

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

非ヒト霊長類標準遺伝子 cDNA クローンの収集と
ヒト疾病研究への利用

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 楠 田 潤

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
非ヒト霊長類標準遺伝子 cDNA クローンの収集とヒト疾病研究への利用……………1	
主任研究者：楠 田 潤 ((独) 医薬基盤研究所 遺伝子資源室研究リーダー)	
II. 分担研究報告書	
1. カニクイザル完全長 cDNA の配列決定とその比較……………8	
楠 田 潤 ((独) 医薬基盤研究所 遺伝子資源室研究リーダー)	
2. 疾患遺伝子 cDNA の発現ベクターを用いた機能解析…………… 28	
高橋 一朗 ((独) 医薬基盤研究所 遺伝子資源室 主任研究員)	
3. カニクイザル及びチンパンジーの cDNA ライブラリー作製…………… 32	
菅野 純夫 (東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 ゲノム制御医科学分野 教授)	
4. チンパンジーcDNA 分離とヒトとの比較解析…………… 34	
平井 百樹 (東京女子医科大学 国際統合医科学インスティテュート 教授)	
5. カニクイザルES細胞分化のDNAチップを用いた解析…………… 42	
鳥居 隆三 (滋賀医科大学・動物生命科学研究センター 教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧 …………… 45	

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

非ヒト霊長類標準遺伝子 cDNA クローンの収集とヒト疾病研究への利用

課題番号：H18-ゲノム-指定-0003

主任研究者 楠田潤（独）医薬基盤研究所 遺伝子資源室研究リーダー

Human Gene Mutation Database (HGMD) に収録されている疾患遺伝子 2,056 種のうち、1858 遺伝子に関する cDNA の配列と疾患の原因となる変異情報を取得し、それらを収録したデータベースを構築した。

これらのデータをもとに、東大・菅野研に保管されているヒト完全長 cDNA クローン約 56,000 個を検索し、約 1,200 種の疾患遺伝子に関するクローンを同定した。これらの配列をチェックし分譲の準備を行った。

本年度はカニクイザルの腎臓および肝臓より各 10,000 個の cDNA クローンを V-キャップ法で作製し、それらの 5' 末端配列を解読した。これによりクローン総数が約 86,000 となり、世界最大のカニクイザル cDNA コレクションを保有することになった。

昨年度、チンパンジー精巢 cDNA ライブラリーから得た 2,178 全長配列（韓国 KRIBB との共同）をもとに、ヒト RefSeq 遺伝子に対応するカニクイザル、チンパンジー全長 cDNA 配列を検索した結果、3 種に共通する遺伝子が 406 セットあることがわかった。

約 9,327 種のカニクイザル完全長 cDNA より、1858 個のヒト疾患遺伝子に対応するものを検索したところ 314 遺伝子が該当した。それらをヒト疾患遺伝子とアラインメントしたところ、種間変異とヒトで発症に関係する変異が一致するものが 19 遺伝子で検出された。

カニクイザル疾患遺伝子ホモログの *in vitro* 発現によるタンパク合成系を確立した。また網羅的発現解析に必要なカニクイザルの主要臓器 13 種類の totalRNA を調製し、資源化した。

チンパンジー由来の約 15,451 個の cDNA クローンの Tag 配列を解読し、ヒト RefSeq に対応する 5,689 遺伝子を同定した。その中にはヒトの心臓血管系疾患に関連する遺伝子 39、肥満関連の遺伝子 32 が含まれた。またヒトでのハイリスク（易罹患性）遺伝子型がチンパンジーでは野生型であったり、その逆の例も見いだされた。

サル ES 細胞の心筋細胞、さらにペースメーカー細胞への分化に成功した。またインスリンレセプター、GLUT4、に加え、レプチンやアディポネクチン等を発現する脂肪細胞への誘導分化を可能にした。また PPAR γ -siRNA を導入することにより骨芽細胞へ分化させる方法を開発した。未分化サル ES 細胞 cDNA ライブラリー作製に向けてフィーダー細胞の混入を最小限にした ES 細胞より高品質 RNA を調製した。

カニクイザル標準遺伝子約 6,000 種に相当する cDNA をスポットした cDNA チップを作製し、4 種類の組織における発現プロファイルを作製した。また約 10,000 種の cDNA 配列に基づく Affymetrix 仕様のオリゴチップを完成させた。

分担研究者
高橋 一朗 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源部 主任研究員
菅野 純夫 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授

平井 百樹 東京女子医科大学 国際統合医科学インスティテュート教授
鳥居 隆三 滋賀医科大学 動物生命科学センター教授

A. 研究目的

ポストゲノム研究の課題の一つは近縁種ゲノムの解析と相互の配列比較をもとにしたヒト遺伝子機能とその変異の解明、これら標準遺伝子に対応するカニクイザルおよびチンパンジーのcDNAクローンを作製、収集して疾病研究に利用する。

疾患関連遺伝子のほとんどは1個のアミノ酸置換で発症するが、正常型と変異型のどちらが祖先型かを調べてみると、変異型が祖先型（チンパンジーやカニクイザル型）であるケースが多々みられた。しかしカニクイザルやチンパンジーは病的とはいえ、発症を抑制する機構の存在や食性や生活環境の違いで非ヒト霊長類は発症を免れている可能性が示唆される。疾患遺伝子の発症に関係する変異箇所を祖先型を明らかにすれば、その情報は疾病の治療や予防方法の開発に役立つものと考えられる。

以上の目的を遂行するためにヒト疾患遺伝子に関する配列情報と発症に関係する変異情報を収集しデータベース化する。さらにヒトに進化的に近縁なチンパンジーおよびカニクイザルの完全長cDNAクローンを作製し、配列を解読して標準遺伝子に相当するクローンを収集し、その中から疾患遺伝子に相補的な遺伝子を選別し、ヒト、チンパンジーおよびカニクイザル相互の比較を可能にする。

また収集したカニクイザルcDNAをチップ化し疾患モデルの解析やカニクイザルを用いた新薬の前臨床試験や毒性試験にも役立つ。さらに収集するクローンは完全長cDNAで翻訳すれば全長をもつタンパク質が得られるので発現ベクターに組み込み機能解析にすぐに利用できるようにする。

これにより疾病治療法の開発を加速すると同時に罹患予防の情報を提供し、また創薬を促進することを目的とする。

B. 研究方法

1) 現在HGMDには約2,056種類の疾患関連遺伝子についての情報が収録されている。われわれはこのうち1,858遺伝子に

関する情報をダウンロードし、そこに収録されているcDNA配列と発症に関係する塩基配列置換およびアミノ酸置換のデータを一括して霊長類遺伝子配列と比較できるようにデータセットの作製に利用した。

2) これまで完全長cDNAクローンを作製するのにタバコphosphodiesteraseを利用するオリゴキャップ法を用いていたが、PCRで増幅する操作が含まれるためクローンの重複が高いという指摘があり、今回PCR操作を含まないV-キャップ法を用い、cDNAクローンの作製を試みた。

3) サルES細胞の心筋、脂肪細胞への分化を試みた。ハンギングドロップ培養を行い、自発分化およびインスリン、IBMX、デキサメサゾン等のホルモン添加によりそれぞれ、心筋、脂肪細胞へ分化させた。またsiRNAを用いた新たな分化方法の開発として、ES細胞にPPAR γ -siRNAを導入し、骨芽細胞への分化を行った。さらに高品質DNAチップ作成のため、未分化サルES細胞cDNAライブラリー作製を試みた。すなわちフィーダー上で培養した状態の良い未分化ESコロニーを選択的にピックアップし、RNAを抽出することにより行った。

(倫理面への配慮)

ヒトcDNAライブラリー原材料は医療機関に属する医師により、本人または遺族の書面による許諾を得て採取されたもので、コード化された個人識別情報は研究者に示されない。さらに、作製にあたっては複数の材料を使用するなどの手段で保護を行う形をとった。

カニクイザルは国立感染症研究所

(2005年4月以前) および医薬基盤研究所(2005年4月以降)のサル供給調整委員会や動物実験委員会で審議されたもので、殺処分を行わざるをえなくなったものを研究所担当者との共同研究という形で分与を受けた。チンパンジー組織は三和科学所有で自然死したものから、同所倫理委での審議を経て分与を受けた。

C. 研究結果

ヒト疾患は OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)によれば約 6,000 種あるといわれているが、そのうち原因となる遺伝子が特定されたものは約 2,000 種で、それらは Human Gene Mutation Database(HGMD) に収録されている。本年度、1858 遺伝子に関する cDNA の配列と疾患の原因となる変異情報を取得、収録した。これらのデータを基に、配列の種間差が病的変異と一致する箇所を容易に検索可能なソフトを開発した。

本研究ではヒト、カニクイザルおよびチンパンジーの完全長 cDNA クローンが基本的な研究資源となる。東大・菅野研ではこれまでカニクイザルの脳および精巣を材料とした cDNA クローン約 60,000 個、およびチンパンジーの皮膚、脳、肝臓を材料とする約 15,451 個の cDNA クローンを独自に開発したオリゴキャップ法で作製し、研究素材として提供してきた。さらにヒト完全長 cDNA クローンに関しては約 1,200,000 クローンをベースとしたビッグコレクションが菅野研に保管・管理されている。本年度疾患遺伝子 1,858 遺伝子のうち約 1,200 遺伝子に対応する cDNA クローンが本研究による運用のために分与された。

本年度は cDNA 作製方法を検討する意味でカニクイザルの腎臓および肝臓より各 10,000 個の cDNA クローンを V-キャップ法で作製し、それらの 5'末端配列を解読した。これらをオリゴキャップ cDNA コレクションに追加すれば総数が約 86,300 クローンとなり、世界最大のカニクイザル cDNA コレクションを有することになった。

昨年度、チンパンジー精巣 cDNA ライブラリーから得た 2,178 全長配列(韓国 KRIBB との共同)をもとに、ヒト RefSeq 遺伝子に対応するカニクイザル、チンパンジー全長 cDNA 配列を検索した結果、3 種に共通する遺伝子が 406 セットあることがわかった。

これまで全長配列を決定した約 9,327

種のカニクイザル cDNA に対し、1858 個のヒト疾患遺伝子に対応するものを検索したところ、314 遺伝子が該当した。それらの疾患遺伝子ホモログをヒト疾患遺伝子とアラインメントし、種間変異とヒトで発症に関係する変異が一致するものをサーチしたところ、19 遺伝子で検出された。これらは疾患の原因となる変異の祖先型の確定に役立つものと考えられる。

172 種類の神経疾患遺伝子ホモログのプライマーセットでカニクイザル脳由来の total RNA をテンプレートとして RT-PCR を行ったところ、8 種類の遺伝子が増幅された。これらを GST 融合遺伝子として発現させたところ、SCNA, QDPR 融合タンパクは、高発現であったのに対して他は発現が見られなかったりする低発現であった。一方クローンコレクションから得られないカニクイザル疾患遺伝子ホモログをクローニングするため、RT-PCR の鋳型となる RNA を 13 組織(大脳、小脳、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、心臓、精巣、筋肉)から抽出し、資源化した。

チンパンジー由来の約 15,451 個の cDNA の中にはヒト RefSeq mRNA 配列に対応するものが 5,689 遺伝子あり、一部についてはその全長について詳細に解析した。ヒトで疾患関連遺伝子として登録された 2,411 遺伝子に対応する配列(7,492 クローン)があるので、特に心臓血管系疾患関連の配列 39、肥満関連の遺伝子 32 について 5'側配列の種間比較を行った。これにより、ヒトでのハイリスク(易罹患性)遺伝子型がチンパンジーでの野生型であったり、その逆の例も見いだされた。

サル ES 細胞の心筋細胞、脂肪細胞への分化に成功した。分化した心筋細胞は GATA4, 心筋特異的トロポニン I、ナトリウム利尿ホルモン(ANP, BNP)を発現しており、さらに分化心筋はペースメーカー細胞に分化可能なことがわかった。脂肪細胞はインスリンレセプター、GLUT4、レプチンやアディポネクチン等を発現しており、さらに GLUT4 はインスリン刺激に反

応し細胞膜に移動した。現在、約 $1-2 \times 10^4$ の未分化サル ES 細胞より 2 μ g の良質な total RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製中である。

全長配列を解読したカニクイザル cDNA から標準遺伝子に相当するものを約 6,000 種選別し、支持基盤にスポットした cDNA チップを作製した。本年度は大脳皮質、小脳、延髄、精巣、肝臓、膵臓について 6,000 種の遺伝子の標準発現プロファイルを作製した。コントロール実験によりカニクイザル cDNA チップはヒト Affymetrix GeneChip とほぼ同等の品質をもつことが予想された。さらに約 10,000 種のカニクイザル cDNA 配列をもとにしたオリゴアレーを Affymetrix 社の協力により完成した。

D. 考察

疾患遺伝子とカニクイザルホモログ遺伝子の配列比較ではヒトで病気を引き起こす変異をカニクイザルの野生型遺伝子をもつ例が 19 遺伝子で見つかったが、それらの多くは生活習慣病に分類されるものが多い。すなわち、ヒトの高カロリーを摂取する食生活や住環境では当該遺伝子の機能低下が症状となって現れるが、サル等の低カロリーな食習慣や生活をする野外環境では症状として出てこないという説明が可能かもしれない。

172 種類のヒト神経系疾患関連遺伝子プライマーセットでカニクイザル脳の total RNA をテンプレートとして、遺伝子 DNA の増幅を試みたがいささか効率が悪かったので、脳以外の 13 種類の臓器をから totalRNA の調製を行った。

これらのカニクイザル各種臓器 total RNA は、マイクロアレーを用いた発現解析などにも利用可能で、資源としては十分価値があると思われる。

ヒト疾患と相関が高い対立遺伝子型が、チンパンジーにおいては野生型となっている例が今回の解析でも見つかっている。チンパンジーの多型の有無については調べた個体数が少ないので明確ではないが、今後、他の疾患関連遺伝子につ

いても解析することにより疾患の遺伝的背景についての重要な情報が得られると思われる。本研究で、とくにヒトでは採取しにくい脳の組織からの全長 cDNA を得ているので、これらからヒトで機能未知の遺伝子が得られることを期待している。

サル ES 細胞から内分泌機能を持つ心筋、脂肪細胞を分化させられることが明らかとなった。すなわち機能性を持つ成熟機能細胞への *in vitro* 分化が可能であることを示した。さらに化学合成した siRNA を使用して分化方向を脂肪細胞から骨芽細胞へと変えられることを明らかにした。未分化サル ES 細胞 cDNA ライブラリーに関してはフィーダー細胞の混入を最小限にした高品質なライブラリーが作製できると考えられる。ES 細胞由来の RAN を材料とした cDNA ライブラリーは現在作製中であるが、既に完成したカニクイザル脳および精巣由来の cDNA を利用した cDNA マイクロアレーとオリゴアレーが完成しているので、とりあえずこれらを使用すれば ES 細胞から脂肪細胞や骨芽細胞への分化で特異的に発現する遺伝子の探索が可能になるものと思われる。

E. 結論

Human Gene Mutation Database (HGMD) に収録されている疾患遺伝子 1858 種に関する cDNA の配列と疾患の原因となる変異情報を取得し、それらを収録したデータベースを構築した。

これらのデータをもとに、東大・菅野研に保管されているヒト完全長 cDNA クローン約 56,000 個を検索し、ヒットした約 1,200 種の疾患遺伝子に対応するクローンが遺伝子バンクに移管された。

本年度はカニクイザルの腎臓および肝臓より各 10,000 個の cDNA クローンを V-キャップ法で作製し、それらの 5' 末端配列を解読した。これによりクローン総数が約 86,300 となり、世界最大のカニクイザル cDNA コレクションを保有することになった。

昨年度、チンパンジー精巣 cDNA ライブラリーから得た 2,178 全長配列 (韓国

KRIBB との共同) をもとに、ヒト RefSeq 遺伝子に対応するカニクイザル、チンパンジー全長 cDNA 配列を検索した結果、3 種に共通する遺伝子が 406 セットあることがわかった。

全長配列が解読された約 9,327 種のカニクイザル完全長 cDNA に対し、1858 個のヒト疾患遺伝子を検索したところ、314 遺伝子が該当した。それらをヒト疾患遺伝子とアラインメントしてみると、種間変異とヒトで発症に関係する変異が一致するものが 19 遺伝子で検出された。

カニクイザル疾患遺伝子ホモログの *in vitro* 発現タンパク合成系を確立した。また網羅的発現解析に必要なカニクイザルの主要臓器 13 種類の totalRNA を調製し、資源化した。

チンパンジー由来の約 15,451 個の cDNA クローンが原資となるヒト RefSeq 対応の 5,689 遺伝子の中にはヒトの心臓血管系疾患に関連する遺伝子 39、肥満関連の遺伝子 32 が含まれた。またヒトでのハイリスク (易罹患性) 遺伝子型がチンパンジーでは野生型であったり、その逆の例も見いだされた。

サル ES 細胞の心筋細胞、さらにペースメーカー細胞への分化に成功した。またインスリンレセプター、GLUT4、レプチンやアディポネクチン等を発現する脂肪細胞への誘導分化を可能にした。未分化サル ES 細胞 cDNA ライブラリー作製に向けてフィーダー細胞の混入を最小限にした ES 細胞より高品質 RNA を調製した。

カニクイザル標準遺伝子約 6,000 種に相当する cDNA をスポットした cDNA チップを作製し、4 種類の組織における発現プロファイルを構築した。また約 10,000 種の cDNA 配列に基づく Affymetrix 仕様のオリゴチップを完成させた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Naoki Osada, Katsuyuki Hashimoto, Momoki Hirai, Jun Kusuda. Aberrant

termination of reproduction-related TMEM30C transcripts in the hominoids. Gene in press (2007)

2) Hisayuki Nomiyama, Kaori Otsuka-Ono, Retsu Miura, Naoki Osada, Keiji Terao, Osamu Yoshie, Jun Kusuda. Identification of a Novel CXCL1-Like Chemokine Gene in Macaques and its Inactivation in Hominids. *J Interferon Cytokine Res.* 27:32-37 (2007).

3) Wang HY, Chien HC, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Gojobori T, Chou CK, Tsai SF, Wu CI, Shen CK. Rate of Evolution in Brain-Expressed Genes in Humans and Other Primates. *PLoS Biol.* 2006 Dec 26;5:e13 [Epub ahead of print]

4) Cheong J, Yamada Y, Yamashita R, Irie T, Kanai A, Wakaguri H, Nakai K, Ito T, Saito I, Sugano S, Suzuki Y. Diverse DNA methylation statuses at alternative promoters of human genes in various tissues. *DNA Res.* 13:155-167 (2006)

5) Takeda J, Suzuki Y, Nakao M, Barrero RA, Koyanagi KO, Jin L, Motono C, Hata H, Isogai T, Nagai K, Otsuki T, Kuryshhev V, Shionyu M, Yura K, Go M, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Wiemann S, Nomura N, Sugano S, Gojobori T, Imanishi T. Large-scale identification and characterization of alternative splicing variants of human gene transcripts using 56,419 completely sequenced and manually annotated full-length cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 34:3917-3928 (2006)

6) Yamashita R, Suzuki Y, Wakaguri H, Tsuritani K, Nakai K, Sugano S. DBTSS: DataBase of Human Transcription Start Sites, progress report 2006. *Nucleic Acids Res.* 34:D86-89 (2006)

7) Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, Ishii S, Sugiyama T, Saito K, Isono Y, Irie R, Kushida N, Yoneyama T, Otsuka R, Kanda K, Yokoi T, Kondo H, Wagatsuma M, Murakawa K, Ishida S, Ishibashi T, Takahashi-Fujii A, Tanase

- 8) T, Nagai K, Kikuchi H, Nakai K, Isogai T, Sugano S. Diversification of transcriptional modulation: Large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 16: 55-65 (2006)
- 9) Takada T., Suzuki Y., Kadota N., Kondo Y., and Torii R. Generation of GFP-expressing monkey ES cells. *Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc. Embryonic Stem Cell Protocols, Turksen K., ed. 2nd ed. 329, 305-312 (2006)*
- 10) Tsukada, H., Takada, T., Shiomi, N., Tani, T., and Torii, R. Acidic fibroblast growth factor promotes hepatic differentiation of monkey embryonic stem cells. *In vitro Cell. Dev-An.* 42, 83-88 (2006)
- 11) Abdelalim, E., Takada, T., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Tooyama, I., and Torii, R. In vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 689-695 (2006)
- 12) Yamashita A., Takada, T., Omatsu-Kanbe, M., Nemoto, K., Matsuura, H., Yamamoto G., and Torii R. Monkey embryonic stem cells differentiate into adipocytes in vitro. *Cloning Stem Cells* 8, 3-9 (2006)
- 13) Abdelalim, E., Takada, T., Torii, R. and Tooyama, I. Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical localization in the hypothalamus of monkey. *Peptides* 27, 1886-1893 (2006)
- 14) Yamashita A., Takada, T., Yamamoto G., and Torii R. Stable maintenance of monkey embryonic stem cells in the absence of bFGF. *Transplant. Proc.* 38, 1614-1615 (2006)
- 15) Yamashita A., Takada, T., Nemoto, K., Yamamoto G., and Torii R. Transient suppression of PPAR directed ES cells into an osteoblastic lineage. *FEBS Lett.*, 580, 4121-4125 (2006)
2. 学会発表
- 1) 高等霊長類でのTMEM30C遺伝子転写の進化
長田直樹、橋本雄之、平井百樹、楠田潤
日本進化学会 2006年8月 東京
- 2) 亀岡洋祐、高橋一朗、長田直樹、田沼玲子、平田誠、楠田潤、カニクザルcDNAマイクロアレイの作製と評価、
日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月 名古屋
- 3) 倉島治、赤見理美、吉川泰弘、松沢哲郎、平井百樹、長谷川寿一：大型類人猿情報ネットワークにおける資源配布システム
第22回日本霊長類学会大会 2006年7月 大阪
- 4) 落合-大平知美、倉島治、長谷川寿一、平井百樹、松沢哲郎、吉川泰弘：大型類人猿の日本での飼育の歴史、第22回日本霊長類学会大会大会 2006年7月 大阪
- 5) 山下晃弘、高田達之、尾松万里子、松浦博、山本学、鳥居隆三、カニクザルES細胞の脂肪細胞への分化誘導、第5回日本再生医療学会 2006年3月 岡山
- 6) Abdelalim E., Takada T., Toyoda F., Omatsu-Kanbe M., Matsuura H., Tooyama I., and Torii R., Monkey embryonic stem cell-derived cardiomyocytes express natriuretic peptides *in vitro*. 第5回日本再生医療学会 2006年3月 岡山
- 7) 高田 達之、サルES細胞と再生医学、第53回日本実験動物学会、神戸、公開シンポジウム「再生医学の現状と今後の展望」2006 (5/13)
- 8) 山下晃弘、高田達之、鳥居隆三、サルES細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導、第53回日本実験動物学会 2006年5月 神戸

9) Abdelalim E., Takada T., Toyoda F., Omatsu-Kanbe M., Matsuura H., Tooyama I., and Torii R. Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells into Functional Cardiomyocytes *In Vitro*. 第53回日本実験動物学会 2006年5月 神戸

10) 高田達之、山下晃弘、鳥居隆三、PPAR γ -siRNAを用いたES細胞の骨芽細胞への分化、日本分子生物学会フォーラム 2006年12月 名古屋

11) Abdelalim E., Takada T., Tooyama I., and Torii R. Expression of ANP and BNP in monkey embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. 20th IUBMB International Biochemistry and Molecular biology and 11th FAOBMB Congress Kyoto, Japan June 18-23, 2006

12) Takada T., Nemoto K., Yamashita A., Kobayashi M., Kato M., Kondo Y., and Torii R. siRNA mediated efficient gene silencing of Oct4 and cell differentiation in mouse and monkey ES cells. 4th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Toronto, Ontario, Canada, June 29-July 1, 2006

13) Yamashita A., Takada T., Omatsu-Kanbe M., Nemoto K., Matsuura H., Yamamoto G., and Torii R. Osteoblast and adipocyte differentiation of monkey embryonic stem cells *in vitro*. 4th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Toronto, Ontario, Canada, June 29-July 1, 2006

カニクイザル完全長 cDNA の配列決定とその比較

分担研究者 楠 田 潤 （独）医薬基盤研究所 遺伝子資源室研究リーダー

疾患研究の基礎となる疾患遺伝子に関する配列および発症の原因となる変異情報を1858 遺伝子について収集した。これらは疾患遺伝子総数 2,056 個の 90% に相当する。

カニクイザルの腎臓および肝臓を材料とし、それぞれ約 10,000 個の完全長 cDNA クロオンを V-キャップ法で作製し、その末端配列を解読した。これまで収集してきた脳および精巣のクロオンと合わせると約 86,300 クロオンとなり、世界最大の cDNA コレクションを保有することになった。

昨年度、チンパンジー精巣 cDNA ライブラリーから得た 2,178 全長配列（韓国 KRIBB との共同）をもとに、ヒト RefSeq 遺伝子に対応するカニクイザル、チンパンジー全長 cDNA 配列を検索した結果、3 種に共通する遺伝子が 406 セットあることがわかった。

約 9,327 種のカニクイザル完全長 cDNA より、1858 個のヒト疾患遺伝子に対応するものを検索したところ、314 遺伝子が該当した。それらをヒト疾患遺伝子とアラインメントしたところ、種間変異とヒトで発症に関係する変異が一致するものが 19 遺伝子で検出された。

カニクイザル cDNA 約 6,000 種を固定した cDNA マイクロアレーに加え、本年度、約 10,000 種の cDNA 配列をもとにしたオリゴアレーを Affymetrix 社の協力により完成した。これらを併用すれば cDNA アレーとオリゴアレーの長所を活かしたより正確でグローバルな遺伝子の網羅的発現解析が可能になるものと思われた。

A. 研究目的

人類に共通する悩みである疾病はヒト集団に分布する多型の一つで、実はその原因となる変異が祖先である非ヒト霊長類から受け継がれている例が多数示されるようになった。カニクイザルおよびチンパンジーよりヒト疾患に関連する遺伝子のホモログを単離、収集してヒト遺伝子と比較し、治療方法の開発や予防に利用することをめざす。このためには本年度以下の研究を行う。

- 1) 比較の基準となるヒト疾患遺伝子に関する正確なデータが必要であり、これらの入手と整理および、霊長類ホモログとの比較を容易にするソフトの開発が不可欠である。また得られた結果を機能的に検証するため、ただちに実験に使用可能疾患遺伝子 cDNA クロオンを収集する。
- 2) 実験霊長類として最も多用されたいカニクイザルを材料にこれまで約 60,000 個の cDNA クロオン作製、収集して

きたが、本年度は 20,000 個のクロオンを追加し、クロオンコレクションの充実をはかる。

3) 収集したカニクイザル cDNA クロオンを利用して、DNA マイクロアレーを作製した。これらによる疾患組織における遺伝子の網羅的発現解析をすることで疾患に特異的なバイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

1) 現在 HGMD には約 2,056 種類の疾患関連遺伝子についての情報が収録されている。われわれはこのうち 1,858 遺伝子に関する情報をダウンロードし、そこに収録されている cDNA 配列と発症に係る塩基配列置換およびアミノ酸置換のデータを一括して霊長類遺伝子配列と比較できるようなデータセットを作製した。

2) これまで完全長 cDNA クロオンを作製するのにタバコ phosphodiesterase を利

用するオリゴキャップ法を用いていたが、PCR で増幅する操作が含まれるためクローンの重複が高いという指摘があり、今回 PCR 操作を含まない V-キャップ法を用い、cDNA クローンの作製を試みた。

3) カニクイザルの標準遺伝子約 6,000 種の cDNA を固定した DNA チップを既に完成している。本年度、Affymetrix 社の協力によりカニクイザル cDNA 配列を利用したおオリゴチップの作製を試みた。

C. 研究結果

1) ヒト疾患は OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)によれば約 6,000 種あるといわれているが、そのうち原因となる遺伝子が特定されたものは約 2,000 種近くあり、それらは Human Gene Mutation Database(HGMD) に収録されている。そのうち 1858 遺伝子に関する cDNA の配列と疾患の原因となる変異情報を本年度取得、収録した。これらのデータを基に、ヒト疾患遺伝子配列とサンプル配列を ClustalW でアラインメントし、違いがあった部分が疾患の原因となる変異と重なる部分があればそのトリプレットコドンを一リストアップするようなソフトを構築した。

(<http://genbank.nibio.go.jp/tool/HGMD1857.html>) このソフトを利用すれば、配列の種間差が病的変異と一致する箇所を容易に検索可能になる。

2) これまで、カニクイザルの脳および精巣を材料に約 60,000 個の完全長 cDNA クローンを作製し、コレクションすると同時に標準遺伝子に対応する約 9,327 種の遺伝子のクローンについて全長配列を解読してきた。本年度はクローンコレクションのさらなる充実を図るため、腎臓および肝臓より各 10,000 個の cDNA クローンを作製し、それらの 5'末端配列を解読した。

3) 昨年度、チンパンジー精巣 cDNA ライブラリーから得た 2,178 全長配列(韓国 KRIBB との共同)をもとに、ヒト RefSeq 遺伝子に対応するカニクイザル、チンパンジー全長 cDNA 配列を検索した結果、3 種

に共通する遺伝子が 406 セットあることがわかった。

4) すでに全長配列を決定した約 9,327 種のカニクイザル cDNA に対し、1858 個のヒト疾患遺伝子に対応するものを検索したところ 314 遺伝子が該当した。それらを疾患遺伝子とアラインメントし、種間変異とヒトで発症に関係する変異が一致するものをサーチしたところ、19 遺伝子で検出された。そのうち 8 種類はこれまでに報告がなく新規の一致例であった。これらは疾患の原因となる変異の祖先型の確定に役立つものと考えられる。

5) 全長配列を解読したカニクイザル cDNA から標準遺伝子に相当するものを約 6,000 種選別し、PCR で挿入断片を増幅し、支持基盤にスポットした cDNA チップを作製した。本年度は脳皮質、小脳、延髄、精巣、肝臓、膵臓について 6,000 種の遺伝子の標準発現プロファイルを作製した。比較的組織特異的な発現を示す RNASE 4(ribonuclease, RNase A family, 4 precursor), EIF5(eukaryotic translation factor 5), DLG2(chapsyn-110), TMED3(transmembrane erp24 domain containing 3)についてヒトの Affymetrix GeneChip を用いてヒトの各組織での発現を調べたところ、カニクイザルの結果とほぼ一致する組織特異的な発現が確認され、カニクイザル cDNA チップはヒト Affymetrix GeneChip とほぼ同等の品質をもつことが予想された。さらに約 10,000 種のカニクイザル cDNA 配列をもとにしたオリゴアレーを Affymetrix 社の協力により完成した。

D. 考察

本課題では疾患に関連する遺伝子に関する詳細で正確な情報をいかに広範囲に収集できるかが重要な基本的作業となる。遺伝性疾患については疾患ごとのデータベースはあるが、データの記述方法がまちまちで使用し難いし、すべての疾患データベースからデータを収集するのは大変である。一方、疾患のすべてを対象と

したデータベースとして OMIM, HGMD, H-inv、疾患遺伝子変異データベース（慶応大学）、Gene and Disease (NCBI) などがあるが、OMIM, HGMD、H-inv 以外は網羅する疾患、データとも量的に不十分である。OMIM は収録する情報も最大で、ほぼすべての疾患を網羅している。しかし発症の原因となる遺伝子障害の約 70% を占める 1 アミノ酸置換（1 塩基置換による）に関わる mutation の情報は論文からの引用で、その基準となる cDNA 配列の開始点が論文により異なる場合があるため、mutation の位置を相互に比較し難いという欠点がある。H-inv の mutation データも OMIM とリンクをはってあるだけで OMIM の不便が解消されない。この点、HGMD は基準となる cDNA 配列を設定した上で、その配列における疾病関連の mutation が記載され、整理されているので正確で汎用性の高いデータが得られる。本年度、HGMD が収録する 2,056 疾患遺伝子のうち、1,858 遺伝子に関するデータを手に入れたので、疾患遺伝子の霊長類ホモログとの比較解析が加速されるものと思われる。

腎臓および肝臓を材料として約 20,000 個の完全長 cDNA クローンを作製したが、今回は従来使用していたオリゴキャップ法に変え、V-キャップ法を用いて作製した。オリゴキャップ法には PCR で増幅するステップが含まれるので、できたクローン集団における重複率が高いという指摘があったので今回、V-キャップ法を採用した。現在、20,000 クローンの末端配列の解読が終了したところで、重複率のオリゴキャップ法で作製したクローンとの比較など今後の課題となる。マウスやラットのモデル動物を用いた実験では、腎機能の詳細部分についてヒトとマウス、ラット間で異なるという報告がある。また肝臓においても実験霊長類であるカニクイザルとヒトで薬物代謝能に差異があることが知られており、モデル実験をより正確に行うためにはこれらの器官におけるカニクイザルとヒトの遺伝子の発現の種間差を把握しておく必要

がある。われわれが収集した腎臓と肝臓の cDNA コレクションは遺伝子発現の網羅的解析を支援するものである。

E. 結論

疾患研究の基礎となる疾患遺伝子に関する配列および発症の原因となる変異情報を 1858 遺伝子について収集した。これは現在、疾患遺伝子総数 2,056 個の 90% に相当する。

カニクイザルの腎臓および肝臓を材料とし、それぞれ約 10,000 個の完全長 cDNA クローンを V-キャップ法で作製し、その末端配列を解読した。これまで収集してきた脳および精巣のクローンと合わせると約 86,300 クローンとなり、世界最大の cDNA コレクションを保有することになる。

昨年度、チンパンジー精巣 cDNA ライブラリーから得た 2,178 全長配列（韓国 KRIBB との共同）をもとに、ヒト RefSeq 遺伝子に対応するカニクイザル、チンパンジー全長 cDNA 配列を検索した結果、3 種に共通する遺伝子が 406 セットあることがわかった。

約 9,327 種のカニクイザル完全長 cDNA より、1858 個のヒト疾患遺伝子に対応するものを検索したところ、314 遺伝子が該当した。それらをヒト疾患遺伝子とアラインメントしたところ、種間変異とヒトで発症に関係する変異が一致するものが 19 遺伝子で検出された。

カニクイザル cDNA 約 6,000 種を固定した cDNA マイクロアレーに加え、本年度、約 10,000 種の cDNA 配列をもとにしたオリゴアレーを Affymetrix 社の協力により完成した。これらを併用すれば cDNA アレーとオリゴアレーの長所を活かしたより正確でグローバルな遺伝子の網羅的発現解析が可能になるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hisayuki Nomiyama, Kaori Otsuka-Ono, Retsu Miura, Naoki Osada, Keiji Terao, Osamu Yoshie, **Jun Kusuda**. Identification of a Novel CXCL1-Like Chemokine Gene in

Macaques and its Inactivation in Hominids. *J Interferon Cytokine Res.* 27:32-37(2007).

2) Naoki Osada, Katsuyuki Hashimoto, Momoki Hirai, Jun Kusuda. Aberrant termination of reproduction-related TMEM30C transcripts in the hominoids. Gene in press (2007).

3) 楠田 潤
疾患研究および創薬のための遺伝子資源
バンク
医学のあゆみ 220:5654-5658 (2007)

2. 学会発表

1) 高等霊長類での TMEM30C 遺伝子転写の進化

長田直樹、橋本雄之、平井百樹、楠田潤
日本進化学会 2006年8月 東京

2) 亀岡洋祐、高橋一朗、長田直樹、田沼玲子、平田誠、楠田潤、

カニクイザルcDNAマイクロアレイの作製と評価、

日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋

ESB GENE BANK 2007/03/14 05:28 PM

HGMD(1857 sequences) blat-> clustalw

SEQUENCES

図1 ヒト疾患遺伝子の病的変異と一致する配列を検索するためのツール

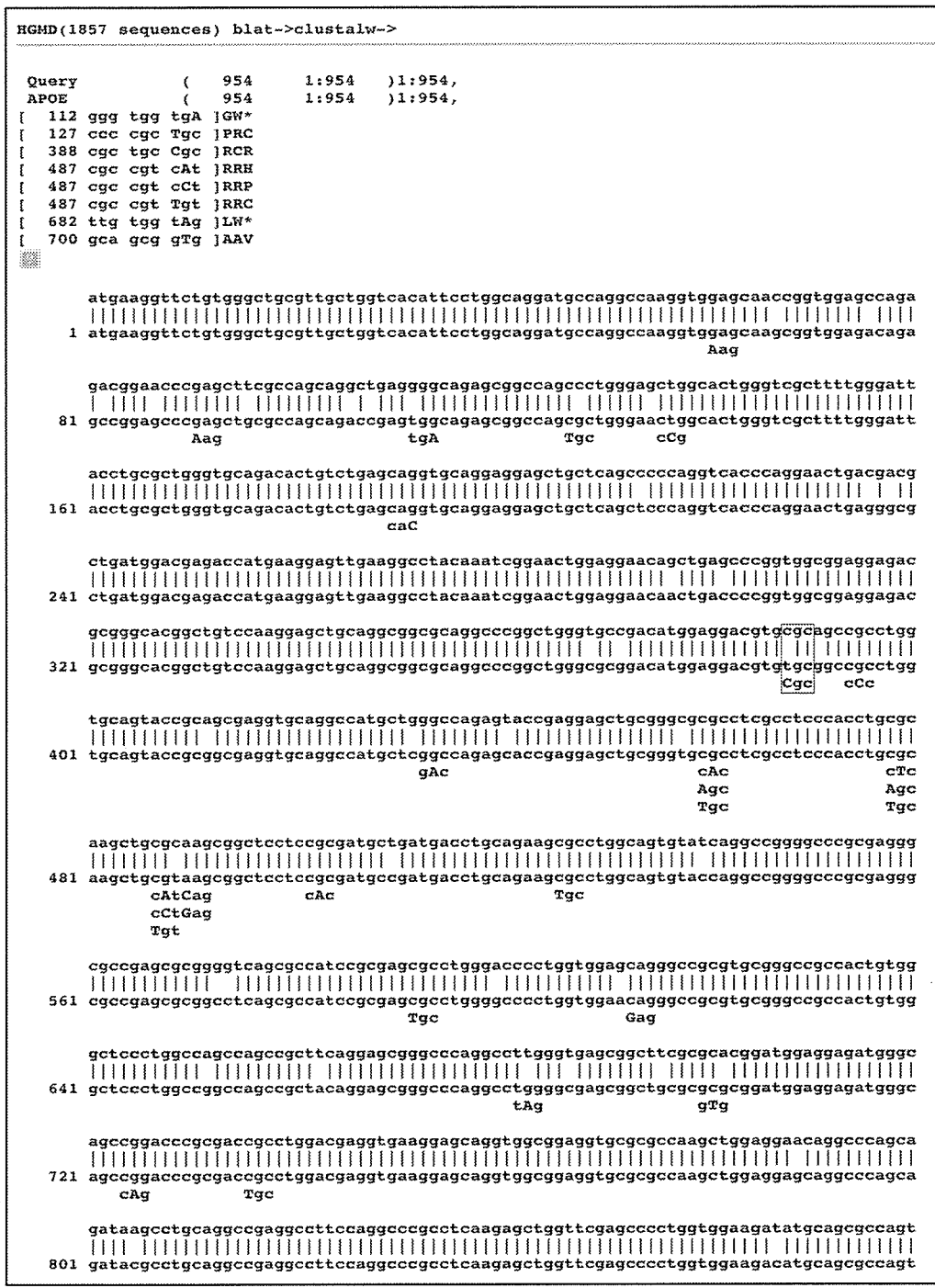


図2 検索ツールによるカニクイザル APOE 遺伝子における種間で異なる塩基と病的変異が一致した例

表1 H18年度に収集されたヒト疾患遺伝子cDNAクローン

No.	疾患遺伝子	クローン名	基盤研整理番号	管野研整理番号
1	A2M	BC040071	DG1300-1_G09	IRAK082O18
2	A4GALT	BC017068.1	suganoB-249 B12 seq	IRAK 022_L03
3	AAAS	BC000659	DG1300-3_A07	IRAL005D04
4	AASS	AK023446.1	suganoA-098 E12 seq	144_A02
5	ABAT	BC015628.1	suganoC-637 G12 seq	IRAL 033_O21
6	ABCB7	BC006323.1	suganoC-550rc C11 seq	IRAL 017_K11
7	ABCD1	BC025358.1	suganoC-709rc B12 seq	IRAL 042_L14
8	ABCG5	AK091997.1	suganoA-031rc A11 seq	037_E11
9	ABHD5	BC021958.1	suganoB-219revc_C07 seq	IRAK 015_M19
10	ACADM	BC005377.1	suganoC-524rc A10 seq	IRAL 016_F19
11	ACADS	BC025963.1	suganoC-708rc B11 seq	IRAL 042_G12
12	ACADSB	BC013756.1	suganoB-272rc F10 seq	IRAK 028_L23
13	ACADVL	BC012912.1	suganoB-265T7_A09 seq	IRAK 028_C05
14	ACTA1	BC012597.1	suganoC-563rc D10 seq	IRAL 019_N12
15	ACTC	BC009978.1	suganoC-587rc F02 seq	IRAL 026_D12
16	ACTN4	BC005033.1	suganoC-554rc D03 seq	IRAL 018_K19
17	ACVRL1	BC042637	DG1300-1_E05	IRAK051P13
18	ADA	BC007678.1	suganoC-486rc A12 seq	IRAL 012_C10
19	ADH1B	BC033009.1	suganoB-291 E09 seq	IRAK 034_D14
20	ADSL	BC000253.1	suganoC-431 B08 seq	IRAL 006_O13
21	AFP	BC027881.1	suganoB-308revc_D06 seq	IRAK 049_I12
22	AGA	BC012392.1	suganoB-238 B08 seq	IRAK 021_D15
23	AGER	BC020669.1	suganoC-667 A11 seq	IRAL 037_E17
24	AGPAT2	BC019292.1	suganoC-469rc G01 seq	IRAL 009_K10
25	AGT	BC011519.1	suganoB-193rc B08 seq	IRAK 012_N22
26	AGTR1	BC022447.1	suganoB-277 D08 seq	IRAK 032_H05
27	AICDA	BC006296.1	suganoC-541rc C03 seq	IRAL 017_A01
28	AIPL1	BC012055	DG1300-3_D04	IRAL029J22
29	AK1	BC001116.1	suganoC-395 A08 seq	IRAL 003_P13
30	ALAS2	BC030230.1	suganoB-319revc_D10 seq	IRAK 049_N14
31	ALB	BC034023.1	suganoC-677 B09 seq	IRAL 037_J22
32	ALDH2	BC002967.1	suganoC-451rc E08 seq	IRAL 008_E16
33	ALDH3A2	BC002430.1	suganoC-413rc C03 seq	IRAL 005_C20
34	ALDH4A1	BC007581.1	suganoC-579rc E09 seq	IRAL 022_H15
35	ALDH5A1	BC034321.1	suganoB-371rc G10 seq	IRAK 072_F15
36	ALDH6A1	BC032371.1	suganoB-349 G04 seq	IRAK 064_D03
37	ALDOA	BC015888	DG1300-1_A07	IRAK015I14
38	ALDOB	BC029399.1	suganoC-701rs1 C06 seq	IRAL 041_E10
39	alg12	BC001729.1	suganoC-422rc C10 seq	IRAL 006_D01
40	alg6	BC001253	DG1300-1_A02	IRAK004E13
41	ALMS1	BC014492	DG1300-3_D10	IRAL034B23
42	ALPL	AK097413.1	suganoA-111 F12 seq	158_H01
43	AMACR	BC009471	DG1300-3_A11	IRAL009L14
44	AMH	BC049194	DG1300-2_A03	IRAK093G03
45	AMN	AK055802.1	suganoA-040 C05 seq	053_D08
46	AMPD1	AK097077.1	suganoA-067 D09 seq	097_A10
47	AMT	BC007546.1	suganoC-578rc E08 seq	IRAL 022_B09
48	ANK2	AK095596.1	suganoA-064 D06 seq	095_C07
49	APOA1	BC005380.1	suganoC-536rc B10 seq	IRAL 016_L23
50	APOA2	BC005282.1	suganoC-534rc B08 seq	IRAL 016_J21
51	APOC2	BC005348.1	suganoC-527rc B01 seq	IRAL 016_F23
52	APOC3	BC027977.1	suganoB-323 G02 seq	IRAK 049_P24
53	APOE	BC003557.1	suganoC-427rc D02 seq	IRAL 006_H23
54	APOH	BC026283.1	suganoC-673 B05 seq	IRAL 037_I23

55	APTX	AK055672.1	suganoA-005rc A01 seq	004_B06
56	AQP2	BC042496	DG1300-1_D11	IRAK050G07
57	ARG1	BC020653.1	suganoC-663 A07 seq	IRAL 037_C17
58	ARSA	BC014210	DG1300-3_D06	IRAL030P15
59	ARSB	BC029051.1	suganoB-325	IRAK 050_G11
60	ASAH1	BC016481.1	suganoB-253 C03 seq	IRAK 026_D10
61	ASL	BC033146.1	suganoC-714rc C02 seq	IRAL 043_C20
62	ASPM	AK001379.1	suganoA-087 E07 seq	130_F05
63	ASS	BC021676	DG1300-3_D07	IRAL031K24
64	ATM	BC007023.1	suganoC-531rc B05 seq	IRAL 016_I14
65	ATP2A1	AK092691.1	suganoA-049rc B06 seq	065_C10
66	ATP2A3	BC035729	DG1300-1_G04	IRAK079G20
67	ATP2C1	BC028139	DG1300-1_E10	IRAK062H11
68	ATP6V0A4	AK055789.1	suganoA-041rc B02 seq	053_G06
69	ATP6V1B1	BC035978	DG1300-3_E06	IRAL041E14
70	ATRX	BC002521.1	suganoC-403rc B09 seq	IRAL 004_E16
71	AUH	BC020722.1	suganoC-657 A02 seq	IRAL 036_I06
72	B3GALT3	BC047618	DG1300-2_A01	IRAK090L04
73	B4GALT7	BC007317	DG1300-3_A03	IRAL003B20
74	BAAT	BC009567.1	suganoC-540rc C02 seq	IRAL 016_P20
75	BBS1	AK027645.1	suganoA-094rc C11 seq	138_A01
76	BBS2	BC014140.1	suganoC-627 G08 seq	IRAL 030_O11
77	BBS4	BC027624.1	suganoB-300 F01 seq	IRAK 046_L03
78	BBS7	BC032691	DG1300-1_F07	IRAK069B12
79	BCKDHA	BC023983.1	suganoC-634 G11 seq	IRAL 032_P20
80	BCKDHB	BC040139	DG1300-1_G11	IRAK084F19
81	BCS1L	BC007500	DG1300-3_B01	IRAL010B05
82	BDNF	BC029795.1	suganoB-332	IRAK 050_L02
83	BLMH	BC003616.1	suganoC-384 A01 seq	IRAL 003_A14
84	BLNK	BC018906.1	suganoC-514rc A06 seq	IRAL 015_D24
85	BMPR1A	BC028383	DG1300-1_C08	IRAK046M04
86	BMPR2	BC052985	DG1300-2_B06	IRAK110K17
87	BPGM	BC017050.1	suganoB-232rc E01 seq	IRAK 020_G17
88	BSCL2	BC009866.1	suganoC-585 F03 seq	IRAL 025_E09
89	BTK	AK057105.1	suganoA-012 A09 seq	012_F12
90	C1QB	BC008983.1	suganoB-192revc_B11 seq	IRAK 012_M18
91	C1QG	BC009016.1	suganoB-191 B01 seq	IRAK 012_M15
92	C1S	AK055183.1	suganoA-042 C06 seq	056_G06
93	C2	BC043484	DG1300-1_H10	IRAK089I19
94	C3	AK094728.1	suganoA-114rc D08 seq	166_C03
95	C4A	BC012372.1	suganoB-190rc B06 seq	IRAK 012_M10
96	C6	BC035723	DG1300-1_G03	IRAK079G04
97	C9	BC020721.1	suganoC-672 B04 seq	IRAL 037_I19
98	CA1	BC027890.1	suganoB-314rc H02 seq	IRAK 049_K24
99	CA2	BC011949.1	suganoB-240rc E05 seq	IRAK 021_I10
100	CAPN3	AK097401.1	suganoA-108 F10 seq	157_H02
101	cart	BC029882.1	suganoB-333T7_B01 seq	IRAK 051_F05
102	CASP10	BC042844	DG1300-1_E03	IRAK051N22
103	CASQ2	BC022288.1	suganoC-651 H08 seq	IRAL 036_A16
104	CBS	BC010242.1	suganoB-224rc D08 seq	IRAK 019_F20
105	CCKBR	BC000740.1	suganoC-438rc D08 seq	IRAL 007_G01
106	CCL5	BC008600.1	suganoB-188 A11 seq	IRAK 012_M01
107	CCM1	AK056537.1	suganoA-020rs A05 seq	022_G01
108	CCND1	BC025302.1	suganoC-713rc seq	IRAL 042_P14
109	CD36	BC008406	DG1300-3_C10	IRAL021P23
110	CD38	BC007964.1	suganoC-570rc E05 seq	IRAL 020_P06
111	CD3E	BC049847	DG1300-2_A05	IRAK093J02
112	CD8A	BC025715.1	suganoB-321revc_D11 seq	IRAK 049_O07

113	CDH3	BC041846	DG1300-1_F12	IRAK074H03
114	CDK4	BC010153.1	suganoC-592rc F07 seq	IRAL 027_D13
115	CDKN1A	BC000312.1	suganoC-374rc A03 seq	IRAL 001_E11
116	CDKN1B	BC001971.1	suganoB-175rc A09 seq	IRAK 004_C06
117	CDKN2A	BC021998.1	suganoC-389 A04 seq	IRAL 003_J21
118	CETP	BC025739.1	suganoB-316 F09 seq	IRAK 049_M02
119	CGB	BC030994.1	suganoC-703 D02 seq	IRAL 041_E24
120	CHEK2	BC004207.1	suganoC-479rcG10 seq	IRAL 011_F17
121	CHIT1	AK055165.1	suganoA-026 B06 seq	030_H03
122	CHRNA1	BC006314.1	suganoC-544rc C06 seq	IRAL 017_G03
123	CHRN1	BC011371.1	suganoB-205revc_C02 seq	IRAK 013_O09
124	CIAS1	AK027194.1	suganoA-124rc E01 seq	200_C01
125	CIRH1A	BC009348	DG1300-3_D01	IRAL026K22
126	CKM	BC007462.1	suganoC-533rc B07 seq	IRAL 016_J17
127	CKN1	BC009793	DG1300-3_C02	IRAL019A04
128	CLCN5	AK092049.1	suganoA-054	080_E07
129	CLCN7	BC012737.1	suganoC-586 F04 seq	IRAL 025_N15
130	CLCNKB	BC020873	DG1300-3_E01	IRAL036F06
131	CLDN14	BC012126.1	suganoC-623rc H02 seq	IRAL 029_P02
132	CLN2	BC014863.1	suganoB-259 C09 seq	IRAK 026_O15
133	CLN3	BC004433.1	suganoC-472rc G04 seq	IRAL 009_O23
134	CLN6	BC013130	DG1300-1_B03	IRAK028I24
135	COCH	BC007230.1	suganoC-577rc E07 seq	IRAL 022_A14
136	COL18A1	AK098216.1	suganoA-112rc D06 seq	161_B08
137	COL1A1	BC036531	DG1300-1_C12	IRAK047I05
138	COL1A2	BC054498	DG1300-2_B04	IRAK107P03
139	COL3A1	BC028178.1	suganoB-348rc F07 seq	IRAK 062_P11
140	COL5A1	AK057231.1	suganoA-014rc A05 seq	013_E12
141	COL6A3	AK092021.1	suganoA-052rc B07 seq	080_B04
142	COL9A3	BC011705.1	suganoC-593rc F08 seq	IRAL 027_H03
143	COMP	BC033676.1	suganoB-356	IRAK 068_K03
144	COMT	BC011935.1	suganoC-601rc G04 seq	IRAL 028_B16
145	COX10	BC006394.1	suganoC-549rc C10 seq	IRAL 017_J11
146	COX15	BC013403.1	suganoC-474rc G06 seq	IRAL 010_B03
147	CP	AK095290.1	suganoA-059rc B09 seq	091_H03
148	CPB2	BC007057.1	suganoC-525rc A11 seq	IRAL 016_F21
149	CPE	BC033866.1	suganoB-358	IRAK 068_L18
150	CPO	BC017210.1	suganoC-512 D08 seq	IRAL 015_A24
151	CPT1A	BC000185.1	suganoC-421rc C09 seq	IRAL 006_C19
152	CRLF1	BC044634	DG1300-3_F02	IRAL044O23
153	CRYAB	BC007008.1	suganoC-532rc B06 seq	IRAL 016_J15
154	CRYBB1	BC036790	DG1300-1_G06	IRAK079N19
155	CRYM	BC018061.1	suganoB-282 E01 seq	IRAK 032_N03
156	CSF1R	BC047521	DG1300-1_B12	IRAK032P23
157	CSF3R	BC053585	DG1300-2_B12	IRAK115E04
158	CSRP3	BC024010.1	suganoB-289rc G02 seq	IRAK 033_P12
159	CST3	BC013083.1	suganoB-230rc D12 seq	IRAK 019_P02
160	CSTB	BC010532.1	suganoB-228 B06 seq	IRAK 019_L01
161	CTH	BC015807.1	suganoB-217 B03 seq	IRAK 015_K07
162	CTNS	BC032850	DG1300-1_D03	IRAK047N13
163	CTSD	BC016320.1	suganoC-446rc E03 seq	IRAL 007_O14
164	CTSK	BC016058.1	suganoC-640rc A02 seq	IRAL 034_G12
165	CX3CR1	BC028078.1	suganoB-346 G03 seq	IRAK 062_I10
166	CXCR4	BC020968.1	suganoB-231	IRAK 020_G12
167	CYB5	BC015182	DG1300-1_A10	IRAK022J12
168	CYBA	BC006465.1	suganoC-423 B07 seq	IRAL 006_F12
169	CYLD	BC012342	DG1300-3_D03	IRAL029C05
170	CYP11A1	BC032329.1	suganoB-350revc_E07 seq	IRAK 064_E02

171	CYP11B1	AK094090.1	suganoA-110rc D05 seq	158_F11
172	CYP17A1	AK094106.1	suganoA-071 E01 seq	101_E04
173	CYP19A1	BC035959	DG1300-3_E08	IRAL041P18
174	CYP1A1	BC023019.1	suganoB-299	IRAK 042_N10
175	CYP1B1	BC012049.1	suganoC-624rc H03 seq	IRAL 029_P07
176	CYP21A2	AK054616.1	suganoA-003 A03 seq	001_H07
177	CYP27A1	BC051851	DG1300-2_B05	IRAK110D16
178	CYP2C8	BC020596.1	suganoC-678 B10 seq	IRAL 037_K09
179	CYP2J2	BC032594.1	suganoB-368rc G08 seq	IRAK 069_I14
180	CYP3A4	BC033862	DG1300-1_F04	IRAK068L02
181	DAF	BC001288.1	suganoB-177 A08 seq	IRAK 004_D02
182	DAZL	BC027595.1	suganoB-292 E10 seq	IRAK 034_G01
183	DBH	BC017174.1	suganoC-416rc A03 seq	IRAL 005_G21
184	DBT	BC016675.1	suganoB-256 C06 seq	IRAK 026_E22
185	DCLRE1C	BC009185	DG1300-3_C11	IRAL025H21
186	DCTN1	AK055298.1	suganoA-036 C01 seq	046_F11
187	DCX	BC027925.1	suganoB-322 G01 seq	IRAK 049_P07
188	DDB2	BC000093.1	suganoC-435 B10 seq	IRAL 007_D04
189	DGUOK	BC015757	DG1300-3_D11	IRAL034C17
190	DHCR24	BC004375	DG1300-3_B07	IRAL013F10
191	DHCR7	BC000054.1	suganoC-436 B11 seq	IRAL 007_E18
192	DKC1	BC010015.1	suganoC-590rc F05 seq	IRAL 026_P18
193	DLD	BC018696.1	suganoC-477rc G09 seq	IRAL 010_P12
194	DLL3	BC000218.1	suganoC-442rc D11 seq	IRAL 007_J02
195	dmgdh	AK057641.1	suganoA-016rc A06 seq	014_E11
196	DMRT1	BC040847	DG1300-1_H07	IRAK088C14
197	DNAH11	AK054657.1	suganoA-001 A01 seq	001_A10
198	DNAI1	BC030583.1	suganoB-293rc G03 seq	IRAK 034_M22
199	DNASE1	BC029437.1	suganoC-702 D01 seq	IRAL 041_E15
200	DNMT3B	AK001191.1	suganoA-081rc C02 seq	124_C08
201	DPAGT1	BC000325.1	suganoC-376rc A05 seq	IRAL 001_G17
202	DPM1	BC016322.1	suganoC-633rc H09 seq	IRAL 032_J14
203	DRD2	BC021195.1	suganoC-515 D10 seq	IRAL 015_E01
204	DRD5	BC009748.1	suganoC-510 D06 seq	IRAL 014_N08
205	DTNA	BC005300.1	suganoC-523rc A09 seq	IRAL 016_B17
206	EBAF	BC027883.1	suganoB-310 F08 seq	IRAK 049_K02
207	EBP	BC001572.1	suganoB-176rcA10 seq	IRAK 004_C21
208	ECGF1	BC018160.1	suganoB-243 B10 seq	IRAK 021_M06
209	ECM1	BC023505	DG1300-3_B06	IRAL012H03
210	EDARADD	AK096339.1	suganoA-104 F06 seq	156_A12
211	EDN1	BC009720.1	suganoB-210	IRAK 014_M23
212	EDN3	BC008876.1	suganoC-589rc F04 seq	IRAL 026_M17
213	EDNRA	BC022511.1	suganoB-280 D11 seq	IRAK 032_J07
214	EDNRB	BC014472.1	suganoC-643 H02 seq	IRAL 034_L23
215	EFEMP1	BC014410.1	suganoC-614rc G06 seq	IRAL 029_A23
216	EGR2	BC035625	DG1300-1_F06	IRAK068N04
217	EIF2B2	BC011750.1	suganoC-591rc F06 seq	IRAL 027_D02
218	EIF2B4	BC001870.1	suganoC-456 C02 seq	IRAL 008_I17
219	EIF2B5	BC053646	DG1300-2_B11	IRAK115D13
220	ELAC2	BC004158.1	suganoC-468rc F12 seq	IRAL 009_I17
221	ELK1	BC056150	DG1300-2_C06	IRAK119P19
222	ELN	AK094138.1	suganoA-122 G05 seq	182_H05
223	EMD	BC000738.1	suganoC-440rc2 A06 seq	IRAL 007_H09
224	ENG	BC014271.1	suganoC-508rc A05 seq	IRAL 014_I16
225	EPB41	BC039079	DG1300-1_E07	IRAK052O11
226	EPHX1	BC008291.1	suganoC-553rc D02 seq	IRAL 018_F08
227	EPM2A	AK022721.1	suganoA-084 E06 seq	127_A12
228	ERCC2	BC008346.1	suganoC-580 F02 seq	IRAL 023_H07

229	ERCC3	BC008820.1	suganoC-517rc A07 seq	IRAL_015_F10
230	ERCC5	BC031522.1	suganoB-195rc B10 seq	IRAK_013_J22
231	ESR2	BC024181.1	suganoB-288 E07 seq	IRAK_033_M07
232	ETFA	BC015526.1	suganoB-236rc E04 seq	IRAK_020_O07
233	ETFDH	BC011890.1	suganoC-604 F08 seq	IRAL_028_G04
234	EVC	AK025394.1	suganoA-152 A11 seq	247_G04
235	EVER1	BC023597	DG1300-3_D08	IRAL033B02
236	EXO1	BC007491.1	suganoC-385rc B01 seq	IRAL_003_A23
237	EXT1	BC001174.1	suganoC-429rcA04 seq	IRAL_006_L06
238	EXT2	BC010058.1	suganoC-596rc F11 seq	IRAL_027_K05
239	EYA4	BC041063	DG1300-3_E11	IRAL044K10
240	F10	BC046125	DG1300-2_B02	IRAK107H24
241	F13A1	BC027963.1	suganoB-315revc_A09 seq	IRAK_049_L16
242	F2	BC051332	DG1300-3_F06	IRAL047I22
243	FABP2	AK025079.1	suganoA-141 H12 seq	234_E04
244	FAH	BC002527.1	suganoC-406 B02 seq	IRAL_004_I14
245	FANCC	BC015748.1	suganoC-641rc A03 seq	IRAL_034_I13
246	FANCD2	AK022613.1	suganoA-083rc C04 seq	126_F07
247	FANCF	AK001716.1	suganoA-051 C11 seq	077_A05
248	FANCG	BC011623.1	suganoC-518 E01 seq	IRAL_015_F20
249	FBLN5	BC022280.1	suganoC-659 A04 seq	IRAL_036_N23
250	FBP1	BC012927.1	suganoB-271revc_D03 seq	IRAK_028_I22
251	FCGR1A	BC032634.1	suganoB-364revc_F03 seq	IRAK_069_D17
252	FCGR2A	BC019931.1	suganoB-296rc G04 seq	IRAK_042_D24
253	FCGR3A	BC017865.1	suganoC-658 A03 seq	IRAL_036_L11
254	FECH	BC039841	DG1300-1_H05	IRAK084N10
255	FGD1	BC034530	DG1300-1_B10	IRAK029O13
256	FGFR4	BC011847.1	suganoC-607 F11 seq	IRAL_028_I21
257	FGG	BC021674.1	suganoC-632 G10 seq	IRAL_031_G23
258	FH	BC017444.1	suganoC-582rc E11 seq	IRAL_023_N07
259	FKRP	BC002612	DG1300-3_A06	IRAL004N16
260	FOLH1	BC025672.1	suganoB-306 F04 seq	IRAK_049_E05
261	FOXA2	BC011780.1	suganoC-595rc F10 seq	IRAL_027_J06
262	FRDA	BC048097	DG1300-2_A10	IRAK106P13
263	FUCA1	BC017338.1	suganoC-687 C03 seq	IRAL_039_H05
264	FUT2	BC001899.1	suganoC-450rc A10 seq	IRAL_008_C19
265	FUT6	AK098073.1	suganoA-105 F07 seq	156_D10
266	FY	BC017817.1	suganoC-660 A05 seq	IRAL_036_O01
267	G6PD	BC000337.1	suganoC-378rc A07 seq	IRAL_001_I21
268	G6PT1	BC015650.1	suganoC-635rc H10 seq	IRAL_033_I24
269	GAA	BC040431	DG1300-1_H02	IRAK084J08
270	GABRA1	BC030696.1	suganoB-284 E03 seq	IRAK_033_A15
271	GABRB3	BC010641.1	suganoB-198	IRAK_013_K06
272	GALC	BC036518	DG1300-1_D02	IRAK047L03
273	GALE	BC001273.1	suganoB-179 A09 seq	IRAK_004_O10
274	GALK1	BC001166.1	suganoC-428rc D03 seq	IRAL_006_I24
275	GALNS	BC056151	DG1300-2_C04	IRAK119K01
276	GALT	BC015045.1	suganoB-221rc D05 seq	IRAK_015_P10
277	GAMT	BC016760.1	suganoC-390 A05 seq	IRAL_003_K12
278	GATA1	BC009797.1	suganoC-558rc D06 seq	IRAL_019_B01
279	GATA3	BC006793.1	suganoB-171 A05 seq	IRAK_003_P09
280	GATA4	AK097060.1	suganoA-069 D11 seq	097_H07
281	GATM	BC004141.1	suganoC-392rc B04 seq	IRAL_003_K24
282	GBE1	BC012098.1	suganoC-616rc G08 seq	IRAL_029_H15
283	GCDH	BC002579.1	suganoC-401 A12 seq	IRAL_004_D12
284	GCH1	BC025415.1	suganoC-545 E05 seq	IRAL_017_H01
285	GCK	BC001890.1	suganoC-458rc F02 seq	IRAL_008_L07
286	gcs1	BC002804.1	suganoC-485 C04 seq	IRAL_012_B16