

2022 年度  
修士論文

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

高知工科大学大学院

環境理工学群

1255084

神崎 智宏

指導教員 蒲池 雄介 教授

## 要旨

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ーションごとに異なる。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際には、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ーション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 由来バリエーションでは Achilles、Venus、mNeonGreen が、顕微注入後の早い段階で強い蛍光を示した。RFP 由来バリエーション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 由来バリエーション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、各抗体のバリエーション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関わらず、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。

## 序論

蛍光タンパク質は 1992 年にオワンクラゲが由来となる緑色蛍光タンパク質 (GFP) の遺伝子がクローニングされて以来、遺伝子発現の可視化やタンパク質の局在解析など、さまざまな生命科学の実験に多く応用されている。GFP のクローニングからさらに、サンゴ由来となる赤色蛍光タンパク質 (RFP) の遺伝子のクローニングにも成功し、今では様々な性質を持つ蛍光タンパク質バリエーションが作られ応用の幅はさらに広がっている。モデル生物であるゼブラフィッシュにおいても蛍光タンパク質は広く利用されている。しかし、ゼブラフィッシュ胚の発生の進行は非常に早いため、多くの蛍光タンパク質バリエーションの中から、発色団を形成する時間、成熟時間が短いものを選択する必要がある。成熟時間の短いものを選択することで、標的タンパク質の発現後、短い時間差で観察することができる。また、実験の条件によっては内在遺伝子の発現レベルと同じレベルで発現された蛍光タンパク質を観察するため、より蛍光強度の強いものを選択する必要がある。しかし、ゼブラフィッシュ胚における蛍光タンパク質バリエーションの比較というものは十分に行われていない。

そこで、本研究ではゼブラフィッシュ胚における蛍光タンパク質を成熟時間、蛍光強度、蛍光強度とタンパク質量の関係に注目して蛍光タンパク質バリエーションの比較を行った。本研究では、オワンクラゲ GFP が由来となる EGFP、Venus(Nagai et al., 2002)、Achilles(Yoshioka-Kobayashi et al., 2020)、mClover2、mClover3(Bajar et al., 2016)、sfGFP(Pédélecq et al., 2006)、mGFPmut2(Balleza et al., 2018)、ウミサボテン由来の CoGFP-Th2co、ナメクジウオ由来の mNeonGreen(Shaner et al., 2013)の合計 9 種類の GFP の比較を行った。特徴として、Venus は成熟速度が早いという特徴があり、その Venus の成熟速度をより早く改良したものが Achilles である (Yoshioka-Kobayashi et al., 2020)。他にも mClover3 や mNeonGreen は強い蛍光を発するという特徴があるため FRET に用いられる (Bajar et al., 2016、Shaner et al., 2013)。次にサンゴ由来の mCherry(Shaner et al., 2004)、mCherry2(Shen et al., 2017)、mCherry を基に作製した mScarlet(Bindels et al., 2017)、mScarlet-I、由来の異なる mRuby3、mKate2 の合計 6 種類の RFP の比較を行った。mCherry は RFP としては成熟速度が早いためよく使用されるが、細胞毒性を示す(Shen et al., 2017)。mCherry2 は mCherry より少し蛍光強度が強くなり、細胞毒性が mCherry より低いという特徴がある(Shen et al., 2017)。mScarlet は mCherry を基に、他の RFP との比較から最適化を図った合成遺伝子であり、mCherry より強い蛍光を発する。mScarlet-I は mScarlet のアミノ酸に 1 つ変異を加えたものである。その他のすでに分かっている蛍光タンパク質の物理化学的特性を以下の

表 1 にまとめた。

本研究では、蛍光タンパク質をコードする mRNA をゼブラフィッシュ胚に顕微注入したのちに注入から 3 時間、6 時間、9 時間後の胚の撮影を行い、画像から蛍光強度を測定し、比較を行った。その結果、発現後の早い時期における蛍光の検出には Achilles、mScarlet-I が適しており、一方強い蛍光強度が必要な場合は mNeonGreen、mScarlet-I が適していることがわかった。また、それぞれのバリエーションにおける蛍光強度と胚内の蛍光タンパク質量の関係を調べるためにタンパク質の発現量の比較を行なった。顕微注入から 9 時間後における胚を用いて、ウェスタンブロットを行なったところ、Achilles、mCherry2 は少ないタンパク質の発現量が少ないにもかかわらず、由来となる蛍光タンパク質と同レベルの蛍光を示すということがわかった。

表 1. 本研究で用いる蛍光タンパク質の特性

	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	吸光係数 (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	量子収率	蛍光強度	成熟時間 (分)
EGFP	488	509	55,900	0.6	33.54	25.0
Venus	515	528	92,200	0.57	52.55	17.6
Achilles	513	525	110,000	0.64	70.4	—
mClover3	506	518	109,000	0.78	85.2	43.5
sfGFP	485	507	83,300	0.65	54.15	13.6
mNeonGreen	506	517	116,000	0.8	92.8	10.0
mCherry	587	610	72,000	0.22	15.84	15.0
mCherry2	589	610	79,400	0.22	17.47	—
mScarlet	559	600	100,000	0.7	70.0	174
mScarlet-I	569	593	104,000	0.54	56.16	36.0
mRuby3	558	592	128,000	0.45	57.6	136.5
mKate2	588	633	62,500	0.4	35.0	20.0

## 結果

本研究では蛍光タンパク質の発現条件をできるだけ揃えるため、今回比較を行う EGFP、Venus、Achilles、mClover2、mClover3、sfGFP、mGFPmut2、mNeonGreen、CoGFP-Th2co、mCherry、mCherry2、mScarlet、mScarlet-I、mRuby3、mKate2 の 15 種の蛍光タンパク質のコード領域をまず pCS2 ベクターへサブクローニングし、コード領域以外はまったく同じ配列もつ mRNA を合成できるようにした。このようにして作成した pCS2 をバックボーンとするプラスミドを鋳型にして GFP および RFP の mRNA を *in vitro* 転写で合成し、1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に顕微注入した。顕微注入をしてから 3 時間後、6 時間後、9 時間後の胚を観察した。同時に蛍光画像の撮影を行い、ImageJ を用いて画像から蛍光強度を測定し、バリエーション間で比較を行った。観察に使用した蛍光顕微鏡、撮影機器の倍率、露光時間、感度の条件は変更せずに行った。実験では顕微注入した液量の違いを補正するため、リファレンスとして GFP の比較では、赤色蛍光色素の dextran-CF 594 を混ぜた溶液を、RFP の比較では、緑色蛍光色素の dextran-CF 488A を混ぜた溶液を顕微注入した(図 1)。

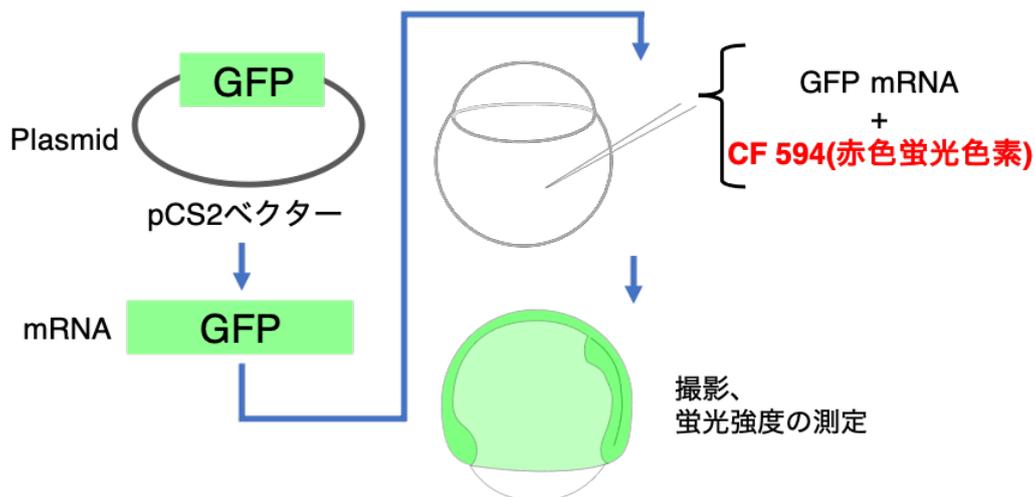


図 1. 実験の手順

GFP バリエーションの比較における実験手順を模式的に示している。RFP バリエーションの比較でも同様の手順で行うが、リファレンスは CF 488A を用いた。

まず最初に、量を補正するためのリファレンスである蛍光色素が、顕微注入量に応じて蛍光強度が変化するかを確認するために、濃度が異なる溶液をそれぞれ同じ量顕微注入し3時間後の胚を撮影し、画像解析から蛍光強度と濃度に相関があるかを調べた。その結果、今回調べた範囲では濃度を上げるとほぼ比例して蛍光強度が強くなったため、本研究においてリファレンスとして用いることに問題がないことがわかった(図2)。

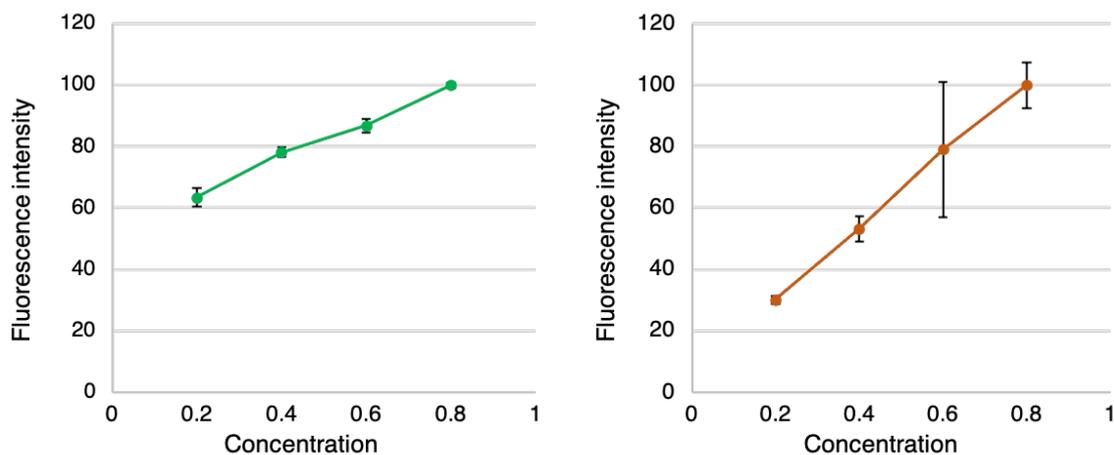
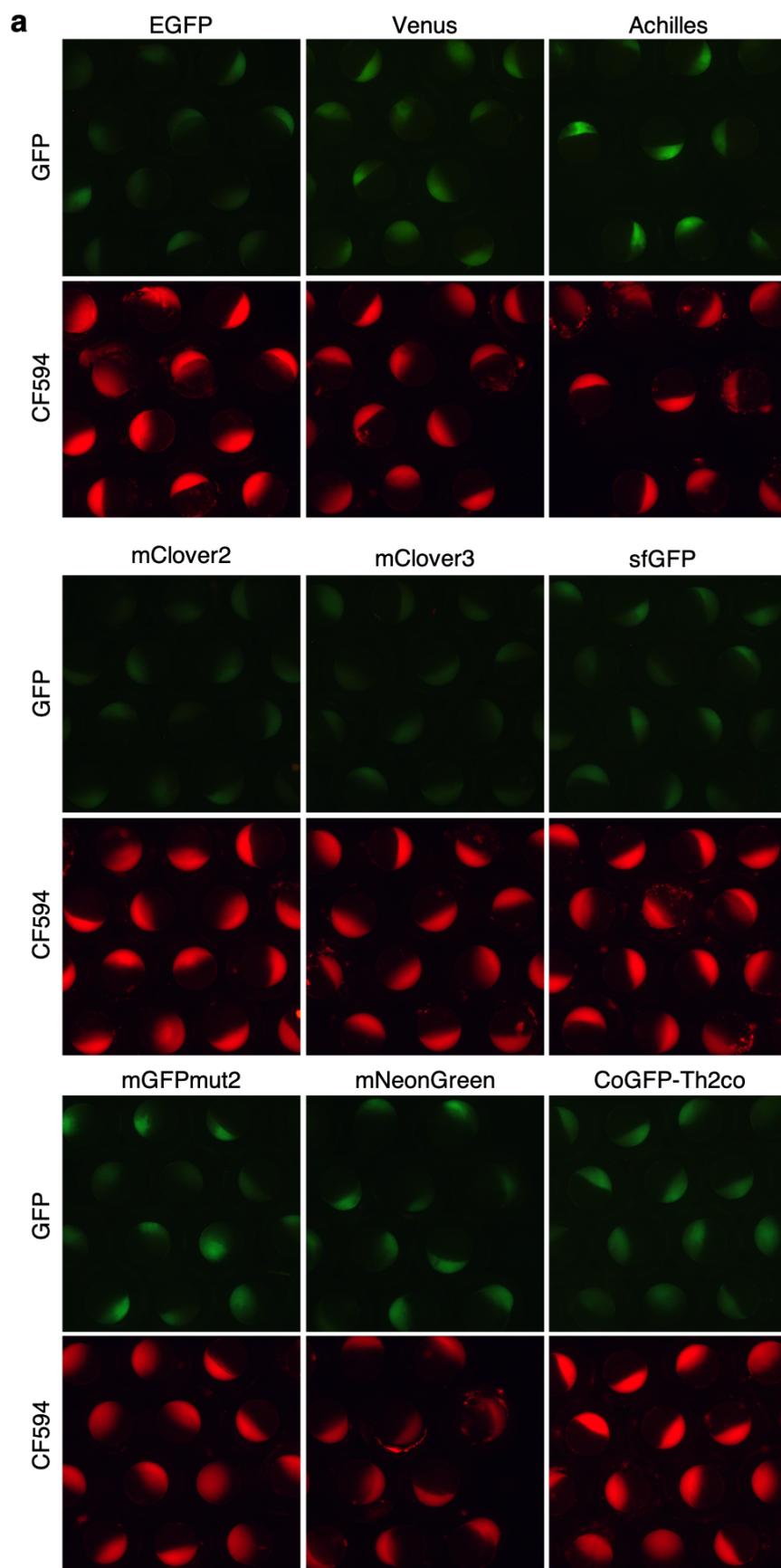


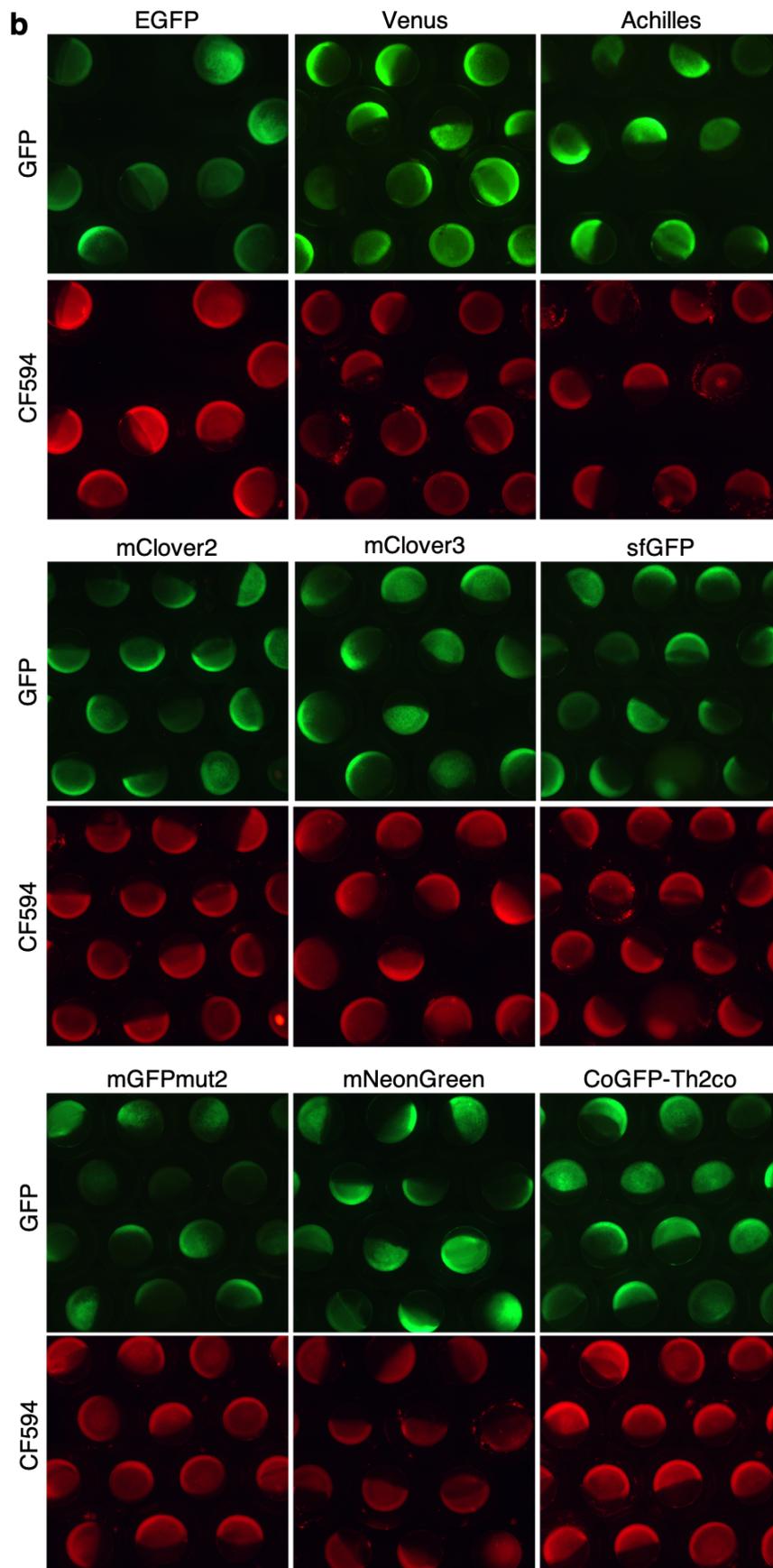
図 2. 蛍光色素の濃度変化に伴う蛍光強度の変化

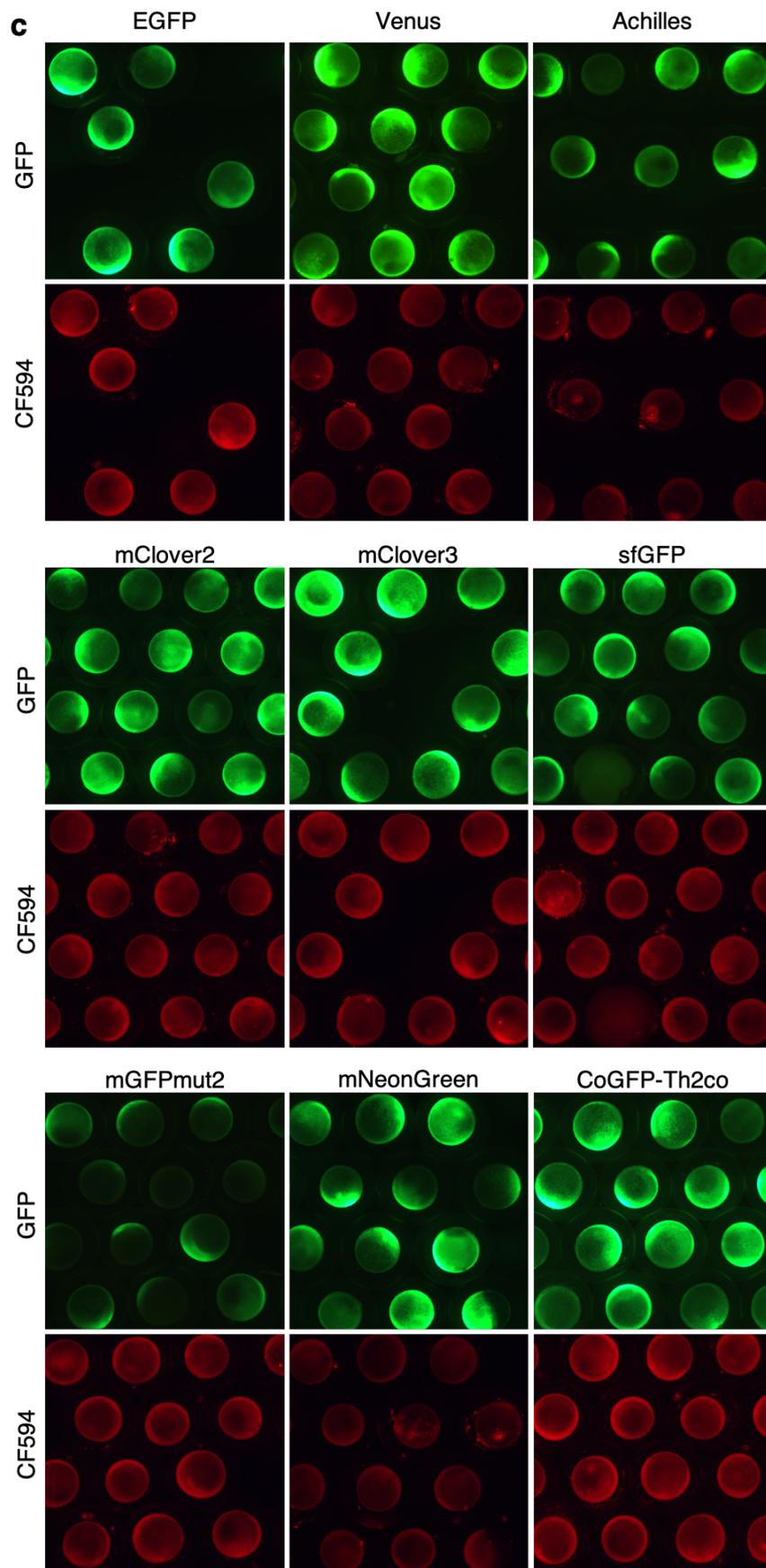
(a)CF488A (b)CF594 0.8 ng の蛍光強度を 100 として表している。  
実際の実験では 0.6 ng となるように注入した量を調製した

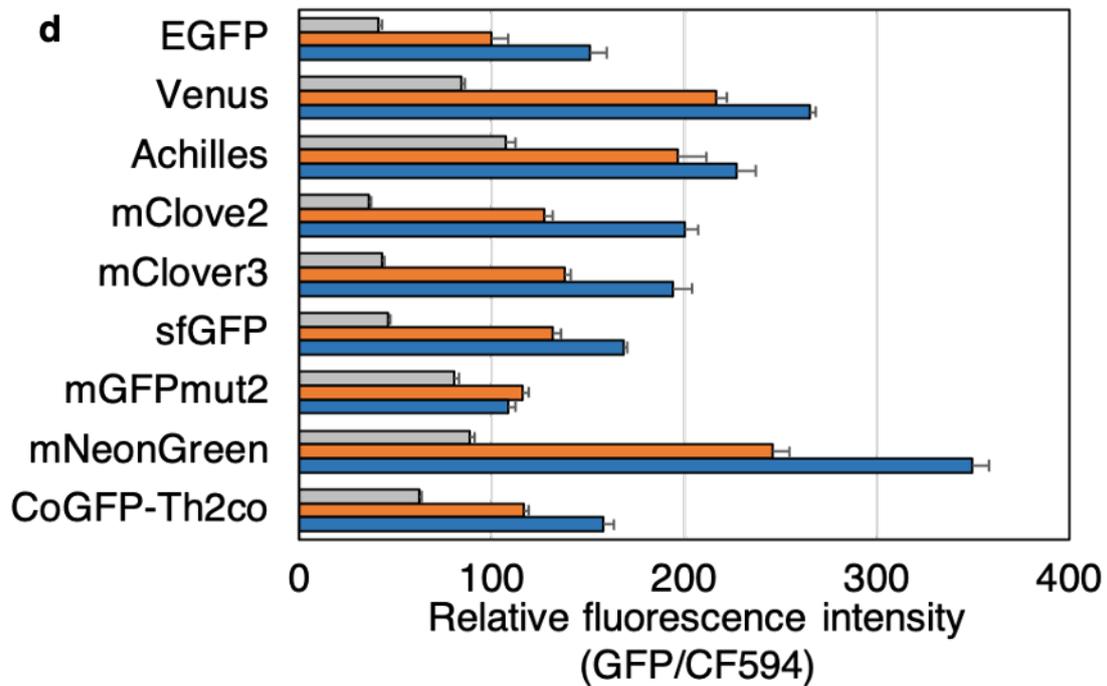
## GFP バリエーションの比較結果

GFP バリエーションの比較では顕微注入後 3 時間の時点で既にどのバリエーションでも蛍光を観察することができた。特に Achilles、Venus、mNeonGreen、mGFPmut2 の 4 種の蛍光強度が強いことが観察できた(図 3 a)。また、撮影したリファレンスである赤色蛍光色素の画像から蛍光強度の定量を行い、GFP の蛍光の補正を行なった。この際は、全てのバリエーションのリファレンスの定量した値の平均値を出し、それで個々の胚のリファレンスの値を除することで相対値を求め、補正值とした。GFP の蛍光量をその補正值で除することで GFP の定量した値を補正した。6 時間後、9 時間後の胚においても同様の方法で補正を行い GFP の定量を行なった。図 3 d から、定量した場合においても Achilles、Venus、mNeonGreen、mGFPmut2 が 3 時間後において蛍光強度が強いという結果となった。6 時間後の胚ではどのバリエーションにおいても蛍光強度が強くなったが、mGFPmut2 は Achilles、Venus、mNeonGreen に比べると蛍光強度の増加はさほど示さなかった(図 3 b,d)。顕微注入後 9 時間の時点では、どのバリエーションも観察するために十分な蛍光強度を示した。しかし、mGFPmut2 においては 6 時間後からの蛍光の強さは、他のバリエーションでは増加しているのに対して、変化しないという結果が得られた(図 3 c,d)。3 時間後の早い時期では成熟時間の早い Achilles がもっとも蛍光強度が強かったが、9 時間後の遅い時期では mNeonGreen の方が蛍光強度が強くなるということがわかった。









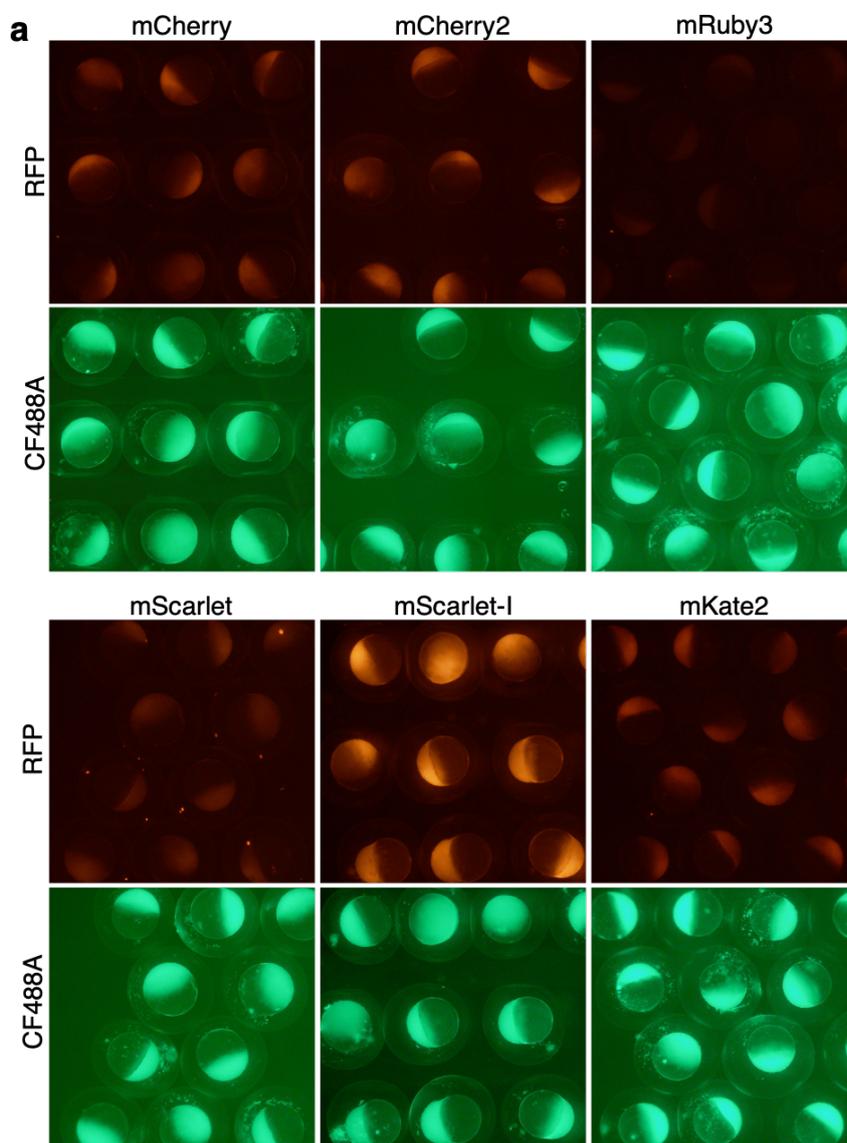
### 図 3. 時間経過における GFP の観察結果

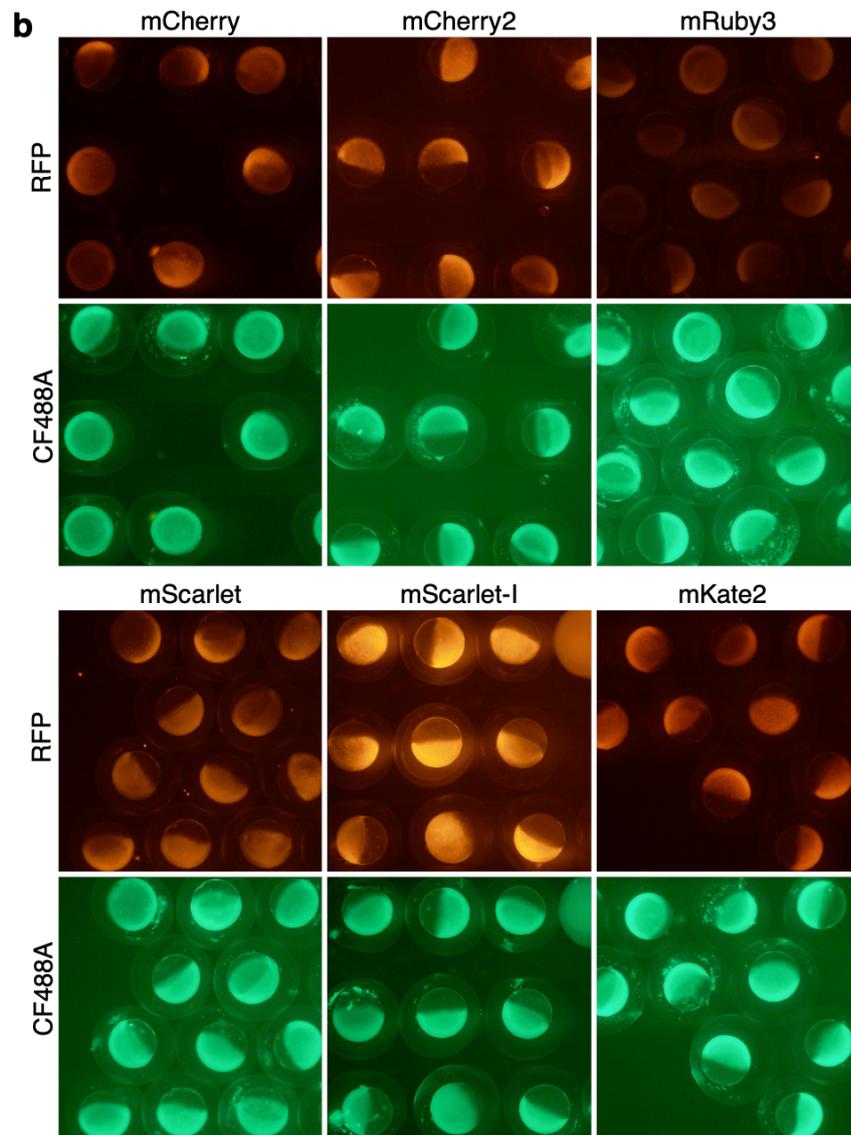
上の画像は GFP バリエーション、下の画像はリファレンスである CF594 の画像である。撮影条件は全て同じである。

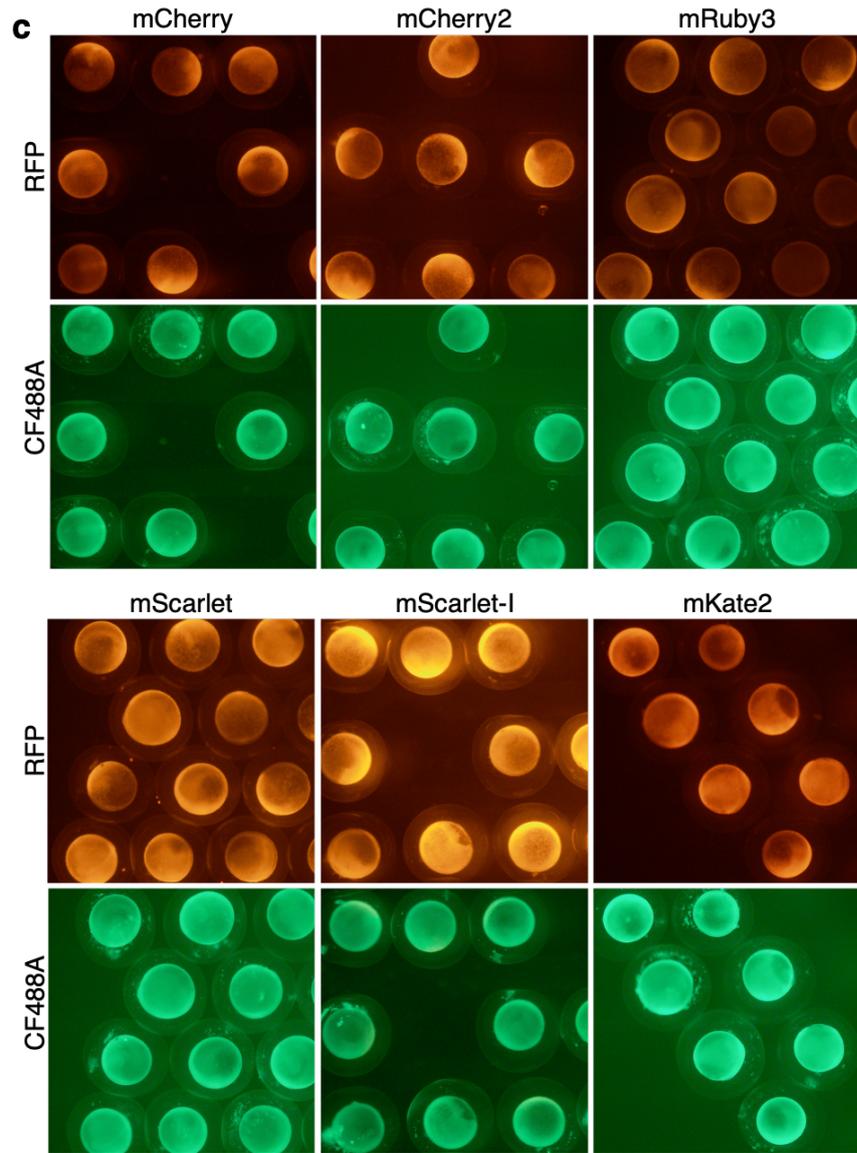
- (a) 顕微注入後 3 時間時点における蛍光タンパク質の観察結果。
- (b) 顕微注入後 6 時間時点における蛍光タンパク質の観察結果。
- (c) 顕微注入後 9 時間時点における蛍光タンパク質の観察結果。
- (d) GFP バリエーションの時間ごとの蛍光強度を画像解析から定量化した結果。横軸は相対的蛍光強度を示し、6 時間後の EGFP の蛍光値を 100 として算出した。灰色は 3 時間後(n=13)、赤色は 6 時間後(n=9)、青色は 9 時間後(n=9)を表している (n=サンプル数)。

## RFP バリエーションの比較結果

RFP バリエーションの比較では、顕微注入後 3 時間の時点で mRuby3、mScarlet の蛍光が弱かった。それに対し、mCherry、mCherry2、mKate2、mScarlet-I の蛍光は観察することができ、特に mScarlet-I の蛍光がもっとも強かった(図 4 a)。GFP と同様にリファレンスである緑色蛍光色素を用いて RFP の蛍光強度の補正を行なった。mScarlet-I は、早い時期において蛍光強度が強いことから、成熟時間が最も早いということが示唆される(図 4 d)。顕微注入後 6 時間では全てのバリエーションで蛍光強度が増加し、mScarlet、mRuby3 においても蛍光を観察することができた(図 4 b)。しかし、mRuby3 では蛍光が見られるが、他のバリエーションと比べて蛍光強度が弱かった。顕微注入から 9 時間後ではすべてのバリエーションで十分な蛍光強度であった(図 4 c)。成熟時間がもっとも早かったのは mScarlet-I であり、また、最終的にもっとも蛍光強度を強く示したのも mScarlet-I という結果が得られた(図 4 d)。







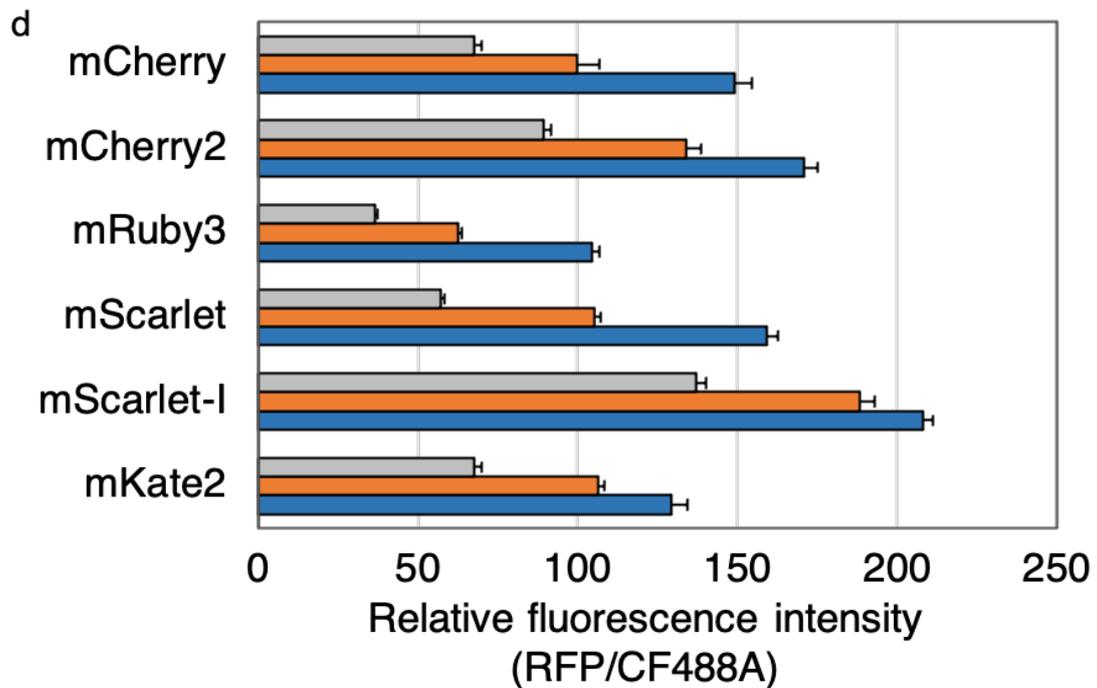


図 4. 時間経過における RFP の観察結果

上の画像は RFP バリエント、下の画像はリファレンスである CF488A の画像である。撮影条件は全て同じである。

- (a) 顕微注入後 3 時間時点における蛍光タンパク質の観察結果。
- (b) 顕微注入後 6 時間時点における蛍光タンパク質の観察結果。
- (c) 顕微注入後 9 時間時点における蛍光タンパク質の観察結果。
- (d) RFP バリエントの時間ごとの蛍光強度を画像解析から定量化した結果。横軸は相対的蛍光強度を示し、6 時間後の mCherry の蛍光値を 100 として算出した結果を示している。灰色は 3 時間後(n=12)、赤色は 6 時間後(n=9)、青色は 9 時間後(n=7)を表している (n=サンプル数)。

## 胚内における蛍光タンパク質量の比較実験

続いて胚内における蛍光タンパク質のタンパク質の発現量を比較する実験を行った。この実験では上記の実験で蛍光強度に特徴のあった Venus、Achilles、mGFPmut2、について、EGFP を基準として比較した。まず、蛍光タンパク質バリエーションの mRNA を 1 細胞期ゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、9 時間後の胚の蛍光を観察、撮影を行った。この実験では、GFP の比較では mScarlet-I に、タグである PA を 3 つ、蛍光タンパク質の C 末端側に付加させた mScarlet-I-PAx3 の mRNA を合成し同時に顕微注入した(図 5)。GFP の比較において、胚の蛍光では前述の結果と同様に EGFP、Venus、Achilles では十分な蛍光が観察でき、それに比べ mGFPmut2 は蛍光が弱いということが観察できた(図 6 a)。リファレンスを用いて、蛍光の補正を行うとやはり、mGFPmut2 が他の GFP と比べ蛍光強度が弱いという結果が得られた(図 6 b)。その胚を用いてタンパク質サンプルの調製を行い、その後、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行い蛍光タンパク質の検出を行った。抗 GFP 抗体と抗 PA 抗体を用いて検出を行ったところ、EGFP、Venus では同レベルのタンパク質の発現量を検出できたが、Achilles、mGFPmut2 のタンパク質の発現量はそれらと比べて低いという結果になった。特に Achilles では蛍光強度において Venus と大きな差はないものの、タンパク質の量が約 2 分の 1 という結果となった(図 6 c,d)。

次に RFP においても GFP の比較と同様に 9 時間後の胚を用いてタンパク質の発現量の比較を行った。RFP ではリファレンスとして EGFP に PA を 3 つ付加させた、EGFP-PAx3 の mRNA を用い、タンパク質の検出には抗 RFP 抗体を用いた。まず、胚の蛍光では前述の結果と同様に mScarlet-I の蛍光が最も強く、他のバリエーションでは大きな差はなかった(図 7 a,b)。しかし、タンパク質の発現量において、mCherry と同じレベルの蛍光を示す mCherry2 が低いという先ほどの Achilles と同様の結果が得られた(図 7 c,d)。この結果は、Achilles で見られた現象に類似しており興味深い点である。

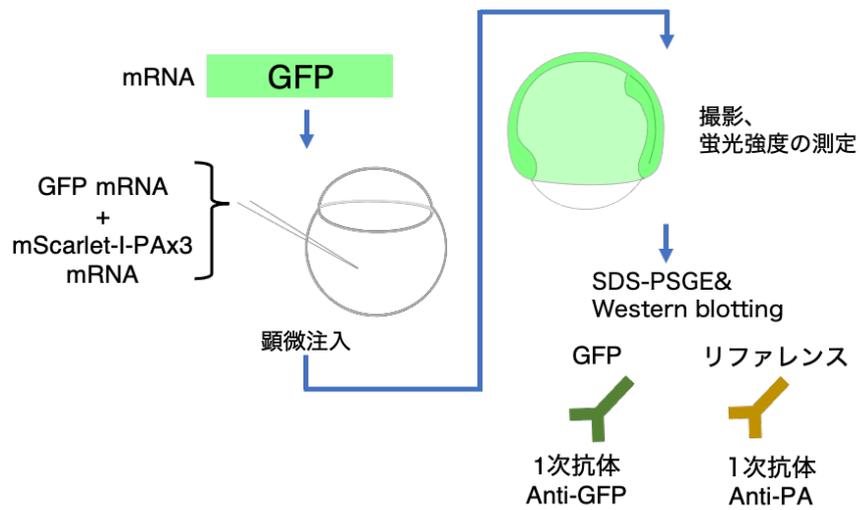
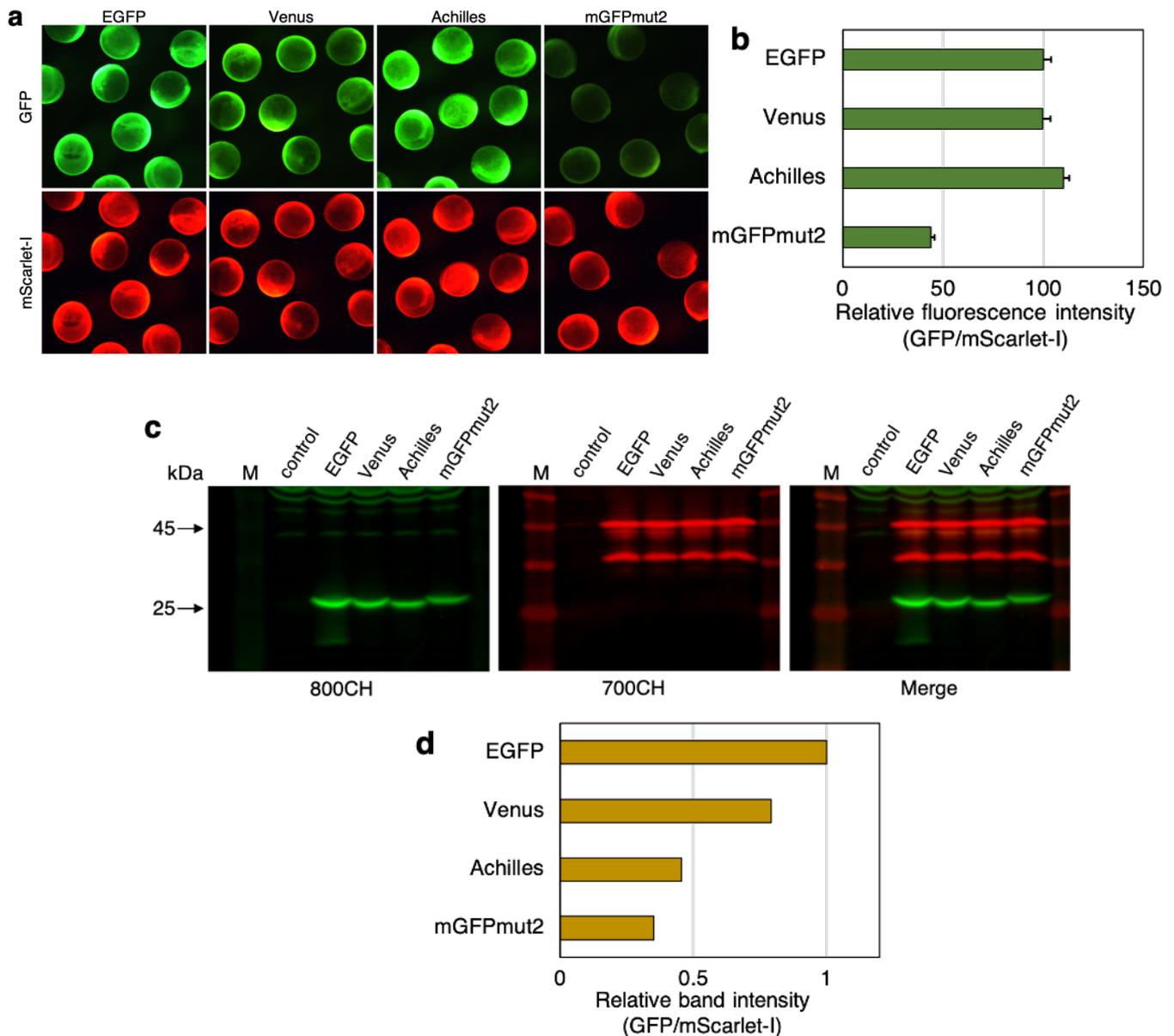


図 5. 蛍光タンパク質の発現量の比較方法

GFP バリエントのタンパク質の発現量比較における実験手順を示す。RFP バリエントの比較でも同様の手順で行うが、リファレンスは EGFP-PAx3 を使い、1 次抗体に anti-RFP を用いて検出を行なった。



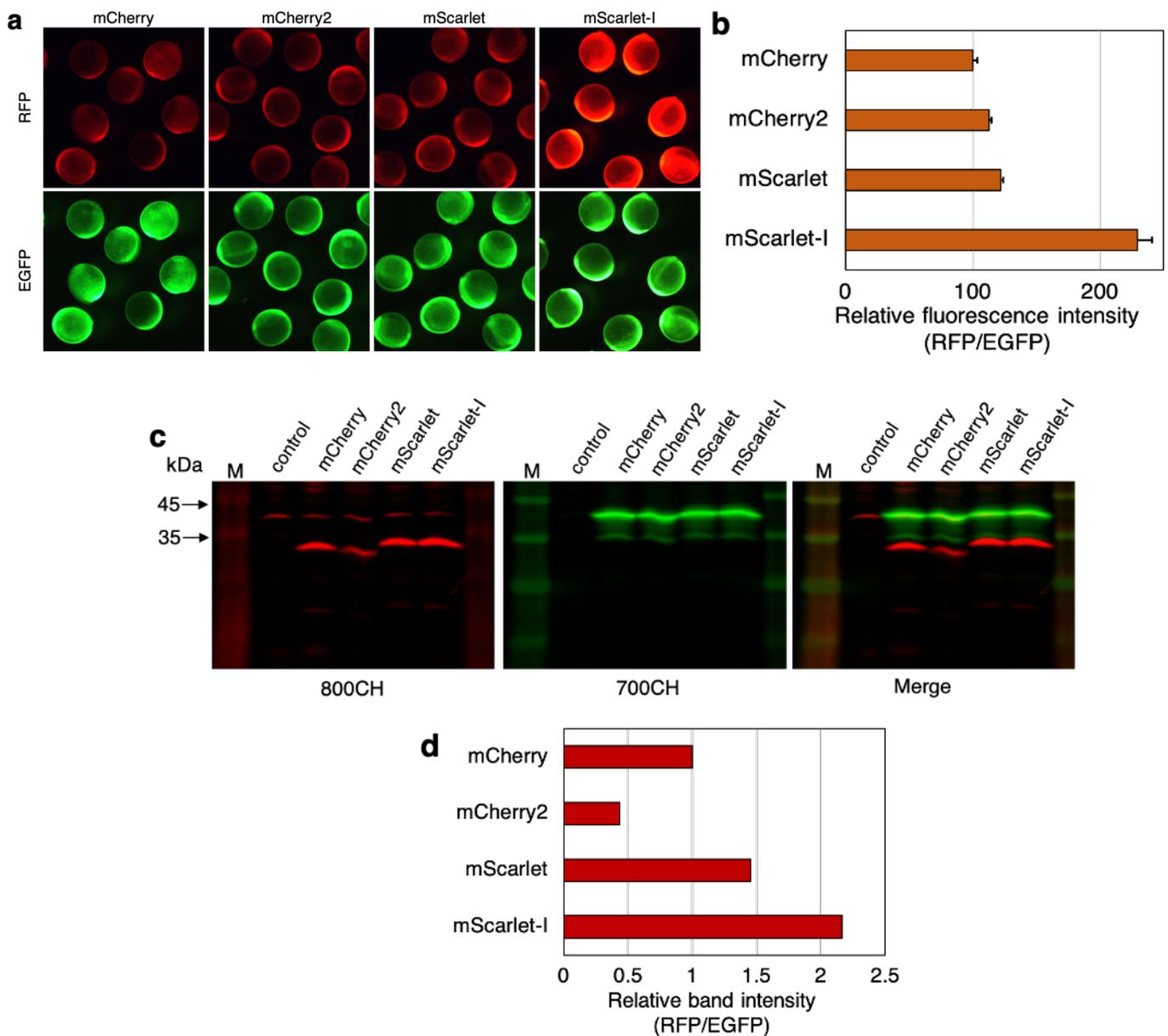
**図 6.9** 9 時間後における GFP の蛍光強度とタンパク質の発現量の比較の結果

(a) 顕微注入 9 時間後における GFP バリエントの観察結果。上の画像は GFP バリエント、下の画像は mScarlet-I-PAx3 の画像である。

(b) 画像解析により定量化し、リファレンスを用いて補正を行った結果。EGFP を 100 とし算出した結果を示している

(c) ウェスタンブロッティングによる抗 GFP 抗体(800CH)と抗 PA 抗体(700CH)の検出の結果。

(d) 検出したバンドを解析した結果。EGFP を 1 とした相対値として示している。



**図 7.9** 時間後における RFP の蛍光強度とタンパク質の発現量の比較の結果

(a) 顕微注入 9 時間後における RFP バリエーションの観察結果。上の画像は RFP バリエーション、下の画像は EGFP-PAx3 の画像である

(b) 画像解析により定量化し、リファレンスを用いて補正を行った結果。mCherry を 100 とし算出した結果を示している

(c) ウェスタンブロッティングによる抗 RFP 抗体(800CH)と抗 PA 抗体(700CH)の検出の結果。

(d) 検出したバンドを解析した結果。mCherry を 1 とした相対値として示している。

## FLAG を用いた蛍光タンパク質の発現量の比較

抗 GFP/RFP 抗体を用いた前述の実験において Achilles、mCherry2 のタンパク質の発現量が低いという結果になった。これは、胚内におけるタンパク質が少ないことを反映している可能性が高いが、抗体の特異性によって検出レベルが低くなっているという可能性も否定できない。このどちらであるかを判別するために、比較を行う蛍光タンパク質の C 末端側に FLAG タグを付加させ、抗 FLAG 抗体を用いて検出を行うことで抗体の特異性の問題を回避する実験を行った。また、抗 GFP 抗体では mNeonGreen を検出できないため、mNeonGreen の比較を行うために、同様に FLAG を付加させて検出を行った。方法は前述の実験と同じように蛍光タンパク質の C 末端側に FLAG を付加させた GFP-FLAG、RFP-FLAG の mRNA を合成し、1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に顕微注入した。注入から 9 時間後の胚を観察撮影し、その胚を用いてサンプルを調製した。その後、抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。今回の実験においても、GFP の比較では mScarlet-I に、RFP の比較では PA を 3 つ付加させた EGFP の mRNA を用いた(図 8)。

GFP-FLAG の比較において前述の実験と同様に EGFP、Venus、Achilles において十分な蛍光が観察でき、mGFPmut2 の蛍光は弱く、また、mNeonGreen の蛍光はほかのバリエーションと比べて最も蛍光強度が強いという結果が得られた(図 9 a,b)。続いてタンパク質の発現量の比較では FLAG を付加させる前の実験結果と同様に、EGFP、Venus、Achilles において、蛍光強度は大きく変わらないが、Achilles のタンパク質量が半分ほどしか検出されなかった(図 9 c,d)。mGFPmut2 においてもタンパク質量はかなり低く、mNeonGreen は EGFP と比べると少し低く検出された(図 9 c,d)。

次に RFP-FLAG の比較において、mCherry、mCherry2、mScarlet の蛍光には大きな差はなく、mScarlet-I が最も蛍光が強いという結果となった(図 10 a,b)。続いてタンパク質の発現量の比較では、FLAG を付加させる前と同様に mCherry2 において、mCherry の蛍光と大きな差はないものの、タンパク質量が半分ほどに低下する結果となった(図 10 c,d)。

これらの結果から、抗 GFP/RFP 抗体を用いた際、Achilles や mCherry2 に見られるタンパク質の発現量の低さは抗体の特異性によるものではなく、実際に胚内においてこれらのタンパク質の量が少ないということが示された。

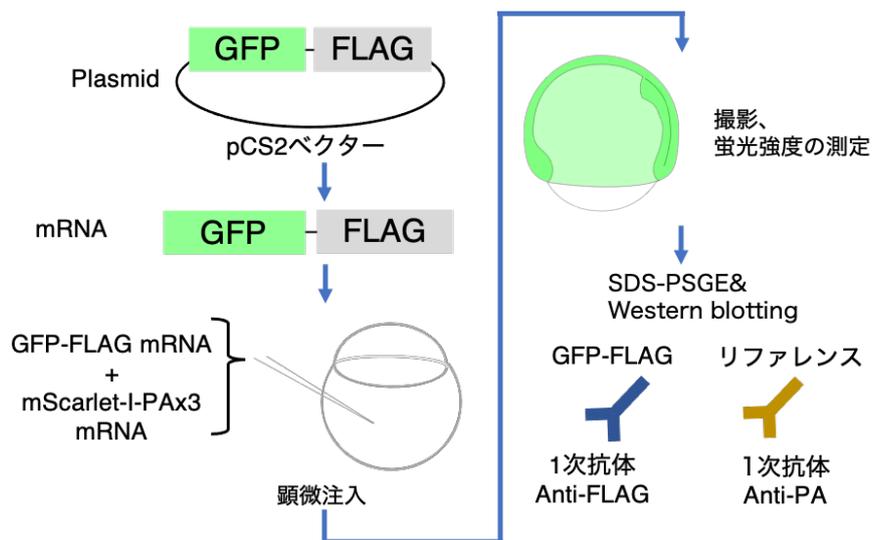
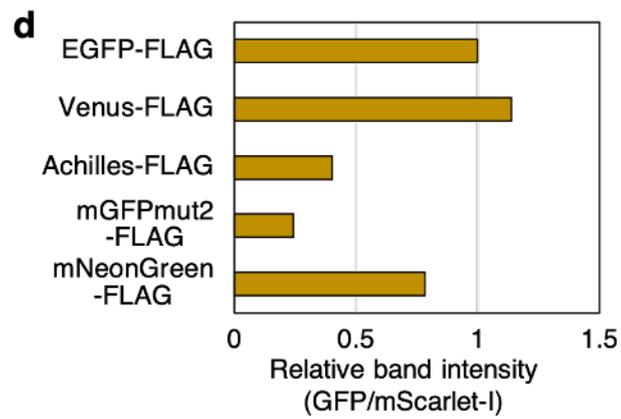
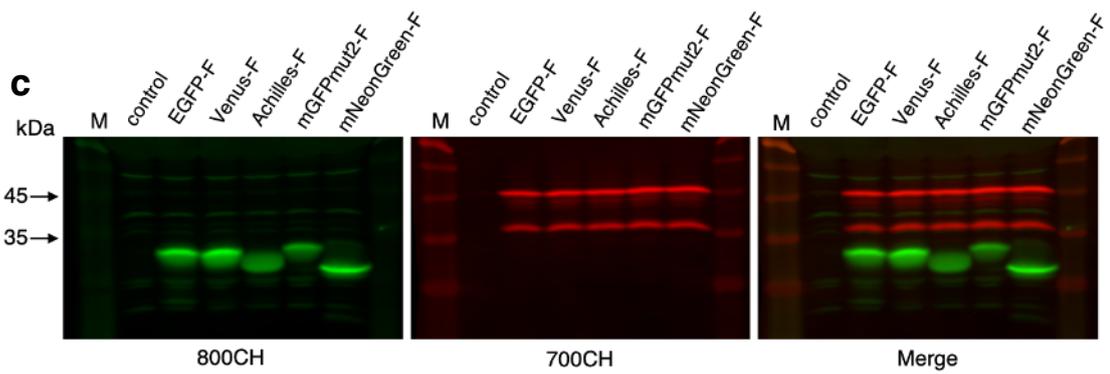
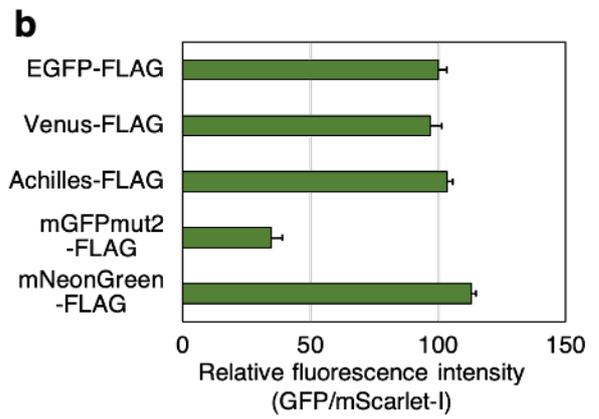
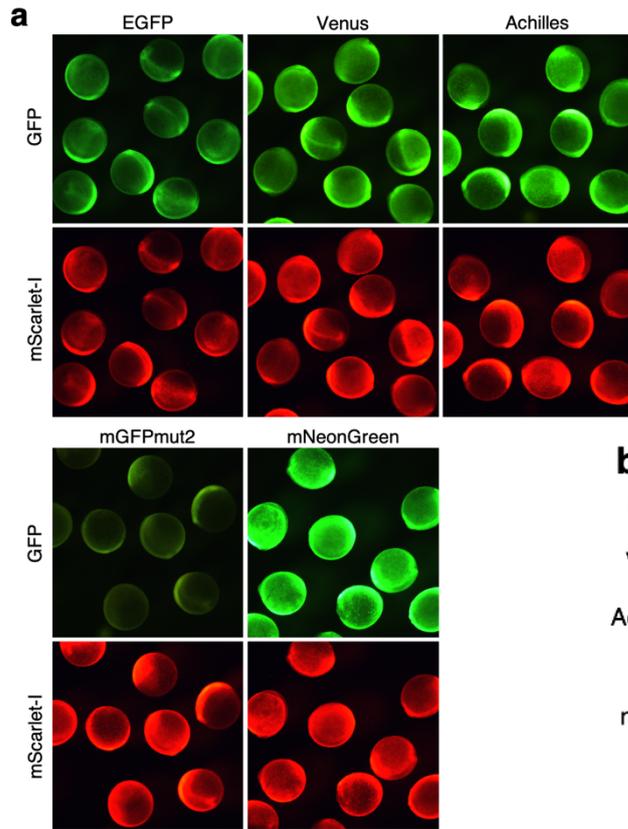


図 8. 蛍光タンパク質に FLAG を付加させたタンパク質の発現量の比較方法

GFP バリエントに FLAG を付加させたタンパク質の発現量の比較における実験手順のモデル図を示している。RFP-FLAG バリエントの比較でも同様の手順で行うが、リファレンスは EGFP-PAX3 を用い、1 次抗体は同じ Anti-FLAG を用いて検出を行なった。



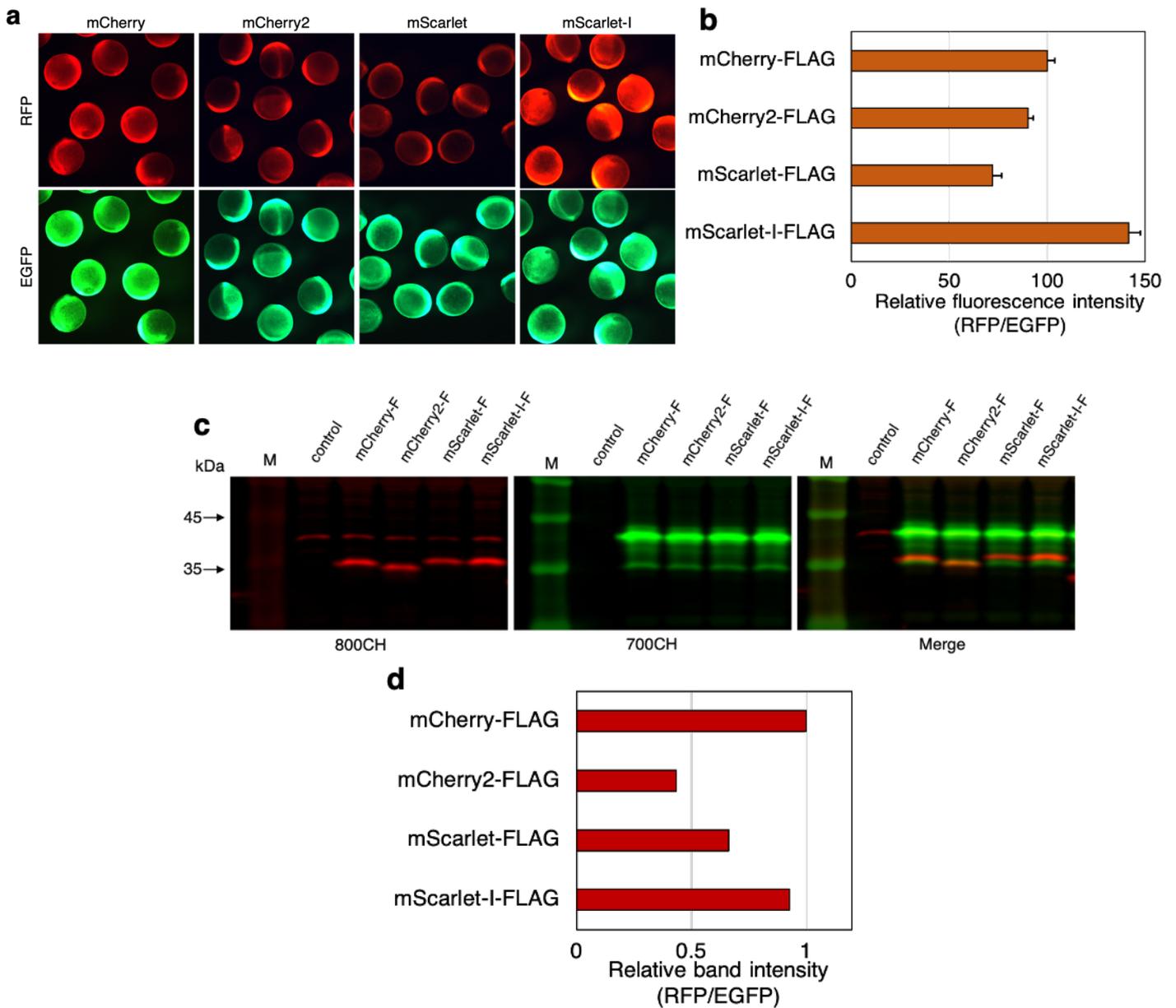
**図 9. 9 時間後における GFP-FLAG の蛍光強度とタンパク質の発現量の比較の結果**

(a) 9 時間後における GFP-FLAG バリエントの観察結果。上の画像は GFP-FLAG バリエント、下の画像は mScarlet-I-PAx3 の画像である

(b) 画像解析により定量化し、リファレンスを用いて補正を行なった結果。EGFP-FLAG を 100 とし算出した結果を示している

(c) ウェスタンブロッティングによる抗 FLAG 抗体(800CH)と抗 PA 抗体(700CH)の検出の結果。

(d) 検出したバンドを解析した結果。EGFP-FLAG を 1 とした相対値として示している。



**図 10.9** 9 時間後における RFP-FLAG の蛍光強度とタンパク質の発現量の比較の結果

(a) 9 時間後における RFP-FLAG バリエーションの観察結果。上の画像は RFP-FLAG バリエーション、下の画像は EGFP-PAx3 の画像である

(b) 画像解析により定量化し、リファレンスを用いて補正を行った結果。mCherry-FLAG を 100 とし算出した結果を示している

(c) ウェスタンブロッティングによる抗 FLAG 抗体(800CH)と抗 PA 抗体(700CH)の検出の結果。

(d) 検出したバンドを解析した結果。mCherry-FLAG を 1 とした相対値として示している。

## 考察

GFP バリエーションの比較においては、顕微注入後 3 時間時点ではどのバリエーションでも蛍光を観察することができたが、特に Venus、Achilles、mGFPmut2、mNeonGreen の 4 種で高い蛍光を観察できた。したがって、これらの 4 種のバリエーションは、成熟時間が他のバリエーションと比べて早いことが示唆される。6 時間後では全てのバリエーションにおいて蛍光が増加し、9 時間後においても mGFPmut2 を除いて他のバリエーションでは蛍光強度が増加する結果が得られた。9 時間後では mNeonGreen が最も蛍光強度が強かった。RFP の比較では、顕微注入後 3 時間後において mRuby3、mScarlet 以外の RFP で蛍光を観察できた。この中では特に mScarlet-I において強い蛍光を観察することができた。また、9 時間後においても最も強い蛍光を示したのも mScarlet-I であった。このことから、mScarlet-I は成熟時間が短くかつ、強い蛍光を出すということがわかった。今回の結果から GFP では発現後の早い時期において観察したい場合は Achilles、強い蛍光強度が必要な場合は mNeonGreen が適しており、RFP では両方の場合においても mScarlet-I を用いることが適していると考えられる。mGFPmut2 の蛍光強度が 6 時間後から 9 時間後において変化しないことについては後述の Achilles の考察と併せて述べる。

本研究で用いた蛍光タンパク質の特性(表 1)と、今回の研究の結果を比較すると、物理化学特性から予想される蛍光強度では説明できない部分があることがわかった。例えば、mClover3 の蛍光強度は、表 1 では mNeonGreen の次に強いが、9 時間後においても Venus よりも弱いと言う結果になった。他にも sfGFP と Venus においても物理化学特性では似ているが、sfGFP の蛍光が弱いという結果となった。この違いの原因については、次のようなことが考えられる。初めに、生物によってコドンの使用頻度が異なり、それがタンパク質の発現レベルに影響することが知られている。本研究で用いた蛍光タンパク質は哺乳類などのコドン使用頻度に至適化されるように遺伝子配列が変更されており、それぞれの配列がゼブラフィッシュのコドン使用頻度と合致しているかどうかは考慮せずに行った。したがって、このことがタンパク質の発現レベルに影響している可能性も考えられる。また、蛍光タンパク質の特性を測る際には、蛍光タンパク質は精製したのちに測定されるため、試験管と細胞内という環境の違いが生じる。蛍光タンパク質は pH や温度などによって成熟速度や蛍光強度が変化するため、この環境の違いによって違いが生じていることも考えられる。

GFP と RFP の胚内におけるタンパク質の発現量を比較する実験において、

Achilles、mCherry2において由来となった蛍光タンパク質と同等レベルの蛍光を示すのに対して、タンパク質の量は1/2程に低くなるという結果が得られた。この結果が胚内におけるタンパク質の量が少ないことが原因であるか、または検出に用いて抗体の特異性によるものかを判別するため、蛍光タンパク質の末端にFLAGを付加させ、再度検出を行なった。この場合も、Achilles、mCherry2は由来の蛍光タンパク質と比べると1/2ほどのタンパク質の量であった。このことからAchilles、mCherry2は胚内においてタンパク質の量が実際に少ないが、強い蛍光を発するということが考えられる。胚内においてタンパク質の量が少なくなる要因としては、タンパク質の安定性があげられる。Achillesが胚内において安定性が低く、プロテアーゼなどによって分解されるため、タンパク質の量が低い可能性がある。mGFPmut2も同様に安定性が低いため、蛍光強度の比較の実験で、6時間後から9時間後において蛍光強度が変化せず、他のバリエーションと比較して最も蛍光強度が低くなったと考えられる。次にAchillesのタンパク質の量に対する蛍光強度については、次のようなモデルが考えられる。蛍光タンパク質は翻訳された全てが光るわけではなく、一部において発色団の形成の失敗などによって、蛍光しない蛍光タンパク質というものができる。この失敗する割合というのがVenusでは高いが、Achillesでは低いため少ないタンパク質の量においてもVenusと同じくらいの蛍光を発するのではないかと考えられる(図11 a)。もう一つのモデルは、1分子あたりの蛍光強度がVenusよりAchillesの方が強いということが挙げられる(図11 b)。実際に表1からも測定条件によってはAchillesがVenusよりも吸光係数や量子収率が若干高いため、その可能性はある。だが、2倍以上異なるタンパク質量の差を覆すほどの差があるわけではないため、蛍光強度が異なる要因の一つとして考えられる。

本研究ではゼブラフィッシュ胚における蛍光タンパク質の蛍光強度、成熟時間、タンパク質の発現量において比較を行なった。蛍光タンパク質を実験において用いる際には目的タンパク質に付加され、タンパク質タグとして用いられることが多い。そのため今回の実験とは状況が異なり、融合するタンパク質の影響を受けるため、同じような結果が得られるとは限らない。また、顕微注入ではなくゲノムにノックインする場合、発現はプロモーターやエンハンサーの活性に依存した発現部位・発現量となるため蛍光強度や成熟速度が変化する可能性が考えられる。したがって、実際に個々の研究で、より最適な蛍光タンパク質を選択するためには、他のタンパク質への付加や、ゲノムへのノックインなど、その実験に用いる際の状況に近い条件での比較が必要な場合もあると考えられる。

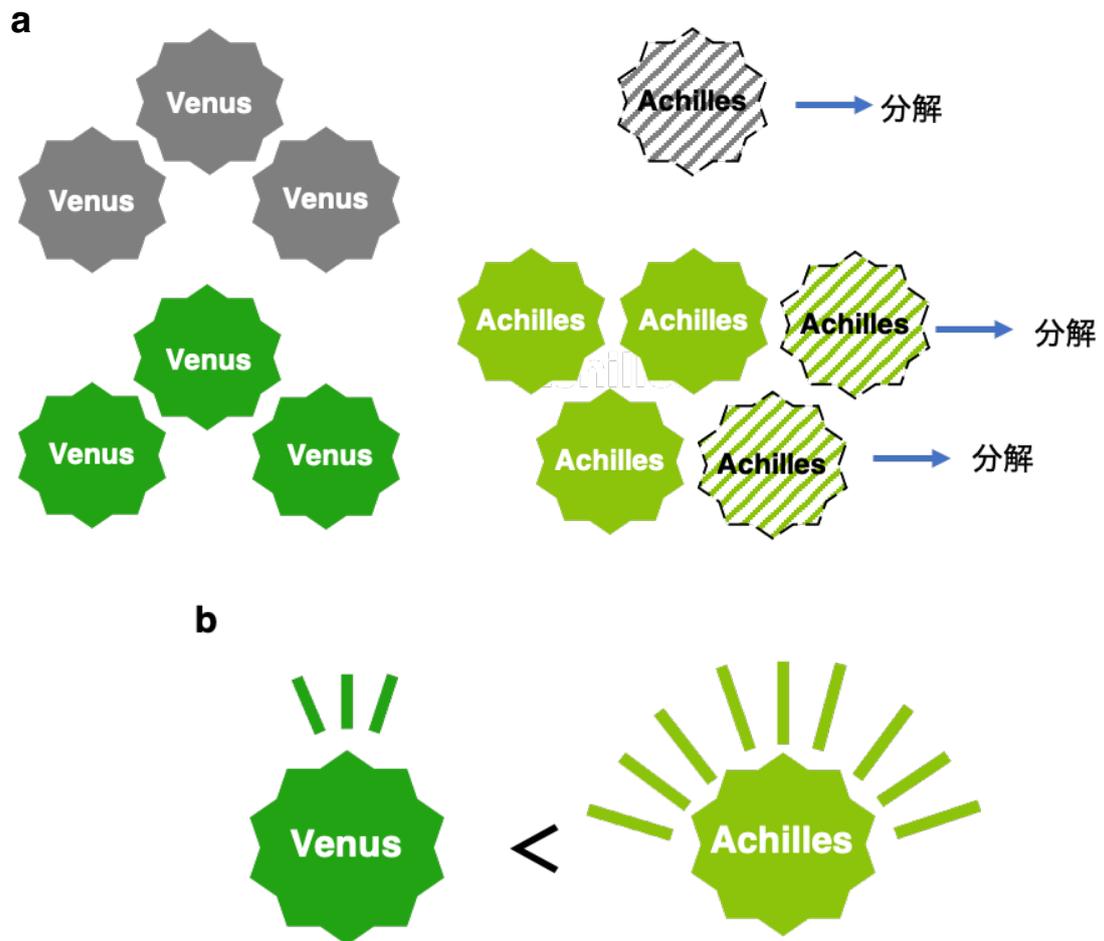


図 11. Achilles の低いタンパク質の量と高い蛍光強度の矛盾を説明するモデル図

## 材料と方法

### プラスミドの作成

GFP、RFP バリエーションおよび GFP-FLAG、RFP-FLAG の遺伝子をコードする領域をすべて pCS2 ベクターにサブクローニングした。pCS2-mGFPmut2、pCS2-mCherry2、pCS2-mScarlet-I、pCS2-mKate2、pCS2-GFP-FLAG、pCS2-RFP-FLAG 以外は、以下と同様のプロセスを経てすでにプラスミドの構築がなされているものを使用した。

以下のプライマーと反応条件を用いて PCR を行い、蛍光タンパク質の遺伝子をコードする領域を増幅させた。

Components	Volume( $\mu$ l)
Autoclaved distilled water	
10 $\times$ PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	5.0
2 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3.0
Primer F (100 $\mu$ M)	0.15
Primer R (100 $\mu$ M)	0.15
KOD-Plus-Neo (1U/ $\mu$ l)	1.0

Template	Volume( $\mu$ l)
pEB1-2ndValmGFPmut2 (47.5 ng/ $\mu$ l)	1.05
pmCherry2-N1 (25 ng/ $\mu$ l)	2.0
pmScarlet-I-C1 (25 ng/ $\mu$ l)	2.0
HS-mKate2 (25 ng/ $\mu$ l)	2.0
pCS2-EGFP (50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-Venus (50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-Achilles (50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-mNeonGreen (50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-mGFPmut2(50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-mCherry(50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-mCherry2 (50 ng/ $\mu$ l)	1.0
pCS2-mScarlet (50 ng/ $\mu$ l)	1.0

pCS2-mScarlet-I (50 ng/ $\mu$ l)	1.0
----------------------------------	-----

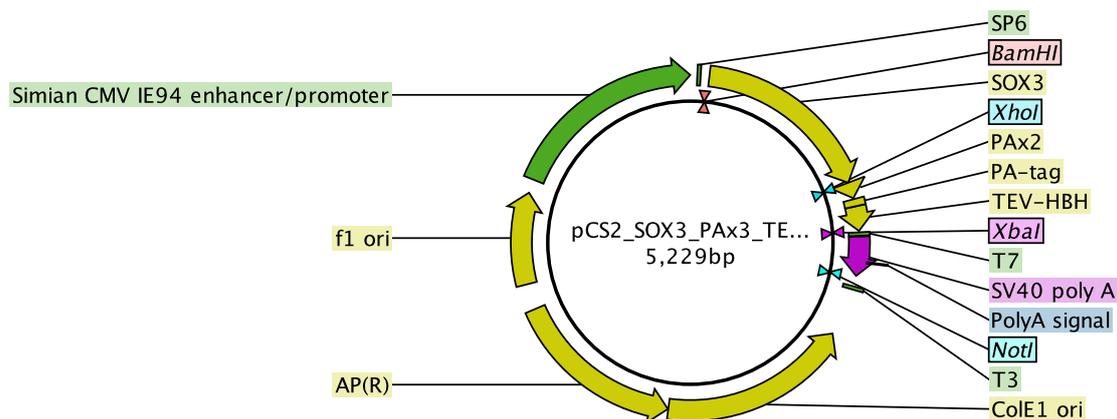
FP variant	Template	Primer-F	Plimer-R
mGFPmut2	pEB1-2nd Val mGFPmut2	BamHI -mGFPmut2 -ATG-F	EcoRI -mGFPmut2 -stop-R
mCherry2	pmCherry2-N1	BamHI-Venus -ATG-F	EcoRI-Venus -stop-R
mScarlet-I	pmScarlet-I-C1	BamHI-mScarlet -ATG-F	EcoRI-Venus -stop-R
mKate2	HS-mKate2	BamHI-mKate2 -ATG-F	EcoRI-mKate2 -stop-R
EGFP-FLAG	pCS2-EGFP	BamHI-Venus -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
Venus-FLAG	pCS2-Venus	BamHI-Venus -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
Achilles-FLAG	pCS2-Achilles	BamHI-Venus -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
mGFPmut2-FLAG	pCS2-mGFPmut2	BamHI- mGFPmut2 -ATG-F	mGFPmut2 -XhoI
mNeonGreen- FLAG	pCS2-mNeonGreen	BamHI-Venus -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
mCherry-FLAG	pCS2-mCherry	BamHI-Venus -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
mCherry2-FLAG	pCS2-mCherry2	BamHI-Venus -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
mScarlet-FLAG	pCS2-mScarlet	BamHI-mScarlet -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R
mScarlet-I-FLAG	pCS2-mScarlet-I	BamHI-mScarlet -ATG-F	EGFP-Xh-GS -FLAG-Xb-R

Primer	Sequence (5' to 3')
BamHI-mGFPmut2 -ATG-F	GGGGGATCCACCATGGTGAGTAAAGGAGAAGAA

EcoRI-mGFPmut2 -stop-R	GGGGAATTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
BamHI-Venus-ATG-F	GGGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
EcoRI-Venus-stop-R	GGGGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
BamHI-mScarlet -ATG-F	GGGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGC
BamHI-mKate2-ATG-F	GGGGGATCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAG
EcoRI-mKate2-stop-R	GGGGAATTCTCATCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG
EGFP-Xh-GS-FLAG -Xb-R	GGGTCTAGATTATTTGTCGTCATCGTCCTTGTA ATCACCGGAGCTCCCACCCTCGAGCTTGTACAG CTCGTCCATGC
mGFPmut2-XhoI	GGGCTCGAGTTTGTATAGTTCATCCATGC

PCRによって増幅させたDNAは、FLAGを含まない配列では制限酵素BamHIとEcoRIを用いて切断処理を行った。同様のBamHIとEcoRIで制限酵素処理を行って切断したpCS2ベクターに挿入することで、pCS2-GFPおよびpCS2-RFPのバリエーションプラスミドを作成した。次にFLAGを含む配列ではBamHIとXbaIで制限酵素処理を行い、同じ制限酵素で処理したpCS2ベクターに挿入することで、pCS2-GFP-FLAGおよびpCS2-RFP-FLAGバリエーションを作成した。mGFPmut2-FLAGの作成にはPCR産物をBamHIとXhoIで処理し、pCS2-Venus-FLAGを同様の処理を行ったものをベクターとし、これに挿入し作成した。リファレンスに用いたEGFP-PAx3、mScarlet-I-PAx3は図に示すプラスミドpCS2-SOX3-PAx3-TEV-HBHをBamHIとXhoIで処理し、ベクターとした。次にpCS2-EGFP-FLAGとpCS2-mScarlet-I-FLAGをBamHIとXhoIで処理したものを先程のベクターに挿入しプラスミドを作製した。その後このプラスミドを含む大腸菌を中規模で培養し、Nucleo Bond Xtra Midi(MACHEREY-NAGEL)を用いてプラスミドを精製した。

mRNAの合成



上記の手順で作成して得たプラスミドを、制限酵素 NotI で直鎖状にし、それを鋳型として mRNA の転写を行った。mScarlet/mScarlet-I の配列は NotI 部位を持つことから、これらを含むプラスミドには Acc65I を用いて直鎖状にした。in vitro 転写には Amplicap SP6 High Yield Marker(CellScript)を用いて行った。mRNA は、Clean&Concentrator-25(Zymo Research)を用いて精製後、顕微注入に用いた。

### 蛍光強度のイメージングと測定

蛍光強度の比較実験では、TL 系統のゼブラフィッシュの交配から得られた 1 細胞期の胚に GFP、あるいは RFP の mRNA を含む溶液を約 1 nl 顕微注入し、28°Cで飼育した。顕微注入した溶液は、GFP の比較では GFP バリエントがコードされた mRNA 濃度を 50ng/ $\mu$ l、リファレンスである CF594 Dextran 10,000 MW(Biotium)を 0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように調製した。また、RFP の比較では RFP バリエントがコードされた mRNA 濃度を 50ng/ $\mu$ l、リファレンスである CF488A Dextran 10,000 MW(Biotium)を 0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように調製した。

注入から 3 時間後、6 時間後、9 時間後の胚の撮影を xxx を用いて行った。観察に用いた蛍光顕微鏡(GFP の測定では M205FA、Leica RFP の測定では SZX12、OLYMPUS)の励起フィルタと吸収フィルタを以下の表 2 で示す。撮影した画像を ImageJ を用いて蛍光強度の定量化を行った。測定と定量化の方法としては、まず画像を RGB 分割した 8 bit の画像にし、Subtract Background によってバックグラウンド処理を行なった。次に輝度閾値を設定することで測定範囲を選択し、その領域におけるシグナルの平均値を求めた。撮影したリファレンスである画像から蛍光強度の定量化を行い、全てのバリエントのリファレンスの定量化した値の平均値を出し、それで個々の胚のリファレンスの値を除することで相対値を求め、補正值とした。比較を行う蛍光タンパク質の蛍光量をその値で除することでそのバリエントの定量化した値を補正した。

表 2. 観察に用いた励起フィルタと吸収フィルタの特性

	励起フィルタ	吸収フィルタ
GFP	460-500 nm	510 LP
RFP	530-550 nm	575 LP

表 3. リファレンスに用いた蛍光色素の特性

	励起波長(nm)	蛍光波長(nm)
CF488A (BIOTIUM) 品番：80110	490	515
CF594 (BIOTIUM) 品番：80114	593	614

### 蛍光タンパク質の抽出

タンパク質量の比較実験では、ゼブラフィッシュの交配から得られた 1 細胞期の胚に GFP あるいは RFP の mRNA を含んだ溶液を約 2 nl 顕微注入し、28°C で飼育した。顕微注入した溶液は、GFP の比較では GFP バリエントがコードされた mRNA 濃度を 30ng/ $\mu$ l、リファレンスである mScarlet-I-PAx3 を 30 ng/ $\mu$ l となるように調製した。また、RFP-FLAG の比較では RFP バリエントがコードされた mRNA 濃度を 30ng/ $\mu$ l、リファレンスである EGFP-PAx3 を 30 ng/ $\mu$ l となるように調製した。注入から 9 時間後の胚を観察および蛍光顕微鏡(GFP と RFP の測定では M205FA、Leica)の励起フィルタと吸収フィルタを用いて撮影を行った。この胚を用いてタンパク質を比較するためのサンプル調製を行った。

10 個の胚を E2 Embryo medium の中でピンセットを用いてコリオンをはがし、撮影を行った。その後、1.5 ml チューブに移し、Embryo medium をできるだけ取り除いた。1/2x Ginzburg Fish Ringer without Calcium 5 ml に cOComplete を 1 錠入れ調整したものを先ほどのチューブに 50  $\mu$ l 加え、2x SDS-PAGE Sample buffer + EDTA を 50  $\mu$ l を加えた。すぐにピペッティングによって胚を破碎し-30°C で保存した。

表 4. 観察に用いた励起フィルタと吸収フィルタの特性

	励起フィルタ	吸収フィルタ
GFP	460-500 nm	510 LP
RFP	510-560 nm	590-650 nm

### SDS-PAGE

10%分利用ポリアクリルアミドゲルと濃縮用ゲルで構成された Niagara mini gel を用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質サンプルは 75°C、5 分で熱処理を行い、さらにゲノム DNA の断片化のための超音波処理を事前に行った。どのサ

サンプルについても2つの胚相当量である 20  $\mu$ l ずつをウェルに入れた。泳動液には SDS running buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS, pH8.3)を用いた。泳動は 30 mA(定電流設定)で約 2 時間電気泳動を行った。

### メンブレンへの転写

メンブレンには PVDF(Immobilon-FL)を用いた。メンブレンはメタノールに 1-2 分間浸した後、純水に 1-2 分浸し、さらに転写バッファーに浸し親水化させた。電気泳動終了後、ゲルを転写バッファー(10 mM CAPS [pH 11], 10% methanol)に浸し、揺らして平衡化した。あらかじめ冷やしておいた転写バッファー中で、転写用の転写板、スポンジ、濾紙の順で重ね合わせ、濾紙の上にゲルをマーカーが右になるように置き、その上にメンブレンを重ねた。さらに濾紙、スポンジ、転写板、転写板の順で重ね合わせ、転写装置にセットした。そして氷中で 90V、1 時間で転写した。転写終了後、メンブレンは TBS(20mM Tris-HCl[pH7.5]、150mM NaCl)中、4°Cで保存した。

### Western Blotting

初めに、1/2x Intercept Blocking Buffer(Intercept Blocking Buffer : TBS = 1:1)にメンブレンを浸しながら 1 時間振とうしてブロッキングを行なった。次に、1 次抗体希釈液(1/2x Intercept Blocking Buffer、0.1% Tween20)に浸し、4°Cで振とうしながらオーバーナイトでインキュベーションを行なった。1 次抗体希釈液を捨て、TBST(TBS、0.1% Tween20)でリンスを行なった。その後、TBSTで 5 分間振とうしながら浸し液を変えることを 4 回繰り返した。次に 2 次抗体希釈液(1/2x Intercept Blocking Buffer、0.2% Tween20、0.01% SDS)に浸し、遮光状態で 1 時間振とうした。1 次抗体希釈液の時と同様に TBST でリンスを行い、洗浄した。メンブレンを TBS でリンスし、メンブレンを Odyssey CLx でスキャンし、検出を行なった。メンブレンは TBS につけて遮光状態、4°Cで保存した。

表 5. ウェスタンブロットティングに用いた抗体の種類と濃度

	1 次抗体	2 次抗体
GFP	Anti-GFP pAb (Gene Tex) 0.1 $\mu$ g/ml 品番 : 113617	CF770 anti rabbit (BIOTIUM) 0.2 $\mu$ g/ml 品番 : 20078-1
RFP	Anti-RFP pAb (MBL) 0.5 $\mu$ g/ml	CF770 anti rabbit (BIOTIUM) 0.2 $\mu$ g/ml

	品番 : PM005	品番 : 20078-1
-FLAG	Anti-DDDDK tag pAb (MBL) 0.1 $\mu$ g/ml 品番 : PM020	CF770 anti rabbit (BIOTIUM) 0.2 $\mu$ g/ml 品番 : 20078-1
-PAx3	Anti-PA tag (Wako) 0.2 $\mu$ g/ml 品番 : 016-25861	CF680 anti rat (SIGMA) 0.1 $\mu$ g/ml 品番 : SAB4600201

## 参考文献

- Bajar, B.T., Wang, E.S., Lam, A.J., Kim, B.B., Jacobs, C.L., Howe, E.S., Davidson, M.W., Lin, M.Z., Chu, J., 2016. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep20889>
- Balleza, E., Kim, J.M., Cluzel, P., 2018. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat. Methods* 15, 47–51. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4509>
- Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A., Gadella, T.W.J., 2017. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat. Methods* 14, 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87–90. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-87>
- Pédrelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S., 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79–88. <https://doi.org/10.1038/nbt1172>
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
- Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chamma, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W., Wang, J., 2013. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat. Methods* 10, 407–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>

Shen, Y., Chen, Y., Wu, J., Shaner, N.C., Campbell, R.E., 2017. Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLOS ONE* 12, e0171257.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171257>

Yoshioka-Kobayashi, K., Matsumiya, M., Niino, Y., Isomura, A., Kori, H., Miyawaki, A., Kageyama, R., 2020. Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. *Nature* 580, 119–123.

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1882-z>