

# 強制発現系を用いた大腸菌における緑色蛍光タンパク質の発現に対する グルコース、イソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド、 及び、サイクリック AMP の効果

## Effect of Glucose, Isopropyl $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside, and Cyclic AMP on Green Fluorescence Protein Expression in *Escherichia coli*

大竹 里美, 小林 葉子

### 要 約

pGreen-BSK+ プラスミドは、強い蛍光強度を持つ緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子, *gfp*, を含んでいる。pGreen-BSK+ より *gfp* を切り出し、大腸菌用タンパク質発現ベクターである pET19b に挿入し、pGreen-ET19 を作成した。pGreen-ET19b を大腸菌 BL21(DE3) に形質転換し、大腸菌内で GFP が合成されることを確認した。基底レベルの大腸菌内のタンパク質の発現は 0.5-1% グルコースで阻害されること、サイクリック AMP (cAMP) によりタンパク質の発現が誘導されることが報告されている。そこで、0-100 mM グルコース、タンパク質発現誘導剤イソプロピル  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 及び cAMP による GFP の発現に対する効果を検討した。基底レベルの GFP の発現は、10 mM 以上のグルコースにより抑制された。IPTG は、0 mM グルコースで GFP の発現量の少ない大腸菌クローンにおいて、10 mM 以上のグルコースが存在する場合でも GFP の発現を誘導した。しかし、基底レベルの GFP の発現量の多い大腸菌クローンにおいては、IPTG は大腸菌の増殖を抑制した。cAMP による付加的な効果は確認されなかった。グルコース存在下における IPTG による大腸菌の増殖抑制は、予想外の結果であり、今後の検討が必要とされる。

キーワード：緑色蛍光タンパク質、タンパク質発現、グルコース、イソプロピル  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド、大腸菌

### はじめに

緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescence Protein; GFP) は、オワンクラゲから単離されたタンパク質であり、紫外線を照射することにより単体で緑色蛍光を発する。GFP 遺伝子を単体あるいは他のタンパク質の遺伝子と結合し、細胞内に導入することにより導入された細胞内でタンパク質が合成される。それを利用して、時間的及び空間的な遺伝子の発現状態を生きた状態で確認をすることが可能である<sup>1-3)</sup>。

大腸菌タンパク質発現ベクターである pET 系ベクターに導入された遺伝子は、T7 RNA ポリメラーゼの作用によりタンパク質が合成される<sup>4)</sup>。pET 系ベクターの 1 つである pET19b は、T7 *lac* プロモーター、及び、アンピシリン耐性遺伝子を持ち、制限酵素 *NdeI* を用いて遺伝子のコード領域を挿入することにより N 末

端に His タグを融合したタンパク質が発現されるようにデザインされている。また、His タグコード領域の先端には、制限酵素 *NcoI* の認識部位があり、*NcoI* とマルチクローニングサイトに存在する制限酵素を用いて、His タグを融合しないタンパク質の発現を誘導することも可能である。T7 *lac* プロモーターによるタンパク質の発現に必要な T7 RNA ポリメラーゼは、バクテリオファージ  $\lambda$ DE3 を持つ宿主 (DE3 溶原大腸菌) の L8-UV5 *lac* プロモーターの調節下で発現が誘導される。定常の条件下では T7 RNA ポリメラーゼの発現は宿主の *lacI* リプレッサーによって抑制されているが、イソプロピル  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) によって T7 RNA ポリメラーゼの発現が誘導される。すなわち、発現させたいタンパク質の遺伝子を挿入した pET19b を DE3 溶原大腸菌株に形質転換し、IPTG を作用させることにより目的のタンパク質を大腸菌内

で合成することができる<sup>5)</sup>。しかし、基底レベルで発現する T7 RNA ポリメラーゼにより、IPTG を添加しなくてもタンパク質の合成が誘導される。基底レベルのタンパク質の合成は、0.5-1% グルコースの添加により抑制できること<sup>6)</sup>、サイクリック AMP (cAMP) によりタンパク質の発現が誘導されることも報告されている<sup>6,7)</sup>。

これまでに、我々は学生実験における遺伝子組み換え実験に有用なプラスミド、pGreen-BSK+ を構築した<sup>8)</sup>。pGreen-BSK+ は、強い蛍光強度を持つ GFP の遺伝子、*gfp* を含んでいる。そして、pGreen-BSK+ より *gfp* を制限酵素 *NcoI* 及び *BamHI* を用いて切り出し pET19b に導入したプラスミド (pGreen-ET19) で大腸菌 JM109(DE3) を形質転換することにより、1) 大腸菌内で GFP タンパク質が合成され、緑色蛍光を発すること、2) GFP の発現量は、大腸菌クローンにより異なること、3) 多くの大腸菌クローンは、タンパク質発現誘導剤である IPTG を添加していない条件下で、高い GFP の発現がみられ、IPTG の添加により発現量は減少することを報告している<sup>8)</sup>。pET ベクターに導入した遺伝子の発現は、グルコースやサイクリック AMP (cAMP) に影響されることも報告されている<sup>6,7)</sup>。本研究では、*gfp* を pET19b に導入したプラスミド pGreen-ET19 をタンパク質の発現系に適した大腸菌 BL21(DE3) に導入し、グルコース、IPTG、及び cAMP 存在下におけるタンパク質の発現量の変化を解析した。

## 方法

### 1. 試薬

アデノシン 3',5'-環状一リン酸ナトリウム水和物 (cAMP-Na) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan), Bacto Yeast Extract は Difco (日本 BD) (Tokyo, Japan), Polypepton は日本製薬株式会社 (Tokyo, Japan), pET19b は Novagen (メルク株式会社) (Tokyo, Japan), 制限酵素 *NcoI* 及び *BamHI*, Quick Ligation Kit は New England Biolabs Japan Inc. (Tokyo, Japan), Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System は Promega KK (Tokyo, Japan) のものを使用した。BL21(DE3) 及び pGreen は NBRP 大腸菌事業 (NIG) より入手した。他の試薬は和光純薬株式会社 (Tokyo, Japan) の特級を使用した。

### 2.1 *gfp* の pET19b への挿入、及び、pGreen-BSK+ と pGreen-ET19 の *gfp* を含む領域近傍の塩基配列の決定

pGreen-BSK+ の *gfp* を含む領域は、制限酵素 *NcoI* 及び *BamHI* を用いて切断した。切断した DNA 断片は、電気泳動後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製した。精製した DNA 断片は *NcoI* 及び *BamHI* で切断をした大腸菌発現ベクター pET19b に Quick Ligation Kit を用いて結合後、大腸菌 JM109(DE3) に形質転換した。紫外線を当て緑色蛍光を放つ大腸菌コロニーを選択し、T7 terminator プライマー、GCTAGTTATTGCTCAGCGG、及び pGreenA200 TF プライマー、ACCTGTTCCCTTGCCCAACAC、を用いた Colony PCR 法により pGreen-ET19 が含まれていることが確認できたものを、pGreen-ET19 を含む大腸菌クローン 1-4 として選択した。pGreen-BSK+ 及び pGreen-ET19 の *gfp* 及び *gfp* 挿入近辺の塩基配列は (それぞれ、M13 universal プライマー、GTTTTCCAGTC ACGAC, M13 reverse プライマー、CAGGAAACAGCT ATGAC, pGreenA200TF プライマー、pGreenA200TR プライマー、GTGTTGGCCAAGGAACAGGT、及び pGreenA200TF プライマー、pGreenA200TR プライマー、T7 terminator プライマー用い、ユーロフィンジェノミクス株式会社 DNA シーケンス部門 (Tokyo, Japan) に解析を委託し、塩基配列を確認した。

### 2.2 pGreen-ET19 及びコントロールベクターによる大腸菌 BL21(DE3) の形質転換

4 つの pGreen-ET19 を含む大腸菌 JM109(DE3) クローンからプラスミドを調整し、大腸菌 BL21(DE3) に形質転換した。得られた大腸菌クローンは GFP-BL21(DE3)-1, -2, -3, -4 とした。また、GFP を発現するプラスミド pGreen 及び GFP を発現しない、すなわち *gfp* を含まない pET19b を BL21(DE3) に形質転換した Green-BL21(DE3) 及び pET19b-BL21(DE3) をそれぞれ陽性コントロール (PC) 及び陰性コントロール (NC) として用いた。

### 2.3 GFP の発現誘導、及び、その確認

GFP の発現量の確認には、LB 培地 (10 g/L Polypepton, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 10 g/L NaCl, 100 µg/mL アンピシリン, 1.5% 寒天) を基本培地として用いた。グルコースの効果を検討する際には、0 mM, 1 mM, 10 mM, 及び 100 mM グルコースを含む LB 培地, 0 mM グルコース -LB 培地, 1 mM グルコース -LB 培地, 10

mM グルコース -LB 培地, 及び 100 mM グルコース -LB 培地, を用いた. また, IPTG の効果を検討するためには, 0 mM, 1 mM, 10 mM, 及び, 100 mM グルコース -LB 培地に 1 mM IPTG を添加した 0 mM グルコース +IPTG-LB 培地, 1 mM グルコース +IPTG-LB 培地, 10 mM グルコース +IPTG-LB 培地, 100 mM グルコース +IPTG-LB 培地, また, cAMP の効果を検討するためには, 0 mM, 1 mM, 10 mM, 及び, 100 mM グルコース -LB 培地に 100  $\mu$ L の 1 mM cAMP-Na を塗布した 0 mM グルコース +cAMP-LB 培地, 1 mM グルコース +cAMP-LB 培地, 10 mM グルコース +cAMP-LB 培地, 100 mM グルコース +cAMP-LB 培地 を用いた.

GFP-BL21(DE3)-1, -2, -3, -4, Green-BL21(DE3) 及び pET19b-BL21(DE3) の 1 つのコロニーをアンピシリン含む LB 液体培地 4 mL を用いて 4 時間培養した. 各大腸菌培養液を 6 つの区画に分けたそれぞれの培地に塗布し, 37°C で一晩培養した. Transilluminator (Benchtop 2 UV TM Transilluminator) 上で大腸菌を培養したプレートに 365 nm の紫外線を照射し, デジタルカメラを用いて撮影した. 同じ条件の実験は, それぞれ 3 枚ずつ行った.

## 結果

### 1. pGreen-BSK+ 及び pGreen-ET19 の *gfp* 挿入部, 及び, その近傍の塩基配列の決定

pGreen-BSK+ は, pGreen に含まれる *gfp* にコードする GFP のアミノ酸配列を変えずに遺伝子変異を加え, その *gfp* を pBluescriptSK+ に挿入し構築したプラスミドである. *Gfp* 挿入部の塩基配列を解析し, 点変異の導入, 及び, *Nco*I と *Eco*RI の制限酵素認識部位で *gfp* が挿入されていることを確認した (Fig. 1).

また, pGreen-ET19 は, pGreen-BSK+ より制限酵素 *Nco*I 及び *Bam*HI で切り出した *gfp* を含む領域を pET19b に挿入したものである. *Gfp* 挿入部位近傍の塩基配列を解析し, *gfp* が pET19b に *Nco*I 及び *Bam*HI の制限酵素部位で挿入されていることを確認した. pGreen-ET19 の *gfp* 挿入部位近傍の遺伝子発現調節にかかわる領域を Fig. 2 に示した.

### 2. GFP の発現の確認

GFP-BL21(DE3)-1, -2, -3, -4, Green-BL21(DE3) 及び pET19b-BL21(DE3) を塗布し, 一晩培養した大腸菌プレートに紫外線を照射した時の結果を示す (Fig. 3). GFP-BL21(DE3)-1, -2, -3, -4 は, それぞれ,

a-1, a-2, a-3, a-4 の区画で, Green-BL21(DE3) は PC の区画, pET19b-BL21(DE3) は NC の区画で培養した. グルコース, IPTG 及び cAMP を含まない条件下 (0 mM グルコース) では, 陰性コントロールである pET19b-BL21(DE3) から緑色蛍光は確認されず, 陽性コントロールである Green-BL21(DE3) は薄い緑色蛍光を発することが確認された. そして, GFP-BL21(DE3)-1, -3, -4 からは, Green-BL21(DE3) よりも強い緑色蛍光が検出された. GFP-BL21(DE3)-2 は, GFP-BL21(DE3)-1, -3, -4 に比べ緑色蛍光の強度は低く, Green-BL21(DE3) と同程度の緑色蛍光を示した. 1 mM グルコースを含む培地を用いた場合でも, 0 mM グルコースを含む場合と同様の結果を示した. 10 mM グルコース及び 100 mM グルコースを含む条件では, 形質転換したすべての大腸菌で増殖は見られたが, 緑色蛍光を確認することはできなかった.

### 3. IPTG の効果

IPTG は, *lac* リプレッサーと結合し, タンパク質合成を誘導する薬剤である. Green-BL21(DE3) は 1 mM IPTG を含む 0 mM グルコース及び 1 mM グルコース -LB 培地を用いた場合, 緑色蛍光を発した. 1 mM グルコースが存在する時, Green-BL21(DE3) から発せられる緑色蛍光は, IPTG 非添加 (None) の場合よりも強い緑色蛍光が検出された. IPTG が存在しても, 10 mM 及び 100 mM グルコース添加の条件では緑色蛍光は減少した. また, pET19b-BL21(DE3) は, 緑色蛍光を発しないことが確認された.

Green-ET19b を含む大腸菌の場合, 大腸菌クローンにより異なる結果となった. 0 mM 及び 1 mM グルコースを含む条件で, IPTG によるタンパク質の誘導をかけた場合, GFP-BL21(DE3)-2 は, Green-BL21(DE3) と同等の緑色蛍光を発した. そして, この緑色蛍光は, 10 mM 及び 100 mM グルコースを含む条件では減少した. しかし, IPTG 非添加の条件で強い緑色蛍光を示した GFP-BL21(DE3)-1, -3, -4 は, 0-100 mM グルコース及び IPTG を含む条件では, 大腸菌のコロニーが形成されず, すなわち, 大腸菌の増殖が認められず, また, 緑色蛍光も確認できなかった.

### 4. cAMP の効果

1 mM cAMP-Na を塗布した培地では, 全種類の大腸菌クローンとも, IPTG 及び cAMP-Na を添加していないものと同程度の緑色蛍光を示した.

```

        660          670          680          690          700          710
TGGGTACCGG GCCCCCCCTC GAGGTCATG GTACCGGTAG AAAAAATGAG TAAAGGAGAA
        658          699          677 T→C          685
        KpnI*          XhoI          NcoI          KpnI*
        720          730          740          750          760          770
GAACTTTTCA CTGGAGTTGT CCCAATTCTT GTTGAATTAG ATGGTGATGT TAATGGGCAC

        780          790          800          810          820          830
AAATTTTCTG TCAGTGGAGA GGGTGAAGGT GATGCAACAT ACGGAAAAC TACCCTTAA

        840          850          860          870          880          890
TTTATTTGCA CACTGGA AAACTACTCTGTT CCTTGGCCAA CACTGTGCAC TACTTTGACT
                                A→T

        900          910          920          930          940          950
TATGGTGTTT AATGCTTTTC AAGATACCCA GATCATATGA AACGGCATGA CTTTTTCAAG

        960          970          980          990          1000          1010
AGTGCCATGC CCGAAGGTTA TGTACAGGAA AGAACTATAT TTTTCAAAGA TGACGGGAAC

        1020          1030          1040          1050          1060          1070
TACAAGACAC GTGCTGAAGT CAAGTTTGAA GGTGATACCC TTGTTAATAG AATCGAGTTA

        1080          1090          1100          1110          1120          1130
AAAGGTATTG ATTTTAAAGA AGATGGAAAC ATTCTTGGAC ACAAATGGA ATACAACAT

        1140          1150          1160          1170          1180          1190
AACTCACACA ATGTATACAT CATGGCAGAC AAACAAAAGA ATGGAATCAA AGTTAACTTC

        1200          1210          1220          1230          1240          1250
AAAATTAGAC ACAACATTGA AGATGGAAGC GTTCAACTAG CAGACCATTA TCAACAAAAT

        1260          1270          1280          1290          1300          1310
ACTCCAATTG GCGATGGCCC TGTCCTTTTA CCAGACAACC ATTACCTGTC CACACAATCT

        1320          1330          1340          1350          1360          1370
GCCCTTTCGA AAGATCCCAA CGAAAAGAGA GACCACATGG TCCTTCTTGA GTTTGTAAACA

        1380          1390          1400          1410          1420          1430
GCTGCTGGGA TTACACATGG CATGGATGAA CTATACAAAT AGCATTTCGTA GAATTCCTGC
                                                                1422
                                                                EcoRI

        440          1450          1460          1470          1480          1490
AGCCCCGGGG ATCCACTAGT TCTAGAGCGG CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAGCTTTTGT
1432 1436 1440
PstI SmaI BamHI
        1500          1510          1520          1530          1540
TCCCTTTAGT GAGGGTTAAT TTCGAGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT

```

Fig. 1. DNA sequence NEAR the *gfp*-inserted site in pGreen-BSK+  
The DNA sequence around the *gfp* insertion site in pGreen-BSK+ is shown in Fig. 1. The numbers correspond to the nucleotide positions from the f1 origin beginning at position 3. The *gfp* region is enclosed in a box and the nucleotide sequences from the pBluescriptSK+ plasmid are indicated with bold lines. Bold and italic text indicates mutations. Restriction enzymes that digest pGreen-BSK+ at unique sites are indicated with the nucleotide numbers and restriction enzyme name. The asterisk (\*) indicates the recognition sites of the restriction enzyme *KpnI*, which digests pGreen-BSK+ at those two sites.

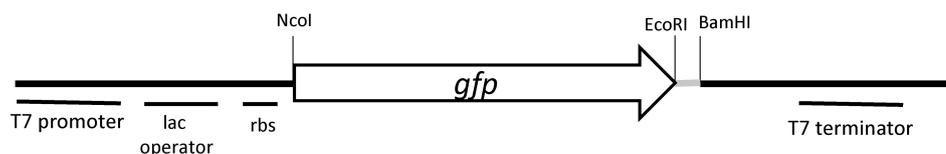


Fig. 2. Schematic diagram of pGreen-ET19 expression  
The sequences of the T7 promoter, *lac* operator, and ribosome-binding site (rbs) are present in the upstream region of *gfp* in pGreen-ET19. Therefore, the T7 terminator sequence is downstream of *gfp*. *Gfp* was inserted into pET19b between *NcoI* and *BamHI* sites, and started at ATG.

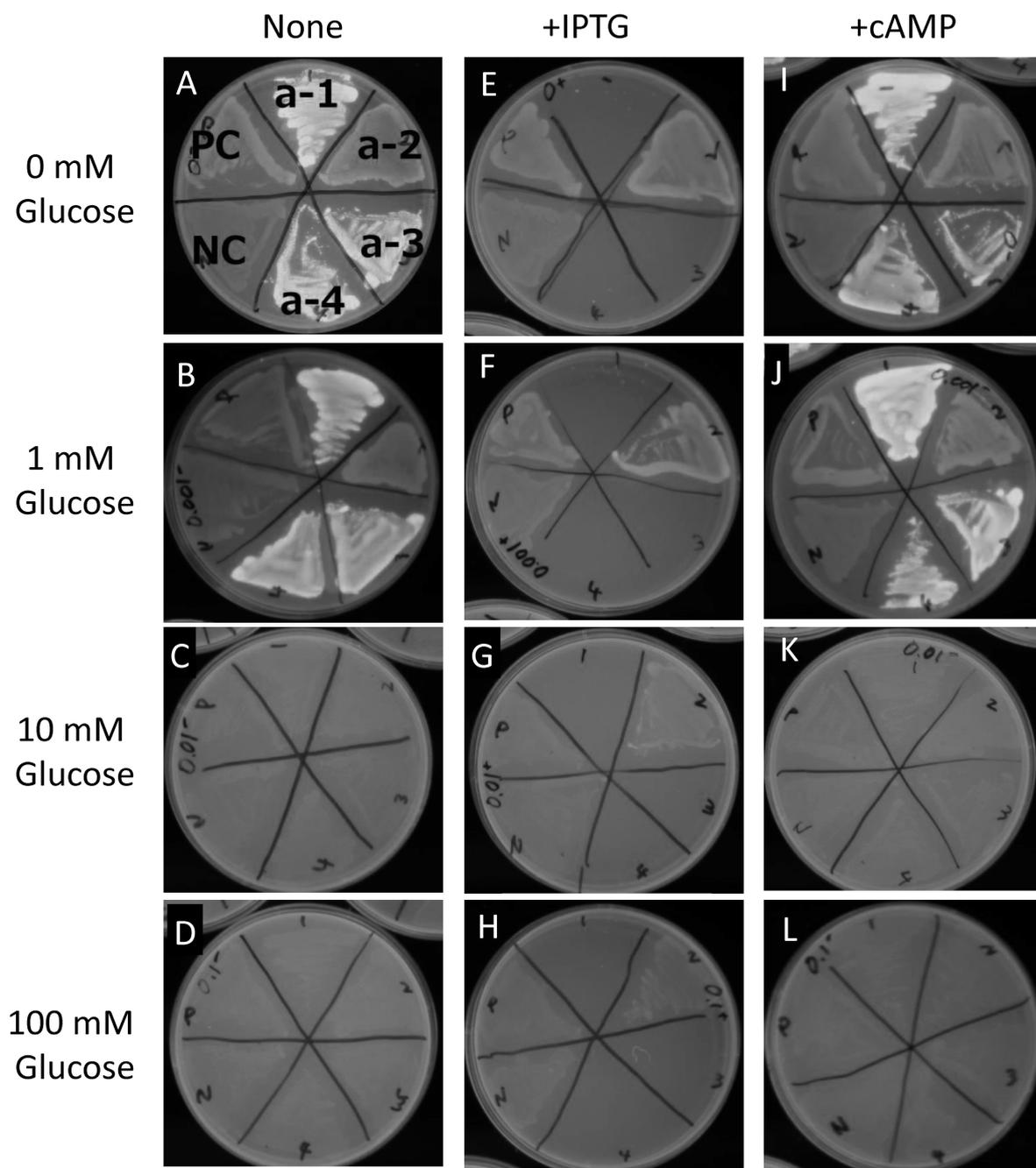


Fig. 3. Expression of GFP in BL21(DE3) in the presence of glucose, IPTG, and cAMP  
 Each plate was divided into 6 regions, and BL21(DE3)-transfected pGreen-ET19 1, 2, 3, or 4 (GFP-BL21(DE3)-1, -2, -3, or -4), pGreen, (Green-BL21(DE3) and pET19b (pET19b-BL21(DE3)) was seeded in regions a-1, a-2, a-3 or a-4, PC, and NC. LB medium included 0 mM (A, E, I), 1 mM (B, F, J), 10 mM (C, G, K) and 100 mM glucose (D, H, L). E, F, G, and H were additionally supplemented with 1 mM IPTG. Cyclic AMP was added at a concentration of 1 mM to LB plates with or without glucose (I, J, K, and L). BL21(DE3) transfected with pGreen or pET19b were respectively used as the positive and negative controls. All experiments were used 3 plates for each analysis. The three plates showed consistent results for all the three analytes.

## 考察

T7 プロモーターの下流に挿入した遺伝子の発現は、IPTG により誘導され、また、グルコースや cAMP によっても発現が調節されることも知られている<sup>2)</sup>。本研究では、可視化できる GFP を用い、グルコース、cAMP、IPTG のタンパク質の発現に対する効果の検討を行った。

*lac* オペロンによる発現調節は、0.5-1% グルコースで抑えられることが知られている<sup>6)</sup>。それだけではなく、グルコースは cAMP の合成も抑制し<sup>6)</sup>、*lac* オペロンのプロモーター領域に結合する cAMP 濃度を減少させる。すなわち、*lac* オペロンの制御を受ける遺伝子は、高濃度のグルコースにより遺伝子発現は抑制され、グルコース消費、そして、それに伴う cAMP の濃度上昇により遺伝子の発現が促進されるはずで

ある。今回使用した GFP-BL21(DE3) は、LB 培地上で GFP タンパク質を合成し、この合成は 10 mM 以上のグルコースが存在する時に抑制された。10 mM グルコースは約 0.2% グルコースに相当し、報告のあるグルコースによる基底レベルのタンパク質の発現誘導の抑制と一致する。そして、1 mM cAMP を添加しても緑色蛍光の発光、すなわち、GFP の発現量には変化がなかった。グルコースが cAMP の合成を抑制し、また、グルコースが利用され、グルコース濃度が低くなると cAMP の合成が誘導される。すなわち、グルコースによる調節よりも cAMP の調節が下流の制御にかかわるため、cAMP の添加によりグルコース存在下でも GFP の発現が上昇すると考えていた。しかし、今回の結果は、cAMP の効果よりも、グルコースの作用のほうが強い作用を示した。cAMP の効果を検討する際、一晚の培養で cAMP が大腸菌内に取り込まれると予想し、cAMP を培養プレートに塗布し用いたが、cAMP が細胞内に取り込まれなかった可能性も否定できない。cAMP の効果を検出する際に、膜透過性 cAMP であるジブチリル cAMP (N, N-Dibutyladenosine 3', 5'-phosphoric acid) あるいは、8-CPT-cAMP (8-(4-Chlorophenylthio)-adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate) の使用を検討する必要がある。

さらに、pET19b は、T7 *lac* プロモーターを持つ。また、大腸菌は天然のプロモーターと *lac* リプレッサーをコードする *lacI* を持つ。DE3 溶原大腸菌で、*lac* リプレッサーは宿主染色体の *lacUV5* プロモーター及びベクターの T7 *lac* プロモーターにも作用し、*lacUV* プロモーターからの T7 RNA ポリメラーゼの転写及び T7 RNA ポリメラーゼによる目的遺伝子の転写が抑制される。IPTG は、*lac* リプレッサーに結合してその働きを阻害する。すなわち、宿主からの RNA ポリメラーゼの合成、そして、それに引き続くベクターの T7 *lac* プロモーターの下流に導入された目的遺伝子の転写を促進し、目的タンパク質が合成される<sup>5)</sup>。本研究で用いた 4 つの GFP-BL21(DE3) のクローンのうち、GFP-BL21(DE3)-2 は、IPTG の添加により 1 mM グルコース存在下でも GFP タンパク質の発現が誘導され、10 mM 及び 100 mM でも、弱いながらも IPTG によるタンパク質の発現誘導が確認された。しかし、他の GFP-BL21(DE3)-1, -3, -4 は、IPTG を添加することにより大腸菌の増殖が抑制される結果となった。GFP-BL21(DE3)-1, -3, -4 は、IPTG を添加しない条件で強い緑色蛍光を発している。このことは、GFP-BL21(DE3)-1, -3, -4 は、IPTG を添加していない条件

で、大腸菌内で増幅されたベクター量が多く、タンパク質の発現を抑制するに十分な量の *lac* リプレッサーを持たない、とも考えられる。そして、たとえ、毒性のない GFP タンパク質であったとしても、グルコースにより引き起こされる細胞内 cAMP 合成の抑制 (減少) によるタンパク質発現の抑制と IPTG と *lac* リプレッサーの結合によるタンパク質の促進という逆の反応のスイッチが入ることによって、大腸菌の生存に何らかの影響が出たのかもしれない。すなわち、遺伝子発現を誘導する IPTG を加えることにより大腸菌の生存に影響するような負担がかかってしまったのではないだろうか。

今回の研究は、初期段階のものであり、タンパク質の発現を誘導するための IPTG の濃度、大腸菌濃度など実験条件を検討することが必要である。また、プラスミドに  $\beta$ -ラクタマーゼをコードするアンピシリン耐性遺伝子が含まれている。プラスミドから誘導されるラクタマーゼ遺伝子及び GFP 遺伝子、宿主大腸菌がコードするハウスキーピング遺伝子の発現量を測定し、大腸菌内で増幅されたプラスミドと大腸菌ゲノムから発現されるタンパク質の関連を明らかにすると共に、大腸菌の生存に対する影響の解析も進めていきたい。

## 謝辞

プラスミド pGreen 及び大腸菌 BL21(DE3) はナショナルバイオリソースプロジェクト大腸菌事業 (NIG) より提供して頂きました。心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Shimomura, O., Johnson, F. H. et al: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.*, 59: 223-239, 1962
- 2) Chalfie, M: Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 62: 651-656, 1995
- 3) Rizzuto, R., Brini, M. et al: Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* 5: 635-642, 1995
- 4) Mierendorf R. C., Morris, B. B. et al, Expression and Purification of recombinant proteins Using the pET system *Methods. Mol. Med.* 13: 257-292, 1998.
- 5) Novagen. pET system manual タンパク質発現システム 第 11 版 日本語版, MERCK 社, 2009
- 6) Novy, R. and Morris, B., Use of glucose to control

- basal expression in the pET system. *inNovations* 13: 8-10, 2001
- 7) Grossman, T. H., Kawasaki E. S., et al. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 16209 (1-2): 95-103, 1998
- 8) 小林葉子. 桐生大学紀要 24: 103-109, 2013

## Effect of Glucose, Isopropyl $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside, and Cyclic AMP on Green Fluorescence Protein Expression in *Escherichia coli*

Satomi Ootake, Yoko Kobayashi

### Abstract

The pGreen-BSK+ plasmid includes a green fluorescence protein (GFP)-encoding gene, *gfp*. GFP expresses strong green fluorescence. The *gfp* region from pGreen-BSK+ was inserted into an *Escherichia coli* expression vector, pET19b, for the construction of pGreen-ET19 plasmid. After transfection of pGreen-ET19 into an *E. coli* strain BL21(DE3), GFP was expressed in BL21(DE3) under normal conditions. It has been shown that basal GFP expression is suppressed in the presence of 0.5–1% glucose. In this study, we analyzed the effect of glucose, cyclic AMP (cAMP), and the protein-expression inducer isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) on GFP expression using BL21(DE3) transfected with pGreen-ET19. GFP expression was suppressed in the presence of 10–100 mM glucose. *E. coli* cells, which expressed low levels of GFP on LB plates without glucose, showed higher, IPTG-induced GFP expression on LB plates with 10 mM and 100 mM glucose. *E. coli* cells expressing high levels of GFP on LB plates without glucose showed suppressed growth on LB plates supplemented with IPTG. cAMP did not appear to affect GFP expression. The observed suppression of *E. coli* growth was unexpected. Further analysis of the relationship between *E. coli* growth suppression by IPTG and GFP expression is necessary.

*Keywords:* green fluorescence protein, protein expression, glucose, isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, *Escherichia coli*