

Comparative assessment of green and red fluorescent protein variants
in zebrafish embryos

生命科学の研究分野では、タンパク質の分布や動態を観察することが重要である。蛍光タンパク質は、それをコードする DNA または mRNA を細胞内に導入し、発現のレポーターやタンパク質の標識などとして利用することで、細胞の活動を維持させたまま細胞内の事象を観察することができる非常に有効なツールである。蛍光タンパク質は mRNA から翻訳され、すぐに蛍光を示すのではなく発色団の成熟が必要であり、その成熟時間は蛍光タンパク質の由来やバリエントごとに異なる。発生が早く進むゼブラフィッシュ胚において、蛍光タンパク質を利用するには、発現から観察可能になるまでの発色団の成熟時間が短いことが重要である。また、内在遺伝子の発現レベルで観察可能な蛍光強度が要求される。

本研究では、ゼブラフィッシュ胚において緑色蛍光タンパク質 (GFP) および赤色蛍光タンパク質 (RFP) に由来する様々なバリエントを成熟速度と蛍光強度に注目して比較した。初めに、ゼブラフィッシュ胚に GFP または RFP をコードする mRNA を顕微注入し、注入後 3~9 時間における蛍光タンパク質の蛍光強度を測定した。顕微注入のリファレンスとして蛍光色素 CF dye を dextran (10,000 MW) に結合させた dextran-CF 488A あるいは dextran-CF 594 を、それぞれ RFP と GFP に対して用いた。その結果、GFP 由来バリエントでは Achilles、Venus、mNeonGreen が、顕微注入後の早い段階で強い蛍光を示した。RFP 由来バリエントの成熟速度はもっともよく使用されている mCherry より mScarlet-I が速く、これらに比べて mRuby3 は遅いということが示された。次に胚内での蛍光タンパク質の発現量と蛍光強度の関連を調べるために、GFP、RFP 由来バリエントをそれぞれに対する抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した。また、各抗体のバリエントに対する親和性の違いの影響を排除するために蛍光タンパク質の C 末端側に FLAG タグを付加した mRNA を合成した。それらの mRNA を顕微注入し、注入 9 時間後の胚でウェスタンブロットを行なったところ

Achilles は由来となった EGFP や Venus と比べてバンドが薄かった。同様に、mCherry2 は元となった mCherry と比べてバンドが薄いという結果が得られた。したがって、Achilles と mCherry2 は、タンパク質としては不安定であるにもかかわらず、胚では元となった Venus や mCherry と同程度の蛍光強度を示すことが示唆された。

