

原著論文

## ニワトリ R-スポンジン cDNAs のクローニング及び 組換えタンパク質の発現

工藤季之<sup>1)</sup>\*, 須藤鎮世<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 就実大学薬学部分子生物学研究室, <sup>2)</sup> 就実大学名誉教授

### Cloning of chicken R-spondin cDNAs and expression of recombinant proteins

Toshiyuki Kudo<sup>1)</sup>\*, Shizuyo Sutou<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> *Laboratory of Molecular Biology, School of Pharmacy, Shujitsu University*

<sup>2)</sup> *Emeritus professor, Shujitsu University*

(Received 15 November 2019; accepted 13 December 2019)

---

**Abstract:** The R-spondin (RSPO) protein family is known as a modulator of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, which belongs to the thrombospondin type 1 repeat (TSR-1) protein superfamily. In various vertebrates, the R-spondin protein family genes have been cloned and their functional analysis has been advanced. However, in birds, there are only reports that the existence of a putative gene is described in the database, and there are few reports analyzing what kind of tissue it actually expresses and what kind of protein it functions. In this study, we confirmed the expression in several tissues of the chicken R-spondin protein family, cloned their cDNAs, and tried to express recombinant proteins. As a result, we identified four R-spondin cDNAs (chRSPO1, 2, 3, 4) as in mammals, and found that one of them had three alternative splicing variants (chRSPO4-1, 2, 3). In the expression of the recombinant proteins, relatively high secretory expressions were observed in chRSPO4-2 and chRSPO4-3, but only low secretory expressions were observed in other chRPSOs.

**Key words:** R-spondin, cDNA, alternative splicing, secretory expression, chicken

---

#### 緒言

R-スポンジン (RSPO) タンパク質ファミリーは、トロンボスポンジン1型リピート (TSR-1) タンパク質スーパーファミリーに属し、Wnt/ $\beta$ カテニン経路シグナル伝達におけるモジュレータ

ーとして知られている<sup>1)</sup>。同ファミリーには4種のタンパク質 (RSPO1, 2, 3, 4) が含まれており、その構造は、分泌シグナルペプチド、システインリッチフリン様ドメイン、トロンボスポンジンド

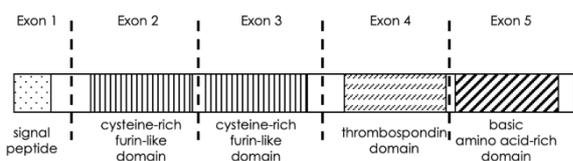


図1 R-スポンジン (RSPO) タンパク質ファミリーの基本構造 N末端に分泌シグナルペプチド、続いて2つのシステインリッチフリリン様ドメイン、1つのトロンボスポンジンドメイン、C末端の塩基性アミノ酸リッチドメインからなる。塩基性アミノ酸リッチドメインは、4種のRSPOにより長さが異なる。遺伝子は、各ドメインをコードする5つのエキソンに分かれている。

メイン、塩基性アミノ酸リッチドメインからなっている (図1)。

最初に報告されたR-スポンジンは、2002年にヒト胎児脳 cDNA からクローニングされたもので、当初は hPWTSR と名付けられた<sup>2)</sup>。これが現在のR-スポンジン3にあたる。その後、2004年にR-スポンジン1及びR-スポンジン2が見つかり、最後にR-スポンジン4が報告された<sup>3-5)</sup>。R-スポンジンの名称は、R-スポンジン1が蓋板 (roof plate) 特異的に発現するトロンボスポンジンドメインをもつタンパク質として見つかったことに由来している<sup>3)</sup>。

R-スポンジンの機能の1つは、細胞膜上に存在する Lgr (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor) 受容体ファミリー (Lgr4, 5, 6) に結合することにより、Wnt/ $\beta$ カテニン経路のシグナルを増強することである<sup>6-8)</sup>。Wnt/ $\beta$ カテニン経路は、発生過程においてはパターン形成及び形態形成を調節しており、成体においては幹細胞の再生を促進し、組織の恒常性維持と損傷の回復に関与している<sup>9,10)</sup>。Lgr 以外にも特異的な受容体がいくつか知られており、その機能の多様性を反映している。

様々な脊椎動物において、R-スポンジンタンパク質ファミリーの遺伝子がクローニングされ、その機能解析が進められている。しかしながら、鳥類ではデータベースに推定遺伝子としてその存在が記載されているのみで、実際にどのような組

織で発現し、どのようなタンパク質として機能しているかを解析した報告はほとんどない。

私たちはこれまで、脊椎動物の性決定と性分化に関する研究を行い、鳥類の卵巣における性ステロイドホルモン合成に関わる転写調節因子 SF-1 及び LRH-1 を解析してきた<sup>11,12)</sup>。近年、R-スポンジン1が哺乳類における卵巣の分化に重要な役割を果たしていることが報告された<sup>13,14)</sup>。このことから、R-スポンジンが鳥類の卵巣における性ステロイド合成細胞の分化・増殖にも重要な役割をもつと考えられる。そこで本研究では、ニワトリ R-スポンジンタンパク質ファミリーの組織における発現を確認し、それらの cDNA のクローニングを行い、組換えタンパク質の発現を試みた。

## 方法

### mRNA の定量

mRNA の定量は、リアルタイム RT-PCR 法により行った。培養細胞からの RNA の調製は、NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) を使用し、プロトコルに従って行った。成体組織からの RNA の調製には ISOGEN (Nippon Gene) を使用した。cDNA の合成は、PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio) を使用した。各プライマーはデータベースの塩基配列をもとに、Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) によりデザインした (表1)。リアルタイム PCR は、SYBR Green Premix ExTaq II (Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って行った。反応及び解析には、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用した。

表1 RT-PCRに使用したプライマーの塩基配列

Name (length)	Sequence
chRSPO1_F2 (20)	AAGTGGTGAAGGGCAAGAGG
chRSPO1_R2 (20)	CCAGAAGGATGAAGAGCTTGG
chRSPO2_F (20)	TGGAAGGCTGTGAAGTTGGT
chRSPO2_R (20)	GATGTTGGGCATGTTATTG
chRSPO3_F (20)	GGAGCCCTTGACAAAGAAA
chRSPO3_R (19)	CCCTTGCTGACGGATGTTG
chRSPO4_F (20)	CAGAACCGATGGAAGAAGCA
chRSPO4_R (20)	CTGGCCTTTGTGACGGTAGA
chRSPO4_F2 (20)	TGCACAAAGGCCAGTGCTTC
chRSPO4_R2 (20)	TCGCACGTTTCTTGGCACTC
chRSPO4N_F (20)	CGCAGAACCGATGGAAGAAG
chRSPO4N_R (20)	ATGCCGTCCCTCCAGATGA

表2 ORFの増幅に使用したプライマーの塩基配列

Name (length)	Sequence
chRSPO1N_Met_IF (40)	AGGAGATATACCATGCAGCTTGAGCTGTTTGT GGTGGTGG
chRSPO1_Stop_IF (40)	ATGGTGGTGCTCGAGTTGGGCGAGGCTGGCG GATGTGGT
chRSPO3_Met_IF (40)	AGGAGATATACCATGCAATTGCGACTGATTCT TGGTTTT
chRSPO3_Stop_IF (40)	ATGGTGGTGCTCGAGATGTGAGTGTGCGACGG GTGCCAGG
chRSPO2_Met_IF2 (40)	AGGAGATATACCATGCGGTTTCGCCTCTCTCC TTTGCCCT
chRSPO2_Stop_IF (40)	ATGGTGGTGCTCGAGCTGGCTTGTGTTTGTCTG TAGCTAAA
chRSPO4_Met_IF (40)	AGGAGATATACCATGCAGTGGATAATATTCATG TTGCTGT
chRSPO4_Stop_IF2 (40)	ATGGTGGTGCTCGAGGAGCAGGATGAGGACT CGGCTGTCA
chRSPO4_Stop_IF3 (40)	ATGGTGGTGCTCGAGGGGGCCGGGGGCTGCG GCGGGGTCG
chRSPO4_Stop_IF4 (40)	ATGGTGGTGCTCGAGGGTGCCTGCTGCTCTGCT CTGCTCTC

#### ニワトリ R-スポンジン cDNAs のクローニング

ニワトリ R-スポンジン 1 及び 3 の cDNA は、PCR により増幅した後、動物細胞発現ベクター pTriEx-4Neo (Novagen) に導入した。cDNA の合成は、ニワトリ卵巣及び副腎由来の RNA を鋳型とし、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit

(Takara Bio) を用いて行った。PCR には表 2 に示したプライマーを用い、PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って行った。増幅した cDNA 断片は、アガロースゲル電気泳動により分離した後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) で精製した。この cDNA 断片と、制限酵素 Nco I 及び Xho I で切断した pTriEx-4Neo を、In-Fusion HD Cloning kit (Takara Bio) で結合させた後、NEB Turbo Competent *E. coli* (New England Biolabs) に導入した。複数クローンの塩基配列を確認した後、データベースの塩基配列と同等のものを真正のクローンとした。

ニワトリ R-スポンジン 2 及び 4 の 5'RACE (5' Rapid amplification of cDNA ends) は、GeneRacer Kit with SuperScript III RT (Invitrogen) を、3'RACE は SMART RACE cDNA Amplification Kit

(Clontech) を用いて行った。cDNA の合成は、ニワトリ 6 日胚由来の RNA を鋳型とし、遺伝子特異的プライマーは表 3 のものを使用した。増幅した DNA 断片は、TOPO TA Cloning Kit for

表3 RACEに使用したプライマーの塩基配列

Name (length)	Sequence
chRSPO2_R2 (25)	GCGTTCGGAGTCCATAGTACCCTGA
chRSPO2_R3 (25)	TGCAGGCATTACCCGACTGTCTCA
chRSPO2_F2 (25)	GGAGTGAATGGGGAACTTGCAGCAG
chRSPO2_F3 (30)	GCAGAGTCCAGACGGGTGAAAATGGCCGTG
chRSPO2_F4 (30)	AATGGCCGTGAGGCACTGTCCAGGAGGAAG
chRSPO4N_F2 (25)	TGCGAGAGCTGCTTCAGCAAAGACT
chRSPO4N_F3 (25)	CTACCTGCACAAAGGCCAGTGCTTC

Sequencing (Invitrogen) を用いてサブクローニングし、塩基配列を決定した。

ニワトリ R-スポンジン 2 及び 4 の cDNA は、前記と同様に PCR で増幅し、プラスミドベクターに導入した。ただし、鋳型にはニワトリ 6 日胚由来及び卵巣由来の RNA を使用し、プライマーは表 2 に示したものを使用した。

塩基配列の確認には、DYEnamic ET cycling sequencing kit (GE Healthcare) を使用し、3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により解析を行った。

さらに、得られたクローンは動物細胞に遺伝子導入し、組換えタンパク質の発現に供した。また、cDNA は組換えタンパク質の C 末端に付加した His タグ配列を含めて動物細胞発現ベクター pEBMulti-Neo (Nippongene) にサブクローニングし、これも組換えタンパク質の発現に供した。

#### 細胞の培養

ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293T は、DMEM (Sigma) に非働化した FBS (Hyclone) 10% 及び抗生物質 (最終濃度: 50 units/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシン, Nacalai Tesque) を添加したものをを用い、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。

ニワトリ雄肝がん細胞株 LMH (Leghorn Male Hepatoma) は、Waymouth's medium (Life Technologies) に非働化した FBS (Hyclone) 10% 及び抗生物質 (最終濃度: 50 units/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシン, Nacalai Tesque) を添加したものをを用い、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。

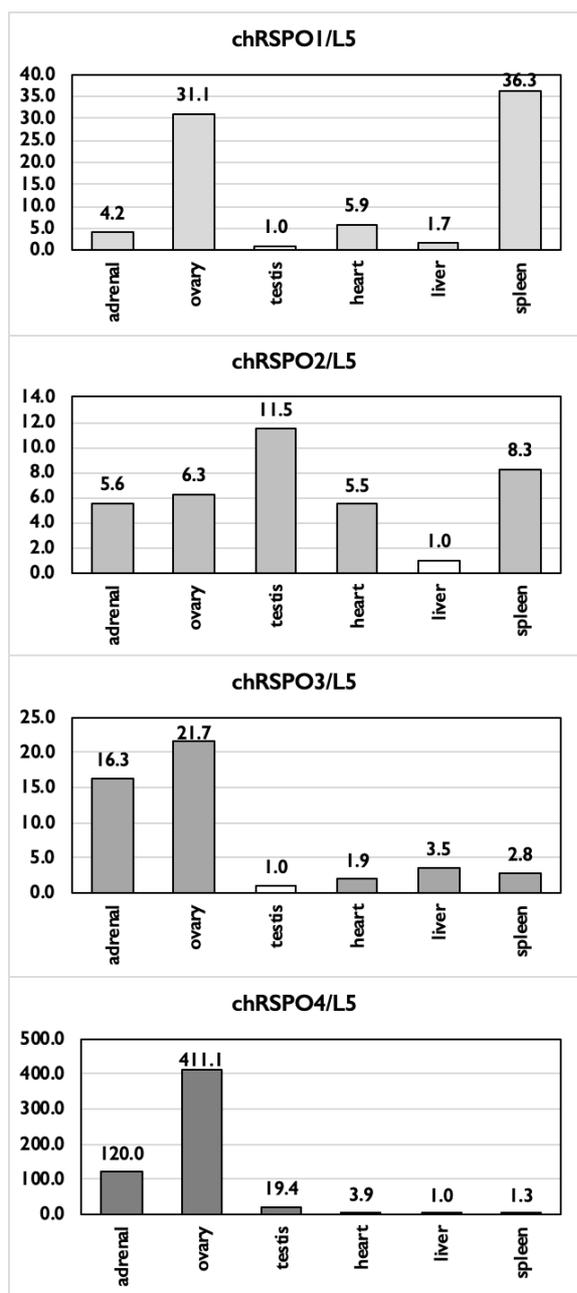


図2 ニワトリ成体組織におけるR-スポンジン遺伝子の発現リアルタイムRT-PCRにより定量を行った。ニワトリリボソームタンパク質L5 (chRPL5) 遺伝子を内部対照として、 $\Delta\Delta Ct$ 法により計算し、プライマーごとに最も値の小さいものを1.0とする相対値で示した。

また、培養にはブタ臍由来タイプIコラーゲンでコートされたプラスチックディッシュ (Asahi Techno glass) を使用した。

#### 細胞への遺伝子導入

細胞は、遺伝子導入の前日に植え継ぎ、遺伝子導入時にプレート表面を70%程度おおうように調整した。遺伝子の導入には、遺伝子導入試薬

HilyMax (Dojindo) を使用した。6 well プレートの場合、1 well あたり使用するプラスミドDNAは4  $\mu$ g, HilyMaxは12  $\mu$ Lとした。培地に試薬で処理したDNAを添加した後、そのまま約48時間培養し、タンパク質の発現を確認した。

プラスミドDNAは、NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) を使用して調製した。

#### 免疫ブロッティング

細胞はPBS(-)で洗浄した後、6 well プレートの場合、1 well あたり200  $\mu$ Lの細胞溶解液CellLytic-M (Sigma) で処理して溶解した。得られた試料は、等量の2 $\times$ サンプリングバッファーと混合し、100 $^{\circ}$ Cで2分間熱処理した。各試料15  $\mu$ LをSDSポリアクリルアミド電気泳動

(Mini-PROTEAN TGX Any kD 15 wells, Bio-Rad) に供した。培養上清についても等量の2 $\times$ サンプリングバッファーと混合し、同様に電気泳動を行った。泳動後は、タンパク質をPVDFメンブレン (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad) に転写した。ブロッティングにはPVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO) を、一次抗体及び二次抗体の希釈にはCan Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を使用した。一次抗体は、抗6 $\times$ His抗体 (Wako) を10,000倍希釈で、二次抗体は、HRP標識抗マウスIgG抗体 (GE Healthcare) を10,000倍希釈で使用した。検出には、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を使用し、ルミノ・イメージアナライザーLAS-1000 Plus (Fuji Film) により解析を行った。

#### 結果

##### ニワトリR-スポンジン mRNAの発現

種々の組織におけるニワトリR-スポンジンタンパク質ファミリーの発現をリアルタイムRT-PCRにより確認した (図2)。プライマーはデータベースに推定遺伝子として登録されている塩基配列を基にし、ORFを増幅するものを選択した。ニワトリR-スポンジン1 (chRSPO1) は、

脾臓と卵巣で発現が相対的に高く、ニワトリ R-スポンジン 2 (chRSPO2) は、精巣で最も高い傾向を示したが組織による発現の相対的な差が比較的少なかった。一方、ニワトリ R-スポンジン 3 (chRSPO3) 及びニワトリ R-スポンジン 4 (chRSPO4) は、ともに卵巣と副腎で相対的に高い発現を示した。また、これらの中で、ニワトリ R-スポンジン 2 (chRSPO2) が最も低い増幅値を示していた。

ニワトリ R-スポンジン cDNA のクローニング

ニワトリ R-スポンジンタンパク質ファミリーの発現が高かった組織 (卵巣, 副腎, 精巣) 由来の RNA を鋳型にして, PCR による cDNA の増幅を試みた。chRSPO3 に関しては, データベースに完全な ORF の塩基配列が登録されていたため, それを基にプライマーを合成した (表 2)。一方, chRSPO1 に関しては, データベースに登録されていた ORF の塩基配列を他の脊椎動物と比較したところ, 明らかに N 末端を欠いていたため, ゲノムデータベースから不足している配列を予測し, プライマーを合成した (表 2)。PCR を行ったところ, 期待通りの増幅産物が得られたため, 塩基配列を確認したところ, データベースの推定遺伝子と同様の配列を含んでいた (図 3)。

chRSPO2 及び chRSPO4 に関しては, データベースに完全長の ORF 情報が含まれていなかったため, RACE により cDNA の完全長塩基配列を決定した。最初は, 卵巣及び副腎由来の RNA を鋳型にして増幅を試みたが, 十分な増幅産物が得られなかったため, ニワトリ 6 日胚由来の RNA を鋳型にして増幅を行った。chRSPO2 は発現量が少ないためか, 単一の増幅産物を得られなかったが, サブクローニングした DNA 断片の塩基配列を他の脊椎動物と比較することで, 完全長と考えられる塩基配列を得ることができた (図 3)。chRSPO4 では, 3'RACE においてスミアな複数のバンドが確認されたため, それらをまとめて全てクローニングして塩基配列の確認を行った。ゲノムの塩基配列と比較したところ, エキソン 4 とエキソン

chRSPO1

```

ATGCAGCTGGACTGTTTGTGGTGGTGGTTTTTCTAAGCTCGATGGATCTAACAGCGCCG 60
M Q L G L F V V V F L S S M D L T G G
AGCAAAGTGGTGAAGGGCAAGAGGCAAGGGCAATAGCACTAGAGCTGAGCCAGGGCTGT 120
S K V V K G K R Q R R I S T E L S Q G C
GCCAGGGGCTGCAGCTGTGCTCTGAGTTCAACGGGTGCCTGAGATGTTCCCAAGCTC 180
A R G C D L C S E F N G C L R C S P K L
TTCTCCTTGGAGAGGAACGATATCCGGCAAATGGGATCTGCCTCCATCCTGTCCA 240
F I L L E R N D I R Q I G I C L P S C P
CTGGGATACTTGGCCCTTCGCAATACAGACATGAACAAGTGCATCAATGCAAAATCGAG 300
L G Y F G L R N T D M N K C I K C K I E
AACTGTGAGTCTGCTTCAGCCGAACTTTGACAAAATGTAAGGAAGTTGTATTG 360
N C E S C F S R N F C T K C K E G L Y L
CACAAGGGAGATGTTACGTCACGTGCCCGAAGGCTACTCTGCTCCCAATGGCACCATG 420
H K G R C Y V T C P E G Y S A A G T M
GAGTCAGCAGTCTGCGCAATGTGAATGAGTGGGGCCCTGGGGCCCTGCTGCTC 480
E C S S P A Q C E M S E W G P W G P C S
AAGAAGAGGAGTGTGGCTTCAAGAAGGGGAACGAGGACCAACCGCCGGGATCTGT 540
K K R K L C G F K K G N E D R T R R I L
CAGGCTCCTTGGGGAGCTGTCCCTGTGCCCGCCACCGAGGTCGCCAGATGTCACT 600
Q A P S G D V S L C P A T T E V R R C T
GTGCAAGAGCCAAATGCCCGAAGGAAAAGGAAGAAAGGACGAGCAAGGAAGCA 660
V Q K S Q C P E G K R K K D E Q G K Q
GATAATACAAAGGAAACAGAAATCGAAAGACACCAAGATGCAAGTCTGCCACCAAG 720
D N T N G N R N R K D T K D A K S G T K
AAGAGGAAGCAACAGAGGGGGCTGTGCCCCACCATCCCGCAGCCCTGCCCAA 780
R K R S K Q R G A V A P T T S A S P A Q
TAG
*
    
```

chRSPO2

```

ATGCGGTTTCGCCTTCTCTCTTTGCTTGTATCGTCTGAACTGTATGGAATACGGCCAC 60
M R F R L F S F A L I V L N C M D Y G H
TGCAGCCCGCGCTGAGAGCGGCAAGAGAGTATGATGGAATCAATTCATTC 120
C Q A G R W R R G K R A S Y G S N P I C
AAAGGCTGTTGCTTCTTCAAAGGATAAATGGTGCATCAGATGCCAGCAGATTTATC 180
K G C L S C S K D N G C I R C Q H K L F
TTCTTCTACGAAGAGGGGAATGAGACAGTACGGTGAATGCAATGCAATGCAATCA 240
F F L R R E G M R Q Y G E C L H S C P S
GGTACTATGACTTCGCAAGCCAGATATGACAGATGTTCAAGATGCAAGTGAAGAAC 300
G Y Y G L R T P D M N R C S R C R I E N
TGCAGCTCTGCTTCAGCAGAGACTTTTGACCAAAATGCAAGTGGCTTCTACTCCAC 360
C D S C F S R D F C T K K A G F Y S H
AGAGGCGCTTTCAGAGGTGGCCGCTGGATTTGCTGCTTGAAGAGCTCATGGAG 420
R G R C F R G C P P G F A A L E E L M E
TGTGGAAGGCTGTGAAGTGGTCAAGTGAATGAGTGGGAACTTCAGCAGAAATAAT 480
C V E G C E V G Q W S E W G T C S R N
AAACATGTGGATTAAGTGGGCTTGGAACGAGAAACAGGCAAAATCGTGAAGAAGCCA 540
K T C G F K W G L E T R T R Q I V K K P
GCAAAAGACAAATACCATGCCAACCATCGCAGAGTCCAGACGGTGTAAATGGCCGTG 600
A K D T I P C P T I A E S R R C K M A V
AGGCATGTCCAGGAGGAAGAGGCAACAAAACAAAGGAAGAAAGAAAGAAAGAAAG 660
R H C P G G R R A T K T K E K K K K K
AATTTGATGGAGGGCTCAGAAGCAGCACAGCATCTTTTATGATACAGCAAAACAGC 720
N L M E R A Q K Q H S I F L A T D K T S
CAGTAA
Q *
    
```

chRSPO3

```

ATGCAATTCGCACTGATTTCTTGGTTTTTATCGTTTGAACCTTATGGAATACATGGC 60
M Q L R L I S W F F I A L N F M E Y I G
AGCCAGCAGCCTCAGGGTACGGCGCACAGGGAAGATGCATCTCAAGCTGAGCCAGGGT 120
S Q H A S R V R R Q G R M H P V S Q G
TGCCAGGAGGGTGTGCTACATGTTCCGACTACAAATGGAATGCTGATGAGCCAGCA 180
C Q G G C A T C S D Y N G C L S C K P R
CTCTTTTTTGTGGAGAGGATCGCATGAAACAGATCGGAGTATGCTCTTCTCGGT 240
L F F V L E R I G M K Q I G V C L S S C
CCAGTGGATATGCGCACGGTATCTCTGACATTAACAGTGTGCAAAATGTAAGCT 300
P S G Y Y G T R Y P D I N K C A K C K A
GATTTGATCTGCTTCCAGAACTCTGCACAAAGTCTAAAGTGGGTTTTTACTT 360
D C D T C F T R N F C T K C K S G F Y L
TACAGTGAAGTGCCTTGAAGAGTCCCGGATGGGCTGGAAGCAACCAACCAATG 420
Y S G K C L E K C P D G L E A N H T M
GAGTGCATAGTATTGTGCACTGTGAAGCTAGTGAATGAGTCCATGGAGCCCTTGACCA 480
E C T S I V H C E A S E W S P W S P C T
AAGAAGGAAAACATGTGGTTTCAAAGAGGAAATGAAGTAAAGGTCAGAGATCGTA 540
K K G K T C G F K R G N E V R V I V E I V
CAACATCGTCAGCAAGGGCAATCTTCCCGAGTACAGCGAGAGCAGAAATGTATG 600
Q H P S A R G N P C P A T S E S R K C M
GTCAAGAAAGAGATGTCAGAAGGAAGGAAAAGGAAAATAAGGAGGAAAAGAA 660
V Q R K R C Q K E G K G K K N R E E K R
AAAAGTCCACAAGCAAGTAAAGGATCAAGCAGGAAAGCAAGAGGAGGAGGAGCC 720
K K S N K D E S K E S R Q E S K G R A
CGAGGCAAAACCGAGAGCGAGGAAAACAAACAAACGACGAGCAAGAAACGAAAA 780
R R Q N R E A G Q R E N N K T Q P K K R K
GCCCCAGTAAAGAACAGGACCTGGCCAGCCGCTGACACTTAA 828
A P S K E Q D L A P V D T A H *
    
```

図3 ニワトリ R-スポンジン 1,2,3 の ORF の塩基配列と推定アミノ酸配列 クローニングした DNA 断片から ORF 部分の塩基配列のみ記載。SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) で予測される分泌シグナル配列を四角で囲んだ。推定される N-結合型グリコシル化部位は丸で囲んだ。

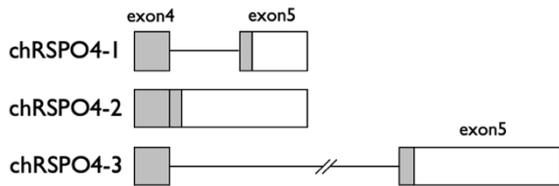


図4 ニワトリR-スポンジン4,1,2,3のORFの遺伝子の構造と選択的スプライシング ボックスはエクソンを示す。網掛けはORFを、白抜きは3'UTRを表す。

5において、選択的スプライシングが複数生じていることが確認された(図4)。そのうち、ほぼ同じ長さのORFを含む3つの塩基配列をそれぞれchRSPO4-1,2,3とした(図5)。また、解析したクローンの中には、エクソン4が欠失しているものも多数存在したが、いずれもORFが一般的なR-スポンジンよりかなり短くなるため、更なる解析は行わなかった。

組換えニワトリR-スポンジンタンパク質の発現

次に、得られたORFの塩基配列がタンパク質に翻訳され、分泌タンパク質として機能するかどうかを確認するため、組換えタンパク質の発現を試みた(図6,7,8)。発現ベクターとしては、CMVプロモーターをもつpTriEx-4Neo及びCAGプロモーターをもつpEBMulti-Neoを使用し、いずれも発現確認用に組換えタンパク質のC末端側にHisタグを挿入した。pEBMulti-Neoは、EBNA1遺伝子により哺乳類細胞においてエピソーマルベクターとして機能する。安定発現株を容易に樹立できるため、組換えタンパク質の生産に適している。宿主細胞には、ヒト(293T)及びニワトリ(LMH)の細胞を使用した。

推定アミノ酸配列から予想される各分子量は分泌シグナル配列を含めて、chRSPO1, 2, 3がそれぞれ28.8 kDa, 26.0 kDa, 31.3 kDaであり、chRSPO4-1, 2, 3がそれぞれ25.1 kDa, 24.6 kDa, 25.5 kDaである。6種のタンパク質の細胞内での発現に関しては、いずれのベクターでも293T細胞において、細胞溶解液で組換えタンパク質が検出された(図6,7)。確認されたバンドの分子量

chRSPO4-1

```
ATGCAGTGGATAATATTCATGTTGCTGTTATTTCATCAGCTCCATGGAATGCTCTCGAG 60
M Q W I I F M L L L F I S S M E M L S Q
AACCGATGGAAGAAGCAAGTGAACGCCGGGCTCTTGGAGAAGTGCACGGGCTGCGTCTG 120
N R W K K Q V N A G L L E C T G C V L
TGCTCGGAGGAGAAGCGGTGCATCACCCTGCCACCACCGGCTCTCTGCTCATCTGGAGG 180
C S E E N G C I T C H H R L F L L I W R
GACGGCATCCGCCAGTACGGGGTGTGCGTCCACACCTGCCCCCCCGGCTACTTCGGCGTG 240
D G I R Q Y G V C V H T C P P G Y F G V
CGGGTCTGGAGGTCAACAGATGCACAAAGTGCAGGTGCAGGCTGCCAGCTGCCAGAAACGTGC 300
R G L E V N R C T K C R S P S C E S C F
AGCAAAGACTTCTGCATGAAATGCAAGGAGAAGTCTACCTGCACAAAGCCAGTGTTC 360
S K D F C M K C K E K F Y L H K G Q C F
CGCCAGTCCCGCCAGCACCAGCGCGCGACCCCGGACCCCGGAGTGCACAGAAACGTGC 420
R Q C P P S T A A Q P G T R E C Q E T C
GAGCCGGGCGCTGGAGCGAGTGGAGCGCCTGCACTCAGAGGGCCGGAGCTGCGGCTCT 480
E P G P W S E W S A C T H E G R S C G S
AAATGGGCTCTGGAGCGCGGTTGCGGAGGTGCCGGGACCCACGGAGGAGGGGCT 540
K W G L E T R V R E V P G T P R E E G A
GCGTCCCGCGCTGGAGAGCGCAGTGCCTGAGGAAGCAGTCCCGGGAGG 600
A C P A L L E S R R C R L R K Q C P G E
ATGCAGAGACAGCGGAGGATCGCTGGGGAGCTGTGACAGCCGAGTCCCTCATCTCTG 660
M Q R Q P E G I A W G S C D S R V L I L
CTCTGA 666
L *
```

chRSPO4-2

```
ATGCAGTGGATAATATTCATGTTGCTGTTATTTCATCAGCTCCATGGAATGCTCTCGAG 60
M Q W I I F M L L L F I S S M E M L S Q
AACCGATGGAAGAAGCAAGTGAACGCCGGGCTCTTGGAGAAGTGCACGGGCTGCGTCTG 120
N R W K K Q V N A G L L E C T G C V L
TGCTCGGAGGAGAAGCGGTGCATCACCCTGCCACCACCGGCTCTCTGCTCATCTGGAGG 180
C S E E N G C I T C H H R L F L L I W R
GACGGCATCCGCCAGTACGGGGTGTGCGTCCACACCTGCCCCCCCGGCTACTTCGGCGTG 240
D G I R Q Y G V C V H T C P P G Y F G V
CGGGTCTGGAGGTCAACAGATGCACAAAGTGCAGGTGCAGGCTGCCAGCTGCCAGAAACGTGC 300
R G L E V N R C T K C R S P S C E S C F
AGCAAAGACTTCTGCATGAAATGCAAGGAGAAGTCTACCTGCACAAAGCCAGTGTTC 360
S K D F C M K C K E K F Y L H K G Q C F
CGCCAGTCCCGCCAGCACCAGCGCGCGACCCCGGACCCCGGAGTGCACAGAAACGTGC 420
R Q C P P S T A A Q P G T R E C Q E T C
GAGCCGGGCGCTGGAGCGAGTGGAGCGCCTGCACTCAGAGGGCCGGAGCTGCGGCTCT 480
E P G P W S E W S A C T H E G R S C G S
AAATGGGCTCTGGAGCGCGGTTGCGGAGGTGCCGGGACCCACGGAGGAGGGGCT 540
K W G L E T R V R E V P G T P R E E G A
GCGTCCCGCGCTGGAGAGCGCAGTGCCTGAGGAAGCAGTCCCGGGAGG 600
A C P A L L E S R R C R L R K Q C P G E
GAGCCAGCCCGGATGCACCCCGCAGCCCGGACCCCGGCGCAGCCCGGCGCTTAA 660
E R S P G C T P Q P P D P A Q P P G P *
```

chRSPO4-3

```
ATGCAGTGGATAATATTCATGTTGCTGTTATTTCATCAGCTCCATGGAATGCTCTCGAG 60
M Q W I I F M L L L F I S S M E M L S Q
AACCGATGGAAGAAGCAAGTGAACGCCGGGCTCTTGGAGAAGTGCACGGGCTGCGTCTG 120
N R W K K Q V N A G L L E C T G C V L
TGCTCGGAGGAGAAGCGGTGCATCACCCTGCCACCACCGGCTCTCTGCTCATCTGGAGG 180
C S E E N G C I T C H H R L F L L I W R
GACGGCATCCGCCAGTACGGGGTGTGCGTCCACACCTGCCCCCCCGGCTACTTCGGCGTG 240
D G I R Q Y G V C V H T C P P G Y F G V
CGGGTCTGGAGGTCAACAGATGCACAAAGTGCAGGTGCAGGCTGCCAGCTGCCAGAAACGTGC 300
R G L E V N R C T K C R S P S C E S C F
AGCAAAGACTTCTGCATGAAATGCAAGGAGAAGTCTACCTGCACAAAGCCAGTGTTC 360
S K D F C M K C K E K F Y L H K G Q C F
CGCCAGTCCCGCCAGCACCAGCGCGCGACCCCGGACCCCGGAGTGCACAGAAACGTGC 420
R Q C P P S T A A Q P G T R E C Q E T C
GAGCCGGGCGCTGGAGCGAGTGGAGCGCCTGCACTCAGAGGGCCGGAGCTGCGGCTCT 480
E P G P W S E W S A C T H E G R S C G S
AAATGGGCTCTGGAGCGCGGTTGCGGAGGTGCCGGGACCCACGGAGGAGGGGCT 540
K W G L E T R V R E V P G T P R E E G A
GCGTCCCGCGCTGGAGAGCGCAGTGCCTGAGGAAGCAGTCCCGGGAGG 600
A C P A L L E S R R C R L R K Q C P G E
AAACCAACTCAGAAACAAAGGCAAAAGCGGCAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 660
K T K L R N K G K K R Q K K Q R T E Q D
CGGGCACCTAA 673
A G T *
```

図5 ニワトリR-スポンジン4,1,2,3のORFの塩基配列と推定アミノ酸配列 クローニングしたDNA断片からORF部分の塩基配列のみ記載。SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)で予測される分泌シグナル配列を四角で囲んだ。推定されるN-結合型グリコシル化部位は丸で囲んだ。下線は選択的スプライシングにより配列が異なる部分を示す。

は概ね推定値に一致していた(実際には付加されたHisタグの分だけ大きくなる)が、いずれも主要な2つ以上のバンドとして観察された。しかし

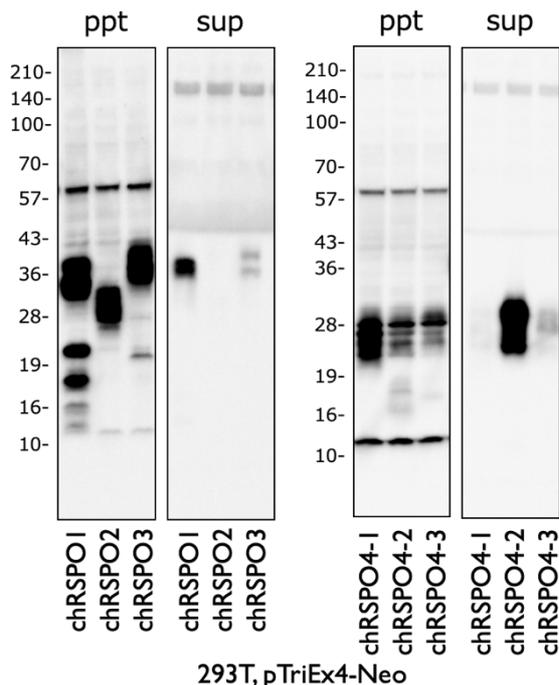


図6 ニワトリ R-スポンジン1,2,3,4の組換えタンパク質の発現 (1) ppt は細胞溶解液を, sup は培養上清を示す。

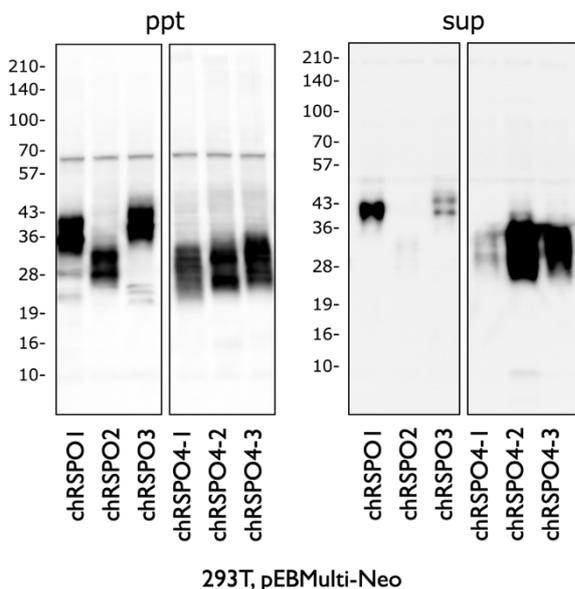


図7 ニワトリ R-スポンジン1,2,3,4の組換えタンパク質の発現 (2) ppt は細胞溶解液を, sup は培養上清を示す。

ながら, その分泌発現に関しては, 培養上清中に検出される組換えタンパク質が6種のタンパク質で顕著に異なった (図6,7,8)。最も多く培養上清中に組換えタンパク質が確認されたのが, chRSPO4-2であり, 次いでchRSPO4-3であった。

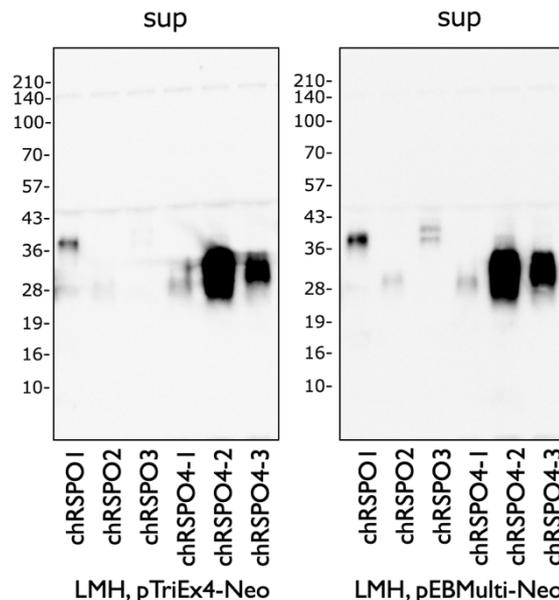


図8 ニワトリ R-スポンジン1,2,3,4の組換えタンパク質の発現 (3) sup は培養上清を示す。

組換えタンパク質の分泌発現が最も多かった LMH細胞と pEBMulti-Neoベクターの組合せでは, 293T細胞と pTriEx-4Neoベクターの組合せで検出できなかった chRSPO2 においても培養上清中に組換えタンパク質が確認された (図6,8)。

### 考察

ゲノムプロジェクトにより多くの生物種の全遺伝情報が解析され, それによって多くの遺伝子がデータベース上で同定されている。しかしながら, これらは全て推定されたものであり, 実際に遺伝子として機能しているかどうかは, 実験によって検証する必要がある。

本研究では, データベースに推定遺伝子として登録されているニワトリ R-スポンジンタンパク質ファミリーの cDNA をクローニングし, 組換えタンパク質の発現を試みた。RSPO1 は, スポンジンタンパク質ファミリーの中で最も良く研究されており, 卵巣の分化に重要な役割を果たしている<sup>13,14</sup>。機能は十分に解明されていないものの, 脾臓での発現も確認されており, chRSPO1 の発現はこれと一致している。RSPO2 は, 四肢や肺, 毛包の発生に不可欠であるが, その他の臓

器での発現についてはほとんど検討されていない<sup>15,16)</sup>。本研究で検討した臓器においては、**chRSPO2**の発現はいずれも比較的低レベルだった。ヒトにおいては、**RSPO2**遺伝子の変異が卵巣機能の低下と関連していることが報告されており<sup>17)</sup>、鳥類の卵巣においても何らかの機能をもつことも考えられる。**RSPO3**は、**RSPO1**と類似した発現を示しており、哺乳類においては、胎盤の発生に関わっていることが知られている<sup>18)</sup>。**chRSPO3**の卵巣や副腎における強い発現は、鳥類において性ステロイドホルモン合成系に何らかの役割を果たしていることが推定される。**RSPO4**は、無爪症の原因遺伝子として知られ、爪の形成に重要な役割を担っている<sup>19,20)</sup>。**chRSPO4**は卵巣と副腎で強い発現を示しているが、その卵巣における機能に関する報告はない。**chRSPO1**や**chRSPO3**との機能的な差異を含めて今後検討する必要がある。

データベースに登録されている推定遺伝子は、必ずしも正確に予測できているとは限らず、今回検討した4つの遺伝子のうち、3つで予測が不十分であることが判明した。新たに得られたcDNAの塩基配列をゲノムデータベースで再検索したところ、いずれも正確なスプライシングシグナルをもつエキソンとして同定することができた。cDNAから推定されるアミノ酸配列をみると、いずれもN末端側に分泌シグナル配列をもっていた。また、他の生物種でも保存されているN結合型グリコシル化部位も認められた。また、**chRSPO4**の複数の選択的スプライシングについては、哺乳類においてもデータベース上の記載があり、何らかの機能的な差異を示すものと推定される<sup>21)</sup>。エキソン5は、塩基性アミノ酸ドメインに相当するが(図1)、**chRSPO4-1**では2個、**chRSPO4-2**では1個の塩基性アミノ酸しか存在せず、**chRSPO4-3**では10個認められる。このことから**chRSPO4-3**が主要なクローンである可能性が高いが、このドメインは脊椎動物種間でホモロジーが低いため、さらに詳細な解析が必要であ

る。今回は解析しなかったが、エキソン4の欠失クローンはトロンボスポンジンドメインを欠くことになるため、どのような機能をもつのか興味深い。

組換えタンパク質の発現においては、いずれの**chRSPO**も細部内ではよく発現していた。また、主要なバンドが2つ以上認められたのは、糖鎖付加によるものと考えられる。これは、ヒトのR-spondin1の組換えタンパク質でも報告されており、糖鎖付加が分泌を促進することも確認されている<sup>22)</sup>。本研究においても、分泌された**chRSPO1**は糖鎖付加体と考えられる高分子量のものが多く、この知見と一致する。ヒトの293T細胞では、**chRSPO2**、**chRSPO3**、**chRSPO4-1**はタンパク質としては発現しているもののほとんど分泌されていなかった(図6,7)。分泌機能の種差を考慮し、ニワトリのLMH細胞で再検討してみたが、大きな違いは認められなかった(図8)。むしろ、分泌シグナル配列や糖鎖付加等が、タンパク質の分泌制御に大きな影響を与えている可能性が考えられる。**chRSPO4**のスプライシングバリエーションに関しては、C末端のアミノ酸配列が大きく異なっているため、これが分泌に影響を与えているものと考えられる。

今後は、これらタンパク質の分泌に影響を与える機構を解析するとともに、特異的受容体との関連性を解明する必要がある。

## 引用文献

- 1) de Lau WB, Snel B, Clevers HC: The R-spondin protein family. *Genome Biol.*, 13(3): 242. (2013).
- 2) Chen JZ, Wang S, Tang R, Yang QS, Zhao E, Chao Y, Ying K, Xie Y, Mao YM: Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hPWTSR. *Mol Biol Rep.*, 29: 287-292. (2002).
- 3) Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H: R-spondin, a novel gene

- with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim Biophys Acta.*, 1676: 51-62. (2004).
- 4) Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W: R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell.*, 7: 525-534. (2004).
- 5) Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, Abo A, Tomizuka K, Funk WD: R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle.*, 5: 23-26. (2006).
- 6) de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegerbarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es JE, Guardavaccaro D, Schasfoort RB, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJ, Clevers H: Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476: 293-297. (2011).
- 7) Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q: R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 108: 11452-11457. (2011).
- 8) Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, Boutros M, Cruciat CM, Niehrs C: LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.*, 12: 1055-1061. (2011).
- 9) Hoppler S, Moon RT: Wnt Signaling in Development and Disease: Molecular Mechanisms and Biological Functions. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell. (2014).
- 10) Clevers H, Loh KM, Nusse R: Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012. (2014).
- 11) Kudo T, Sutou S: Structural characterization of chicken SF-1/Ad4BP gene. *Gene* 231: 33-40. (1999).
- 12) Kudo T, Sutou S: Chicken LRH-1 gene is transcribed from multiple promoters in steroidogenic organs. *Gene* 367: 38-45. (2006).
- 13) Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC: Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet.*, 17: 1264-1277. (2008).
- 14) Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, Oshima T, Kakitani M: R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet.*, 17: 1278-1291. (2008).
- 15) Bell SM, Schreiner CM, Wert SE, Mucenski ML, Scott WJ, Whitsett JA: R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development*, 135: 1049-1058. (2008).
- 16) Cadieu E, Neff MW, Quignon P, Walsh K, Chase K, Parker HG, Vonholdt BM, Rhue A, Boyko A, Byers A, Wong A, Mosher DS, Elkahoul AG, Spady TC, André C, Lark KG, Cargill M, Bustamante CD, Wayne RK, Ostrander EA: Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science*, 326: 150-153. (2009).
- 17) Bouilly J, Beau I, Barraud S, Bernard V, Delemer B, Young J, Binart N: R-spondin2, a novel target of NOBOX: identification of variants in a cohort of women with primary ovarian insufficiency. *J Ovarian Res.* 10: 51. (2017).

- 18) Aoki M, Mieda M, Ikeda T, Hamada Y, Nakamura H, Okamoto H: R-spondin3 is required for mouse placental development. *Dev Biol.*, 301: 218-226. (2007).
- 19) Bergmann C, Senderek J, Anhufer D, Thiel CT, Ekici AB, Poblete-Gutierrez P, van Steensel M, Seelow D, Nürnberg G, Schild HH, Nürnberg P, Reis A, Frank J, Zerres K: Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. *Am J Hum Genet.*, 79: 1105-1109. (2006).
- 20) Blaydon DC, Ishii Y, O'Toole EA, Unsworth HC, Teh MT, Ruschendorf F, Sinclair C, Hopsu-Havu VK, Tidman N, Moss C, Watson R, de Berker D, Wajid M, Christiano AM, Kelsell DP: The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nat Genet.*, 38: 1245-1247. (2006).
- 21) NCBI homepage, Gene database, RSPO4 R-spondin 4 [ Homo sapiens (human) ], Gene ID: 343637, updated on 12-Oct-2019, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/343637>
- 22) Chang CF, Hsu LS, Weng CY, Chen CK, Wang SY, Chou YH, Liu YY, Yuan ZX, Huang WY, Lin H, Chen YH, Tsai JN: N-Glycosylation of Human R-Spondin 1 Is Required for Efficient Secretion and Stability but Not for Its Heparin Binding Ability. *Int J Mol Sci.* 17: pii: E937. (2016).