

ゼブラフィッシュ胚における青・緑・赤色蛍光タンパク質バリエーションの比較
Comparative assessment of blue, green, and red fluorescent protein variants
in zebrafish embryos

一瀬 藍子

Aiko Ichinose

蛍光タンパク質は、細胞の活動を維持したままその検出が可能であることから、細胞内の事象を観察するために生命科学の広い分野で利用されている。特に緑色および赤色蛍光タンパク質の利用が多いが、複数色の蛍光タンパク質を必要とするマルチカラーイメージングの普及に伴い、青色系統の蛍光タンパク質の利用も広がっている。蛍光タンパク質は、その由来やバリエーションごとに成熟時間や蛍光輝度が異なることが知られており、これらの特性は発現宿主によっても変化する。発生生物学のモデル生物であるゼブラフィッシュ胚は発生が極めて早いため、*in vivo* イメージングには成熟時間が短く、高い蛍光輝度をもつ蛍光タンパク質が求められる。

そこで本研究では、青色蛍光タンパク質を中心に、緑色および赤色蛍光タンパク質についても、ゼブラフィッシュ胚における特性の比較を行った。まず、2種の青色および6種のシアン色蛍光タンパク質をそれぞれコードする mRNA をゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、注入後 3、6、9 時間経過した胚を蛍光顕微鏡により観察、撮影した。画像解析から胚の蛍光強度を定量した結果、青色では mTagBFP2 が経過時間によらず高い蛍光強度を示した。シアン色では注入後 3 時間の時点で SCFP3A と AmCyan1 が、9 時間後には AmCyan1 が他のバリエーションよりもわずかに高い蛍光強度を示した。次に、蛍光強度と胚内における蛍光タンパク質の発現量との関連を調べた。各蛍光タンパク質の C 末端側に FLAG タグを付加した mRNA を顕微注入し、注入後 9 時間経過した胚の蛍光強度を測定した後、同一胚を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、mTagBFP2 は BFP よりも高い蛍光強度を示したが、発現量に大きな差は見られなかったことから、蛍光強度の差はタンパク質 1 分子あたりの蛍光輝度の違いによるものと考えられる。一方、AmCyan1 は蛍光強度と発現量のいずれも高いことから、タンパク質の高い安定性が胚の蛍光強度に寄与していると考えられる。

近年、ゲノム編集技術の進展に伴い、蛍光タンパク質遺伝子をゲノムへノックインすることで、内在遺伝子の発現パターンを可視化する手法が用いられている。そこで、mRNA 注入実験で優れた特性を示した蛍光タンパク質バリエーションに関して、CRISPR-Cas9 システムを用いたノックインを行い、内在遺伝子の発現制御下における蛍光タンパク質の挙動を比較した。この研究は、当研究室における同様の比較実験で優れた特性を持つことがわかっている緑色および赤色蛍光タンパク質も含めて実施した。ノックインは、mTagBFP2、SCFP3A、AmCyan1、Achilles、EGFP、mNeonGreen、mCherry、mScarlet-I の 8 種の蛍光タンパク質遺伝子をドナーベクターの 2A 配列の下流に組み込み、各ドナーを *sox3* 遺伝子を切断する CRISPR-Cas9 と共にゼブラフィッシュ胚に顕微注入することで行った。注入後 24 時間の胚を観察したところ、すべての蛍光タンパク質で *sox3* の発現部位である中枢神経系での発現が見られた。特に青色、シアン色、緑色、赤色では、それぞれ mTagBFP2、SCFP3A、Achilles/mNeonGreen、mScarlet-I ノックイン胚が高い蛍光を示した。また、顕微注入後 12 時間で緑色および赤色蛍光タンパク質ノックイン胚を観察した場合にも、24 時間後と同様に Achilles/mNeonGreen、mScarlet-I で蛍光強度が高い胚が見られた。以上の結果より、これら 5 種の蛍光タンパク質はゼブラフィッシュ胚における *in vivo* でのレポーターに適していると考えられる。