) によりリン酸化タウを確認することができます。また、アミロイド染色をすることにより、細胞内のタウ凝集を確認することが可能です。

【II -1】キット構成

● 本製品のプラスミドベクターは ATUM 社で合成した商品を使用しています。

内容	容量	数量	保存温度	取扱上の注意
pCMV-Tau(2N4R)-P301L (P301L 変異型タウ (2N4R) 発現プラスミド、緑キャップ)	50 μL (濃度:1 μg/μL)	1 本	4°C	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるように十分に配慮してください。 (*ベクター 2 種は購入者のみライセンス、第三者への pCMV-dGFP 譲渡は禁止)
pCMV-dGFP (dGFP 発現プラスミドベクター、青キャップ)	5 μL (濃度:1 μg/μL)	1 本		
F-Tau(RD)-P301L (P301L 変異型タウ線維化タンパク質、透明キャップ)	100 μL (濃度:1 μg/μL)	1 本	4°C	廃棄する際は、オートクレーブ処理 (134°C・20 分) を行ってください。条件を満たせない場合は、「感染性廃棄物」の取り扱いに従って廃棄してください。

【II -2】ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- アッセイ用細胞株（推奨：Neuro 2a）
- 培養用培地（推奨：DMEM、10% FBS）
- 遺伝子導入試薬（サーモフィッシャーサイエンティフィック：Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent など）
- Opti-MEM® または無血清培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック：31985062 等をご用意ください）
- 滅菌済み精製水（DNase, RNase フリー）

※ III -1 から III -3 までの操作はクリーンベンチ内で無菌的に行ってください。

【III - 1】試薬の事前調製

- pCMV-Tau(2N4R)-P301L（P301L 変異型タウ (2N4R) 発現プラスミド）、pCMV-dGFP（dGFP 発現プラスミドベクター）
そのままご使用いただけます。実験系の使用量に合わせて滅菌済み精製水で希釈してください。
例) 24 ウェルプレート使用時、0.2 ~ 1 μ L/ ウェルの使用量です。

- F-Tau(RD)-P301L（P301L 変異型タウ線維化タンパク質）

使用前にバスタイプの超音波装置で超音波処理をしてご使用下さい。

実験系の使用量に合わせて滅菌済み精製水で希釈してください。（用事調製）

例) 24 ウェルプレート使用時、0.5 ~ 2 μ L/ ウェルの使用量です。

※注意事項：線維化タウタンパク質を廃棄する際は、安全のためオートクレーブ処理（134℃・20分）を行ってください。
温度条件を満たせない場合は、「感染性廃棄物」の取り扱いに従って廃棄してください。

【III -2】キットの使用方法

- 以下は Neuro 2a 細胞および Lipofectamine® 3000 Reagent を用いた培養実験例です。
- 他の細胞を使用する場合や初回の実験では下記プロトコルの使用量を参考に、導入条件の予備検討を実施されることをお勧めします。
- 被験物質の添加時期：被験物質は評価したい目的に合わせて導入前、導入時、導入後などご検討ください。

1 予備培養にて必要な細胞数を準備します。

2 24 ウェルのマルチウェルプレートに $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/ ウェルで播種します。

3 翌日（細胞と培地のコンディションに合わせて、培養条件を予備検討してください）50%コンフルエントになったら、Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent のマニュアルにしたがってプラスミドおよび線維化タンパクを調製し、培地に添加します。

導入量はプラスミド 0.5 ~ 1 μ g/ ウェル、線維化タンパク量 1 ~ 2 μ g/ ウェルからお試しいただき、最適条件をご検討ください。（使用例を III -3 に記載）

4 1 ~ 3 日で Tau の凝集沈着が見られます。

【III -3】 試薬調製量の例（使用するウェル数に合わせて調製してください）

● 以下は 24 ウェルプレートを使用する場合の 1 ウェルあたりの調製量です。培養液は 1 ウェル当たり、0.5 mL とします。

- 1 pCMV-Tau(2N4R)-P301L プラスミド (1 μ g/ μ L) 0.5 μ L と F-Tau(RD)-P301L (1 μ g/ μ L) 1 μ L を 25 μ L Opti-MEM[®] に混ぜ、P3000 Reagent 1 μ L を加えます。
- 2 25 μ L Opti-MEM[®] に Lipofectamine[®] 3000 Transfection Reagent を 1 μ L 加えます。
- 3 2つを混合し、10 分間室温でインキュベートします。
- 4 500 μ L の培地が入っている 24well の細胞に混合液を 50 μ L 加えます。
- 5 1 ~ 3 日後、適切な方法で評価します。

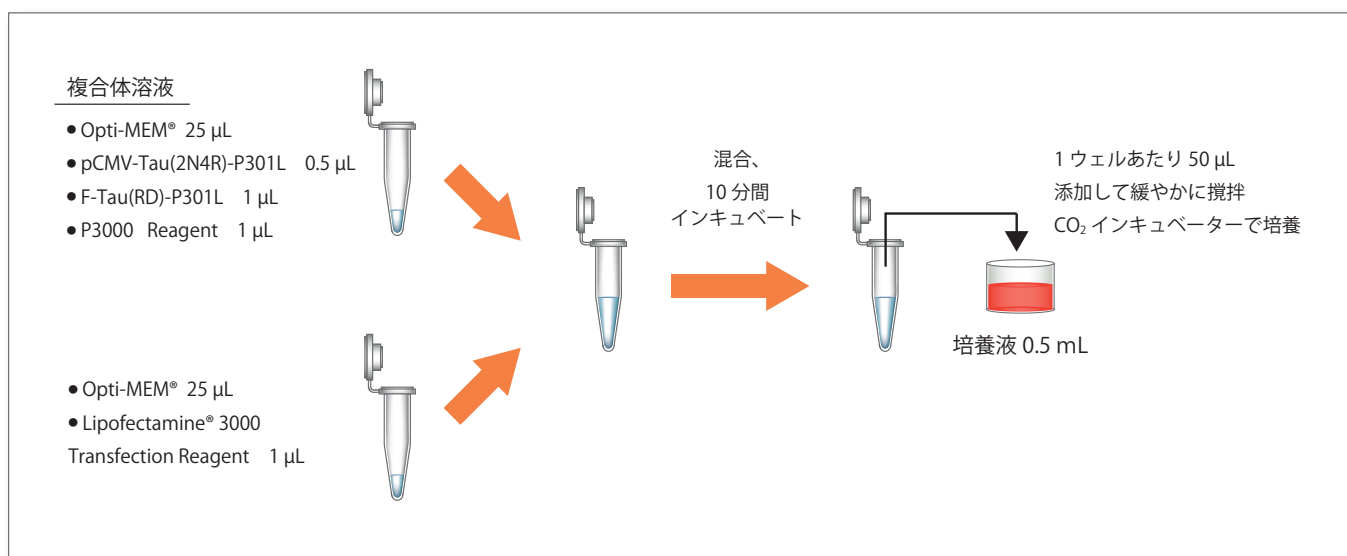
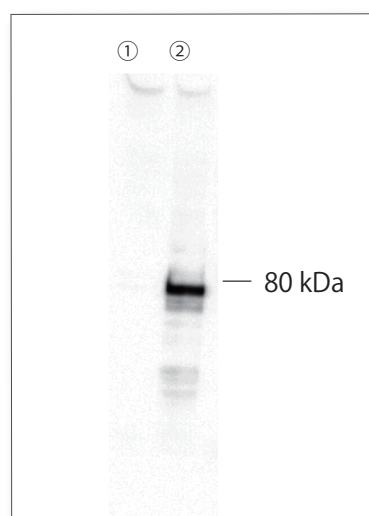


図 1. 導入手順（24 ウェルプレート使用時、1 ウェル分量）

【IV】 タウ凝集体の検出実験例

1. ウェスタンブロット法による評価

各種タウ抗体を用いて、ウェスタンブロットによる検出が可能です。



本キットで Tau を細胞内に凝集させた場合、リン酸化 Tau の沈着が起こることが特長の一つです。

培養後の細胞を PBS で回収し、超音波破碎後に 2% SDS sample buffer で溶解、100 $^{\circ}$ C ボイル 5 分間の後、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを常法にて行い、Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody (AT8) (ThermoFisher : MN1020) で検出した例です。また、アミロイド染色をすることにより、細胞内のタウ凝集を確認することが可能です。

図 2. ウェスタンブロットによるリン酸化タウの検出

- ① pCMV-Tau(2N4R)-P301L プラスミドのみ導入した細胞
- ② pCMV-Tau(2N4R)-P301L + F-Tau(RD)-P301L 両方を導入した細胞

細胞試験例 SH-SY5Y 細胞（ヒト神経芽腫細胞）

細胞調整

SH-SY5Y 細胞（ヒト神経芽腫細胞） 5×10^4 cells を 6well プレートにまく。

本製品のプロトコル通りに、A 細胞培養のみ、B プラスミドのみ、C プラスミド + 線維化たんぱく質の 3 群にタウを導入する。（プラスミド $4 \mu\text{g}/\text{well}$ 、線維化タンパク $8 \mu\text{g}/\text{well}$ ）

transfection の 48 時間後に PBS で細胞を回収し、遠心してペレットを回収し、 $300 \mu\text{L}$ の $5 \times$ SDS バッファ（2ME+）を加えて 100°C 5 分加熱および超音波破碎を行った。

図 3. ウェスタンブロットによる SH-SY5Y 細胞（ヒト神経芽腫細胞）の検出

各溶解液 $2 \mu\text{L}$ を SDS-PAGE に供し、3 抗体による検出を行った。

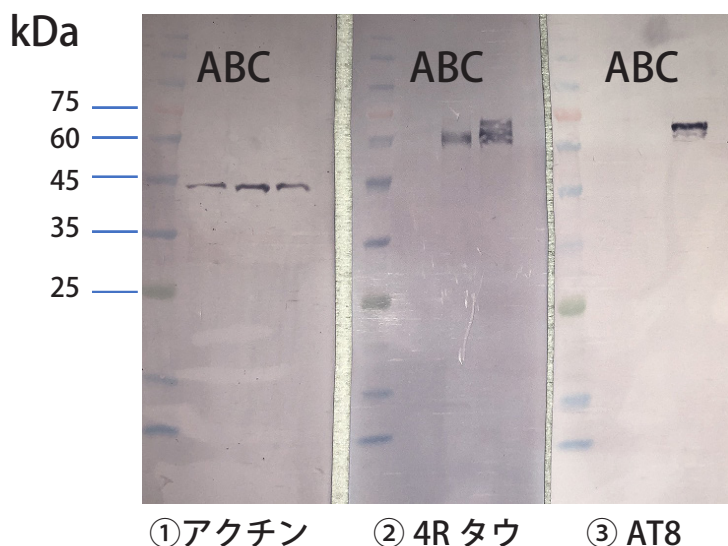
A 未導入の細胞

B pCMV-Tau(2N4R)-P301L プラスミドのみ導入した細胞

C pCMV-Tau(2N4R)-P301L + F-Tau(RD)-P301L 両方を導入した細胞

検出抗体

- ① β アクチン（SIGMA：A5441）
- ② 4R タウ抗体（コスモ・バイオ：TIP-4RT-P01、Tau 全般に反応）
- ③ AT8 抗体（コスモ・バイオ：90206、リン酸化 Tau に反応）



1. 4R タウは遺伝子導入だけでもじゅうぶん検出されており、タウタンパク質が産生されている。
2. C のレーンで 4R タウのバンドが上方にシフトしているのはリン酸化タウのバンドである。
3. 遺伝子導入だけではリン酸化タウは検出されない。タウ凝集体の出現とともに細胞のリン酸化酵素によって検出される。

【IV】 タウ凝集体の検出実験例 つづき

2. 免疫染色による評価

pCMV-Tau(2N4R)-P301L + F-Tau(RD)-P301L 両方を導入した細胞について、Anti-Tau Antibody, clone 2A1-2E1 (MERCK: MABN2472-100UG) および -CellstainR- Hoechst 33342 solution (同仁化学研究所: H342) で検出した例です。

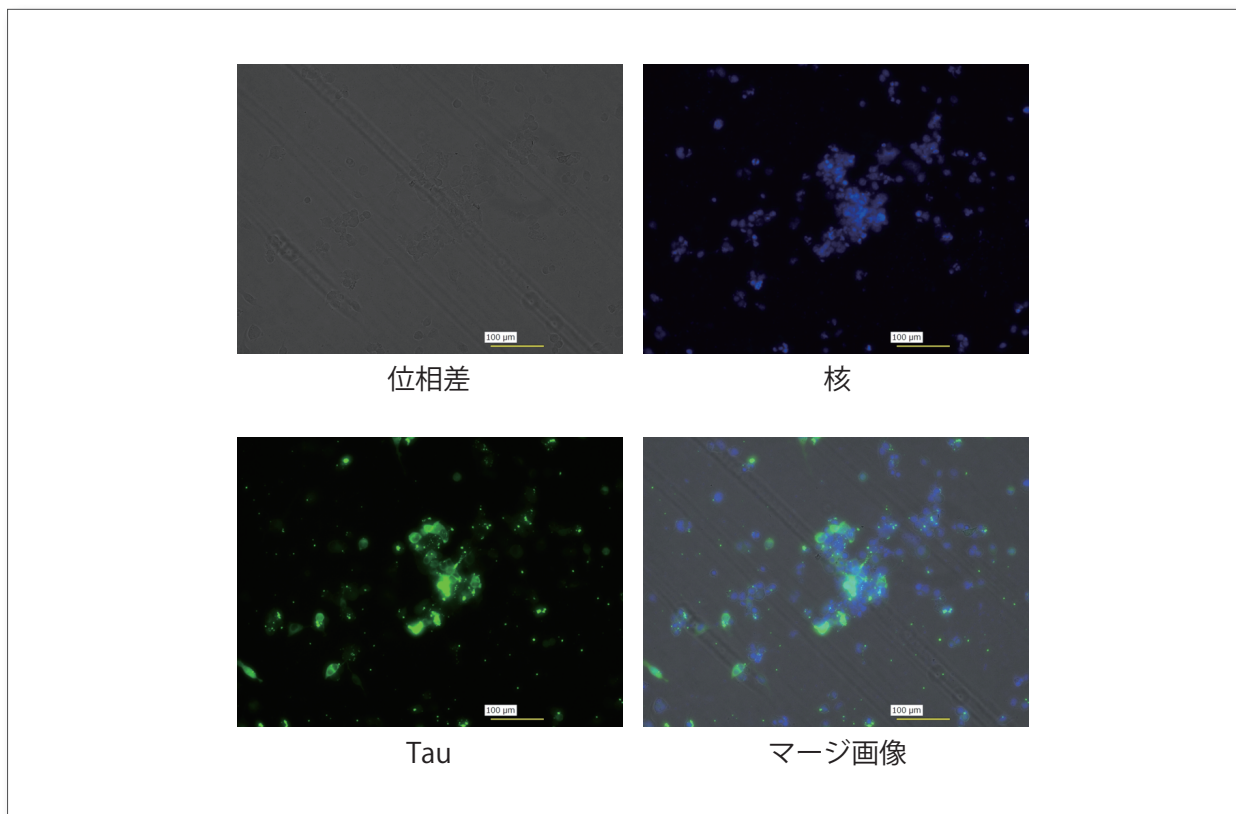
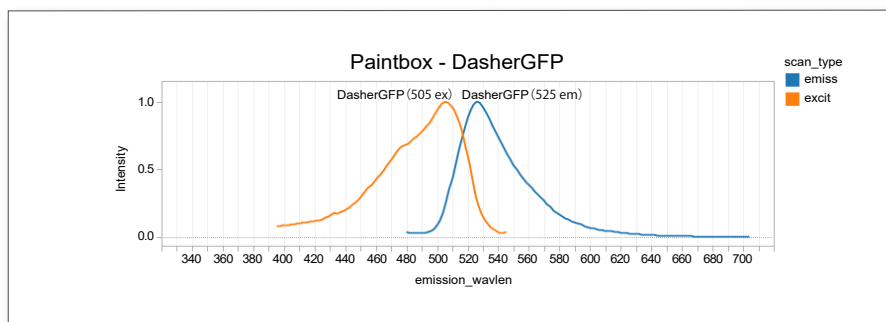


図 3. 免疫染色による顕微鏡画像

【V】アッセイのトラブルシューティング

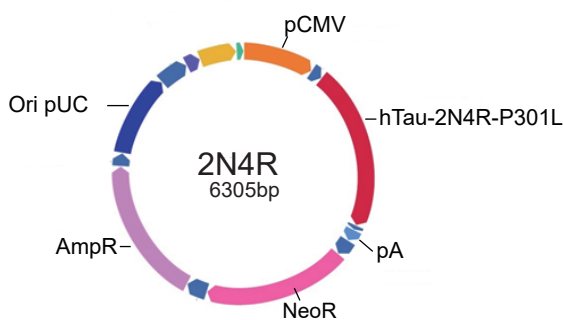
Tau の凝集沈着ができないときは、トランスフェクションが出来ていない、またはトランスフェクションの効率が悪いことが原因である可能性が高いです。遺伝子導入効率が良い細胞株や、遺伝子導入の実績・経験が豊富な細胞株で実験することをお勧めします。導入効率を検証するために、ベクター配列が同じで GFP 遺伝子を挿入しているコントロールベクター (pCMV-dGFP) がキットに付属しております。励起 / 蛍光波長については下のスペクトルデータを参考に観察を行ってください。



また、本キットの発現ベクターは CMV プロモーターのため、一部の細胞で発現効率が低くなる可能性があります。一例として神経細胞への導入において CMV プロモーターからのタンパク質の発現効率が低下するものが知られており、タウタンパク質の発現量が低下する可能性があります。

【VI】参考資料 プラスミドマップ

pCMV-Tau(2N4R)-P301L



pCMV-dGFP

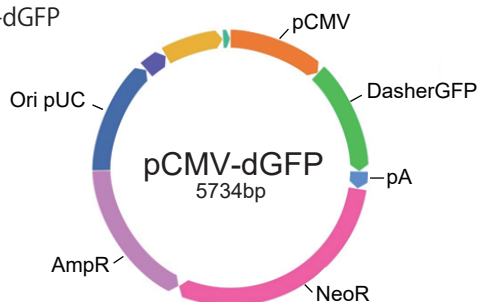


図 4. プラスミドマップ



Tau Aggregation Assay Kit

— タウ凝集アッセイキット —

Cat. No. TAU01

www.cosmobio.co.jp

【VII】 参考文献

- [1] Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 285, 34885–34898.
- [2] Guo, J.L., Buist, A., Soares, A., Callaerts, K., Calafate, S., Stevenaert, F., Daniels, J.P., Zoll, B.E., Crowe, A., Brunden, K.R., et al. (2016). The Dynamics and Turnover of Tau Aggregates in Cultured Cells INSIGHTS INTO THERAPIES FOR TAUOPATHIES. *J. Biol. Chem.* 291, 13175–13193.
- [3] Matsumoto, G., Matsumoto, K., Kimura, T., Suhara, T., Higuchi, M., Sahara, N., and Mori, N. (2018). Tau Fibril Formation in Cultured Cells Compatible with a Mouse Model of Tauopathy. *Int J Mol Sci* 19, 1497.

【VIII】 関連商品

メーカー略号：CSR

品番	品名	内容量
TAU02	4R タウ線維化タンパク質 (P301L 変異体)	100 UL
TAU03	4R タウタンパク質フラグメント (P301L 変異体)	1mL(1mg)

13119

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO Co., LTD.— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9623— 商品に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9619

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル