

3 マウス 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子の解析と KO マウスの作製

3.1 要旨

IFN は腫瘍細胞に対して増殖抑制やアポトーシスの誘導などの直接作用を有することから、その作用を担う細胞内シグナル伝達経路に着目した。IFN- γ 処理によって B16 悪性黒色腫細胞に強く誘導される遺伝子の中で、2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2-5OAS) 遺伝子はその候補遺伝子の一つと考えられたことから、2-5OAS の抗腫瘍機能を検討するために、KO マウスの作製を試みた。まず、KO マウス作製に先立ってマウス 2-5OAS 遺伝子の構造の解析を行った。マウスゲノム DNA の解析、および EST データベースの検索から新規のマウス 2-5OAS 遺伝子を 6 つクローニングすることに成功した。その結果、ヒトでは独立した 4 つのクラスの遺伝子からなるファミリーを形成しているが、マウスではその中の 2 つのクラス (OAS1、OASL) で遺伝子増幅を起こしてサブファミリーを形成しており、少なくとも計 11 の遺伝子からなることを明らかにした。同時にゲノム構造も解析し、OAS1 サブファミリー遺伝子 (少なくとも 7 つ)、*Oas3*、*Oas2* が約 220kb の領域にクラスターを形成していることがわかった。2-5OAS ファミリー遺伝子 mRNA の発現は、IFN 誘導剤である poly I:C 刺激により全て誘導されるが、未刺激状態での各臓器ごとの発現分布はそれぞれ異なっていた。これらの結果は、遺伝子間で機能の相違があることを示唆している。また、アミノ酸シーケンス上の特徴と大腸菌内で発現させた組み換えタンパクの実験から、全ての 2-5OAS ファミリー分子は二本鎖 RNA との結合能を有しているが、マウス特有の遺伝子群は酵素活性を欠くことがわかり、古典的 2-5A システムの制御には関与していないことが予想された。次に、2-5OAS 遺伝子ファミリーの中で、その原型であり最も基本的な遺伝子 *Oas1a* の KO マウスの作製を行い、生殖系列への伝達に成功した。今後、2-5OAS 遺伝子の個体における生理機能の解析、抗腫瘍作用の解析に非常に有用であると考えられる。

3.2 序論

2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2-5OAS) は、インターフェロン (IFN) によって誘導されるタンパク質の一つで、IFN 作用機構の重要な柱として知られている(96, 107)。2',5'-オリゴアデニル酸 (2-5A) はアデニル酸 (ATP) が 2',5'-ホスホジエステル結合で繋がったオリゴヌクレオチド { pppA(2'p5'A)_n (1 ≤ n < 30) } であり、当初、IFN によって誘導されるタンパク質合成阻害物質として同定された。この 2-5A を合成する酵素が 2-5OAS である。

2-5OAS は IFN によって強力に誘導され、また二本鎖 RNA (dsRNA) と結合することによって活性化して、ATP を基質として 2-5A を合成する。この 2-5A 分子は不活性型の RNase L を活性型に転換する(32, 60, 136)。その結果、RNA の分解が生じて、ウイルスおよび細胞の増殖が阻害される。この系は「2-5A」システムと呼ばれ、IFN による抗ウイルス作用の一つを担っている(14, 68, 98)

(図 3.1.1)。この他には二本鎖 RNA 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKR) によるタンパク質合成開始因子 eIF2 のリン酸化による不活性化を介したタンパク質合成阻害や(94)、GTP 結合・GTPase 活性を示す G タンパク質の一つである Mx を介した転写抑制なども(114)、IFN による抗ウイルス作用の細胞内機構として知られている。

近年、これら IFN の抗ウイルス分子の KO マウスが作製され、抗ウイルス作用以外の機能が示唆されている。特に、2-5A システムの最終段階で機能している RNase L の KO マウスは脳心筋炎ウイルス (encephalo-myocarditis virus: EMCV) 感染時の IFN- α 投与に対して低感受性になるだけでなく、胸腺細胞のアポトーシス感受性の低下に起因する胸腺の肥大が認められる。このことから、RNase L は IFN システムとは無関係な、一般的なアポトーシス誘導シグナルにも関与していることが示唆されている(137)。さらに、Bisbal らは、RNase L が MyoD mRNA の安定性と筋芽細胞の分化を制御していることを報告している(7)。これらの知見から、2-5OAS は RNA の安定性や、分裂や分化、アポトーシスなど細胞の生理的な機構を制御していると考えられる(26, 69, 104, 135)。

2-5OAS 遺伝子はヒトでは詳しく調べられているが、マウスやラット、ブタ、ニワトリ、海綿では存在は報告があるものの、ほとんど報告がなされていない。ヒトでは、2-5OAS 遺伝子は 4 つの独立した遺伝子、OAS1 (p40/p46)、OAS2 (p69/p71)、OAS3 (p100)、OASL (p59/OAS-related protein) から成るファミリーを形成している。このうち、OAS1、OAS2、OAS3 の 3 つの遺伝子はヒト染

染色体 12q24.1 の約 130kb の領域にクラスターを形成しており、この領域を 2-5OAS 領域と呼んでいる(48)。一方、OASL は 12q24.2 にマップされており、2-5OAS 領域からは 1Mb 以上離れている(47)。OAS1 の 2 つのアイソフォームである p40 と p46 は単一の遺伝子からオルタナティブスプライシングによって生じる、N 末側の 346 アミノ酸が共通だが C 末側が異なっているタンパク質である(5)。同様に OAS2 遺伝子からもスプライシングの違いにより C 末の異なる p69 と p71 の 2 つの産物が作られる(78)。OAS1 が 2-5OAS 酵素活性に必要となる最小単位であり、OAS1 の N 末側約 340 アミノ酸を 1 つの基本構造とすると、これと非常によく保存された構造が OAS2 では 2 つ、OAS3 は 3 つタンデムに並んだ構造をしている(5, 78, 96)。一方、OASL は 1 つの基本構造と、その C 末側に 2 つのユビキチン様配列が付加された分子構造をしているが、2-5OAS 酵素活性は欠如している(43, 97)。これらの 2-5OAS ファミリー分子は細胞内の局在も異なっており、OAS1 は核内に、OAS2 は核膜に、OAS3 は細胞質中に一様に分布していると報告されている(79)。また、酵素活性にも差があり、OAS1 と OAS2 は比較的長鎖の 2-5A を合成するが、OAS3 は短く、2 量体の 2-5A が中心となっている(77)。この様に 4 つのヒト 2-5OAS は細胞内局在と酵素活性に違いがあることから、2-5A システムにおける機能の違いが推測されるが、現在のところ不明である。

マウスでは複数の 2-5OAS がこれまでに報告されているが、それらはヒト OAS1 と OASL に相当する分子だけであり、OAS2 と OAS3 に相当する 2-5OAS はクローニングがなされていなかった(図 3.1.2)。マウスの OAS1 ホモログは、L3(17)または S(+)(50)としてクローニングされており、ヒト OAS1 とはアミノ酸レベルで約 70%の相同性を有している。一方、Ghosh らはマウス OAS1 として 2 つの cDNA を報告しているが(35)、これはヒト OAS1 と N 末側の 346 アミノ酸が 99%一致しており、クローニング時にヒト mRNA が混入したため誤ってクローニングされたと考えられる(58)。さらに、Rutherford ら(101)、宗川ら(112)、そして我々の研究グループの柴田らは(110)、独立したマウス OAS1 様遺伝子として、L1、L2/S(-)、Oasl5 をクローニングしている。また、マウス OASL(p54) は、樹状細胞とマクロファージのサブトラクション法により、樹状細胞で強く発現する遺伝子としてクローニングされた(124)。しかし、p54 は 2 量体の 2-5A を合成する酵素活性が認められることから、酵素活性を持たないというヒト OASL の実験結果と矛盾していることが知られていた。このように、マウスで

は 2-5OAS 遺伝子ファミリーの全体像は不明であり、またその機能解析も IFN システム以外では十分になされていなかった。

そこで 2-5OAS の機能、特に抗ウイルス作用以外の役割（アポトーシス誘導や、発がん防止における役割）を解析するために、KO マウスの作製を試みた。そのための準備として、まずマウスにおける 2-5OAS 遺伝子の構造を解析した。マウスゲノムライブラリーから得られた 2-5OAS 領域および EST (expression sequence tag) データベースを解析することによって、OAS2、OAS3 のマウスホモログを含む新規の 2-5OAS 遺伝子を 6 つクローニングすることに成功し、また 2-5OAS 領域の遺伝子分布などの概要も明らかにした。このことから、マウス 2-5OAS 遺伝子は少なくとも 11 個の遺伝子からなるファミリーを形成していることがわかった。特にヒト OAS1 と OASL に対応する遺伝子はマウスではそれぞれ 7、2 でありサブファミリーを形成していることから、これまでの遺伝子名を整理して新しい分類・名前を提唱する。

マウス 2-5OAS ファミリーは、それぞれの遺伝子の各種臓器における発現パターンや酵素活性が異なることから、2-5OAS としての共通の機能の他に独自の機能を持っていることが予測されたことから、それぞれの個体における生理機能を解析するために、各々の KO マウスと 2-5OAS 遺伝子群の KO マウスの作製を計画した。このとき、OASL 遺伝子を除く 9 つの遺伝子が第 5 番染色体長腕の約 220kb からなる 2-5OAS 領域にクラスターをなして存在していることから、バクテリオファージ由来の組み換え酵素 Cre リコンビナーゼを用いた Cre-loxP システムを利用して(40, 41)、2-5OAS 領域の KO マウスの作製を進めている。

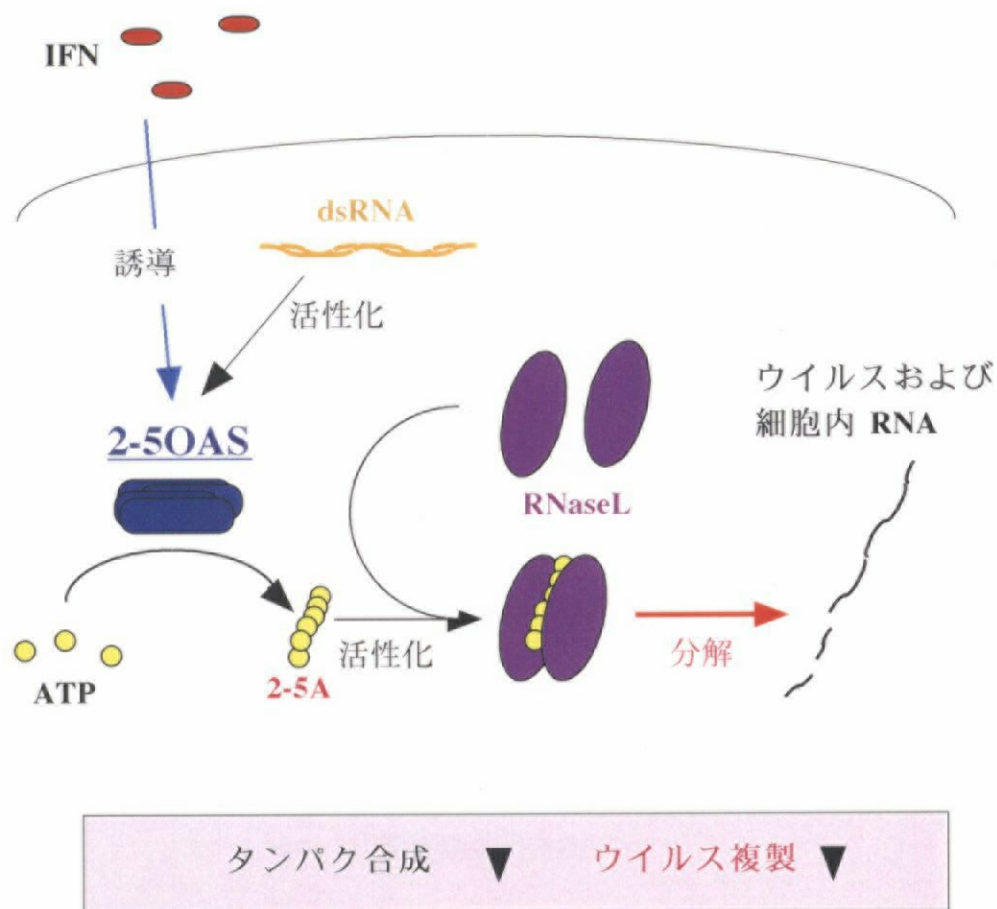
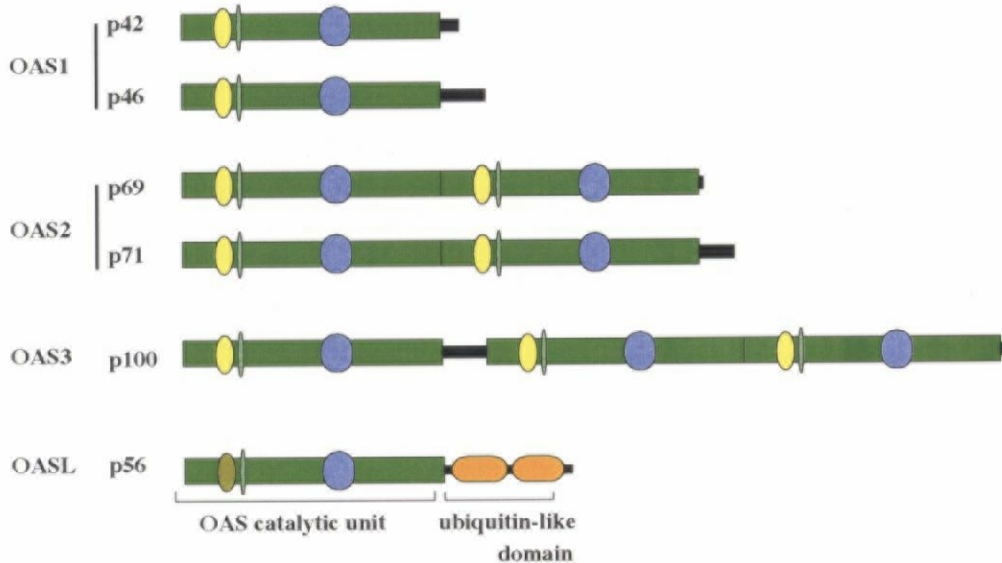


図3.2.1 2-5Aシステム

2-5OASはIFNによって強力に誘導され、dsRNA依存的に活性化する。活性化した2-5OASはATPを基質として $2\text{-}5\text{A}'[\text{pppA}(2'\text{p}5'\text{A})_n$ ($1 \leq n < 30$)] を合成する。この2-5A分子は不活性型のRNase Lを活性型に転換する。その結果、RNAの分解が生じてウイルスおよび細胞の増殖が阻害される。

ヒト2-5OASファミリー



マウス2-5OASファミリー (これまでに報告されたもの)

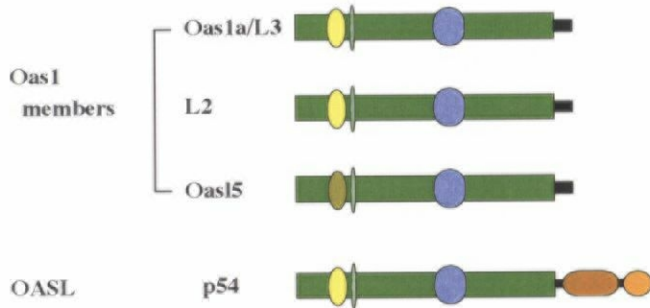


図3.2.2 2-5OASファミリー分子の構造

2-5OASはよく保存された遺伝子ファミリーを形成している。ヒトでは3つのクラスの2-5OAS遺伝子 (OAS1、OAS2、OAS3) と1つの2-5OAS様遺伝子 (OASL) からなる。また、OAS1とOAS2は選択的スプライシングにより2つのC末側が異なる遺伝子産物を生じる。一方、マウスではOAS2およびOAS3に相当する遺伝子は同定されていなかった。

緑の太線部分はよく保存されたOAS基本構造部分を示し、オレンジ部分はユビキチン様領域を示す。また、OAS基本構造部分はP-loop (黄色)、D-box (黄緑) およびKR-rich領域 (青) の各モチーフを含んでいる。

3.3 材料と方法

マウス

SLC (静岡、日本) より SPF の C57BL/6J マウスを入手し、8~10週齢の時点で解剖し、各種臓器を採取した。

マウスゲノム BAC (bacterial artificial chromosome) クローン

Research Genetics 社 (Huntsville, AL) より入手した 129Sv/J 由来の CITB-CJ7-B マウス BAC ライブラリーに対して、*Oas1a* (L3) 遺伝子の 1.1kb の ORF 全領域をプローブとして用いたハイブリダイゼーションスクリーニング、または *Oas1d* (L1) 遺伝子のエクソン 1 内の 130bp を特異的に増幅するプライマーセット (L1f2: 5'-AGG TAA AAG CTG GAC CTA GGA TGG-3', L1r5: 5'-AGG GCA TCT ATG ACT TCT CTG AGG-3') を用いた PCR スクリーニングを行い、それぞれ陽性クローン 5つ (58I10, 96L18, 167B5, 331G6, 406G3)、1つ (233G15) を単離した。

これら 6つのクローンについて、サザンハイブリダイゼーションおよび PCR 法を用いてゲノムのマッピングを行い、以後の実験に用いた。なお、サザンハイブリダイゼーション時の電気泳動は、20-150kb 程度の大きさの DNA 断片の分離が必要となる Sal I 消化断片の解析時のみパルスフィールド電気泳動を行った。パルスフィールド電気泳動装置は、北里大学薬学部の岡田信彦先生および東京大学医科学研究所生物物理学研究部の池田日出男先生より貸与していただいた。

RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法による cDNA のクローニング

200 μ l の PBS に溶解した 500 μ g の poly I:C (SIGMA, St.Louis, MO) を C57BL/6J マウスの尾静脈より投与し、12 時間後にマウスを解剖して卵巣、大腸、および脾臓を採取した。これらから AGPC (acid guanidine thiocyanate/phenol chloroform) 法により全 RNA を調製した。プライマーとして 3'-RACE の場合は *Not* I-oligo(dT) プライマー (5'-AAC TGG AAG AAT TCG CGG CCG CAG GAA T₁₈-3') を、5'-RACE の場合はそれぞれの目的の遺伝子ごとに特異的に設計した GSP (gene specific primer) 1 を用いて逆転写反応を行った。なお、逆転写反応には First-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmasia, Buckinghamshire, UK) を使用した。3'-RACE の場合は、この 1st strand DNA に対して *Not* I-adaptor プライマー (5'-TGG AAG AAT TCG CGG CCG CAG-3') と GSP1 の内側に設定した GSP2 を用いて PCR を行い目的の cDNA を増幅した。一方、5'-RACE の場合は逆転写産物を GeneClean

III (BIO101, Montreal, Canada) を用いて余剰のプライマーを除去・精製した後、TdT (terminal deoxytransferase) を用いて 1st strand DNA の末端にオリゴ dC を付加する。その後、anchor プライマー (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') と GSP2 を用いて PCR 反応を行い、目的の遺伝子を増幅する。さらにこの PCR 産物を鋳型として、amplification プライマー (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3') と GSP2 のさらに内側に設定した GSP3 を用いて 2 回目の PCR 反応 (nested-PCR 法) を行う。なお、これらの PCR 反応は LA Taq polymerase (宝酒造, 大津) を用いた。これらの PCR 反応によって得られた産物は、プラスミドベクター pBluescript に導入してクローニングを行い、東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターにてシーケンス反応を行い、cDNA の配列を決定した。

Oas1d (L1) cDNA 全長のクローニング

Rutherford らによって 2-5OAS とホモロジーの高い一部の配列 (GenBank: X55982) のみが既に報告されていたため、その全長の cDNA を 5'-および 3'-RACE 法によって決定した。なお、5'-RACE (L1r1: 5'-ACA TCA AAC TTC ACC TCC TTC AGC AGG TCG-3', L1r2: 5'-TTT AGT TAC TCG ACT CCC ATA CTC CCA GGC-3'), 3'-RACE (L1f: 5'-GGG GCT TCA GAA GTA CTT CCT GAA CTG TCG-3') の各種プライマーを用い、鋳型としては脾臓由来 cDNA を用いた。

Oas1e cDNA 全長のクローニング

Oas1a (L3) cDNA 全長をプローブとして、2-5OAS 領域を含むマウスゲノム BAC クローンのサザンハイブリダイゼーションを行い、*Oas1a* および *Oas1b* (L2) とは異なる領域にもかかわらず陽性シグナルを与える約 20kb の *Sma* I 断片を得た。この *Sma* I 断片を 96L18 クローンよりサブクローニングし、陽性シグナルを与える領域をさらに絞り込みを行い、シーケンスを行った。*Oas1a* と DNA 配列レベルで約 70% のホモロジーを持つ、新規の 2-5OAS 遺伝子の一部の配列を発見した。この情報を元に、エクソン 1 の ATG 翻訳開始点相当部分にプライマーを設計し (L6f3: 5'-CTC AGG ATG GCG AAA AAC CTT AGC-3', L6f4: 5'-TCG GAT TGC TCT CTG CAG CAC TCC-3'), 3'-RACE 法により全長 cDNA のクローニングを行った。なお、卵巣由来の cDNA を鋳型として用いた。

Oas1f, Oas1g, Oas2, Oas3, Oas12 cDNA のクローニング

新規のマウス 2-5OAS 遺伝子をクローニングするために、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) を用いてマウス EST デ

ータベースを検索した。このとき、既知のヒトおよびマウス 2-5OAS の DNA およびアミノ酸配列との相同性を指標として検索し、E value が e^{-20} 以下の DNA 断片について解析を行った。このとき、問い合わせ配列 (query) として 2-5OAS の塩基配列を用いる場合は相同解析プログラムとして「blastn」を、query として 2-5OAS のアミノ酸配列を用い、塩基配列に基づき全てのフレームで翻訳したアミノ酸配列に対して検索を行う場合は相同解析プログラム「tblastn」を用いた。

Oas1f、*Oas1g* は、*Oas1a* と有意に相同性が高い未知の配列を含むクローン (GenBank AA794503) として同定した。この DNA 断片中には、*Oas1a* との相同性から開始コドン ATG を含むエクソン 1 部分が含まれていることが推測されたことから、GSP (LxEST: 5'-CTC AGG ATG GCG AGG GAA CTC TTC-3', LxESTf2: 5'-GGA GGC AGG ATA AGT TCA TAG AGG-3') を用いて 3'-RACE 法により全長 cDNA のクローニングを行った。鋳型としては卵巣由来の cDNA を用いた。このとき、異なる 2 つの cDNA が同時にクローニングされた。EST クローン AA794503 と同一のものを *Oas1g*、もう一つのクローンを *Oas1f* とした。

Oas2 は、ヒト OAS2 の C 末側 (domain II) と相同性の高い 2 つの EST クローン (BE281841, AW230357) として同定した。GSP (L11r1: 5'-GCT CCC AGA GTG CTG AGT TTT ACC-3', L11r2: 5'-TGC ATC ACA GGA CAT CAA AGA AGG-3', L11r3: 5'-TGT CAA AGT CAT CTG TGC CAC TGC-3') を用いて 5'-RACE を行い、また GSP (L11f1: 5'-GCT CCC AGA GTG CTG AGT TTT ACC-3', L11f2: 5'-TGC ATC ACA GGA CAT CAA AGA AGG-3') を用いて 3'-RACE を行い、cDNA 全長のクローニングを行った。鋳型としては大腸由来の cDNA を用いた。

Oas3 は、ヒト OAS3 の中央部分 (domain II/OAS3M) と C 末側 (domain III/OAS3C) とそれぞれ相同性の高い EST クローン (BE283110, BE371571) として同定した。大腸由来の cDNA を鋳型として 2 回の 5'-RACE 法により全長 cDNA をクローニングした。なお、GSP としては 1 回目 (L10r1: 5'-CAT GGC TTG ATG GGA TTG CCA TCC-3', L10r2: 5'-GGA CAA TCA GCT CCA GAA CAG TGC-3', L10r3: 5'-GTT GGT ACC AGT ATT TCA CCA GCC-3')、2 回目 (L10r4: 5'-GTA CTT GCT GTG TTG GAT CAA GGC-3', L10r5: 5'-TCC CAG GCA AAG ATG GTA AGC AGC-3', L10r6: 5'-TGG TAC CAG TGT TTG ACC AGC AGG-3') を用いた。また、3'-RACE としては GSP (L12f1: 5'-CTG ATG CTA CTG GTC AAA CAC TGG-3', L10f1: 5'-GTA ACA AGA CCA TCA AGG GGA AGG-3') を用いた。

Oasl2 は、ヒト OASL と相同性の高い6つの EST クローン (BE136926, BE288875, BE282713, BE369605, AW825512, AW825847) として同定した。GSP (L9f1: 5'-TCG ACA TCG TAG CCA TGG CAG TCG-5', L9f2: 5'-ACT CCT TTG TGG CTC AGT GGC TGC-3') を用いて 3'-RACE を行い、cDNA 全長のクローニングを行った。なお、鋳型としては大腸 cDNA を用いた。

配列のマルチアライメント解析

既知の配列としては、以下のものを用いてアライメントを行った。*Oas1a/L3* (M33863)、*Oas1b/L2* (X58077)、*Oas1l/p54* (AF068835)、ヒト *OAS1/p42* (X04371)、*OAS2/p69* (M87434)、*OAS3/p100* (AF063613)、*OASL/p59* (AJ225089)

マルチアライメントは Web 上で公開されているプログラム ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/clustalw-j.html>) を用いて、デフォルトのパラメーターで計算を行った。得られた結果は、Web 上で同様に公開されているソフトウェア BOXSHADE3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) を用いて修飾を施した。

分子系統樹

分子系統樹は ClustalW のアライメントの結果に基づいて、NJ (neighbour-joining) アルゴリズムを用いて作製した。系統樹の作製にはフリーウェアの TreeView (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx/>) を使用した。なお、アライメントは、2-5OAS のよく保存された基本単位である約 350 アミノ酸配列について行い、その他の多様性に富む部分は除いた。基本単位を複数持つ *OAS2* と *OAS3* については、それぞれの基本単位ごと (*OAS2*: N と C、*OAS3*: N と M、C) に分割して計算をした。

ノザンハイブリダイゼーション

マウス組織の全 RNA を AGPC 法により抽出した後、2.2M ホルムアミドを含む変性 1.2%アガロースゲルにて泳動し、ナイロンメンブラン (Gene Screen Plus; NEN, Boston, MA) にブロッティングを行った。その後、Random Primer Extension Labeling System (NEN) を使用して α -³²P-dCTP 標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、シグナルは BAS 2000 II Bio-Image-Analyzer (Fuji フィルム、東京) にて検出した。

なお、マウス 2-5OAS mRNA 特異的なシグナル検出のために、以下の cDNA 断片をプローブとして用いた。*Oas1a/Oas1b* : *Hha* I 450bp 断片 (エクソン 1-2)、*Oas1c* : *Bam* HI 690bp 断片 (エクソン 5-6)、*Oas1d* : *Sma* I 250bp 断片 (エク

ソン 1-2)、 *Oas1e* : Cla I-Fok I 320bp 断片 (エクソン 2-3)、 *Oas1f/Oas1g* : *Bst* XI-*Bam* HI 600bp 断片 (エクソン 2-4)、 *Oas2* : *Kpn* I 500bp 断片 (エクソン 1-2)、 *Oas3* : *Hind* III 700bp 断片 (エクソン 1-3)、 *Oas1l* : *Kpn* I 700bp 断片 (エクソン 1-4)、 *Oas12* : *Eco* RV 1.0kb 断片 (エクソン 1-5)。また、コントロール用プローブとしてマウス β アクチン *Pst* I 1.0kb 断片 (pAL41 由来) を用いた。

大腸菌での組み換え 2-5OAS タンパク質の発現

マウス大腸または卵巣 (*Oas1e*) より抽出した全 RNA を鋳型として用いて、2-5OAS cDNA の ORF 領域を *Pyrobest*TM DNA polymerase (宝酒造) による PCR 反応を行いクローン化した。この時、以下に示す変異プライマーを用いて翻訳開始コドン部位に *Nde* I サイト (CATATG)、終止コドンの 3' 下流に *Xho* I サイト (CTCGAG) を導入した。

Oas1a (L3*Nde*I: 5'-CCA GAC TTC ATA TGG AGC ACG GAC TCA GG-5', L3*Xho*I: 5'-TGG GCT CGA GCT GCT GTG CTC ACA GCA GG-3'), *Oas1d* (L1*Nde*I: 5'-CCT CAT ATG GAG CAG GAT CTG AGG AGC-3', L1r4: 5'-TCT CGA GCT GTT GGT GCA GGT ATT CAG AGA CC-3'), *Oas1e* (L6*Nde*I: 5'-CCA TAT GGC GAA AAA CCT TAG CAG CAC TCG-3', L6*Xho*I: 5'-CCT CGA GTC TCC TTG GCA GAT GCT TTG G-3'), *Oas1f* (L7/L8*Nde*I: 5'-GCC TCC ATA TGG CGA GGG AAC TCT TCA-3', L7*Xho*I: 5'-CTC TCG AGC CTT CTA GGC AAG TGC TAC-3'), *Oas1g* (L7/L8*Nde*I: 5'-GCC TCC ATA TGG CGA GGG AAC TCT TCA-3', L8*Xho*I: 5'-CTC TCG AGT CTC CTA GGC AGA TGC TGG-3'), *Oas2* (L11*Nde*I: 5'-CAC ATA TGG GAA ACT GGC TGA CTG GAA ACT G-3', L11*Xho*I: 5'-CCT CGA GAT TGC ACA GGA TCT CTG AGA GG-3'), *Oas3* (L10*Nde*I: 5'-GTC CAT ATG GAC CTG TTC CAC ACG CCA GC-3', L10*Xho*I: 5'-TCT CGA GAC TTC ACA CAG CGG CCT TTA CC-3'), *Oas1l* (L4*Nde*I: 5'-AGC TCA TAT GGA CCC GTT CCC CGA CCT GT-3', L4*Xho*I: 5'-GAA CTC GAG AAA TTC TCT AAG TGC TGA GC-3'), *Oas12* (L9*Nde*I: 5'-CGT ACA TAT GGC AGT CGC CCA GGA GCT GT-3', L9*Xho*I: 5'-CCT CGA GGA AGC TAG CTG GGC ACA AAT GG-3')

なお、PCR 産物は pBluescript にクローニングした後にシーケンスを行い、ORF 中に変異がないクローンであることを確認してから以降の実験に用いた。

これら cDNA の *Nde* I-*Xho* I 断片を大腸菌用発現ベクター pET-16b (Novagen, Darmstadt, Germany) の *Nde* I-*Xho* I サイトに導入した。これによって、ファクター Xa 切断部位を挟んで 10 個のヒスチジン (His-tag: histidine tag) を N 末端

に融合した組み換えタンパク質となり、また発現を T7 polymerase によってコントロールできる。発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3)株に導入し、0.5mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 添加により組み換えタンパクを産生させた。タンパク誘導後の大腸菌をバッファー D (組成は下記に記載) に懸濁したのち、液体窒素により急速凍結し、解凍後に菌体の超音波破碎を行った。

バッファー D : 10 mM HEPES-KOH, 3 mM Mg(OAc)₂, 0.3 mM EDTA, 50 mM KCl, 10% glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.2 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml pepstatin A

dsRNA 結合試験

上記の組み換えタンパクを発現させた大腸菌破碎産物の上清に poly I:C アガロース (AGPOLY(I)-POLY(C) TYPE6; Amersham Pharmacia) を加えて室温で 30 分間結合させた後、poly I:C アガロースゲルを回収しバッファー D で 3 回洗浄した。この poly I:C アガロース結合タンパクについてウエスタンブロッティングを行うため、12.5% (OAS1 サブファミリー) または 8.0% (その他) SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロースメンブラン (Trans-Blot; BioRad, Hercules, CA) にブロッティングした。なお、His-tag 融合組み換えタンパクを検出するため、ウサギ抗 His-tag ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) とプロテイン A-HRP (Amersham Pharmacia)、化学発光分析試薬 (Renaissance; NEN) を用い、オートラジオグラフィフィルム (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia) にてシグナルを可視化した。

2-5OAS 活性測定

poly I:C アガロースに結合させた組み換え 2-5OAS タンパク質を 2-5OAS 活性測定に用いた。ゲルをバッファー H (組成は下記に記載) に懸濁した後、20 μ Ci [γ -³²P]ATP (NEN) を加えて 33°C で 6~12 時間加温した。反応液の上清を回収し、7M 尿素を含む 20%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行ない、シグナルは BAS 2000 II Bio-Image-Analyzer にて可視化した。

バッファー H : 20 mM HEPES-KOH, 25 mM Mg(OAc)₂, 50 mM KCl, 7 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM creatine phosphate (SIGMA), 1U/ μ l creatine kinase (SIGMA), 5 mM ATP

マウス 2-5OAS ターゲティングベクターの作製

Oas1a KO マウスを作製するために、ターゲティングベクターは *Oas1a* 遺伝子の翻訳開始コドン ATG を含む第 1 エクソンから第 2 エクソンまでをネオマ

イシン耐性遺伝子 (neo) で置換することにより遺伝子を破壊するように設計した。また、同時に *Oas1a* 遺伝子の 5'側上流 7kb 地点に転写報告が逆向きに存在する *Oas1g* 遺伝子の第 1 イントロン部分に loxP 配列を挿入することにより、マウス 2-5OAS 領域欠損マウス作製のための 5'側 loxP サイト導入 ES 細胞の樹立となるような設計とした。そのために、129Sv/J 由来ゲノム BAC クローン 167B5 を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR 反応を行い、ターゲティングベクターの相同領域を作製した。3'側相同領域はエクソン 2 とエクソン 3 上に設定したプライマー (L3ex2: 5'-ATC AGG AGG TGG AGT TTG ATG TGC-3', L3ex3: 5'-GAT GGC ATA GAT TCT GGG ATC AGG-3') にて増幅した第 2 イントロン部分の *Bam* HI-*Bam* HI 3.4kb 断片を用いた。5'側相同領域は *Oas1a* 遺伝子のエクソン 1 の 5'側部分から *Oas1g* 遺伝子の第 2 イントロン上の *Eco* RI サイトの内側までとした。ただし、*Oas1g* 遺伝子第 1 イントロン部分に pULwL 由来の loxP 配列を挿入するために loxP-5'側 (L8ex2XhoI: TTT GCT cgA GTT ACT GTC CTG GCT TCC, L8ex2SalI: GAC TGG tcG ACT GGA CAG ATG GAA GC) 相同領域 (2.0kb) と loxP-3'側 (L8ex1XbaI: TCA TCt AGa CAT CAG GCA GTG GTG TC, L3ex1XbaI: CTC CAT GCT AAG TCT aGA GCT TCC TG) 相同領域 (7.5kb) に分割して作製し、loxP-5'側に *Sal* I サイトを、loxP-3'側に *Xba* I サイトを新たに導入して loxP 配列 (*Xho* I-*Xba* I 遺伝子断片) と連結した。ネオマイシン耐性遺伝子は pPGKneo-pA (基礎生物学研究所・八木健先生より供与) 由来の *Sal* I-*Xho* I 遺伝子断片を、ネガティブセレクション用のジフテリアトキシン遺伝子は pMC1DT-pA (基礎生物学研究所・八木健先生より供与) 由来の *Xho* I-*Hind* III 遺伝子断片を用いた。これらの遺伝子断片を用いて作られたプラスミドベクター pL3KO-L8lox を *Not* I で消化することにより直鎖状とし、ターゲティングベクターとした。

ES 細胞

KO マウス作製のための ES 細胞としては、129Sv/J 由来の E14.1 を用いた。ES 細胞は、ES 培養用培地 (組成は下記に記載) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内でフィーダー細胞と共培養を行った。フィーダー細胞としては、ネオマイシン耐性遺伝子トランスジェニックマウス胎児 (胎生 13.5~15.5 日) 由来の初代培養細胞 (primary culture: PC) を 10µg/ml のマイトマイシン C (Sigma) 含有培地にて 150 分培養することにより増殖を停止させ、3~5x10⁴ 細胞/cm² となるように培養シャーレに蒔いたものを用いた。また、遺伝子導入後の ES 細

胞は ES 培養用培地に 300 μ g/ml の G418 (geneticin; GibcoBRL) を加えて培養することにより、ネオマイシン耐性遺伝子によるポジティブセレクションを行った。

ES 培養用培地：DMEM (GibcoBRL) , 15% FBS (Sigma) , 1000units/ml GSGRO™(LIF) (GibcoBRL) , 1 x non-essential amino acids solution (GibcoBRL) , 1 mM Na-pyruvate (GibcoBRL) , 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 50units/ml penicillin (明治製菓) , 50 μ g/ml streptomycin (明治製菓)

相同組み換え ES 細胞の単離

ES 細胞 1 x 10⁷ 個に対してターゲティングベクター pL3KO-L8lox/Not I を 25 μ g 加えて、エレクトロポレーターにより 250V/500 μ F の条件にて遺伝子導入を行った。300 μ g/ml G418 含有 ES 培地にて 7 日間ポジティブセレクションを行い、実体顕微鏡下で薬剤耐性クローンを 1 つずつ単離して 24well dish (IWAKI, 日本) にて分離培養を行った後、24well dish 2 枚に継代し、1 枚は凍結保存、残り 1 枚からは DNA を回収してサザンハイブリダイゼーション解析に用いた。

1 クローンあたり 5~10 μ g 得られた DNA は全量を 50u の *Eco* RI で消化し、1% アガロースゲルにて電気泳動を行った後、ナイロンメンブラン (Gene Screen Plus; NEN) にブロッティングを行った。その後、Random Primer Extension Labeling System (NEN) を使用して L3 cDNA 3'-probe (*Hha* I-*Eco* RI fragment) を α -³²P-dCTP 標識してプローブとし、ハイブリダイゼーションをすることにより 3' 側相同組み換え体の一次スクリーニングとした。なお、シグナルは BAS 2000 II Bio-Image-Analyzer (Fuji フィルム) にて検出した。野生型・非相同組み換え体は 23kb (*Oas1a*) と 5.3kb (*Oas1b*) の 2 本のバンドが、相同組み換え体では 12kb の特異的なシグナルが得られることから、候補クローンを選別した。候補クローンは解凍・培養後、さらに DNA を抽出して *Eco* RI (neo) または *Bam* HI (5'側 loxP 領域) のサザンハイブリダイゼーションを行った。なお、プローブとしてはネオマイシン遺伝子全長、または L8lox-probe2 (pL8loxprobe1/*Hinc* II) を用いた。ネオマイシン遺伝子プローブでは相同組み換え体特異的に 12.1kb のバンドが、5'プローブでは野生型・非相同組み換え体 6.0kb、相同組み換え体 4.0kb のバンドが得られる。これらのシグナルのパターンから最終的に相同組み換え体を判別した。

キメラマウスの作製

相同組み換えが確認された ES 細胞は、須藤カツ子博士によって C57BL/6J 由

来の 8 細胞期胚とのアグリゲーションキメラ作製法を用いて、C57BL/6J マウスとのキメラとして個体を形成させた。キメラマウスは毛色により ES 細胞の寄与率を判定した。ES 細胞由来の部分は毛色が野生色（茶色）または白色となり、C57BL/6J 由来では黒色になる。この比率が 80%以上の個体について C57BL/6J の雌と交配を行い、仔についても毛色で判定し、野生色の場合は ES 細胞由来の遺伝子が伝達されたと判断した。これらの個体については、尾から DNA を抽出して PCR 法またはサザンハイブリダイゼーションにて *Oas1a* KO 遺伝子座を確認した。なお、PCR はターゲティングベクターの 5'側上流の外側部分と loxP 配列部分に設定したプライマー（L8com1: 5'-CAT GAT AAG TGA GGA TGT GGT CGG-3', loxP1: 5'-ACC GAG CGA ACG CGT ATA ACT TCG-3'）により、陽性の場合には 2.1kb のバンドとして検出した。

3.3 結果

新規マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子のクローニング

2-5OAS は複数の遺伝子からなるファミリーを形成していることが知られており、既にヒトでは構造の異なる4つの遺伝子から成るファミリーを形成していることが報告されていた(図 3.1.2)。一方、マウスについては OAS1 と OASL に相当する4つの遺伝子の報告のみであり、不完全な情報しかなかった。このことは 2-5OAS 遺伝子の機能解析するにあたって有効な KO マウスを作製するにあたって重大な問題となったため、まず前段階としてマウス 2-5OAS 遺伝子ファミリーの全貌を明らかにするための遺伝子クローニングを行った。

まず Rutherford らによって一部の塩基配列 (GenBank: X55982) のみが報告されていた L1 遺伝子について(101)、その cDNA 全長を 5'-および 3'-RACE 法によって決定した。L1 (*Oas1d* と新たに命名) 遺伝子全長 cDNA は 1831bp からなっていたが、252 番目のアミノ酸に相当する部分が終止コドンとなっており、結果として 2-5OAS 基本構造としては不完全な 251 アミノ酸からなるタンパクをコードしていると予想された(図 3.3.1)。また、*Oas1a* とはアミノ酸レベルで 57%の一致率(相同性は 66%)であった。

次に、マウス 2-5OAS 遺伝子として最初にクローニングされた *Oas1a/L3/S(+)* cDNA 全長をプローブとして用いて、マウスゲノム BAC ライブラリーをスクリーニングすることによって単離した BAC クローン (58I10, 96L18, 167B5, 331G6, 406G3) の解析の過程で、*Oas1a* cDNA と弱くクロスハイブリダイゼーションする *Sma* I 20kb DNA 断片を得たため、この領域に存在する遺伝子のクローニングを行った。この DNA 断片を *Oas1a* cDNA とのクロスハイブリダイゼーションを指標に領域を狭めた後、シーケンス解析を行ったところ、*Oas1a* の翻訳開始コドン「ATG」を含むエクソン1、エクソン2、エクソン4およびエクソン5と相同性のある新規の 2-5OAS 遺伝子様配列を含んでいることがわかった。そこで、予想されるエクソン1上に PCR プライマーを設定し、3'-RACE 法により cDNA 全長をクローニングし、この遺伝子を *Oas1e/L6* とした(図 3.3.2)。*Oas1e* cDNA は 1720bp からなり、*Oas1a* とアミノ酸レベルで 52%の一致率(相同性は 67%)を示す 369 アミノ酸をコードしていると予想された。

さらに、マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子はヒトとの比較からもまだ複数存在すると予想されたこと、また、従来ヒトに比べて登録数が少なかったマウス

EST クローンの登録数が近年飛躍的に増加したためデータベースを用いた「*in silico*」のクローニングが有効と考えられたことから、続いて BLAST を用いてマウス EST データベースを検索した。このとき、既知のヒトおよびマウス 2-5OAS の DNA およびアミノ酸配列との相同性を指標として検索したところ、それぞれマウス *Oas1a* (AA794503)、ヒト OAS2 (BE281841, AW230357)、OAS3 (BE283110, BE371571)、OASL (BE136926, BE288875, BE282713, BE369605, AW825512, AW825847) と相同性の高いクローンが登録されていることを発見した。そこでこれらの遺伝子断片の情報を元にプライマーを設定し、5'-または 3'-RACE 法により cDNA 全長のクローニングを行ったところ、ヒト OAS1、OAS2、OAS3、OASL にそれぞれ対応するマウスホモログであることがわかった。

マウス *Oas1a* と高い相同性を示した EST クローン AA794503 の情報を基に PCR プライマーを設定し、3'-RACE 法にて cDNA クローニングを試みたところ、異なる 2 つの cDNA が得られ、AA794503 と一致するものを *Oas1g*、もう一方を *Oas1f* とした。*Oas1f*、*Oas1g* cDNA はともに約 1700bp からなり、*Oas1f* は 356 アミノ酸、*Oas1g* は 361 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると予測された (図 3.3.3, 3.3.4)。*Oas1f*、*Oas1g* はアミノ酸レベルで 82% (87%) の相同性を示し、*Oas1f* は *Oas1a* とは 56% (71%)、ヒト OAS1 とは 52% (68%) であった。OAS1 サブファミリー分子は *Oas1a*/*Oas1b* を除いて、2-5OAS の酵素活性に必須とされているモチーフのうち、ATP 結合部位である P-loop モチーフと Mg^{2+} 結合部位である DAD モチーフ (D-box) に変異を持っていた (図 3.3.8A)。マウス *Oas2* cDNA は 3290bp からなり、ヒト OAS2 とはアミノ酸レベルで 61% (73%) の相同性を示す 742 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると予想された (図 3.3.5)。また、マウス *Oas3* cDNA は 4728bp からなり、ヒト OAS3 とはアミノ酸レベルで 66% (75%) の相同性を示す 1138 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた (図 3.3.6)。一方、ヒト OASL と高い相同性を示す (アミノ酸レベルで 65%/77%) 新規遺伝子 cDNA は 2050bp であり、511 アミノ酸をコードしていると予測され、*Oas12* と命名した (図 3.3.7)。*Oas12* はこれまで知られていたマウス *Oasl/p54* (以後、*Oasl1* とする) よりもヒト OASL と相同性が高く (*Oasl1* はアミノ酸レベルで 47%/62%)、また、*Oasl2*/*Oasl1* の相同性はわずか 50%程度しかなかった (図 3.3.8D)。また、*Oasl1/p54* を独自にクローニングしたところ、C 末側の塩基配列が一部異なり、ユビキチン様領域が完全なクローンが得られた (*Oasl1*)。この cDNA クローンは、理化学研究所完全長

cDNA プロジェクトで既に報告のあったクローン (AK010034) と一致していた。このことから、マウス種間の遺伝的多型であると考えられ、以後の解析には *Oasl1/p54* でなく、この *Oasl1* を用いて行った。

マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子のゲノム解析

4つのヒト 2-5OAS ファミリー遺伝子のゲノム上の構造はすでに明らかになっており、OAS1、OAS2、OAS3 の3つの遺伝子は 12q24.1 の約 130kb の領域にクラスターを形成していること、OASL はそこからテロメア側に 1Mb 以上離れた 12q24.2 に存在していることが報告されている。

そこで、マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子のクローニングと平行して、*Oasl1a* cDNA をプローブとしたハイブリダイゼーションスクリーニングおよび *Oasl1d* 遺伝子エクソン 1 内に設定した PCR スクリーニングによって、マウスゲノム BAC ライブラリーより単離した6つの BAC クローン (58I10, 96L18, 167B5, 331G6, 406G3, 233G15) を用いてゲノムマッピングを行った。マウスのゲノムもおおよそヒトと一致しており、マウス OAS1 サブファミリー、OAS2、OAS3 の3つの遺伝子は約 220kb の領域にクラスターを形成していた。特に OAS1 サブファミリーについては、OAS3 の 5'側上流に転写方向が一致せずにクラスターを形成していた (図 3.3.9)。一方、OASL サブファミリーについては、今回我々が単離した約 400kb をカバーする BAC クローンコンティグ中には存在せず、ヒトと同様に 2-5OAS 領域近傍には存在していなかった。

マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子の分子系統樹解析

2-5OAS ファミリー遺伝子の分子進化について、ファミリー遺伝子でよく保存されている約 350 アミノ酸からなる基本構造単位のアミノ酸配列の相同性に基づいて、NJ 法を用いて分子系統樹を作製した (図 3.3.10)。このとき、*Oas2*、*Oas3* のように基本構造を複数持つものについては、それぞれの基本構造単位ごとに分割して計算を行った。そうしたところ、2-5OAS ファミリーは大きく5つのグループ (OAS1 グループ、OAS-C 末グループ、OAS2-N 末グループ、OAS3-N 末グループ、OASL グループ) に分類できることがわかった。また、OAS1 グループに関しては、ラット OAS1、OAS2 分子を含む齧歯類 OAS1 サブグループを形成していることが明らかになった。さらに、OASL グループについては、ユビキチン様領域を持っているニワトリ OAS も含まれており、進化の過程の早い時期に分かれたことが示唆された。

マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子の mRNA の発現

2-5OAS 遺伝子の mRNA の発現について検討を行った。これまで、2-5OAS 遺伝子についてはヒトでの解析が主流であり、また、IFN の抗ウイルス作用に主眼をおいた研究がなされてきたことから、2-5OAS 遺伝子の発現については細胞レベルの解析以外、ほとんどなされていなかった。そこで、まず未刺激の生理的な状態での各種臓器における発現についてノザンハイブリダイゼーションによって検討を行った (図 3.3.11A)。このとき、*Oas1a* と *Oas1b* および *Oas1f* と *Oas1g* は塩基配列の相同性が非常に高いためにノザンハイブリダイゼーションでは区別ができないが、PCR 法による解析では区別のできない両者の発現には差がなかった (図示さず)。ヒト OAS1 のマウスホモログ *Oas1a/Oas1* および OASL サブファミリー遺伝子 *Oas11*、*Oas12* はほぼ全ての臓器で恒常的な発現が認められたが、特に腸管や子宮などの粘膜系の組織および免疫系の組織で特に強く発現していた。*Oas11*、*Oas12* はほぼ同様な発現分布であったが、*Oas11* は肺で、*Oas12* は胃で特に強く発現しているなど、違いも認められた。一方、ヒト OAS2 のマウスホモログである *Oas2* は特に子宮で強い発現が認められ、ヒト OAS3 のマウスホモログである *Oas3* は腸管 (特に小腸) と子宮、免疫系の組織で発現しており、限られた一部の組織でのみの発現分布が認められた。また、OAS1 サブファミリー遺伝子も発現が限局しており、*Oas1d* 以外の遺伝子は基本的に卵巣で強く発現していた。また、*Oas1c*、*Oas1d* は免疫系の組織で、*Oas1f*、*Oas1g* は小腸での発現も認められた。以上のことから、2-5OAS ファミリー遺伝子は生理的な状態でそれぞれ異なる発現分布をしていることが明らかになった。

次に、2-5OAS ファミリー遺伝子の IFN による発現誘導について検討した。強力な IFN 誘導作用を持ち、疑似ウイルス感染状態を作り出すことができる poly I:C を尾静脈内投与 12 時間後の小腸、子宮、肝臓、脾臓における発現をノザンハイブリダイゼーションで確認した (図 3.3.11B)。OAS1 サブファミリー遺伝子は誘導レベルが弱かったものの、全ての 2-5OAS 遺伝子は poly I:C 刺激により遺伝子発現が誘導されることがわかった。

マウス 2-5OAS ファミリー遺伝子の組み換えタンパク質を用いた解析

マウス 2-5OAS ファミリー分子の dsRNA 結合能と 2-5OAS 酵素活性を検討するため、マウス 2-5OAS 遺伝子 cDNA を pET-16b プラスミド発現ベクターに導入することにより、大腸菌内で His-tag 融合組み換えタンパク質を産生させた。始めに dsRNA 結合能を、poly I:C との結合を抗 His-tag 抗体を用いたウエスタ

ンブロットティングにより確認する方法で評価した (図 3.3.12A-D)。2-5OAS ファミリー分子は全て poly I:C と結合することから、dsRNA と結合する能力を有することがわかった。

次に、2-5OAS 酵素活性を poly I:C 結合組み換えタンパク質の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の重合能力をポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより検出する方法で評価した (図 3.3.12E-G)。Oas1a では2量体から8量体程度の重合反応が確認できたのに対して、他の OAS1 サブファミリーではこのような重合反応は確認できなかった。Oas2 および Oas3 は、Oas1a に比較して非常に重合活性は弱いものの、ヒト OAS2、OAS3 の報告と同様、2-5OAS 活性があることがわかった。また、OASL サブファミリーについても、これまでの報告と同様に Oasl1 は2量体のみを形成する能力が確認できたが、Oasl2 にはそのような活性が認められなかった。

以上のことから、マウス 2-5OAS ファミリー分子は全て dsRNA 結合能力はあるものの、2-5OAS 活性についてはヒト 2-5OAS ファミリーとよく対応し、齧歯類特有のサブファミリーについては、OAS1 サブファミリーは活性がなく、OASL サブファミリーについては RNase L 活性化能のない2量体を合成する能力しかないことがわかった。

```

10      20      30      40      50      60
TTTCTAGTTCAGCCAGCCTAGGAGACACAGGACCTGCTGGCTGCAGAGGTAAGCTGGA
70      80      90      100     110     120
CCTAGGATGGAGCAGGATCTGAGGAGCATCCCGCCTCGAAGCTTGATAAGTTCATAGAG
M E Q D L R S I P A S K L D K F I E
130     140     150     160     170     180
AACCATCTCCCGGACACCAGCTTCTGTGCTGACCTCAGAGAAGTCATAGATGCCCTGTGT
N H L P D T S F C A D L R E V I D A L C
190     200     210     220     230     240
GCTCTCTGAAAGGACAGATCCTCCGGGGCCCCCTCCGCCAATGAGGGCCTTAAAGGG
A L L K D R S F R G P V R R M R A S K G
250     260     270     280     290     300
GTCAAGGGCAAAGGCACCGCTCAAGGGCAGGTCAGACCTGACCTGGTGGTGTCTCCTT
V K G K G T A L K G R S D A D L V V F L
310     320     330     340     350     360
AACAATCTCACCAGCTTTGAGGATCAGTTAAACCAACAGGGAGTGTGATTAAGGAAAT
N N L T S F E D Q L N Q Q G V L I K E I
370     380     390     400     410     420
AAGAAACAGCTGTGCGAGGTTACAGCATGAGAGACCTTGTGGAGTGAAGTTGAGGTCAC
K K Q L C E V Q H E R R C G V K F E V H
430     440     450     460     470     480
AGTTTAAGGAGTCCCACTCCCGGCTCTGAGCTCAAGCTGAGCGCCCCCGACCTGCTG
S L R S P N S R A L S F K L S A P D L L
490     500     510     520     530     540
AAGGAGGTGAAGTTGATGTGCTGCCAGCCATGATTACATGATCATCTTAACATCCTC
K E V K F D V L P A Y D L L D H L N I L
550     560     570     580     590     600
AAGAAGCCTAACCAACAATCTACGCCAATCTCATGAGTGGCTACCGCCGGGAAGGAG
K K P N Q Q F Y A N L I S G V P A K E
610     620     630     640     650     660
GGCAAGTTATCGATCTGCTTTTGGGGCTTCAGAAGTACTTCCCTGAAGTGTGCCCCAAC
G K L S I C F M G L Q K Y F L N C R P T
670     680     690     700     710     720
AAGCTGAAGCGCTCATCCGCTGGTACGCACTGGTACCACTGTGTAAGGAGAAGCTG
K L K R L I R L V T H W Y Q L C K E K L
730     740     750     760     770     780
GGGGACCCGCTGCCCCACAGTATGCCCTGGAGCTGCTCACACTCGATGCTGGGAGTAT
G D P L P P Q Y A L E L L T L D A W E Y
790     800     810     820     830     840
GGGAGTCCAGTAACATAAATTCACACAGCCAGGGCTTCTGAACCGTCTTGGAACTGGTC
G S R V T K F N T A Q G F *
850     860     870     880     890     900
ACCAAGTACAAACAGCTTCAAATCTACTGGACAGTGTATTATGACTTTCGACATCAAGAG
910     920     930     940     950     960
GTCTCTGAAATACCTGCACCAACAGCTCAAAAAAGACAGGCTGTGATCTTGGACCCCACT
970     980     990     1000    1010    1020
GACCCAAACAGGAACATAGCCGGTTTGAACCCAAAGGACTGGAGGCGTCTAGCAGGAGAG
1030    1040    1050    1060    1070    1080
GCTGCCGCTGGCTGCAATACCCATGCTTTAAGTACAGGGACGGTTCCTCAGTGTGCTCC
1090    1100    1110    1120    1130    1140
TGGGAGGTGCCGACGGAGGTTGCAGTCCCAACGAAGTATCTCTTTTGTCTATTTTCTGG
1150    1160    1170    1180    1190    1200
TTATTGTTTTGGTCTTTGTTTCATTTTCATCTTTGGGAAGACTTCATCTGGATAGCCAGA
1210    1220    1230    1240    1250    1260
GTGTCTTGGATATTGCCATCTCTCTGCCCTTAGCGCTGGCATGACTGCAGCTAGCCCTGG
1270    1280    1290    1300    1310    1320
TATGCCCTGCCCTCCTTCCATCCTCAAGTGGACAAGAAGCTGGGCATGTGTTTTCTGTGAG
1330    1340    1350    1360    1370    1380
CCCAAGTGGACCTGTCCAGGATGCTCCAGAGTCCAGACCATGCTCTGCTCTGCTGCAGGG
1390    1400    1410    1420    1430    1440
CCTTGACCCAGAGAAGACAGGAAGGTGCCCAAGCCCAAGAGAGGGAGGGTCCAACCTGT
1450    1460    1470    1480    1490    1500
GATCAGACTCCAGGCTTCTGTCCTCCCTCAACCCCTGCACAGACAGCCTTTCTCACA
1510    1520    1530    1540    1550    1560
GCCTGCTTTTATCTGCCTTGTCCCCAACAGTGTCTCTGGGAGACAAGAGATTGAGAAGG
1570    1580    1590    1600    1610    1620
AGAATATTATGGTTGTATATGGTTGGCCAGGGAATGGCACTGTTAGGAGGTGTGGCCA
1630    1640    1650    1660    1670    1680
TGTTGGAGTGGGTGTGGCCCTTGTGGGTGTGGGCTTTCTCTGTCTTAGCTGCCGGAAGT
1690    1700    1710    1720    1730    1740
CAGTATTCTGCTAGCAGCCTTCCAGATGAAGATGTAGAAGTCTCAGCTCCTCCTGCACCAT
1750    1760    1770    1780    1790    1800
GCCTGCCCTGGACGTTGCCATGCTCTTGCCCTTGGTTAATAATGGACTGAACGCTGAACTTG
1810    1820    1830    1840
TAAGCCAACCCCAATTAATGTTGTTTTAT

```

図3.4.1 *Oas1d* cDNAのクローニング

これまでcDNAの一部の配列のみが報告されていたL1遺伝子 (*Oas1d*) のcDNA全長を5'-および3'-RACE法を用いてクローニングを行った。報告されていた部分 (GenBank: X55982) を青で、5'- (赤) および3'- (紫) RACE法のために設定したプライマー部分をそれぞれ示す。*Oas1d*は251アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

```

10      20      30      40      50      60
GGCTGCAGTCAGCAACATTCTGCTCCAGGATGCGGAAAACCTTAGCAGCACTCGGA
      M A K N L S S T R I

70      80      90      100     110     120
TTGCTCTGCGAGCACCCGGCTTGGAGGTTGGATAAGTTCATAGAGGGTCACCTCCTTG
A L C S T P A W R L D K F I E G H L L G

130     140     150     160     170     180
GTGACATCACCTTCTTACTGAGCTCAGAACAGACGTGAACCCATAAGTCTTCTCTGA
D I T F L T E L R T D V N S I S A F L K

190     200     210     220     230     240
AGGAGAGATGCTTCCAGGTGCCGCCACCTATGAGGGTCTCCAGGGTTGTGATGGGTG
E R C F Q G A A H P M R V S R V V M G G

250     260     270     280     290     300
GTTCCACAAATCGATACACTGTCTCAAGGGCAGGTCAGAGGTCGACCTATTGGTATTCT
S Y N R Y T V L K G R S E V D L L V F F

310     320     330     340     350     360
TTAATAATCTCACCTGCTTTGAGGATCAGTTCAGCTACAGAAAGAGGTCATTGAGGAAA
N N L T C F D D Q F K L Q K E V I E E I

370     380     390     400     410     420
TTCAGAAACACCTGTGCCAGTTCAGCAAGAAAACGACTGAGAGAGAAGTTTAAAGTCC
Q K H L C Q F Q Q E K R L R E K F K V Q

430     440     450     460     470     480
AGAGCTCAGACCAGCCCAACTTTAGTCCGTGAGCTTCAAACAGAGCTACCCCAAGTTTC
S S D Q P N F R S V S F K L S Y P K F Q

490     500     510     520     530     540
AGCAGGAGGTGGAATTCATATCAGACAGCCATGATGCGCCGTGATGAAGTGAGAAGAA
Q E V E F H M Q T A Y D A L Y E V R R K

550     560     570     580     590     600
AAGAGAATCATAACTGTGAAATCTACAACAAAGTATACGCCCGACTCATCCGTGAGTGCA
E N H N C E I Y N K V Y A R L I R E C T

610     620     630     640     650     660
CCATGCTGGGCAAGGAGGGCGAGTTCAACATCTGCTTTCATGGAGCTTCAGCAAGACTTTC
M L G K E G E F N I C F M E L Q Q D F L

670     680     690     700     710     720
TGTGGAACGTCCATGCGAGCTGAAGAACCCTATTTGTCTGGTCAAGCACTGGTATCAAC
W K R P C E L K N L I C L V K H W Y Q L

730     740     750     760     770     780
TGTGTAAGGAGAAGCTGAGGGAGCCGCTCCACAGTACGCCCTGGAGCTGCTCACTG
C K E K L R E P L P P Q Y A L E L L T V

790     800     810     820     830     840
TCTATGCTGGGAACATGAGCTTCCAGACAAACATGAAACACAGACAGCTCGGGGTTTCC
Y A W E H E L P D K H E T Q T A R G F R

850     860     870     880     890     900
GGACCGCTTAGAACTGATCACTAAGTACCTATGCTCTCGAATCTACTGGACATTGTATT
T V L E L I T K Y L C L R I Y W T L Y Y

910     920     930     940     950     960
ATGACGTTCTACATGAACAGGTCAATGCCCTACCTGTACTCACAGGTCAAAAAGTCAAGT
D V L H E Q V N A Y L Y S Q V K R V S P

970     980     990     1000    1010    1020
CTCTGATCTTGGACCCAGCAGACCCCAACATGGAACGTGGCTGGTTAAACTTACAGGGCT
L I L D P A D P T W N V A G L N L Q G W

1030    1040    1050    1060    1070    1080
GGTGCATACGCGAGAAGAGGCAAAAGCCTGGCTGGATTACCCATGCTTTAAGAACAGGG
C I L A E E A K A W L D Y P C F K N R D

1090    1100    1110    1120    1130    1140
ATGGTTCCTCCGAGTGAGCTCCTGGGATGTGCCCGCAGACAAAAAGGATTTGTCTTCTGT
G S R V S S W D V P P D K K G F V F L *

1150    1160    1170    1180    1190    1200
GAGCACCAAAGCATCTGCCAAGGAGACTCCAGAGTCCAGGGTCATGTCTCTCTGCTG
      *

1210    1220    1230    1240    1250    1260
TAAGACTTTGACCTAGAGAGGACCGGATGGTCTCATGGAGCCAGCGAGGGGATCCAAAC
      *

1270    1280    1290    1300    1310    1320
CTGTGATCAGACTCCAGGCTTCTGATCCTCGCTGCCCGCCCATGGCAGCCTTCTCTCAC
      *

1330    1340    1350    1360    1370    1380
AGCCTGCTTCACTGCTAAGCCTTAACAGTGTTTTCGGGAGTCAGGCTGTGATGGAC
      *

1390    1400    1410    1420    1430    1440
AGAGATTGACTTCCATCTGTCCACCTGTTGGGAGTTCTGTCCAATAGTGGCTGATCAT
      *

1450    1460    1470    1480    1490    1500
CATCAACAAACCACAGCAAGCCATGAGATGGGTGTACTCTGAGGGATCCATCCATC
      *

1510    1520    1530    1540    1550    1560
TCACATAGAAACTCTTCCACAGCTGCACATGTCCCGGAGCCATGGGAATCTGTCTAGTGA
      *

1570    1580    1590    1600    1610    1620
TCATCAGGCTGCATGTTTCTGCAACATGCAGGCTGGGTTTCTGGCAGTCAGGAGAATA
      *

1630    1640    1650    1660    1670    1680
AAATTGCATGGACTTTGAAATTTTGTATGTGTTTGTGAGGATGAAATTTGAAGCACTGAAT
      *

1690    1700    1710
TAAAGCAAAATGCATCAATGAAAAAAAAA
      *

```

図3.4.2 *Oas1e* cDNAのクローニング

Oas1a cDNAをプローブとして用いて2-50ASゲノム領域を含むBACクローンのサザンハイブリダイゼーションを行い、弱くシグナルを与える領域の塩基配列情報を元に、翻訳開始コドンを含む部分にプライマー（赤）を設計して3'-RACEを行いcDNA全長のクローニングを行った。*Oas1e*は369アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

```

10      20      30      40      50      60
CTCAGGATGGCGAGGGAACTCTTCATAACCCCAATCTGGAGGCTGGATAACTTCATAGAG
M A R E L F I T P I W R L D N F I E

70      80      90      100     110     120
GATCAACTCCTTCTTGACACCACCTTCTTACTGAGCTCAGAGCAGACATCGACTCCATA
D Q L L P D T T F L T E L R A D I D S I

130     140     150     160     170     180
AGTGCCTTCTGAAGGAGAGATGCTTCCAAGGTGCCACCCACCCATGAGGGTGCAGGAGG
S A F L K E R C F Q G A T H P M R V A R

190     200     210     220     230     240
GTTGTGATGGGAGGCTCCTATGATGAACACAATGCATCAAGGGAAAGTCAAGGCCAAC
V V M G G S Y D E H N A L K G R S E A N

250     260     270     280     290     300
ATGGTGGTGTCTTTAATGATCTCACCAGCTTTGAGGACCAAGTAAAGTGGCAGCAAGTG
M V V F F N D L T S F E D Q L K W Q Q V

310     320     330     340     350     360
TTCATTGAAGAAATTCGGAAACACCTGCTCCAGTTGCAGCAAGAAAGCCATGTAAACTC
F I E E I R K H L L Q L Q Q E K P C K L

370     380     390     400     410     420
AAGTTTGAAGTGCAGAGCTCAGAGGAGCCACACCAGGCTCTGACCTCAAGTGTGC
K F E V Q S S E E P N T R S L T F K L C

430     440     450     460     470     480
TCCCCAGAGCGCCAGGAGGTTGAAATTTGATGTCAGCCAGCCATGATGCTCTGTAT
S P E R Q Q E V E F D V Q P A Y D A L Y

490     500     510     520     530     540
GAAGGGGATACGCAAGTCTTTGAAATCCATTAACACAAAGTCTACGCCCAACTC
E G G Y C K S F E S I N Y N K V Y A Q L

550     560     570     580     590     600
ATCCATGAGTGCACCACCTGGAGAAGGAGGCGAGTTCATCTGCTTACCAGCCTT
I H E C T T L E K E G E F S I C F T D L

610     620     630     640     650     660
CATCAGAGCTTCTGAGGTATCGTGCGCCCAAGCTCTGGAACTCATCCGCTTGGTCAAG
H Q S F L R Y R A P K L W N L I R L V K

670     680     690     700     710     720
CACTGGTATCAACTGTGTAAGGAGAAGCTGAGGGGACCGCTGCCACAGTATGCGCTG
H W Y Q L C K E K L R G P L P P Q Y A L

730     740     750     760     770     780
GAGCTGCTACAGTCTACGCTTGGGAATTTGGGGTCCAAGACAGCTTTGGACTCCATGCA
E L L T V Y V W E F G V Q D S F G L H A

790     800     810     820     830     840
GCCCCAGTCTCCGAACGGTCTTAGAACTGGTCAACCAAGTACAAATGCCTTCTAATCTAC
A Q C F R T V L E L V T K Y K C L L I Y

850     860     870     880     890     900
TGGACATGGTTTTATGACTTTCGACTGAGATCTCTGACTACCTGCACGGACAGATCAAA
W T W F Y D F R P E I S D Y L H G Q I K

910     920     930     940     950     960
AAAGCCAGGCTCTGATCCTGGATCCGGCAGACCCAAAGGAACGTGGCTGGTTTCAGAC
K A R P L I L D P A D P T R N V A G S D

970     980     990     1000    1010    1020
TTACAGGCATGGGACCTGCTGGCAAAGGAGGCTCAGACCTGGATACATTCAAATTTTTT
L Q A W D L L A K E A Q T W I H S N F F

1030    1040    1050    1060    1070    1080
AGGAACTGTGATATGTCCTTGTGAATGGCTGGGAAGTGTCCGAGAGAAACAAATATGT
R N C D M S L V N G W E V S P E K Q *

1090    1100    1110    1120    1130    1140
GTCTTCCAGTGCAGTGTAGCACTTGCCTAGAAGGCTCCAGAGTCAAGATCATGTGCTC

1150    1160    1170    1180    1190    1200
CTCCGCTGAAGACTTTGACCTAGAGAGGACAGGATGGTCTCATGTCTCCAGCGAGGGG

1210    1220    1230    1240    1250    1260
TATCCAACTGTGATTAGACTCCAGGCTTCTGATCCCTGCCTGCCATGGATAGCCTTCC

1270    1280    1290    1300    1310    1320
TCACAGGCTGCTTCACTGCTTAGCTTCCAACAGTGTCTCTGGGAGTCAAGCTGTGAT

1330    1340    1350    1360    1370    1380
GGACAGAGAAGAAGCAAGCTCGACTTCCATCTGTCCACCTGTTGGGAGTTCGTCCAA

1390    1400    1410    1420    1430    1440
TAGTGGCTGATCGTCATCATCAAATCACAGCAAGCCATGGGGGAGGGTGCACCTCAGGGG

1450    1460    1470    1480    1490    1500
AGTCCTCAGACCACACAGAACTTTTCAGCAGTGCATGTGGCCCTGGCACCTGGGAATC

1510    1520    1530    1540    1550    1560
TGGCCAGTGTTCATCAAGGTGCAGTGTTCACAAATGCAGGCGGGTTTTATGGCAGTT

1570    1580    1590    1600    1610    1620
CGGGAAAAATAAACTGCGGATACTTTAAATTTATGACTTTAAAAATTTAGTGTATGTGTG

1630    1640    1650    1660    1670    1680
TGTGTGTATATATATATATAAATTTGAAGCACTGAATTTAAATCAAAATGCATTGAATTA

1690    1700    1710
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図3.43 *Oas1f*cDNAのクローニング

ESTデータベースより*Oas1a*と相同性の高い配列として見つかったESTクローン

(AA794503)のcDNA全長を3'-RACE法を用いてクローニングを行い、PCRプライマーがクロスしたために得られた*Oas1f*cDNAの全長を示す。ESTクローンに相当する部分を青で、3'-RACE法のために設定したプライマー部分を赤でそれぞれ示す。*Oas1f*は356アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

```

10      20      30      40      50      60
CAAACCTCCTGGCCCTCAGGATGGCAGGGAACTCTTCAAGAACCCCAATCTGGAGGCTGG
      M A R E L F R T F I W R L D

70      80      90      100     110     120
ATAAGTTCATAGAGGATCAACTCCTTCC TGACACCACCTTCTTACTGAGCTCAGAGCAG
      K F I E D Q L L P D T T F L T E L R A D

130     140     150     160     170     180
ACATCGACTCCATAAGTCTTCTTGATGGAGAGATGCTTCCAAAGGTGCCGCCATCCTCG
      I D S I S A F L M E R C F Q G A A H P V

190     200     210     220     230     240
TGAGGGTCTCCAGGGTGTGATGGGTGGCTGTACAAATGAATACAGTGTGCTCAAGGGCA
      R V S R V V M G G C Y N E Y T V L K G R

250     260     270     280     290     300
GGCTGAGGCCAACATGGTGGTGTCCCTTATCAATCTCACAGCTTTGAGGATCAGTTCA
      S E A N M V V F L I N L T S F E D Q F N

310     320     330     340     350     360
ACGGACAGGTAGTGTTCATTGGAGAAAFTTGGAGACACCTACTCCAGTTGCGCAGAGAGA
      G Q V V F I E E I W R H L L Q L Q Q E K

370     380     390     400     410     420
AACTATGTAAACTCAAGTTTGAGGTCCAGAGCCCAAAGGAGCCCAACGCCAGTTTCTGA
      L C K L K F E V Q S P K E P N S R F L S

430     440     450     460     470     480
GCTTCAAGCTGAGCTCCCGAGGCCAGCATGAGTTGGAATTTGATGTGACGCCAGCTT
      F K L S C P E R Q H E L E F D V Q P A Y

490     500     510     520     530     540
ATGATGCCCTGTATGAAAGTAAGACACTTCAAGGCCTTTGACTCCAGTAACACACAAAG
      D A L Y E V R H F K P F D S S N Y N K V

550     560     570     580     590     600
TCTACGCCCAACTCACCCATGAGTGCACACACATGGAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCATCT
      Y A Q L T H E C T T L E K E G E F S I C

610     620     630     640     650     660
GCTTCCAGCACCTCCATCAGAGCTTCCCTGAGGTATCGTGGGCCAAGCTCTGGAACTCA
      F T D L H Q S F L R Y R A F K L W N L I

670     680     690     700     710     720
TCCGTTTGGTCAAGCACGGTATCAACTGTGTAAGGAGAAAGCTGAGGGGGCCGCTGCCTC
      R L V K H W Y Q L C K E K L R G P L P P

730     740     750     760     770     780
CACAGTACGCCCTGGAGCTGCTCACAGTCTACGTCGGGAATACGGGATCCACGAAACC
      Q Y A L E L L T V Y V W E Y G I H E N P

790     800     810     820     830     840
CTGGACTCCATACAGCCCAAGTGCCTCCGACATGCTTTAGAACTTGTCCACCAAGTACAAAC
      G L H T A Q C F R T V L E L V T K Y K R

850     860     870     880     890     900
GGCTTCGAATCTACTGGACATGGTGTATGACTTTCAACAGGATCTCTGACTACCTGC
      L R I Y W T W C Y D F Q H E I S D Y L Q

910     920     930     940     950     960
AGGGACAGATCAAAAAGCCAGGCCCTCGATCCTGGATCCAGCAGACCCCAAGGAATG
      G Q I K K A R F L I L D P A D P T R N V

970     980     990     1000    1010    1020
TGGCTGGTTCAGACTTACAGGCATGGGACCTGCTGGCAAGGAGGCTCAGATCTGGATAG
      A G S D L Q A W D L L A K E A Q I W I D

1030    1040    1050    1060    1070    1080
ATTTCGACTTCTTTACGAAACATGATATGTCATTTGTGGAAGCCTGGGAAAGTATGCCAG
      S T F F T N H D M S I V E A W E V M P E

1090    1100    1110    1120    1130    1140
AGAGACAAGAATGTGCTTCCCTGTGAGCACCCCCAGCATCTGCCTAGGAGACTCCAGAGT
      R Q E C V F L *

1150    1160    1170    1180    1190    1200
CAGGGGCATGTCCCTCCTTCTGTAAGACCTTGACCTAGAGAGGACAGACAGGATGGCAC
      1210    1220    1230    1240    1250    1260
TCAAAGCTCCAGCGAGGGGCATCCAACCTGTGATCAGACTCCAGGCTTCTGATCCCTGCC
      1270    1280    1290    1300    1310    1320
TGCCCATGGACAGCCTTCTCCACAGGCTGCTTCTGCTGCTTAGCTTCCAAACAGTGTCTT
      1330    1340    1350    1360    1370    1380
CTGGAGTCCAGACTGTGATGGACAGAGAAAGCAAGCTCAGACTTCCATCTGTTCACCT
      1390    1400    1410    1420    1430    1440
GTTGGAGGGTTATGTCCAAATAGTGGCTGATCATCATCAACAACCAAGCAAGCAAGCAAG
      1450    1460    1470    1480    1490    1500
GGGGGGTGCACCTCTGAGGGAGGAGTCCACAGACCACACAGAAACCTTTTCAGCAGTGCATG
      1510    1520    1530    1540    1550    1560
TGCCCTTGGAGCCCTGGGAATCTGGCCAGTGTTCATCAAGGTGCACGTTTTCGCAACAT
      1570    1580    1590    1600    1610    1620
GCAGGCTGGGTTTATGGTAGTGCAGGAAATAAAATTGCATGCAATTTAAATTTATGAT
      1630    1640    1650    1660    1670    1680
TTTAAAACTTAGGGGTGTGTGTATGAGATTTGAAGCACTAAAATAAAGCAAAACGCAAT
      1690    1700    1710    1720
TGAATTTAAACTAATCTAAAAAATAAAAAAAAAA

```

図3.4.4 *Oas1g* cDNAのクローニング

ESTデータベースより*Oas1a*と相同性の高い配列として見つかったESTクローン

(AA794503)のcDNA全長を3'-RACE法を用いてクローニングを行った。ESTクローンに相当する部分を青で、3'-RACE法のために設定したプライマー部分を赤でそれぞれ示す。*Oas1f*は361アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

Oas2 cDNA

```

10      20      30      40      50      60
AAACCCGGTGCACGGCAGAAAGCCAGGACTTACAGTACAGTCTGCTGCTCCACAAAT
70      80      90      100     110     120
GACAAGACCAGTAGCAACGATGGGAAACGGCTGACGGAAACGGTTCATCTGACAGGT
      M G N W L T G N W S S D R S
130     140     150     160     170     180
CATCTGGCTATTCATCTGGCTGGTCACTGGTGGGTCTTCAGGGTGCCTCCGGGCCAG
      S G Y S S G W S P G G S S G V P S G P V
190     200     210     220     230     240
TGCACAAGTTAGAAAAGTCTATCCAGGAAACCTCACACCCAAAGAAAACGTCTGTAAGC
      H K L E K S I Q A N L T P N E N C L K Q
250     260     270     280     290     300
AGATTGGCGTCTCGGTGCCATCGCAGAAAGGTAGAAAGGTATATCCAGAAAACCTCA
      I A V S S V F P S Q K L E G Y I Q E N L K
310     320     330     340     350     360
AACCTAACAGAGAAATCTCTGAAGCAGATAGACACAGGCCGTGGATGCCATCTGGGACCTGC
      P N R E S L K Q I D Q A V D A I W D L L
370     380     390     400     410     420
TGCAGATCAGATCCCTGTGAAGGAAGTGGCTAAGGGTGGCTCCATGGCCGGGAAACAG
      R S Q I P V K E V A K G G S Y G R E T A
430     440     450     460     470     480
CCCTAAGAGCTGCTCCGATGGTACCCTGGTCTCTCATGGACTGCTCCACAGATCTCC
      L R G C S D G T L V L F M D C F Q Q F Q
490     500     510     520     530     540
AAGATCAGATAAAAATACCAAGATGCAATACCTTGAAGTCAATGAACTGGCTGAAAATCC
      D Q I X Y Q D A Y L D V I E L W L K I H
550     560     570     580     590     600
ATGAGAAGAAAGTCAATAAAGCATGAAACATGCCCTTGTAGTACAAGTGTCTGTACCAGGGC
      E K K S V K H E H A L V V Q V S V P G Q
610     620     630     640     650     660
AGAGAATACCTCCCTGCAATTTACTTCCAGTCTTCAAATCTTACGCTCAATGAGAAATCCA
      R I L L Q L L P V F N P L R S N E N P S
670     680     690     700     710     720
GCTCTGTGTCTATGTGGATCTCAAAAATCCATGGATCAAGTAAGAGCTCACAGGGG
      S C V Y V D L K K S M D Q V R A S P G E
730     740     750     760     770     780
AGTTCTCAGACTGCTTCCACACATGCGAGCAGCGGTTTTTCAAGAAATATCCCAAGAC
      F S D C F T T L Q Q R F F K K Y P Q R L
790     800     810     820     830     840
TGAAGAAATTTGATCCTATTTGGTCAAGCAGTGGTATGAAACAGTCCAGGAAAGTGGAAA
      K D L I L L V K H W Y E Q C Q E K W K T
850     860     870     880     890     900
CACCCCACTCAGCCATTTCTGTACGCACTGGAACTGCTCACTGTGTGCTGGGAAAC
      P P P Q P L L Y A L E L L T V C A W E Q
910     920     930     940     950     960
AGGGCTGCAAGCTGAAGACTTCCACATGGCACAAGGCTCAGGACCTGCTGCGACTTA
      G C Q A E D F D M A Q G V R T V L R L I
970     980     990     1000    1010    1020
TCCAGCGCCGACAGAGCTGTGTGCTACTGGACAGTCAATTAACAATTTGAGGATGAGA
      Q R P T E L C V Y W T V N Y N F E D E T
1030    1040    1050    1060    1070    1080
CAGTCCGGAACATCCCTTCTGCAAGCAGTCAAGTCCCAAGACAGTCACTTTGGATCCAA
      V R N I L L H Q L R S Q R F V I L D P T
1090    1100    1110    1120    1130    1140
CTGACCCCAACCAATTAATGAGGCAAGATGATGGGTTCTGGGAGCTACTGACAGGGAAG
      D P T N N V G K D D G F W E L L T E E A
1150    1160    1170    1180    1190    1200
CTATGGCTGGCTGACTCTCCAGGCTGAAATACAGTCACTGACCAATTTGGGATG
      M A W L Y S P S L N T E S P A P Y W D V
1210    1220    1230    1240    1250    1260
TTCTGCCATGCCACTTTTCTGCTCACTCCAAAGCAGTCAAGAAAGTTCATCAAGAGCT
      L P M P L F V T P S H L L N K F I K D F
1270    1280    1290    1300    1310    1320
TTCTCCAGCCCAACCAAGCTCTTCCAAAGCAGATCAAGGAAAGTGTGACATTATATGTT
      L Q P N K L F L K Q I K E A V D I I C S
1330    1340    1350    1360    1370    1380
CCTTCTTAAAATGCTGCTTCTTGAATCTGACACCAAGTCTGAAAGCCGCTCAAGG
      F L K N V C F L N S D T K V L K T V K G
1390    1400    1410    1420    1430    1440
GAGGATCCAC TGCCAAAGCCACAGCTCTGAAAGCGGGATCAGATGCTGACATTGTGTGT
      G S T A K G T A L K R G S D A D I V V F
1450    1460    1470    1480    1490    1500
TCCTCTCCCTGGTGGAGAGTTACGACTCTTAAAAACCAACCCGCTCCAGTTCGGTCAAG
      L S S L E S Y D S L K T N R S Q F V Q E
1510    1520    1530    1540    1550    1560
AGATCCASAAGCAGTTAGAAGAATTCGTGAGCCGCAAGAGTGGAGGTTGACGTTTGAGA
      I Q K Q L E E F V Q A Q E W E V T F E I
1570    1580    1590    1600    1610    1620
TTTCAAAAATGGAAGGCTCCAGAGTCTGAGTTTACCTTGAAATCCAAGACTCTCAATG
      S X W K A P R V L S F T L K S K T L N E
1630    1640    1650    1660    1670    1680
AAAGTGTGGAGTTGGATGTCTCTCCGCTTATGATGACACTAGGTCAACTCGGCTGACT
      S V E F D V L P A Y D A L G Q L R S D F
1690    1700    1710    1720    1730    1740
TCACCTCAGGCCCGAAGCTTACAAGGATCTATGAGCTGTGTGATCACAGSACATCA
      Y L R P E A Y K D L I E L C A S Q D I K
1750    1760    1770    1780    1790    1800
AAGAAGGAGAGTTTCTATCTGTTTACTGAGCTGAGAGAAAATTCATCAAAACCCGGC
      E G E F S I C F T E L Q R N F I Q T R P
1810    1820    1830    1840    1850    1860
CCACCAAACTGAAGATCTACTCCGCTGATCAAGCACTGGTACAACAAGTATGAAAGGA
      T K L K S L L R L I K H W Y K Q Y E R K
1870    1880    1890    1900    1910    1920
AGATGAAGCCAAAGCAATCTTACCCCAAGTACGCTTGGAGCTCCTCACCGTGTATG
      M K P K A S L P P K Y A L E L L T V Y A
1930    1940    1950    1960    1970    1980
CCTGGGAGCAGGCCAGTGGCACAGATGACTTTGACATTTGTAAGGCTCCGGACCGTCC
      W E Q G S G T D D F D I A E G L R T V L
1990    2000    2010    2020    2030    2040
TGGACCTGGTATAAAAATACCGGAGCTTGCATCTTCTGACAGTCAATTAACAATTTG
      D L V I K Y R Q L C I F W T V N Y N F E
2050    2060    2070    2080    2090    2100
AAGAGGAATACATGCGGAAGTCTTACTGACCCAGATCCAGAAAAGAGGCTGTAAATCC
      E E Y M R K F L L T Q I Q K K R P V I L
2110    2120    2130    2140    2150    2160
TGGATCCAGCAGATCCACAGGCGATGTTGGAGGAGGAGCCCTGGTCTGGCATCTTC
      D P A D P T G D V G G G D R W C W H L L
2170    2180    2190    2200    2210    2220
TAGCTGAAGAAAGCAAGAGTGGCTGTCTCCCTCCCTTGTTCCTCAAGTGGAGCAAAAAGGC
      A E E A K E W L S S P C F Q V E Q K G L
2230    2240    2250    2260    2270    2280
TGGTACAGCTTTGGAAAGTGGCAGTAAATGACAGACCCCGAAGCTGTGGAGGTCAGATCT
      V Q P W K V P V M Q T P G S C G G Q I Y
2290    2300    2310    2320    2330    2340
ACCCCACTGTGGTGGAGTTACTAAGTAGGAGTCCATTCAGCTCTGGAAGACGCTCTGG
      P T V G G V T K +
2350    2360    2370    2380    2390    2400
AGTGACTGGCAAGACTCAGACTGTGTTAGAAAAGGAGCCCTGGTTCAGTCTCTCTGG
2410    2420    2430    2440    2450    2460
CAGGCTCGCACCTCAATTCCTTCTTGGAAACAAGCATGGGATTAATCCCTCCCTC
2470    2480    2490    2500    2510    2520
CCCCAGGCTCACAGCACAGGCCCTGCTCTGTGTGATGACCTCCTTCAGAGACACTTG
2530    2540    2550    2560    2570    2580
CCCCATGCACTGATGGGTCTGGGTTTGTCTGTATCTGTGAGTATTTTCTGCTC
2590    2600    2610    2620    2630    2640
CCTGCTCTGTAGTCTCTAGTCAAGCAGCTCCAGACTCACCTGTGTCAAGGTTAAGG
2650    2660    2670    2680    2690    2700
CCCTCCCTAGCCCTTCAAGTGTCAATCCCACTAGCCCTCGGAGTCTTCCATTTGTGG
2710    2720    2730    2740    2750    2760
TCTTTGCTGTCTCTTTCCTTCCCTGTTGGATACAGAGATGTACCATCCATCCAGCAGC
2770    2780    2790    2800    2810    2820
TAGCCAACTCCCTCCCTCCACTCTGCTGTTAAAACCCCTTCTCTGGGGAAATGTAAA
2830    2840    2850    2860    2870    2880
CAATATCTACCTCTCTAATGTCCAGGACAAACTAAGCTGACATTCCTCCCTCCCTGG

```

図3.4.5 Oas2 cDNAのクローニング

```

2890      2900      2910      2920      2930      2940
AAGCCAAAGCTTCCCTGATTGAGCTTAGCTGCTCACAGGAGAGGGGTTACAGGCCTTTGA

2950      2960      2970      2980      2990      3000
AGCTGCCACACTAGAAGATCTGCACCCAGCTAGATGGGTGCAGATGGCTTCCCTGGGGCT

3010      3020      3030      3040      3050      3060
GCATAAAGAGAACCCCTCCCTCATCTTTCTCTCTGTATCCTCTAGCCCTCTCAGAGAT

3070      3080      3090      3100      3110      3120
CCTGTGCAATCAGGGCAGAATAGCATGCAGCTGGTTGAAACCACCTTGCTAAATAACTCAG

3130      3140      3150      3160      3170      3180
GTGAGGGTCCCATAACTTCCCAGCCACCTCCCTTCCAAGAGTGAAGATAACAGTCAAC

3190      3200      3210      3220      3230      3240
AAGCCACAGCTGTGATGTTCATTGATAAGCAGGCTCTGGTGGACTCCTAAAGATGGTGCCA

3250      3260      3270      3280      3290      3300
GTGTGGCTCAGTGAATAGCCCTGCATAACATTTTACACACACCAAATGCTGGTTGATATC

3310      3320      3330      3340      3350      3360
TCTTGCTGGCTGCCAGGGAGCCTTACACCCAGGGCTTTAACGTCACAGAGACATGAGGT

3370      3380      3390      3400      3410      3420
CTAAGCCCTTCGCAATCCCAAGTAAGGCTGAGCCTTTTCTGCTGTGCTTGCTCTGAT

3430      3440      3450      3460      3470      3480
GCATTGAGGATCATGCTGGCCACTGTGCAACTTTTAAAGCAGAGCGGTGCAACATCCCAG

3490      3500      3510      3520      3530      3540
GGAGTTGACTTCTATGTAAACACCTTCATCCATTTCTGATGTATGCTTTGAGGTGGCTCA

3550      3560      3570      3580      3590      3600
GGCTGGGCTAGCCAGCCAGACAGAAATCCTAGGCATGTGATTAGAGGATCAGAACCCT

3610      3620      3630      3640      3650      3660
TCTGGCCCTTCTTCAGGGGAGAGATGGGGCTGAAGGTGGGGTCAAATCTCATGCGGAGT

3670      3680      3690      3700      3710      3720
GATGGAACCCGACATCCCTAGGTGCTAAGGCCCCACCAAATCTCTGGATAAGGAAGTTC

3730      3740      3750      3760      3770      3780
CAGGAATCTTTACTGATAAACATCCCAATGTATCAACAAGGTAGACTCTGACCTCCATGG

3790      3800      3810      3820      3830      3840
GACAGAAGGATCCTGGGTGCTGCTCCCTCCCTGGGGACTCTGCAGTTGGCTGTTCAATTAT

3850      3860      3870      3880      3890      3900
ATGCTTCATAATAAATGGTTTCTTTGTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

3910      3920      3930
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図3.4.5 *Oas2* cDNAのクローニング

ESTデータベースよりヒトOAS2と相同性の高い配列として見つかったESTクローン (AW230357, BE281841) のcDNA全長を5'-および3'-RACE法を用いてクローニングを行った。ESTクローンに相当する部分を青で、5'-RACE法のために設定したプライマー部分を赤で、3'-RACE法のために設定したプライマー部分を紫それぞれ示す。*Oas2*は742アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

Oas3 cDNA

```

10      20      30      40      50      60
AGAGAAACGAAACTCTACTGAGAGTACCGGTCAACATGGACCTGTTCACACGCCAGCCG
          M D L F H T P A G

70      80      90      100     110     120
GAGCTCTGGATAAGCTGGTGGGCCACAACTGCACCCAGCCCTGAGTTACACAGCAGCCG
A L D K L V A H N L H P A P E F T A A V

130     140     150     160     170     180
TACGGGCTGCTCTGGGGTGCCTAAACATCACCTACAGCAGCACAGAGCCCGAGGGTCAC
R G A L G S L N I T L Q Q H R A R G S Q

190     200     210     220     230     240
AGAGACCAAGAGTGATAAGGATTGCCAAGGGAGGAGCCCTATGCCCGGGCACAGCTCTCA
R F R V I R I A K G G A Y A R G T A L R

250     260     270     280     290     300
GAGGTGGCACCGATGTCGAACTCGTCACTTCTCTGCACTGCTCCAGAGCTTTGGTGACC
G G T D V E L V I F L D C F Q S F G D Q

310     320     330     340     350     360
AGAAGACCTGTCACTCAGAGACCCCTGGGGTCCATGCCAAATGTTGCTGGAGTCCCTGGGGG
K T C H S E T L G A H R H L L E S W G G

370     380     390     400     410     420
GCCACCCCGGGCTGGGCTGACTTTGAGTTTCTCAAGTCAAAGGCGCTCCAGGATCTTAC
H P G P G L T F E F S Q S K A S R I L Q

430     440     450     460     470     480
AGTTTCCTCTGGCATCGGCAGACGGGAACACTGGATAGATGTTAGCCCTGGTGGCTGGCT
F R L A S A D G E H W I D V S L V P A F

490     500     510     520     530     540
TTSATGCTCTAGGACAGCCCGCTCTGGAGTCAAGCGACACCCACCGTGTACTCCCTCC
D V L G Q P R S G V K P T P H V Y S S L

550     560     570     580     590     600
TCCTTAGCAGCCACTGCCAGGCGGGGAGTACTCAGCCCTGCTTCACTGAGCCCGGAAAGA
L S S H C Q A G E Y S A C F T E P R K N

610     620     630     640     650     660
ACTTTGTGAACACTCGCCAGCCAGCTTAAGAACTTAATCTCTGCTGGTCAAAACACTGGT
F V N T R P A K L K N L I L L V K H W Y

670     680     690     700     710     720
ACCAACAGTTCAGACACAGGCGCCGAGAGGGCCACACTGCCCGCCAGCTACGCCCTAGAGC
H Q V Q T R A V R A T L P P S Y A L E L

730     740     750     760     770     780
TGGTACCACTCTTGGCTGGGAGCAGGGCTGTGGGAAGGACAGCTTCAAGCTGGCCCAAG
L T I F A W E Q G C G K D S F S L A Q G

790     800     810     820     830     840
GGCTCCGGACGCTCTGGCTGATCCACAGCAGCAAGTACTCTGCAATTTCTGGACGG
L R T V L A L I Q H S K Y L C I F W T E

850     860     870     880     890     900
AAAATATGGCTTCGAGGACCTGCAGTGGAGAGTTCCTGCGAAGGCAGCTTAAGAGAC
N Y G F E D P A V G E F L R R Q L K R P

910     920     930     940     950     960
CCAGGCGCGTGAATCTGGATCCAGCTGATCCAACTGGGACGTGGCAACGGGACAGCCCT
R P V I L D P A D P T W D V G N G T A W

970     980     990     1000    1010    1020
GGCGTGGGATGTGCTGGCCAGGAGGCTGAGTCCAGCTTTAGCCAGCACTGCTTCAAGC
R W D V L A Q E A E S S F S Q Q C P K Q

1030    1040    1050    1060    1070    1080
AGGCCCTCAGGAGTCTTGTGCAGCCCTGGGAGGGGCGGGCCCTGCCACGGGCTGGGATCT
A S G V L V Q P W E G P G L P R A G I L

1090    1100    1110    1120    1130    1140
TGGATTTGGGCCACCCAACTATCAAGGGCTTAACAGGCCCTTGAAGACAAACAAAGGCC
D L G R P I Y Q G P N Q A L E D N K G H

1150    1160    1170    1180    1190    1200
ACCTGCTGTTCAAGTCAAAGGAAAGGAGCCAAAACCTTCCAAATTCAGCTCCAGGATTC
L A V Q S K E R S Q K P S N S A P G F P

1210    1220    1230    1240    1250    1260
CAGAAGCAGCCCAAGATCCCTGCTATGCCCCAACCCCAAGTGGCAATAAAACCCGCAAGA
E A A T K I P A M P N P S A N K T R K I

1270    1280    1290    1300    1310    1320
TCCGCAAGAAAGCAGCTCACCCAAAGACTGTCCAGGAAGCAGCATGGATAGTATCTCAA
R K K A A H P K T V Q E A A L D S I S

1330    1340    1350    1360    1370    1380
GTCAATTTGGATCACCCAGGACACAGCATCTCCACACATGCCCTCTGACCGCTTACGCA
H V R I T Q S T A S S H M P P D R S S I

1390    1400    1410    1420    1430    1440
TCTCCACCCTGGGTACGGATGAGCCAGATCTGTCCACAGATCCCGAGCAAGGATCTAG
S T A G S R M S P D L S Q I P S K D L D

1450    1460    1470    1480    1490    1500
ACTGCTTCATCCAGGACCACTTAGCCGAGTCCCCAGTCCAGCAGCAGGTTGAAGCAGG
C F I Q D H L R P S P Q F Q Q Q V K Q A

1510    1520    1530    1540    1550    1560
CCATCGACGCCATCTGTGTGCTGCCCTCGGGGAGAGAGTGTATACAAAAGTCTTGGAGGTC
I D A I L C C L R E K S V Y K V L R V S

1570    1580    1590    1600    1610    1620
GCAAGGGCGCTCTTTCGGCCGTGGCACAGACCTCAGGGGCACTGCGATGTGAAGTTC
K G G S F G R G T D L R G S C D V E L V

1630    1640    1650    1660    1670    1680
TCATCTTTTATAAAACCCCTCGGGGACTTCAAGGGCCAGAAAGCTCACCAGGACAGATCC
I F Y K T L G D F K G Q K P H Q A E I L

1690    1700    1710    1720    1730    1740
TGGTGCATGACAGGCCCCAGCTAGCAGACTGGTGTCAAAACCCCTGCTGGAGTGAAGCC
R D M Q A Q L R H W C Q N P V P G L S L

1750    1760    1770    1780    1790    1800
TCCAGTTTATTGAACAGAAAGCCCAACGCTCTGCAACTCCAGTGGCGCCACCGACCTCA
Q F I E Q K P N A L Q L Q L A S T D L S

1810    1820    1830    1840    1850    1860
GCAACCGGGTGGACCTCAGTGTGCTGCCCTGCTTTTGTATGCTGTGGGGCCGCTGAAGTCCG
N R V D L S V L P A F D A V G P L K S G

1870    1880    1890    1900    1910    1920
GCACAAACCTCAGCCCCAGGTGTACTCTCTGCTCTCAGCAGGCGTGGCAGGCTGGGG
T K F Q P Q V Y S S L L S S G C Q A G E

1930    1940    1950    1960    1970    1980
AGCACGACGCTGCTTCGACAGACTTCGAAGGAACTTCATAAACTTGGCCCTCCCAAC
H A A C F A E L R R N P I N T C P P K L

1990    2000    2010    2020    2030    2040
TTAAGACCTGATGCTACGGTCAAACACTGGTACCGCCAGGTTGTCACTCGATATAAAG
K S L M L L V K H W Y R Q V V T R Y K G

2050    2060    2070    2080    2090    2100
GAGGAGAGGCGGAGGTTGCTGCTCCGCCAGCCCTAGCCCTGGAGCTTCTGACCACTCT
G E A A G D A P P P A Y A L E L L T I F

2110    2120    2130    2140    2150    2160
TTGCTGGGAACAAGGCTGTGGAGAGCAAAAGTTCAGGCTGGCTGAAGGCTCGGGACCA
A W E Q G C G E Q K F S L A E G L R T I

2170    2180    2190    2200    2210    2220
TCTGAGGCTGATCCACAGCAGCAGCTGCTTTGTATCTTACGGAGGCTCAACTACAGTG
L R L I Q Q H Q S L C I Y W T V N Y S V

2230    2240    2250    2260    2270    2280
TCCAGGACCCCGCCATCAGAGCAGACTCTCTGCGCAGCTTCGAAAGCCAGGCTCTAG
Q D P A I R A H L L C Q L R K A R P L V

2290    2300    2310    2320    2330    2340
TCCGGACCCCTGAGATCCACCTGGAACTGGGGCCAGGGGAGTGAAGCTATTAGCTC
L D P A D P T W N V G Q G D W K L L A Q

2350    2360    2370    2380    2390    2400
AGGAGGACGCTGCCCTTGGGTCAGAAAGTCTGCCCTCAGAGTGGGATGGGACTCTGGGTC
E A A A L G S Q V C L Q S G D G T L V P

2410    2420    2430    2440    2450    2460
CACCTGGGATGTGACGCCAGCCCTCTTCCACAGACCTTAGCTGAGGACCTGGACAAAT
P W D V T P A L L H Q T L A E D L D K F

2470    2480    2490    2500    2510    2520
TCATGATGAAATCCCTCCAGCCCAACCGCCACTTCTGACTCAAGTGAAGAGAGCCGTTG
I S E F L Q P N R H F L T Q V K R A V D

2530    2540    2550    2560    2570    2580
ACACCATATGTTCTCTTCTTGAAGAAAACCTGCTCCGGAACCTTACCATCAAGGTGCTCA
T I C S F L K E N C F R N S T I K V L K

2590    2600    2610    2620    2630    2640
AGGTGGTCAAGGGTGGGCTCTTCTGCCAAGGCAAGGCTCTTACAAGGACGCTCAGATGCCG
V V K G G S S A K G T A L Q G R S D A D

2650    2660    2670    2680    2690    2700
ACCTGGTGGTGTCTCTCAGCTGCTTCCGCCAGTCTCTGAGCAAGGACGACATCGGGCAG
L V V F L S C F R Q P S E Q G S H R A E

2710    2720    2730    2740    2750
AGATCATCTCGAGATCCAGGCTCACTTGGAGGCGTGTGACGAGATGACAGCTTCAATG
I I S E I Q A H L E A C Q Q M S F D V

```

図3.46 Oas3 cDNAのクローニング

```

2770      2780      2790      2800      2810      2820
TCAAAGTTGAGGTCCTCAAAGAGGAAGAACCCTCCAGTCTCAGCTTCACGCTGACATCCC
K F E V S K R K N P R V L S F T L T S Q

2830      2840      2850      2860      2870      2880
AGACGCTGCTGGACCAAAGCGTGGACTTTGACGCTCCGACGCTTTGATGCTCTCGGCC
T L L D Q S V D F D V L P A F D A L G Q

2890      2900      2910      2920      2930      2940
AGCTGAGGTCGCGCTCTCGGCTGATCCCGGCTCAGACAGACCTCATCCACAGCTOCA
L R S G S R P D P R V Y T D L I H S C S

2950      2960      2970      2980      2990      3000
GTAATGCAGGAGATTCTCTACCTGCTTCACAGAGCTCCAGAGGGACTTCATTACCTCCC
N A G E F S T C F T E L Q R D F I T S R

3010      3020      3030      3040      3050      3060
GTCCACCAAACCTCAAGAGCTGATCCGGCTGGTGAATACTGGTACCAACAGTGTAAACA
P T K L K S L I R L V K Y W Y Q Q C N K

3070      3080      3090      3100      3110      3120
AGACCACTCAAGGGGAAGGCTTCCTGCTCCAGCAGCGGCTGGAGCTCCTAACCTGCTG
T I K G K G S L P P Q H G L E L L T V Y

3130      3140      3150      3160      3170      3180
ACGCCCTGGGAGCAAGGTGGCCAGAACTCCCGAGTTCAACATGGGGAGGGCTCCCGCACTG
A W E Q G G Q N P Q F N H A E G F R T V

3190      3200      3210      3220      3230      3240
TTCGGAGCTGATTGTCCAGTACCGGCAGCTCTGCGCTATTGGACCATCAACTACAGCG
L E L I V Q Y R Q L C V Y W T I N Y S A

3250      3260      3270      3280      3290      3300
CAGAAGCAAGACCACTCGGTGACTTCCCTGAAGATGCACTTCGGAGCCCAAGGCTGTGCA
E D K T I G D F L K M Q L R K P R P V I

3310      3320      3330      3340      3350      3360
TCTGGAGCCAGCTGACCCGACAGGCAACCTGGGCCACAAACCTCGCTGGGATCTGCTGTG
L D P A D P T G N L G H N A R W D L L A

3370      3380      3390      3400      3410      3420
CCAAGGAGGCTACCGTGTACGCATCTGCCCTGTGCTGCGTGACAGGGATGGCAATCCCA
K K E A T V Y A S A L C C V D R D G N P I

3430      3440      3450      3460      3470      3480
TCAAGCCATGGCCCGTAAGGCCCGCTGTGTGAAGTCTAGAGAGATCAAGTGTCCACATGG
K F W P V K A A V *

3490      3500      3510      3520      3530      3540
ATAGAAAAGTGACACCAGCCCTCAGCAAAGTATCTCAGAGTATCTGAGTGTGTGTGTGTG
ATAGAAAAGTGACACCAGCCCTCAGCAAAGTATCTCAGAGTATCTGAGTGTGTGTGTGTG

3550      3560      3570      3580      3590      3600
TGTGTTGATTTATCTGTATGTGTGTATTTGTGGTATGCTGTGTGCCATATAGAGGGTG

3610      3620      3630      3640      3650      3660
TGTCTATGTGGGTGCTGTGTATCTGTGGGTATCTATATGTGTCTGTATATATGTATGTG

3670      3680      3690      3700      3710      3720
TGTGTGTGTGTGTATTCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGTGTGTGTGTGTATTCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

3730      3740      3750      3760      3770      3780
CTGTGTGTGTGTATCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT
CTGTGTGTGTGTATCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT

3790      3800      3810      3820      3830      3840
GTATGTGTGTGTATATGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT
GTATGTGTGTGTATATGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT

3850      3860      3870      3880      3890      3900
GTGTCTATCTATATGTAAATGTATGTATGTACTTATGTCCATGTATATCTGTGTGAATGT

3910      3920      3930      3940      3950      3960
CTGTGTGTATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CTGTGTGTATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

3970      3980      3990      4000      4010      4020
CTGAGTGTGTGACATGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATA
CTGAGTGTGTGACATGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATA

```

図3.4.6 *Oas3* cDNAのクローニング

ESTデータベースよりヒトOAS3と相同性の高い配列として見つかったESTクローン (BE283110, BE371571) のcDNA全長を5'-および3'-RACE法を用いてクローニングを行った。ESTクローンに相当する部分を青で、5'-RACE法のために設定したプライマー部分を赤で、3'-RACE法のために設定したプライマー部分を紫それぞれ示す。*Oas3*は1138アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

```

10      20      30      40      50      60
AATTCGTCGACATCGTAGCCATGGCAGTCCGCCAGGAGCTGTACGGCTTCOCGGGCTCCA
      M A V A Q E L Y G F P A S K

70      80      90      100     110     120
AGCTGGACTCCTTTGTTGGCTCAGTGGCTGCAGCCAAACAGAGAGTGGAAAGAGAGTCC
L D S F V A Q W L Q P T R E W K E E V L

130     140     150     160     170     180
TGGAGACCGTGCAGACAGTGGAGCAGTTCCGTGAGGCAGGAGAAATTCGGTGAAGATCGTG
E T V Q T V E Q F L R Q K N F R E D R G

190     200     210     220     230     240
GCCCGGCTCGGGATGTGCGCGTGTCTCAAGGTACTCAAGGTAGGCTGCTTTGGAAATGGCA
P A R D V R V L K V L K V G C F G N G T

250     260     270     280     290     300
CCGTGCTCAGGAGCACTACAGACGTGGAGCTGGTCTGTTCCTGAGCTGTGTTCCACAGCT
V L R S T T D V E L V V F L S C F H S F

310     320     330     340     350     360
TCCAGGAAGAAAGCCAAAGCACATCAGGCTGTCTCTGAGACTGATACAGAAAAGGATGTACT
Q E E A K H H Q A V L R L I Q K R M Y Y

370     380     390     400     410     420
ACTGCCAGGAGCTGATGGACCTTGGGCTCAGTAACCTGAGTGTGACTAACAGAGATCCCA
C Q E L M D L G L S N L S V T N R V P S

430     440     450     460     470     480
GTAGTCTCATCTTCACGATCCAGACCCAGGAGACCTGGGAGACCATCCTGCACCCGTTG
S L I F T I Q T R E T W E T I F V T V V

490     500     510     520     530     540
TGCCCGGCTACAGAGCCCTGGGCTTCCTGTGCCAGCTCCGAGGCTACGGCAAAATCGA
P A Y R A L G P S C P S S E V Y A N L I

550     560     570     580     590     600
TCAAGGCTAATGGGTACCCAGGAAATTCCTCCATCTCTCAGCGAGCTGCAGCGAAACT
K A N G Y P G N F S P S F S E L Q R N F

610     620     630     640     650     660
TCGTGAGGATCGGCCGACGAAAGCTGAAGAGCTCCCTTCGGTTGGTCAAAACACTGGTACC
V K H R P T K L K S L L R L V K H W Y Q

670     680     690     700     710     720
AGCAGTATGTGAGAGCAAAGTGCCTCCCGGCAACCTGGCCCTCTGTATGCCCTGGAGG
Q Y V R D K C P R A N L P F L Y A L E L

730     740     750     760     770     780
TGCTCACTGTCTATGCCCTGGAAAGCGGGCACCCGGGAGGATGCCAAGTTCAGGC TGGATG
L T V Y A W E A G T R E D A N F R L D E

790     800     810     820     830     840
AAGSCTCGCCACGGTGTATGGAGCTGCTCCAGGATCATGAGCTCCTGTATCTACTGGA
G L A T V M E L L Q D H E L L C I Y W T

850     860     870     880     890     900
CCAAAGCACTACAGCTGCAGCACCCGGTTCATCGAGGCTGTGTGAGGAGCAGCTCAGGG
K H Y T L Q H P V I E A C V R R Q L R G

910     920     930     940     950     960
GACAAAGGCTATCATCTGGACCCAGCAGACCCCAACAAATGTGGCAGAAAGCTACA
Q R P I I L D P A D P T N N V A E G Y R

970     980     990     1000    1010    1020
GATGGACATAGTGGCTCAGCGGGCCAAACAGTGTCTGAAACAGGACTGTGCTATGACA
W D I V A Q R A N Q C L K Q D C C Y D N

1030    1040    1050    1060    1070    1080
ACAGGGACAGCCCGTCCCAAGCTGGAGGTTGAAGAGCAGCCGATATCCAGGTGACCG
R D S F V F S W R V K R A P D I Q V T V

1090    1100    1110    1120    1130    1140
TCCAGGAGTGGGGCACTCGGATTTAACCTTCTGGGTGAACCCCTTATGAAACCCATAAGA
Q E W G H S D L T F W V H F Y E P I K K

1150    1160    1170    1180    1190    1200
AACTGAAGAGAAAATCCAACTGAGCCAGGCTACTTGGGCTGCAGGCTCTGTCCTTC
L K E K I Q L S Q G Y L G L Q R L S F Q

1210    1220    1230    1240    1250    1260
AGGAGCCCGCCGGAGAACCTCAGCTCATCAGAAGCCATTGCACGCTCGCCTACTACGGAA
E P G G E R Q L I R S H C T L A Y V G I

1270    1280    1290    1300    1310    1320
TCTTCTCGCACACCCACATCTGCCCTGCTGGACACCATCTCCCGTGGATCCAGGCTCTTGT
F C D T H I C L L O T I S P E I Q V F V

1330    1340    1350    1360    1370    1380
TGAAAAACCCGGATGGCAGGAGCCACGCCATGCGATCCACCCGCTTGATTACGCTCTGA
K R P D G R S H A Y A I H P L D Y V L N

1390    1400    1410    1420    1430    1440
ACCTGAAGCAGCAGATAGAAGACAGGCGAGGCTTCGATGCCAGGAGCAGCCCTGGAGT
L K Q Q I E D R Q G L R C Q E Q R L E F

1450    1460    1470    1480    1490    1500
TCCAGGGCCACATCTCGAGGACTGGTTTGACTTTAAATCCATGGATCCAAAGACAGTG
Q G H I L E D W F D F K S Y G I Q D S V

1510    1520    1530    1540    1550    1560
TCACAGTCACTCTGCAAGACGACGGAGGGGGCAGCTCCATTGTGCCAGCTAGCTTC
T V I L S K T T E G A A P F V P S *

1570    1580    1590    1600    1610    1620
CTCTGTGGTGGCTCTGCCCTTTTATTGCTCATCTCAGACTCAGCCTAGTGGCTCTC

1630    1640    1650    1660    1670    1680
CTTCCCGTCTCTGCCCGGATGGCTCACCTCTTCAGTACTTGCACAGCAGGAGTCAGAG

1690    1700    1710    1720    1730    1740
GGGGTGTGAGAGTCTGTGTACAGCCAGACACTCTGTGTGACAATGGAAATTCGAGTCC

1750    1760    1770    1780    1790    1800
CCTGGGAAATCATGCGCAGGACCTCTGCCCTTCTCGTGGCTCAGCTCAGACTGTGTCA

1810    1820    1830    1840    1850    1860
GTGAATAGCTGGCTCAGACATTTCTCACATGTTTCAGAGAAAGCCAAACACTCTTCCT

1870    1880    1890    1900    1910    1920
AACCAAATCAGAGGACCTGCTTGAAGTGTGCCACCTCAAATCTTCCAGTGAACCTC

1930    1940    1950    1960    1970    1980
CATCAGGGCGGCTCTGAGGCTTCCCTGTGCCCAACACTTCTGCTGCTGCTTGCAGT

1990    2000    2010    2020    2030    2040
ATCCAAAGCAAGGTAGGAGGGGATCAAGTCTTTCAAATGGAGAATAAAAAAGCCATTG

2050    2060
TTTCTTCCAAAAA

```

図3.4.7 *Oasl2* cDNAのクローニング

ESTデータベースよりヒトOASLと相同性の高い配列として見つかったESTクローン (BE136926, BE288875) のcDNA全長を3-RACE法を用いてクローニングを行った。ESTクローンに相当する部分を青で、3'-RACE法のために設定したプライマー部分を赤で示す。*Oasl2*は511アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予想された。

(A)

```

Oas1b 1  -----MEHGRLSIPAWTLDKFIEDYLLPDTTGADYKSAVNWVCDFLKERCFQGAHPVRSKVVKGG
Oas1a 1  -----MEHGRLSIPAWTLDKFIEDYLLPDTTGADYKSAVNWVCDFLKERCFQGAHPVRSKVVKGG
OAS1  1  -----MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTTGRMQINHAIDICGFLKERCFRGSYFVQVSKVVKGG
Oas1d 1  -----MQDLRSIPASKLDKFIEM-LPDPDTTCALLREVIDALCALLKRSFRGEVRRNFKASKVKG-
Oas1f 1  -----MARERFITPWWLDDNFIEDYLLPDTTFLTELRAIDISISAFLEKRCFOGATHPRVAVNVMGG
Oas1g 1  -----MARERFRTPIWLLDKFIEDYLLPDTTFLTELRAIDISISAFLEKRCFOGAAHPVRSKVVKGG
Oas1c 1  -----MENGRLSIPAWTLDKFIEDYLLPDTTFLTELRAIDISISAFLEKRCFOGAAHPVRSKVVKGG
Oas1e 1  MAKNLSSTRIALCSTPAWRLDKFIEGHLLGDIIFLTELRTDYNSSISAFLEKRCFOGAAHPVRSKVVKGG

Oas1b 64  SSGKGTLLKGRSADLVVFLNLLTSFEDQLNRRGEFIEIKKKQYEVQHEHRRFRVKFEVQSSWVFNARSLL
Oas1a 64  SSGKGTLLKGRSADLVVFLNLLTSFEDQLNRRGEFIEIKKKQYEVQHEHRRFRVKFEVQSSWVFNARSLL
OAS1  63  SSGKGTLLKGRSADLVVFLSPLTTFQQLNRRGEFIEIKKKQYEVQHEHRRFRVKFEVQSSWVFNARSLL
Oas1d 62  --KGTLLKGRSADLVVFLNLLTSFEDQLNQGVLIKIKKKQYEVQHEHRRFRVKFEVQSSWVFNARSLL
Oas1f 64  SYDEHVALKGRSAAWVVFLLNLLTSFEDQLKQVVFIEEIKKHLLQLQEQEKPKKRFVQSSWVFNARSLL
Oas1g 64  CYNEYVALKGRSAAWVVFLLNLLTSFEDQLNGQVVFIEEIKKHLLQLQEQEKPKKRFVQSSWVFNARSLL
Oas1c 64  SYDEHVALKGRSAAWVVFLLNLLTSFEDQLNRRGEFIEIKKHLLQLQEQEKPKKRFVQSSWVFNARSLL
Oas1e 71  SYNRYVALKGRSAAWVVFLLNLLTSFEDQLKQVVFIEEIKKHLLQLQEQEKPKKRFVQSSWVFNARSLL

P-loop          DAD
Oas1b 134  SFKLSAHLHQVEVEFDVLPAPFVLLGHGSIKPKFP---LIYTIILIEECTSLGKRGGFSTCFTELQRNFL
Oas1a 134  SFKLSAHLHQVEVEFDVLPAPFVLLGHVNTSSKFP---KIYALIEIECTSLGKRGGFSTCFTELQRNFL
OAS1  133  SFVLSAHLQVEVEFDVLPAPDALGQVGSYKFPN---QYVLIIEIECTDLQKEGFSTCFTELQRNFL
Oas1d 129  SFKLSAHLKVEVVFVLPAYDLYLHNLKPKNQ---QFYALISGVF-AGKEGKLSICFMGLQKYFL
Oas1f 134  SFKLSAHLHQVEVEFDVLPAYDALYEGYCKSPSSINYNKYVAGLIEECTSLLEKEGFSTCFTELQRNFL
Oas1g 134  SFKLSAHLHQVEVEFDVLPAYDALYERHFKSPSSINYNKYVAGLIEECTSLLEKEGFSTCFTELQRNFL
Oas1c 134  SFKLSAHLQVEVEFDVLPAYDLYEVRNNTYAFQFYNKVYAGLIEECTSLLEKEGFSTCFTELQRNFL
Oas1e 141  SFKLSAHLQVEVEFDVLPAYDALYEVRRKENHNCETYNKYVAGLIEECTSLLEKEGFSTCFTELQRNFL

Oas1b 200  KQRPTKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQNG-CNEFNTAQGFRTVLELVINYQ
Oas1a 200  KQRPTKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQNG-CYEFNTAQGFRTVLELVINYQ
OAS1  199  KQRPTKLSLRLVKKHWYQMCCKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQSM-KTHFNTAQGFRTVLELVINYQ
Oas1d 194  MCRPTKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQSR-VTKFNNTAQGFRTVLELVINYQ
Oas1f 204  KYRAKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQVQDSFGLHAAQCFRTVLELVINYQ
Oas1g 204  KYRAKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQIHEHNPGLHAAQCFRTVLELVINYQ
Oas1c 204  KYRAKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQSMKNQKVTAKNPRTLVLELVINYQ
Oas1e 211  WKRPTKLSLRLVKKHWYQLCKEKLGRPLPPQYALELLTVYAWEQELPKHETQAGGFRTVLELVINYQ

Oas1b 269  HLRIYTYKYYDFQHKEVSKYLLRQLKARPLIDPADPTGNVAGGMPGWRRLAEADVWVWYPCMKND
Oas1a 269  HLRIYTYKYYDFQHKEVSKYLLRQLKARPLIDPADPTGNVAGGMPGWRRLAEADVWVWYPCMKND
OAS1  267  QLCIYTYKYYDFKNIYKYYLLRQLKARPLIDPADPTGNVAGGMPGWRRLAEADVWVWYPCMKND
Oas1d 267  -----
Oas1f 274  CLRIYTYKYYDFRHESSDYLGQIKKARPLIDPADPTGNVAGSDLGAWDLAEAQTWYHNSNPNND
Oas1g 274  RLRIYTYKYYDFRHESSDYLGQIKKARPLIDPADPTGNVAGSDLGAWDLAEAQTWYHNSNPNND
Oas1c 274  NLRIYTYKYYDFRHESSDYLGQIKKARPLIDPADPTGNVAGSDLGAWDLAEAQTWYHNSNPNND
Oas1e 281  CLRIYTYKYYDFRHESSDYLGQIKKARPLIDPADPTGNVAGSDLGAWDLAEAQTWYHNSNPNND

Tetramer
Oas1b 339  GSRVSSWDVPTVVPVPEQVEENWTCILL
Oas1a 339  GSRVSSWDVPTVVPVPEQVEENWTCILL
OAS1  337  GSPVSSWILLVRRPPASLFFIAPLHEA-
Oas1d 337  -----
Oas1f 343  MSIVNGLWVMSKPKQ-----
Oas1g 343  MSIVNGLWVMSKPKQ-----
Oas1c 344  MSIVNGLWVMSKPKQ-----
Oas1e 351  GSRVSSWDVPTVVPVPEQVEENWTCILL

```

(B)

```

Oas2 1  MGNWLTGNWSSDRSSGYSSGWSGGSSGVSPVHRLEKSIQANLTPNENCLKQIAYSSVPSOKLREGYIQ
OAS2 1  -----MGNWLTGNWSSDRSSGYSSGWSGGSSGVSPVHRLEKSIQANLTPNENCLKQIAYSSVPSOKLREGYIQ

Oas2 71  ENLKPRESIKQIDQAVDAVWDLR---SQIPVKEVAHGGSYGRETAALRGCSGDTLVLEFMDCFQFQDQI
OAS2 22  EYLKBYEBCQTLIDEMVNTICDVCRNFEQFPVYQGVAGGSGYGRKTVLRGMSDGTLVLEFSDDLKQFQDQI

Oas2 138  KYQDAYLDVILWLRIHEK-----KSVKHEHALVQVSPVGRITLLQLLPVFNPRSNPNPSCVYV
OAS2 92  RSQRDILDKTKGDKLRFCLFTKWLKNNFEIQSLDGSSTQVFTKNQISFEVLAENALSLNPNPSPWYV

Oas2 200  DLKRSMDQVRSAPGFEISDCFTELOQRFFKKYQLKDLILLKHWYEQCKKWTFFPPPLLALYALELLTV
OAS2 162  ELKRSMDKTNASPGFEAVCFTELOQRFFDNRGKLDLILLKHWYEQCKKWTFFPPPLLALYALELLTV

Oas2 270  CAWEQGCQAEDFDMAQGVRTVLRLLIQRPTELCYVWTVNYNFEDETNRNILLHQLRSQRPVILDETDPTNN
OAS2 231  YAWEQGCRKDNFDIAQGVRTVLRLLIKCQEKLCYVWTVNYNFEDETNRNILLHQLRSQARPVILDETDPTNN

Oas2 340  VGRDGFWEELLTEEAAMWLYSPLNTEAPAVWVLDVLEMPLEVTPPSHLLNKFIKDFLQPNKLFKQIKKAV
OAS2 301  VSGDKICWQWLKKEAQTWLTSPNLDNELPAPSWNVLEAPLETPPGHLLDKFIKDFLQPNKLFKQIKKAV

Oas2 410  DIICSFLLKNCVFLNSDTKVLKTVKGGSTAKGTALKGSDADVVVFLSLSYSLSLKTMSQFVQEIQKQL
OAS2 371  NIIRTFLLKNCVFR-QSTAKIQLVGGSTAKGTALKGSDADVVVFLSLSYSLSLKTMSQKNEHKKIVKIEHQQL

Oas2 480  EEVQ--ACHEVFEISKWKAPRVLFSFLKSKTLNESVFDVLPALDAGQERSDFELRPEAKDLIEL
OAS2 440  KAEWREKEELEVFEIPKWKAPRVLFSFLKSKTLNESVFDVLPALDAGQERSDFELRPEAKDLIEL

Oas2 548  CASQDIKEGFSTCFTVLRNFIQVRRPTKLSLRLKHWYQYERKMKPKSLPPKYALELLTVYAWEQ
OAS2 510  YKSQDLPGGFSTCFTVLRNFIQVRRPTKLSLRLKHWYQYERKMKPKSLPPKYALELLTVYAWEQ

Oas2 618  GSGTDFDFDAEGLRTVLELVIKYRQLCFIWTVNYNFEKEMRKFLLEKQKTRPVILDEADPTGVDGGGD
OAS2 580  GSGVDFDFDAEGLRTVLELVITQYQQLGIFWTVNYNFEKEMRKFLLEKQKTRPVILDEADPTGVDGGGD

Oas2 688  RWCWHLLEAKKWLSSPCFQVEQKGLVQVWVPMQTPGSCGGQIYPTVGGVTK
OAS2 650  RWCWHLLEAKKWLSSPCFQVGGTGNPFPVWVPMQTPGSCGGQIYPTVGGVTK

```

図3.4.8 ヒトおよびマウス2-5OASファミリー遺伝子のアミノ酸配列の比較
ClustalWを用いたマルチアライメントの結果を示す。(A) OAS1サブファミリー、
(B)ヒトおよびマウスOAS2、(C)ヒトおよびマウスOAS3、(D)ヒトおよびマウス
OASLとニワトリ2-5OAS

(C)

Oas3 1 MDLHTPAAGALDKLVANNHPAPEETAAGALGSLNITQQHRAAG-SQRPRVIRIAKGGAYARGTALR
OAS3 1 MDLHTPAAGALDKLVANNHPAPEETAAGALGSLNITQQHRAAG-SQRPRVIRIAKGGAYARGTALR

Oas3 70 GGTDELVIFLDCQSFQDKTCSSETLGMAMRLLESWGGHPGPGTTFEFSQSKASRIQLQFRLASADGHE
OAS3 71 GGTDELVIFLDCQSFQDKTCSSETLGMAMRLLESWGGHPGPGTTFEFSQSKASRIQLQFRLASADGHE

Oas3 140 WIDVSLVPAFDFVLGQPRSCVQKPTFNVYSLLSSHCQAAGEYSACFTEPRKKNFVNTTRPAKLNKLLLVKHWY
OAS3 141 WIDVSLVPAFDFVLGQPRSCVQKPTFNVYSLLSSHCQAAGEYSACFTEPRKKNFVNTTRPAKLNKLLLVKHWY

Oas3 210 HQVQTR-AVRA TLPPSYALELLTIFAWEGGCKKDSFSLAQGLRTVDALIQHRSKYLCIFWTE NYGFEDPAV
OAS3 211 HQVQTR-AVRA TLPPSYALELLTIFAWEGGCKKDSFSLAQGLRTVDALIQHRSKYLCIFWTE NYGFEDPAV

Oas3 279 GFLRRQLKRRPRVILDPADPTWDVGNGLAWRWDVLAQEAESSFSQQCFKQASGVLVQPVWGGPLPRAGI
OAS3 281 GFLRRQLKRRPRVILDPADPTWDVGNGLAWRWDVLAQEAESSFSQQCFKQASGVLVQPVWGGPLPRAGI

Oas3 349 LDGHRPIYQGNQALEDN-KGHLAVQSKERSQKPSNSAFCFPEAATKIPANPNPSANKTRKIRKKAHPK
OAS3 351 LDGHRPIYQGNQALEDN-KGHLAVQSKERSQKPSNSAFCFPEAATKIPANPNPSANKTRKIRKKAHPK

Oas3 418 TVQEAAALDSISSHVRIQTSTASSHMPDRSSISTAGSRMSPDLSQIPSRKDLDCFIQDHLNPSQFQOQVK
OAS3 404 TVQEAAALDSISSHVRIQTSTASSHMPDRSSISTAGSRMSPDLSQIPSRKDLDCFIQDHLNPSQFQOQVK

Oas3 488 QALDAITCCLREKSVYKVLRVSKGGSFGRGTDLRSKCDVELVIFKYKTLGDFKQKREHQAIEILRDMQAQLR
OAS3 436 QALDAITCCLREKSVYKVLRVSKGGSFGRGTDLRSKCDVELVIFKYKTLGDFKQKREHQAIEILRDMQAQLR

Oas3 558 HWQCNVYVGLSLOFIEQ-KFNALQLQLASTDLSNRVDLSVLPADFVAVGFLKSGTKRQPOVYSRLLSQCQ
OAS3 506 HWQCNVYVGLSLOFIEQ-KFNALQLQLASTDLSNRVDLSVLPADFVAVGFLKSGTKRQPOVYSRLLSQCQ

Oas3 627 AGEHAACFAELRRNFNITCFPKLKSLLMLLVKHWYRQVVTRYKGGAAAGDAPPPAYALELLTIFAWEGGCG
OAS3 576 AGEHAACFAELRRNFNITCFPKLKSLLMLLVKHWYRQVVTRYKGGAAAGDAPPPAYALELLTIFAWEGGCG

Oas3 697 EQKFSIAEGLRITLRLIQOHSLECIYWTVNYSVQDPANFAHLQCQRKARPLVLDPADPTWNVGQEDWKL
OAS3 646 EQKFSIAEGLRITLRLIQOHSLECIYWTVNYSVQDPANFAHLQCQRKARPLVLDPADPTWNVGQEDWKL

Oas3 767 LAQEAALGSGVQLQSGDGTLVFPWDVTFALLHCTLAEDLDKFISEFLOPNRHFITQVKNVAVDTICSFLLK
OAS3 716 LAQEAALGSGVQLQSGDGTLVFPWDVTFALLHCTLAEDLDKFISEFLOPNRHFITQVKNVAVDTICSFLLK

Oas3 837 ENCFRNSITKIVKVVKGGSSAKGTALGRSDADLVVFLSFCFRQFSFEGGSRRAEISEIQRLLEACQQMS
OAS3 786 ENCFRNSITKIVKVVKGGSSAKGTALGRSDADLVVFLSFCFRQFSFEGGSRRAEISEIQRLLEACQQMS

Oas3 907 EDVKFEVSKRKNPRVLSFSLTSOTLDDQSVDFVLPADFALGQVSGSRFDPRVYVDLIHSYCSNAGEFST
OAS3 856 EDVKFEVSKRKNPRVLSFSLTSOTLDDQSVDFVLPADFALGQVSGSRFDPRVYVDLIHSYCSNAGEFST

Oas3 977 CFTELQDFIISRPTKLSLIRLVKHWYQCCNITIKGNSGLPPOHGLELLTVYAWEGGQNFQFNMAEGF
OAS3 926 CFTELQDFIISRPTKLSLIRLVKHWYQCCNITIKGNSGLPPOHGLELLTVYAWEGGQNFQFNMAEGF

Oas3 1047 RTVLELVYQYRQLCVYWTINYSAEKDTIGDFLKMQLRKRPRVILDPADPTGNLGHNAWDLLEAKAATVYA
OAS3 996 RTVLELVYQYRQLCVYWTINYSAEKDTIGDFLKMQLRKRPRVILDPADPTGNLGHNAWDLLEAKAATVYA

Oas3 1117 SALCCVDRDGNPIKPPVKAAY
OAS3 1066 SALCCVDRDGNPIKPPVKAAY

(D)

Oas11/p54 1 MDPPFDLYATPQSDLDHLEHSLOPORWKEEGQDAWERTERFRREQCFRDHLLDQEVVVKVVKGGSS
Oas11 1 MDPPFDLYATPQSDLDHLEHSLOPORWKEEGQDAWERTERFRREQCFRDHLLDQEVVVKVVKGGSS
Oas12 1 MVAQELYGFPAKLDLSFAQWOPHREKKEEVLDAVRTVEEFLREHFGKRGLDQEVVVKVVKGGSA
OASL 1 MVAQELYGFPAKLDLSFAQWOPHREKKEEVLDAVRTVEEFLREHFGKRGLDQEVVVKVVKGGSA
chicken 1 ---MGEESVSSRQLGQVAHLOPSTESTAVKQTVKDCDFLEKRCFEG-----ISVLKTKVGSF

P-loop

Oas11/p54 71 GGGTTLNHRSDQDMILFLSCFSSFEQANREVVISFKKRLIHGSRSLAYNIIIVTHEREG--KRAPRSL
Oas11 71 GGGTTLNHRSDQDMILFLSCFSSFEQANREVVISFKKRLIHGSRSLAYNIIIVTHEREG--KRAPRSL
Oas12 71 GNGTVLRSTREVLVFLSCFHSFQEAAKKHKQVLRLEQKRMYYQQLDLGLSLMVTN---RVSSSL
OASL 71 GNGTVLRSTREVLVFLSCFHSFQEAAKKHKQVLRLEQKRMYYQQLDLGLSLMVTN---RVSSSL
chicken 60 GGGTALRNNSDADVVLVLEINCFSSMQEQEAKRGETLAXHRRLLNCLPTELSFGVYSITSPRYKDSRDRPSSL

DAD

Oas11/p54 139 ALKVQSKKTDIHWMDILPAYDALGPISRDSKPAAPAVETLIRSKGYPGDFSPSPTELQRFVKTREVKL
Oas11 139 ALKVQSKKTDIHWMDILPAYDALGPISRDSKPAAPAVETLIRSKGYPGDFSPSPTELQRFVKTREVKL
Oas12 137 IFTIQHRETWEHTITVTVPAYRAGLGPSPSS---EVANLIKANGYPGCFSPSELOQNFVKHRETKL
OASL 137 VFTIQHRETWEHTITVTVPAYRAGLGPSPSS---EVANLIKANGYPGCFSPSELOQNFVKHRETKL
chicken 130 BLTLSGSSSESIDVDILPAYDALGQVIQDARDPAVVKLLATRCGPGDFSPSPTELQRFVKTREVKL

Oas11/p54 209 RMLLRVLKFWYLQCLRRYGRGAVLPSKYALELLTIYAWEMGTESSDSFNLDDEGFVAVMELLVNYRDI CI
Oas11 209 RMLLRVLKFWYLQCLRRYGRGAVLPSKYALELLTIYAWEMGTESSDSFNLDDEGFVAVMELLVNYRDI CI
Oas12 203 RMLLRVLKHWYQYVYRDKCPRANLPPYALELLTIYAWEMGTEDANFRNLDDEGLATVMELLQDHELLCI
OASL 207 RMLLRVLKHWYQYVYKASPRANLPPYALELLTIYAWEMGTEDENFRNLDDEGTVMELLQDHEVYCI
chicken 200 RMLLRVLKHWYKEMLKPYPNANLPPKYALELLTIYAWEMGTEDENFRNLDDEGTVMELLQDHEVYCI

Oas11/p54 279 YWTKYYNFONEVVRNLLKKQLKGRPIILDPADPTNNLGRRKGNQVAAEAFCFLVQVCCFVGV--FSER
Oas11 279 YWTKYYNFONEVVRNLLKKQLKGRPIILDPADPTNNLGRRKGNQVAAEAFCFLVQVCCFVGV--FSER
Oas12 272 YWTKYYLQHPVTEACVYRQLRQRPRIILDPADPTNNLGRYRWDIIVAQANOCQKQDCYDNRRDSVPS
OASL 276 YWTKYYLQHPVTEACVYRQLRQRPRIILDPADPTNNLGRYRWDIIVAQANOCQKQDCYDNRRDSVPS
chicken 268 YWTKYYLQHPVTEACVYRQLRQRPRIILDPADPTNNLGRYRWDIIVAQANOCQKQDCYDNRRDSVPS

Oas11/p54 347 WNVQRARDVOVRVKQGTVDLWNTNPSPIRKKAEIRREKNFG-GLRISFQEPGGERQLLSSRNTLA
Oas11 347 WNVQRARDVOVRVKQGTVDLWNTNPSPIRKKAEIRREKNFG-GLRISFQEPGGERQLLSSRNTLA
Oas12 342 WNVQRARDVNTVQWGHSDLWVNPYSPIRKKAEIRREKNFG-GLRISFQEPGGERQLLSSRNTLA
OASL 346 WNVQRARDVNTVQWGHSDLWVNPYSPIRKKAEIRREKNFG-GLRISFQEPGGERQLLSSRNTLA
chicken 334 WNVQPTTPVWVKQLQGMSLRKKVHSTTVWELKGEERKWCIPRYQRLALQDNPSNLPALRDRGDSLA

ubiquitin-like domain

Oas11/p54 416 DYCIPSKVNVQVLETPEPELVFVKYFGGQSKKPTIDDDDTILDLEKKEEDAGGGLT-----
Oas11 416 DYCIPSKVNVQVLETPEPELVFVKYFGGQSKKPTIDDDDTILDLEKKEEDAGGGLT-----
Oas12 411 DYCIPGDTHECLLETPEPELVFVKYFGGQSKKPTIDDDDTILDLEKKEEDAGGGLT-----
OASL 415 DYCIPGDTHECLLETPEPELVFVKYFGGQSKKPTIDDDDTILDLEKKEEDAGGGLT-----
chicken 404 AHGTLVDYDVLLECLLETPEPELVVDSN-KETVYVRETDITVKQLKQQLYARQHPVVEQLRLETYETKLE

Oas11/p54 -----
Oas11 486 DDESKLELEHICDTHLIRVID-----
Oas12 481 DWFDTKSYGQDSVTVLSKTEGAPFVPS-----
OASL 485 DWLGLGIYQDSDTFLSKKGEALFFAS-----
chicken 473 NHHTEHYHVGQFRSYYLRLRLRGAGPLPRCVPS

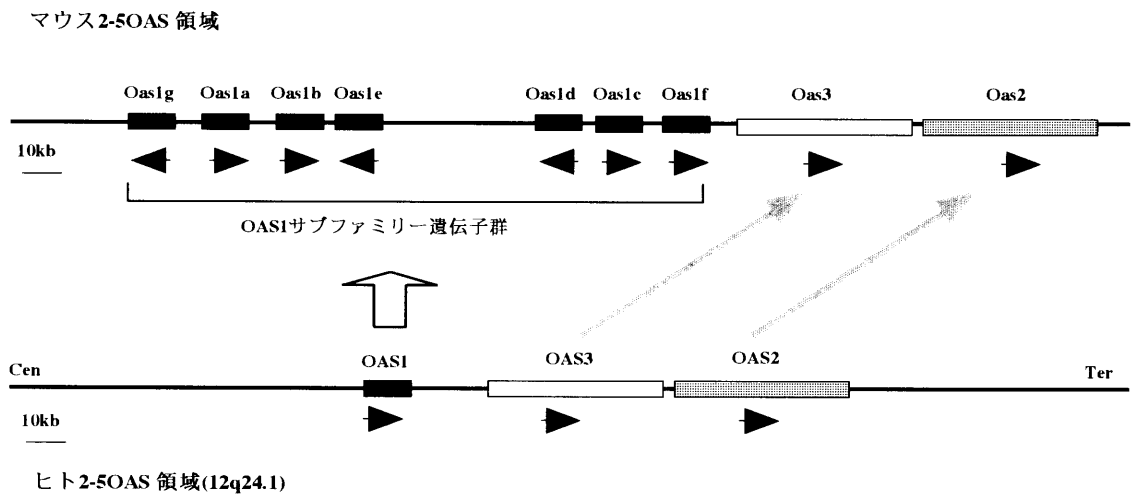


図3.4.9 ヒトおよびマウスの2-5OASファミリー遺伝子のゲノム構造

ヒト2-5OAS遺伝子は染色体12q24.1の163kbの領域にクラスターを形成して存在している。マウス2-5OAS領域を含むBACクローンの解析から、マウスもヒトと同様に約220kbの領域にクラスターを形成していた。マウスOAS1サブファミリー遺伝子群、Oas3遺伝子、Oas2遺伝子の位置関係は保存されていた。なお、遺伝子座をボックスで、遺伝子の転写方向を矢頭で示す。

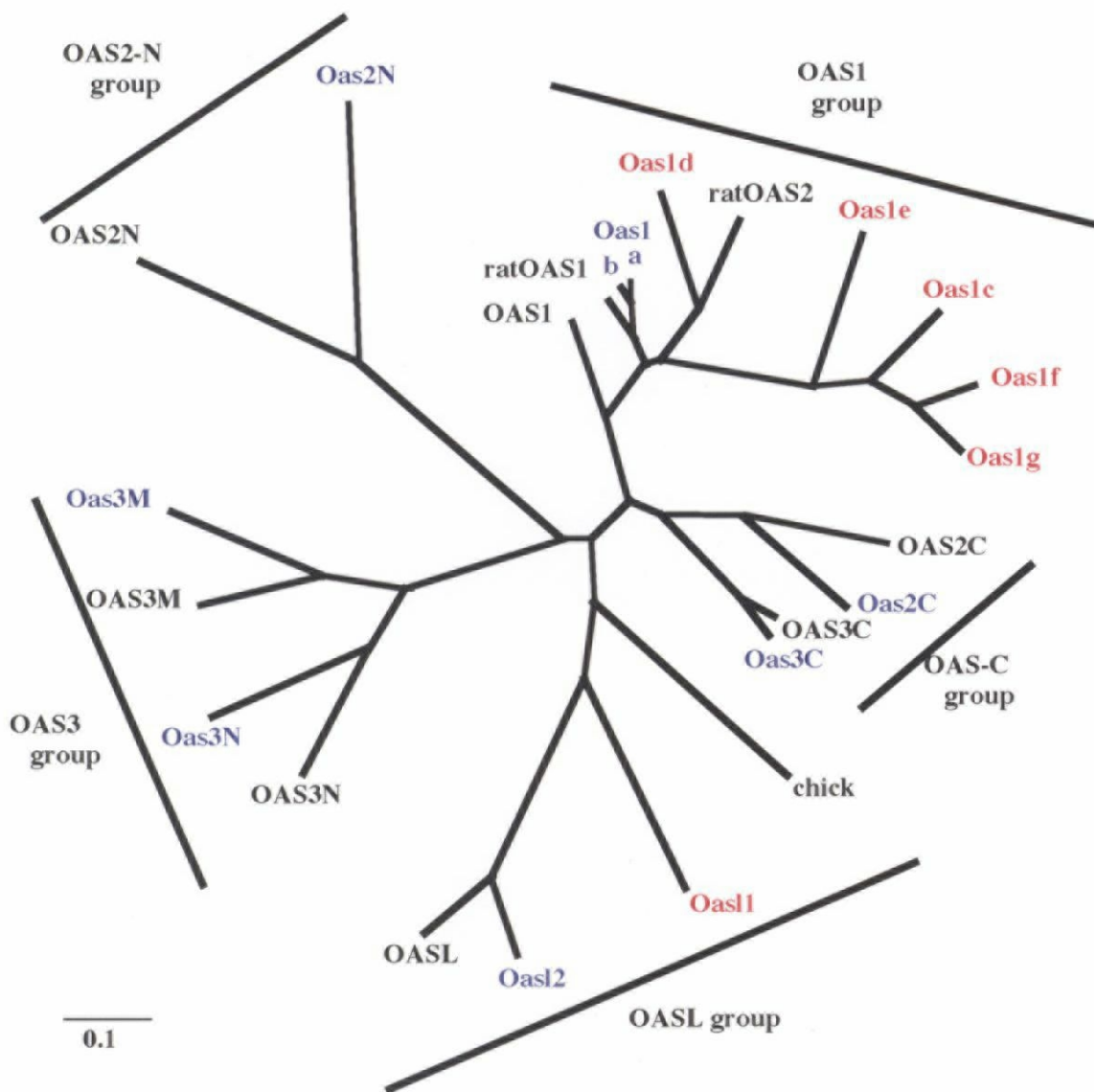


図3.4.10 ヒトおよびマウス、ラットの2-5OASファミリー遺伝子の分子系統樹
 ヒトおよびマウス、ラットの2-5OASファミリー遺伝子の約350アミノ酸からなる基本構造単位のアミノ酸配列を元に、アルゴリズムとしてはNJ法を用いて作成した分子系統樹を示す。OAS2、OAS3はそれぞれ2つ、3つの部分を独立して計算を行った。2-5OASファミリー遺伝子は5つのグループ（OAS1、C-terminal、OAS2 N-terminal、OAS3 N-terminal、OASL）に分類されることがわかる。なお、マウス2-5OASは青で、その中でマウス特異的な遺伝子を赤で示した。

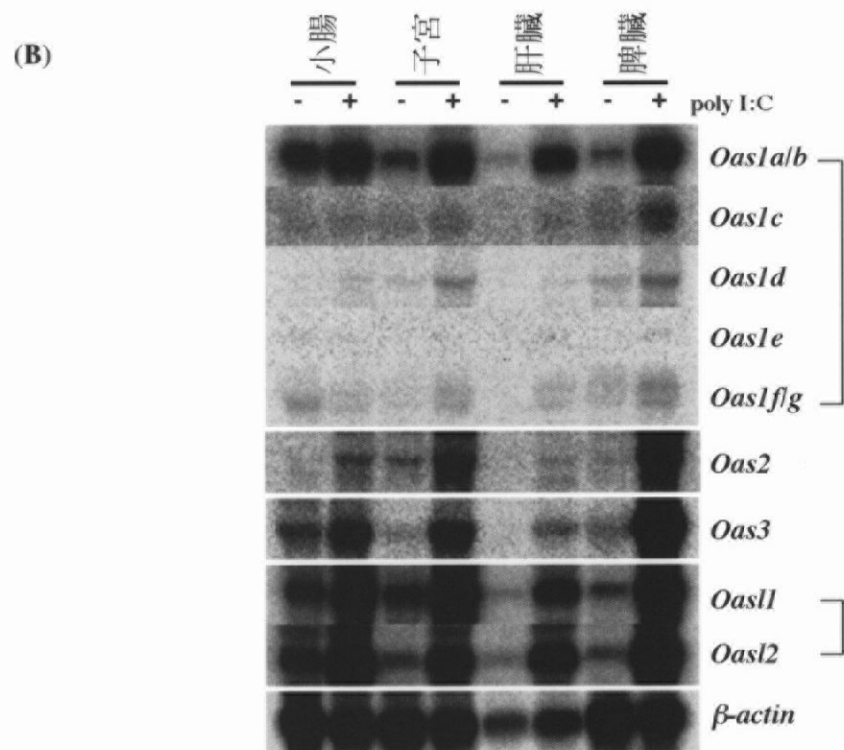
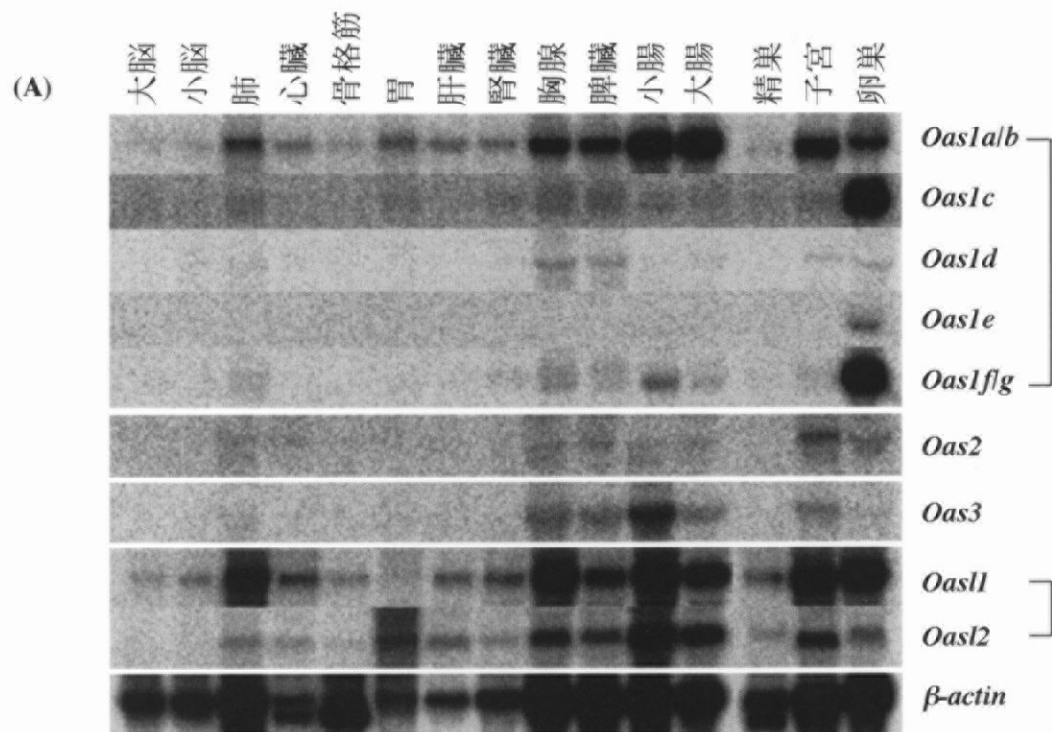


図3.4.11 マウス2-5OASファミリー遺伝子のノザンハイブリダイゼーションによる発現の解析

(A)正常マウスの15種類の臓器におけるマウス2-5OASファミリー遺伝子のmRNAの発現分布

(B) poly I:C 500 μ gまたはPBSを尾静脈内投与12時間後の各種臓器におけるマウス2-5OASファミリー遺伝子の発現誘導

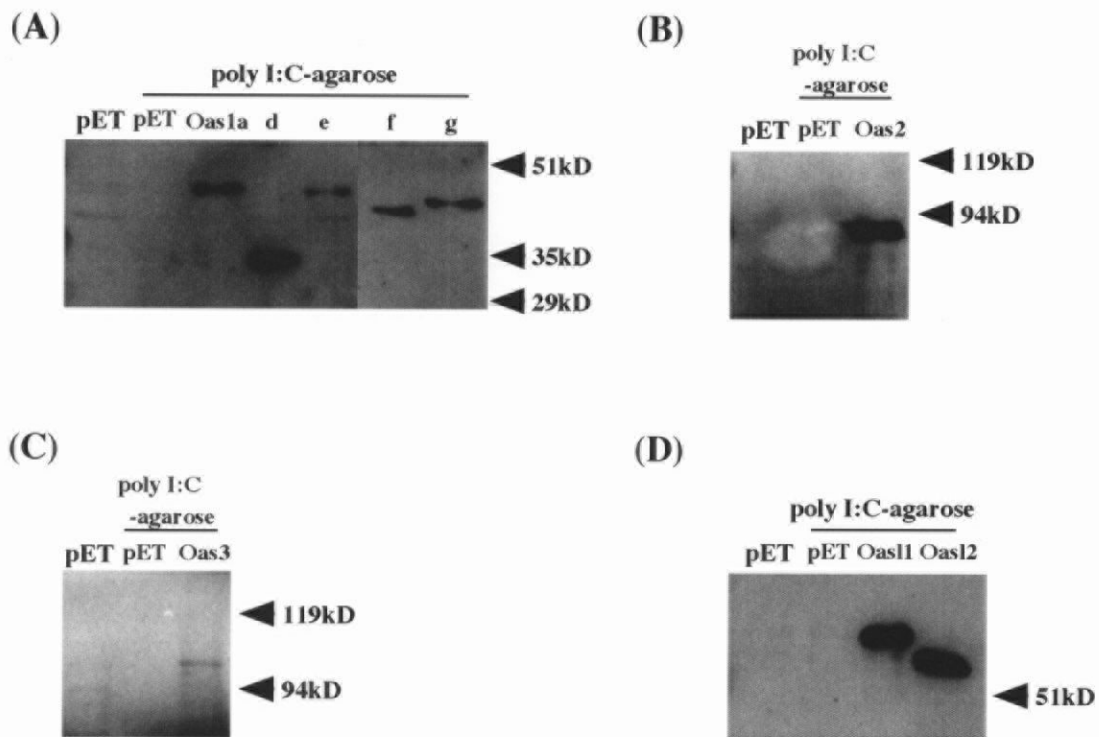


図3.4.12 マウス2-5OASファミリー遺伝子の組み換えタンパク質を用いたdsRNA結合能および2-5OAS酵素活性の検討

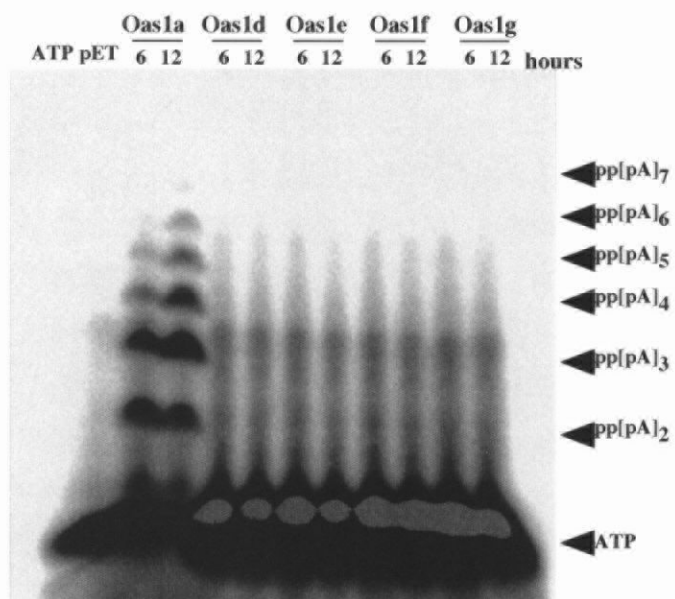
マウス2-5OASファミリー遺伝子をpET-16bプラスミド発現ベクターに導入することにより大腸菌内でHis-tag融合組み換えタンパク質を産生させた。

(A-D)マウス2-5OASファミリー分子のdsRNA結合能の解析：大腸菌溶解物にpoly I:Cアガロースを加えてpoly I:C結合物を分離し、SDS-PAGEを行った後、抗His-tag抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、poly I:Cに結合した(=dsRNA結合能がある)融合組み換えタンパク質を検出した。

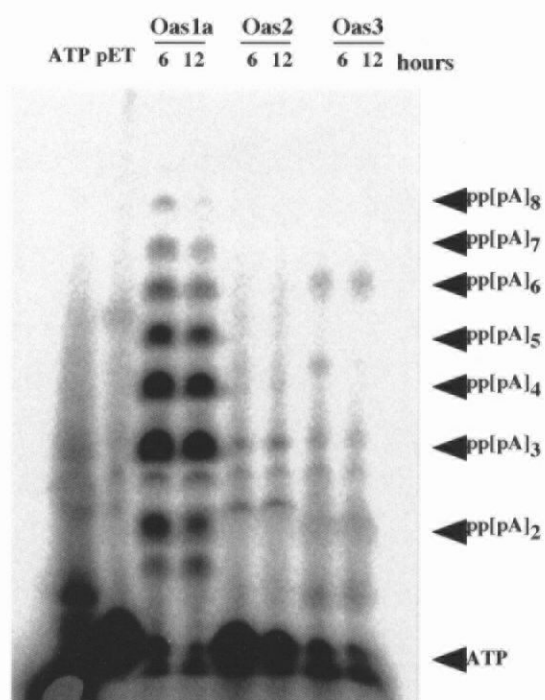
(E-G)マウス2-5OASファミリー分子の2-5OAS酵素活性の解析：poly I:Cに結合した組み換え2-5OAS分子を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を含む反応液中で33℃、6または12時間保温した後、7M尿素を含む20%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。

Oas1aを陽性コントロールとして用いた。(A, E) OAS1サブファミリー、(B, F) OASLサブファミリー、(C, D, G) Oas2, Oas3

(E)



(F)



(G)

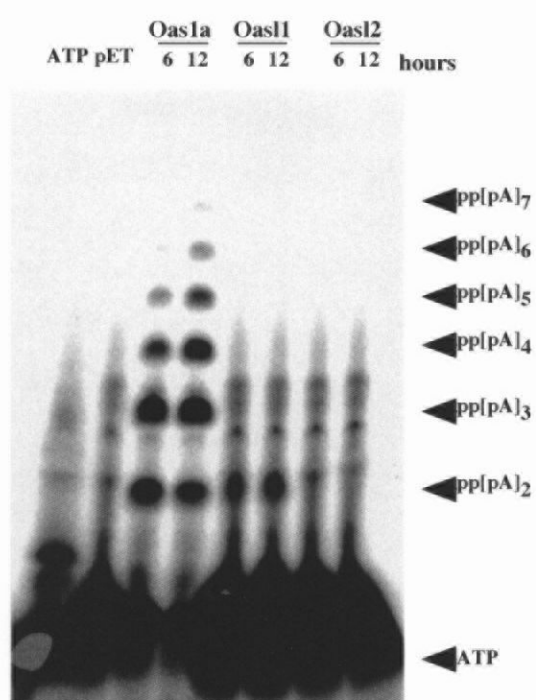


图3.4.12