

287	GCSH	BC020922.1	suganoC-646 H03 seq	IRAL_035_C09
288	GDAP1	BC024939.1	suganoB-254 C04 seq	IRAK_026_D11
289	GDF5	BC032495	DG1300-1_F03	IRAK064P24
290	GDI1	BC012201.1	suganoB-182rc B02 seq	IRAK_012_E08
291	GFI1	BC032751.1	suganoB-370 H03 seq	IRAK_069_P06
292	GGCX	BC013979.1	suganoC-598rc G01 seq	IRAL_027_M19
293	GH2	BC020760.1	suganoC-669 B01 seq	IRAL_037_F18
294	ghrl	BC025791.1	suganoB-343rc F06 seq	IRAK_062_G11
295	GJB1	BC022426.1	suganoC-647 H04 seq	IRAL_035_F08
296	GJB2	BC017048.1	suganoB-234T7_A07 seq	IRAK_020_L01
297	GJB3	BC012918	DG1300-1_B02	IRAK028E17
298	GK	BC029820	DG1300-1_E01	IRAK051C03
299	GLA	BC002689.1	suganoC-495rc H12 seq	IRAL_012_M15
300	GLB1	BC007493.1	suganoC-394 A07 seq	IRAL_003_P03
301	GLMN	BC001257.1	suganoB-180rcA12 seq	IRAK_004_P01
302	GLRB	BC032635.1	suganoB-365revc_F04 seq	IRAK_069_D21
303	GLUD1	BC040132	DG1300-1_H03	IRAK084J09
304	GM2A	BC009273.1	suganoC-520rc A08 seq	IRAL_015_J22
305	GNAS	AK026564.1	suganoA-134revc_B05 seq	226_B11
306	GNAT2	BC000233.1	suganoC-424rc C11 seq	IRAL_006_G05
307	GNMT	BC032627.1	suganoB-361 G10 seq	IRAK_069_B21
308	GNPAT	BC000450.1	suganoC-375rc A04 seq	IRAL_001_F09
309	GNS	BC012482.1	suganoB-270rc F08 seq	IRAK_028_I08
310	GP1BA	BC027955.1	suganoB-309revc_D07 seq	IRAK_049_J16
311	GP9	BC030229.1	suganoB-318revc_D09 seq	IRAK_049_N10
312	GPC3	BC035972	DG1300-3_E07	IRAL041E20
313	GPI	BC004982.1	suganoC-470rc G02 seq	IRAL_009_L06
314	GRHPR	BC000605.1	suganoC-415 B05 seq	IRAL_005_E24
315	GSN	BC026033.1	suganoC-707 D05 seq	IRAL_042_G01
316	GSS	BC007927.1	suganoC-565rc D12 seq	IRAL_020_B06
317	GSTP1	BC010915.1	suganoC-557 E06 seq	IRAL_019_A15
318	GUCA1A	BC031663	DG1300-1_E02	IRAK051H22
319	GUSB	BC014142.1	suganoC-628rc H06 seq	IRAL_030_O15
320	GYPA	BC013328.1	suganoC-560rc D07 seq	IRAL_019_G14
321	HADH2	BC000372.1	suganoC-372rc A01 seq	IRAL_001_A24
322	HADHA	BC009235.1	suganoC-393 A06 seq	IRAL_003_M01
323	HADHB	BC030824.1	suganoC-649 H06 seq	IRAL_036_A04
324	HADHSC	BC000306.1	suganoC-373rc A02 seq	IRAL_001_C23
325	HBA1/HAB2	BC032122.1	suganoC-685rc A11 seq	IRAL_039_G14
326	HBB	BC007075.1	suganoC-575 F01 seq	IRAL_021_P12
327	HBG1	BC020719.1	suganoC-670 B02 seq	IRAL_037_H07
328	HBG2	BC029387.1	suganoC-705 D04 seq	IRAL_041_O09
329	HEXA	BC018927.1	suganoC-564rc D11 seq	IRAL_020_A07
330	HEXB	BC017378.1	suganoC-388 A03 seq	IRAL_003_E15
331	HGD	BC020792.1	suganoC-665 A09 seq	IRAL_037_D08
332	HK1	BC008730.1	suganoC-417rc C06 seq	IRAL_005_K11
333	HLA-B	BC008457	DG1300-3_C07	IRAL021E10
334	HLA-DPB1	BC007963.1	suganoC-569rc E04 seq	IRAL_020_P02
335	HLA-DRB1	BC005312	DG1300-3_B08	IRAL016D15
336	HMBS	BC019323.1	suganoC-465rc F09 seq	IRAL_009_G04
337	HMGCL	BC010570.1	suganoB-186rc B04 seq	IRAK_012_I03
338	HNMT	BC020677.1	suganoC-679 B11 seq	IRAL_037_K13
339	HOXA11	BC040948	DG1300-1_H01	IRAK084H03
340	HP	AK055872.1	suganoA-006 A05 seq	005_C03
341	HPD	BC024287.1	suganoC-710 D06 seq	IRAL_042_M18
342	HPRT1	BC000578.1	suganoC-419 B06 seq	IRAL_005_M19
343	HPS3	BC022062.1	suganoC-386rc B02 seq	IRAL_003_C12
344	HPS4	AK054717.1	suganoA-034rc B01 seq	043_C10

345	HR	AK098053.1	suganoA-123 G06 seq	185_F10
346	HRPT2	AK026969.1	suganoA-156 B03 seq	253_H05
347	HSD11B1	BC012593.1	suganoC-561rc D08 seq	IRAL 019_M17
348	HSD11B2	BC036780	DG1300-1_G05	IRAK079H15
349	HSD17B4	BC003098.1	suganoC-430rc D05 seq	IRAL 006_N14
350	HSD3B2	BC031999	DG1300-1_B08	IRAK028P03
351	HSD3B7	BC004929.1	suganoC-498 C09 seq	IRAL 013_C08
352	HSPD1	BC002676.1	suganoC-492rc H10 seq	IRAL 012_K13
353	HTR3A	BC004453.1	suganoC-463rc F07 seq	IRAL 009_C01
354	HTR5A	AK094255.1	suganoA-120 G04 seq	178_A08
355	ICAM1	BC015969.1	suganoC-439rc D09 seq	IRAL 007_G04
356	IDS	BC006170.1	suganoC-556rc D05 seq	IRAL 018_N01
357	IF	BC020718.1	suganoC-666 A10 seq	IRAL 037_D11
358	IFNGR1	BC005333.1	suganoC-535rc B09 seq	IRAL 016_K12
359	IFNGR2	BC003624.1	suganoC-391rc B03 seq	IRAL 003_K17
360	IGHM	BC017356.1	suganoC-695rs1 C04 seq	IRAL 039_P07
361	IGHMBP2	AK091539.1	suganoA-053rc B08 seq	080_E02
362	IKBKAP	BC033094.1	suganoC-715 D08 seq	IRAL 043_E18
363	IKBKG	BC012114.1	suganoC-622rc H01 seq	IRAL 029_O12
364	IL12RB1	BC029121.1	suganoB-329revc_E02 seq	IRAK 050_I08
365	IL1B	BC008678.1	suganoB-206revc_C03 seq	IRAK 013_P06
366	IL2RG	BC014972.1	suganoC-645rc A06 seq	IRAL 034_N17
367	IMPDH1	BC033622	DG1300-1_F02	IRAK064J04
368	INS	BC005255.1	suganoC-538rc B12 seq	IRAL 016_M08
369	IRAK4	BC013316	DG1300-3_C04	IRAL019N24
370	IRF6	BC014852.1	suganoB-170 A04 seq	IRAK 003_P08
371	IRS1	BC053895	DG1300-2_C02	IRAK115L24
372	ISL1	BC031213	DG1300-1_E11	IRAK063H24
373	ITGB2	BC005861.1	suganoC-484rc H03 seq	IRAL 011_P15
374	ITPA	BC010138.1	suganoC-597rc F12 seq	IRAL 027_M14
375	IVD	BC017202.1	suganoC-496 C07 seq	IRAL 012_O04
376	JUP	BC011865.1	suganoC-611 G03 seq	IRAL 028_O03
377	KCNE1	BC036452	DG1300-1_D01	IRAK047K19
378	KCNH2	BC001914.1	suganoC-447rc A07 seq	IRAL 008_A03
379	KEL	BC003135.1	suganoC-466rc F10 seq	IRAL 009_H08
380	KERA	BC032667.1	suganoB-369rc G09 seq	IRAK 069_L09
381	KHK	BC006233.1	suganoC-513 D09 seq	IRAL 015_B09
382	KL	AK097349.1	suganoA-070 D12 seq	098_F03
383	KLK1	BC005313.1	suganoC-539rc C01 seq	IRAL 016_O06
384	KRT13	BC002661.1	suganoC-489rc H07 seq	IRAL 012_G21
385	KRT14	BC019097.1	suganoC-691 C06 seq	IRAL 039_L14
386	KRT16	BC039169	DG1300-1_B07	IRAK028O21
387	KRT17	BC011901.1	suganoC-606 F10 seq	IRAL 028_I14
388	KRT4	BC042174	DG1300-3_E10	IRAL044J13
389	KRT5	BC024292.1	suganoC-711 D07 seq	IRAL 042_O02
390	KRT6A	BC008807.1	suganoC-519 E02 seq	IRAL 015_J09
391	KRTHB6	AK057905.1	suganoA-129 G12 seq	207_G05
392	LAMA3	AK024889.1	suganoA-125 G08 seq	201_B02
393	LAMP2	BC002965.1	suganoC-455rc E12 seq	IRAL 008_I10
394	LBR	BC020079.1	suganoB-257 C07 seq	IRAK 026_G04
395	LCAT	BC014781.1	suganoB-229rc D11 seq	IRAK 019_N20
396	LDHA	AK026515.1	suganoA-135 H06 seq	226_E01
397	LDHB	BC015122.1	suganoC-630rc H07 seq	IRAL 031_C09
398	LGI1	BC022500.1	suganoB-281 D12 seq	IRAK 032_J11
399	LIG4	BC037491	DG1300-1_C10	IRAK047E18
400	LITAF	AK095955.1	suganoA-066 D08 seq	096_F05
401	LMAN1	BC032330.1	suganoB-351revc_E08 seq	IRAK 064_E10
402	LMNA	BC003162.1	suganoC-462rc F06 seq	IRAL 009_B14

403	LPL	BC011353.1	suganoB-184rc B03 seq	IRAK 012_H10
404	LRAT	BC031053.1	suganoB-302 F02 seq	IRAK 048_D09
405	LYZ	BC004147.1	suganoC-383rc A01 seq	IRAL 002_G16
406	MADH4	BC002379.1	suganoC-379rc A08 seq	IRAL 001_L17
407	MAN2B1	BC000736.1	suganoC-432rc D06 seq	IRAL 007_A13
408	MAPT	AK095802.1	suganoA-116rc D09 seq	166_G12
409	MAT1A	BC018359.1	suganoB-258 C08 seq	IRAK 026_J04
410	MC1R	BC007856	DG1300-3_C05	IRAL020K10
411	MCCC1	BC004187	DG1300-3_B02	IRAL010H19
412	MCCC2	BC014897.1	suganoB-216T7_A06 seq	IRAK 015_H15
413	MCFD2	BC040357	DG1300-1_A12	IRAK026G06
414	MCOLN1	BC005149	DG1300-3_A08	IRAL007C22
415	MECP2	BC011612.1	suganoC-521 E03 seq	IRAL 015_O20
416	MEN1	BC002544.1	suganoC-404 B01 seq	IRAL 004_F07
417	MERTK	AK026681.1	suganoA-145 A04 seq	241_B06
418	MGAT2	BC006390	DG1300-3_B12	IRAL017H15
419	MGP	BC005272.1	suganoC-528rc B02 seq	IRAL 016_H07
420	MID1	BC053626	DG1300-2_C03	IRAK115M22
421	MINPP1	BC032504.1	suganoB-362revc_F01 seq	IRAK 069_C09
422	MKKS	BC028973	DG1300-1_C04	IRAK042B15
423	MLC1	BC028425	DG1300-1_C07	IRAK046F07
424	MLYCD	BC000286.1	suganoC-426rc D01 seq	IRAL 006_G12
425	MMAB	BC011831.1	suganoC-603 F07 seq	IRAL 028_G03
426	MMP1	BC013875.1	suganoC-507 D04 seq	IRAL 014_H19
427	MMP2	BC002576.1	suganoC-400rc B07 seq	IRAL 004_B24
428	MMP3	BC002591	DG1300-3_A05	IRAL004H04
429	mocs1b	AK091306.1	suganoA-045rc B04 seq	062_C07
430	mocs2b	BC046097	DG1300-2_B01	IRAK107H04
431	MPDU1	BC001898	DG1300-3_A10	IRAL008P05
432	MPI	BC017351.1	suganoC-692 C07 seq	IRAL 039_L17
433	MPZ	BC006491.1	suganoC-509 D05 seq	IRAL 014_N02
434	MRE11A	AK095388.1	suganoA-061rc B10 seq	092_G03
435	MTHFD1	BC009806.1	suganoC-441 C01 seq	IRAL 007_H10
436	MTHFR	BC053509	DG1300-3_F07	IRAL047K23
437	MTM1	BC030779.1	suganoB-286 E05 seq	IRAK 033_H06
438	MTMR2	BC052990	DG1300-2_B08	IRAK110O14
439	MUT	BC016282.1	suganoB-212rc C10 seq	IRAK 015_D12
440	MUTYH	BC003178.1	suganoC-473rc G05 seq	IRAL 009_P12
441	MVK	BC016140.1	suganoB-220 B04 seq	IRAK 015_N09
442	MYC	BC000917.2	suganoB-166	IRAK 003_H17
443	MYF6	BC017834.1	suganoC-650 H07 seq	IRAL 036_A09
444	MYL2	BC031006.1	suganoC-700rc B07 seq	IRAL 041_D23
445	NAGA	BC000095.1	suganoC-445rcE02 seq	IRAL 007_O01
446	NAGLU	BC053991	DG1300-3_F03	IRAL047G09
447	NAT1	BC013732.1	suganoB-239 B09 seq	IRAK 021_D16
448	NCF1	BC002816.1	suganoC-488rc H06 seq	IRAL 012_F02
449	NCF2	BC001606.1	suganoC-459rc F03 seq	IRAL 008_M10
450	NDP	BC029901.1	suganoB-338	IRAK 051_P06
451	NDRG1	BC003175.1	suganoC-467rc F11 seq	IRAL 009_H16
452	NDUFS1	BC022368.1	suganoC-676 B08 seq	IRAL 037_J18
453	NDUFS2	BC008868.1	suganoC-588rc F03 seq	IRAL 026_K19
454	NDUFS4	BC005270.1	suganoC-537rc B11 seq	IRAL 016_M03
455	NDUFS7	BC005954.1	suganoC-573 E11 seq	IRAL 021_K20
456	NDUFV1	BC008146	DG1300-1_A03	IRAK012E05
457	NDUFV2	BC017487.1	suganoC-581rc E10 seq	IRAL 023_K06
458	NEB	AK056994.1	suganoA-009rs A01 seq	011_A11
459	NEFL	BC039237	DG1300-3_E04	IRAL041C09
460	NEU1	BC011900.1	suganoC-605 F09 seq	IRAL 028_I08

461	NEUROD1	BC009046.1	suganoB-204 B02 seq	IRAK 013_M21
462	NF2	BC003112.1	suganoC-460rc A11 seq	IRAL 008_N13
463	NKX2-5	BC025711.1	suganoB-317revc_A10 seq	IRAK 049_M21
464	NLGN3	BC051715	DG1300-2_A02	IRAK090L06
465	NME1	BC018994.1	suganoC-608 F12 seq	IRAL 028_J18
466	NODAL	AK001176.1	suganoA-082pcr seq	124_H05
467	NOG	BC034027.1	suganoC-674 B06 seq	IRAL 037_J14
468	not56l	BC002839.1	suganoC-493 C05 seq	IRAL 012_L12
469	NP	AK098544.1	suganoA-148 A07 seq	244_C11
470	NPC2	BC002532.1	suganoC-408 B03 seq	IRAL 004_K24
471	NPHS2	BC029141.1	suganoB-326rc H10 seq	IRAK 050_G24
472	NPY	BC029497.1	suganoB-304 F03 seq	IRAK 048_H04
473	NQO1	BC007659.1	suganoC-414rc A02 seq	IRAL 005_D18
474	NR0B1	BC011564.1	suganoC-618rc G09 seq	IRAL 029_K03
475	NR0B2	BC030207.1	suganoB-312rc G12 seq	IRAK 049_K20
476	NR2E3	BC041421	DG1300-1_H06	IRAK087B22
477	NR3C1	BC015610.1	suganoC-636rc H11 seq	IRAL 033_M01
478	NR4A2	BC009288.1	suganoC-568rc E03 seq	IRAL 020_L22
479	NR5A1	BC032501.1	suganoB-360 G09 seq	IRAK 069_A23
480	NRL	BC012395.1	suganoB-242rc E07 seq	IRAK 021_L17
481	NSD1	AK026066.1	suganoA-137 H08 seq	230_A12
482	nsdhl	BC007816	DG1300-3_C06	IRAL020M07
483	NT5C3	BC015856	DG1300-3_E02	IRAL038H07
484	OAT	BC016928.1	suganoB-248rc E11 seq	IRAK 022_K21
485	OCA2	BC012097.1	suganoC-619rc G10 seq	IRAL 029_L19
486	OGG1	BC000657.1	suganoC-411rc C01 seq	IRAL 005_B24
487	OLR1	BC022295.1	suganoC-668 A12 seq	IRAL 037_F06
488	OPTN	BC013876.1	suganoC-505 D02 seq	IRAL 014_F07
489	OXCT	BC009001.1	suganoB-223rc D07 seq	IRAK 019_E04
490	P2RX7	BC011913.1	suganoC-609 G01 seq	IRAL 028_K22
491	PAH	BC026251.1	suganoC-681 C01 seq	IRAL 037_K23
492	PANK2	AK097796.1	suganoA-058 D03 seq	088_D08
493	PAPSS2	BC009894.1	suganoC-396rc B05 seq	IRAL 003_P17
494	PARK2	BC022014.1	suganoB-287 E06 seq	IRAK 033_J06
495	PARK7	BC008188.1	suganoB-162 A01 seq	IRAK 003_A23
496	PAX6	BC011953.1	suganoB-245rc E09 seq	IRAK 021_M18
497	PAX8	BC001060.1	suganoC-382rc A11 seq	IRAL 002_B20
498	PAX9	BC001159.1	suganoC-453rc E10 seq	IRAL 008_G17
499	PC	BC011617.1	suganoC-522 E04 seq	IRAL 015_P05
500	PCBD	BC006324.1	suganoC-551rc C12 seq	IRAL 017_K13
501	PCCA	BC000140.1	suganoB-172T7_A04 seq	IRAK 003_P19
502	PCCB	BC013768.1	suganoB-252 C02 seq	IRAK 026_C03
503	PDE6B	BC000249.1	suganoC-425rc C12 seq	IRAL 006_G06
504	PDGFB	BC029822.1	suganoB-334	IRAK 051_K05
505	PDHA1	BC002406.1	suganoC-380rc A09 seq	IRAL 001_L24
506	PECAM1	BC022512.1	suganoB-283 E02 seq	IRAK 032_N22
507	PENK	BC032505.1	suganoB-363revc_F02 seq	IRAK 069_C11
508	PEPD	BC015027.1	suganoB-218rc D03 seq	IRAK 015_L05
509	PEX1	BC035575	DG1300-1_F08	IRAK069F03
510	PEX10	BC018198.1	suganoB-246rc E10 seq	IRAK 021_P09
511	PEX12	BC031085	DG1300-1_D08	IRAK048L17
512	PEX13	AK093866.1	suganoA-028rc A10 seq	036_B05
513	PEX16	BC004356.1	suganoC-471rc G03 seq	IRAL 009_N17
514	PEX26	BC047320	DG1300-2_A07	IRAK093M04
515	PEX6	BC048331	DG1300-2_A04	IRAK093H10
516	PFC	BC015756.1	suganoC-639rc B02 seq	IRAL 034_A21
517	PFKM	BC013298.1	suganoC-476rc G08 seq	IRAL 010_J19
518	PGAM2	BC001904.1	suganoC-454rc E11 seq	IRAL 008_G23

519	PHGDH	BC011262.1	suganoB-181revc_B10 seq	IRAK 012_E07
520	PHKA2	BC014036.1	suganoC-612 G04 seq	IRAL 028_P05
521	PHKB	BC033657.1	suganoB-355 G08 seq	IRAK 068_C23
522	PHKG2	BC002541.1	suganoC-399rc B06 seq	IRAL 004_B21
523	PHOX2A	BC041564	DG1300-3_F01	IRAL044O15
524	PHOX2B	BC017199.1	suganoC-409 B04 seq	IRAL 004_N18
525	PHYH	BC029512.1	suganoB-303rc G06 seq	IRAK 048_G19
526	PIK3R1	BC030815.1	suganoC-652 H09 seq	IRAL 036_B22
527	PITX2	BC013998.1	suganoC-602 F06 seq	IRAL 028_F01
528	PITX3	BC011642.1	suganoC-548rc C09 seq	IRAL 017_I15
529	PKHD1	AK091971.1	suganoA-030 B09 seq	037_C08
530	PKLR	BC025737.1	suganoB-311revc_D08 seq	IRAK 049_K10
531	PLA2G2A	BC005919.1	suganoC-574 E12 seq	IRAL 021_O18
532	PLA2G7	BC038452	DG1300-1_G01	IRAK078G17
533	PLCD1	AK090774.1	suganoA-024 B05 seq	029_A10
534	PLG	BC005379	DG1300-3_B09	IRAL016N23
535	PLOD	BC016657.1	suganoB-251 C01 seq	IRAK 026_A02
536	PLP1	BC002665.1	suganoC-491rc H09 seq	IRAL 012_I05
537	PMM2	BC008310.1	suganoC-583rc E12 seq	IRAL 023_P15
538	PMP22	BC019040.1	suganoC-626rc H05 seq	IRAL 030_L15
539	POLH	BC015742	DG1300-3_D12	IRAL034L03
540	pomgnt1	BC001471.1	suganoC-410rc B12 seq	IRAL 004_N19
541	POMT1	AK000391.1	suganoA-143 A02 seq	235_G01
542	PON2	BC046160	DG1300-2_A12	IRAK107E18
543	PPARA	BC000052.1	suganoC-434 B09 seq	IRAL 007_B07
544	PPARG	BC006811.1	suganoB-167rc A04 seq	IRAK 003_I16
545	PPGB	BC000597.1	suganoC-412rc C02 seq	IRAL 005_C10
546	PPOX	BC002357.1	suganoC-377rc A06 seq	IRAL 001_G20
547	PPT1	BC008426.1	suganoC-572 E10 seq	IRAL 021_G10
548	PRG4	AK057197.1	suganoA-013rs A02 seq	013_B08
549	PRKAG2	BC020540.1	suganoB-261revc_C10 seq	IRAK 027_H17
550	PRKAR1A	BC036285	DG1300-1_A04	IRAK012P03
551	PRKCG	BC047876	DG1300-2_B03	IRAK107J10
552	PRKCSH	BC013586.1	suganoB-208rc C06 seq	IRAK 014_F17
553	PRKWNK4	AK096052.1	suganoA-055 C12 seq	084_D02
554	PROC	BC034377.1	suganoB-327revc_E01 seq	IRAK 050_H04
555	PRODH	AK001359.1	suganoA-086rc C06 seq	130_C01
556	PROS1	BC015801.1	suganoB-213rc C11 seq	IRAK 015_E05
557	PRPF8	AK058034.1	suganoA-131rc E02 seq	209_C02
558	PRPS1	BC001605.1	suganoC-457rc F01 seq	IRAL 008_K04
559	PSAP	BC001503.1	suganoC-433rc A05 seq	IRAL 007_B06
560	PSEN2	BC006365.1	suganoC-547rc C08 seq	IRAL 017_I14
561	PSTPIP1	BC008602.1	suganoB-187rc B05 seq	IRAK 012_K03
562	PTEN	BC005821.1	suganoC-503 C12 seq	IRAL 014_B18
563	PTPN11	BC008692.1	suganoB-200T7_A05 seq	IRAK 013_K23
564	PTS	BC009686.1	suganoB-211rc C09 seq	IRAK 014_O08
565	PXMP3	BC005375.1	suganoC-530rc B04 seq	IRAL 016_H19
566	PXR1	BC010621.1	suganoB-203	IRAK 013_M05
567	PYGM	AK056607.1	suganoA-019 B01 seq	022_A08
568	QDPR	BC000576.1	suganoC-418rc C07 seq	IRAL 005_M07
569	RAB7	BC008721	DG1300-3_A02	IRAL001F12
570	RAC2	BC001485.1	suganoC-443rc D12 seq	IRAL 007_L10
571	RAD51	BC001459.1	suganoC-405rc B10 seq	IRAL 004_H19
572	RAG1	BC037344	DG1300-1_F11	IRAK073M12
573	RAG2	BC022397.1	suganoC-656 A01 seq	IRAL 036_I05
574	RAI1	BC021209	DG1300-3_C01	IRAL017J01
575	RAPSN	BC004196.1	suganoC-482rc H01 seq	IRAL 011_O21
576	RBP4	BC020633.1	suganoC-680 B12 seq	IRAL 037_K16

577	RDH5	BC028298.1	suganoB-274rc_F01 seq	IRAK 029_P14
578	RET	BC004257.1	suganoC-499 C10 seq	IRAL 013_E03
579	RFX5	BC017471.1	suganoB-214revc_C05 seq	IRAK 015_E07
580	RFXAP	BC026088.1	suganoB-290 E08 seq	IRAK 034_A23
581	RGR	BC011349.1	suganoB-183	IRAK 012_F04
582	RHAG	BC012605.1	suganoC-559 E07 seq	IRAL 019_C11
583	RLBP1	BC004199.1	suganoC-483rc H02 seq	IRAL 011_P14
584	ROM1	BC008100.1	suganoB-185 A10 seq	IRAK 012_H19
585	RP2	BC043348	DG1300-1_H08	IRAK089D04
586	SAA1	BC007022.1	suganoC-526rc A12 seq	IRAL 016_F22
587	SALL4	AK001666.1	suganoA-096 E10 seq	140_A08
588	SBDS	AK001779.1	suganoA-097rs A11 seq	141_F05
589	SC5DL	BC012333.1	suganoC-461rc F05 seq	IRAL 008_P13
590	SCGB1A1	BC004481.1	suganoC-502rc A03 seq	IRAL 014_A21
591	SCN1B	BC021266.1	suganoC-684rc B04 seq	IRAL 039_E11
592	SCNN1A	BC006526.1	suganoC-511 D07 seq	IRAL 014_N14
593	SCNN1B	BC036352	DG1300-1_E04	IRAK051O17
594	SDHA	BC001380.1	suganoC-407rc B11 seq	IRAL 004_I15
595	SDHB	BC007840.1	suganoC-566rc E01 seq	IRAL 020_E10
596	SDHC	BC033626.1	suganoB-354rc F11 seq	IRAK 064_P02
597	SDHD	BC022350.1	suganoC-648 H05 seq	IRAL 035_I22
598	SEDL	BC016915.1	suganoB-264T7_A08 seq	IRAK 027_O14
599	SELP	BC028067.1	suganoB-341revc_E05 seq	IRAK 062_G06
600	SERPINA1	BC015642	DG1300-3_D09	IRAL033E20
601	SERPINA3	BC010530.1	suganoB-226 B05 seq	IRAK 019_I22
602	SERPINA6	BC056259	DG1300-3_F08	IRAL048G10
603	SERPINA7	BC020747.1	suganoC-664 A08 seq	IRAL 037_D02
604	SERPINC1	BC022309.1	suganoC-675 B07 seq	IRAL 037_J17
605	SERPIND1	BC035028	DG1300-1_C11	IRAK047G13
606	SERPINF2	BC031592.1	suganoB-331revc_E03 seq	IRAK 050_J20
607	SERPING1	BC011171.1	suganoB-225rc D09 seq	IRAK 019_G12
608	SERPINI1	BC018043.1	suganoB-276 D07 seq	IRAK 032_E22
609	SFTPB	BC032785.1	suganoB-357revc_E10 seq	IRAK 068_K13
610	SFTPC	BC005913.1	suganoC-571 E09 seq	IRAL 021_G03
611	SGCA	BC025702.1	suganoB-313rc H01 seq	IRAK 049_K21
612	SGCB	BC020709.1	suganoC-682rc B03 seq	IRAL 037_M06
613	SGCD	BC020740.1	suganoC-661rc A07 seq	IRAL 037_B19
614	SGCE	BC021709.1	suganoB-285 E04 seq	IRAK 033_D23
615	SGSH	BC047318	DG1300-2_A06	IRAK093K20
616	SH2D1A	BC020732.1	suganoC-662 A06 seq	IRAL 037_B21
617	SH3BP2	BC022996.1	suganoB-298 E12 seq	IRAK 042_L03
618	SHFM3	BC007380.1	suganoC-584rc F01 seq	IRAL 024_K04
619	SLC14A1	BC050539	DG1300-2_A11	IRAK107C12
620	SLC16A1	BC026317	DG1300-1_B11	IRAK032I21
621	SLC17A5	BC020961.1	suganoB-233rc E02 seq	IRAK 020_I02
622	SLC19A1	BC003068.1	suganoC-437 B12 seq	IRAL 007_F14
623	SLC22A12	BC053348	DG1300-2_B10	IRAK115C21
624	SLC22A5	BC012325.1	suganoC-613rc G05 seq	IRAL 029_A13
625	SLC25A13	BC006566	DG1300-3_B04	IRAL011F18
626	SLC25A15	BC002702.1	suganoC-497 C08 seq	IRAL 012_O23
627	SLC25A19	BC001075	DG1300-3_A12	IRAL009N03
628	SLC25A20	BC001689.1	suganoC-387 A02 seq	IRAL 003_D24
629	SLC26A3	BC025671.1	suganoB-305revc_D04 seq	IRAK 049_E03
630	SLC34A1	BC050385	DG1300-2_A09	IRAK098F04
631	SLC39A4	AK025537.1	suganoA-159 B06 seq	259_E10
632	SLC3A1	BC022386.1	suganoC-653 H10 seq	IRAL 036_E15
633	SLC40A1	BC037733	DG1300-1_C01	IRAK033F07
634	SLC4A4	BC030977.1	suganoC-704 D03 seq	IRAL 041_F01

635	SLC5A2	AK054830.1	suganoA-035rs A07 seq	045_B01
636	SLC6A8	BC012355.1	suganoC-617 G07 seq	IRAL 029_J18
637	SLC7A7	BC003062	DG1300-3_A09	IRAL007K15
638	SLC7A9	BC017962.1	suganoC-654 H11 seq	IRAL 036_F08
639	SMARCB1	AK021419.1	suganoA-050 C10 seq	075_A03
640	SMN1	BC015308.1	suganoB-263rc F02 seq	IRAK 027_M09
641	SMPD1	BC041164	DG1300-1_H04	IRAK084M05
642	SNAI2	BC015895.1	suganoB-215rc D01 seq	IRAK 015_H04
643	SNCA	BC013293.1	suganoC-480rc G11 seq	IRAL 011_L20
644	SNCAIP	AK001617.1	suganoA-095rc C12 seq	139_G10
645	SOD1	BC001034.1	suganoC-397 A09 seq	IRAL 004_A16
646	SOD2	BC012423.1	suganoB-244rc E08 seq	IRAK 021_M11
647	SOD3	BC014418.1	suganoC-620rc G11 seq	IRAL 029_M04
648	SORBS1	BC042612	DG1300-1_F10	IRAK071E06
649	SOX10	BC002824.1	suganoC-490rc H08 seq	IRAL 012_H08
650	SOX2	BC013923.1	suganoC-381rc A10 seq	IRAL 002_B15
651	SOX9	BC007951.1	suganoC-567rc E02 seq	IRAL 020_L12
652	SPG3A	BC010708.1	suganoB-196rc B11 seq	IRAK 013_J23
653	SPINK1	BC025790.1	suganoB-320rc H07 seq	IRAK 049_N22
654	SPINK5	AK025197.1	suganoA-153 A12 seq	251_A11
655	SPR	BC017310.1	suganoC-694 C08 seq	IRAL 039_O20
656	SREBF2	BC056158	DG1300-2_C05	IRAK119N11
657	STAR	BC010550.1	suganoB-227rc D10 seq	IRAK 019_J08
658	STAT1	BC002704	DG1300-3_B05	IRAL012A04
659	STRC	AK090757.1	suganoA-046 C08 seq	064_A07
660	SURF1	BC028314.1	suganoB-330rc F01 seq	IRAK 050_J06
661	TAP1	BC014081.1	suganoC-610 G02 seq	IRAL 028_L06
662	TAP2	BC002751.1	suganoC-494rc H11 seq	IRAL 012_M04
663	TAZ	BC011515.1	suganoB-194revc_B12 seq	IRAK 012_P06
664	TBCE	BC008654.1	suganoB-202	IRAK 013_M04
665	TBX19	AK091404.1	suganoA-048 C09 seq	064_H09
666	TBX22	BC014194.1	suganoC-625rc H04 seq	IRAL 030_B13
667	TBX3	BC025258.1	suganoC-712rc C01 seq	IRAL 042_P10
668	TBX5	BC027942.1	suganoB-307revc_D05 seq	IRAK 049_F12
669	TCAP	BC012628	DG1300-3_C03	IRAL019I09
670	TCF2	BC017714.1	suganoB-262 C12_seq	IRAK 027_I02
671	TCIRG1	BC032465.1	suganoB-352 G06 seq	IRAK 064_J06
672	TCN2	BC001176.1	suganoC-420rc C08 seq	IRAL 006_B01
673	TCOF1	BC014559	DG1300-3_C12	IRAL025M23
674	TDGF1	BC022393.1	suganoC-655 H12 seq	IRAL 036_G18
675	TDP1	BC015474.1	suganoB-209rc C07 seq	IRAK 014_L04
676	TEK	BC035514	DG1300-1_D09	IRAK049O22
677	TFAP2B	BC037225	DG1300-1_B04	IRAK028M05
678	TFPI	BC015514.1	suganoB-247 B11 seq	IRAK 022_G06
679	TFR2	AK000421.1	suganoA-158 B05 seq	255_F03
680	TGFBI	BC000097.1	suganoC-444rc E01 seq	IRAL 007_L17
681	TGIF	BC000814.1	suganoB-178rcA11 seq	IRAK 004_K19
682	THBD	BC053357	DG1300-2_C01	IRAK115I09
683	THRB	AK096628.1	suganoA-057 D02 seq	085_H10
684	TIMM8A	BC015093.1	suganoC-629 G09 seq	IRAL 031_B09
685	TIMP1	BC000866.1	suganoB-174 A06 seq	IRAK 004_A22
686	TIMP2	BC052605	DG1300-3_F04	IRAL047H06
687	TIMP3	BC014277.1	suganoC-504 D01 seq	IRAL 014_E23
688	TITF1	BC006221.1	suganoC-516 D11 seq	IRAL 015_E09
689	TJP2	BC027592.1	suganoB-294 E11 seq	IRAK 034_P07
690	TK2	AK026021.1	suganoA-138 H09 seq	230_F07
691	TLR2	BC033756.1	suganoB-359revc_E12 seq	IRAK 068_O16
692	TM4SF2	BC018036.1	suganoB-279 D10 seq	IRAK 032_I14

693	TMC1	AK098607.1	suganoA-132 H03 seq	210_H09
694	TNFRSF10B	BC001281.1	suganoB-173rc A08 seq	IRAK 004_A08
695	TNFRSF11B	BC030155.1	suganoC-688 C04 seq	IRAL 039_I04
696	TNFRSF1A	BC010140.1	suganoC-599rc G02 seq	IRAL 027_M22
697	TNFRSF1B	BC052977	DG1300-2_B07	IRAK110N02
698	TNFRSF5	BC012419.1	suganoB-237 B07 seq	IRAK 021_A09
699	TNFSF6	BC017502.1	suganoC-638rc H12 seq	IRAL 034_A12
700	TNNI2	BC032148.1	suganoC-693rc B07 seq	IRAL 039_N18
701	TNNT1	BC034143.1	suganoC-699 C11 seq	IRAL 041_D10
702	TNNT2	BC002653.1	suganoC-487rc H05 seq	IRAL 012_E23
703	TNNT3	AK056968.1	suganoA-011rcA04 seq	011_E07
704	TP53	BC003596.1	suganoC-452rc E09 seq	IRAL 008_F08
705	TP73L	BC039815	DG1300-1_G12	IRAK084G16
706	TPI1	BC015100.1	suganoC-631rc H08 seq	IRAL 031_D09
707	TPM1	BC007433.1	suganoC-475rc G07 seq	IRAL 010_H13
708	TPM2	BC011776.1	suganoC-594rc F09 seq	IRAL 027_H20
709	TPMT	BC009596.1	suganoC-576rc E06 seq	IRAL 021_P17
710	TREM2	BC032362.1	suganoB-353revc_E09 seq	IRAK 064_O16
711	TRIM32	BC003154.1	suganoC-464rc F08 seq	IRAL 009_F06
712	TRPM6	AK026281.1	suganoA-140 H11 seq	233_H08
713	TRPS1	AK000948.1	suganoA-077 E03 seq	109_F11
714	TSC2	AK094152.1	suganoA-063rs A09 seq	094_C03
715	TTID	BC005376.1	suganoC-529rc B03 seq	IRAL 016_H17
716	TTR	BC020791.1	suganoC-671 B03 seq	IRAL 037_I15
717	TULP1	BC032714.1	suganoB-366 H01 seq	IRAK 069_F24
718	TWIST1	BC036704	DG1300-3_B11	IRAL017G20
719	TYR	BC027179.1	suganoB-255 C05 seq	IRAK 026_D20
720	TYROBP	BC011175.1	suganoB-222rc D06 seq	IRAK 019_A14
721	TYRP1	BC052608	DG1300-3_F05	IRAL047H16
722	UBE3A	BC002582.1	suganoC-402rc B08 seq	IRAL 004_D18
723	UCHL1	BC006305.1	suganoC-542rc C04 seq	IRAL 017_C15
724	UCP2	BC011737	DG1300-3_D02	IRAL027P19
725	UCP3	BC008392	DG1300-3_C08	IRAL021F12
726	UGT1A1	BC053576	DG1300-2_B09	IRAK115A22
727	UGT1A7	BC019861.1	suganoB-295	IRAK 042_C08
728	UMOD	BC035975	DG1300-3_E05	IRAL041D02
729	UMPS	BC007511.1	suganoC-478 C03 seq	IRAL 010_P17
730	UROD	BC001778.1	suganoC-449rc A09 seq	IRAL 008_C08
731	UROS	BC002573.1	suganoC-398 A10 seq	IRAL 004_B18
732	USH1C	BC016057.1	suganoC-642rc A04 seq	IRAL 034_K02
733	USH1G	AK091243.1	suganoA-043 C07 seq	058_A01
734	WFS1	BC030130.1	suganoC-546rc C07 seq	IRAL 017_H09
735	WT1	BC032861	DG1300-1_C09	IRAK047A06
736	XK	BC036019	DG1300-1_D05	IRAK048E04
737	XPA	BC014965.1	suganoC-644rc A05 seq	IRAL 034_N16
738	XRCC2	BC042137	DG1300-3_E12	IRAL044M21
739	ZMPSTE24	BC037283	DG1300-1_D04	IRAK047O05



表2 カニクイザル疾患関連遺伝子に局在する病的網アミノ酸置換

Gene symbol	Gene name	Macaque seq.	Accession No.	Mutation	Phenotype
ACADM	Acyl-CoA-dehydrogenase, medium chain	AB170574	CM970026	Thr168Ala	Medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency
ACADVL	Very long chain acyl-CoA dehydrogenase	AB169268	CM990091	Lys247Glu	Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency
AGT	angiotensinogen	QmoA-10278	CM920010	Met235Thr	Hypertension, association with
APOE	Apolipoprotein E	AK240626	CM900020	Cys112Arg	Apolipoprotein E deficiency
CETP	cholesteryl ester transfer protein	QtsA-14108	CM994290	Ile405Val	Higher HDL cholesterol level, association with
DI02	type 2 iodothyronine deiodinase	QtsA-19610	CM021259	Thr92Ala	Insulin resistance, association with
EPHX1	Epoxide hydrolase 1, microsomal	AB220413	CM024366	His139Arg	Preeclampsia, association with ?
FCGR2A	Fc fragment of IgG (CD32A)	NM_021642	CM960640	Arg131His	Lupus nephritis, protection against, association 腎炎
FCGR2A	Fc fragment of IgG (CD32A)	NM_021642	CM980739	Gln127Lys	Immunoglobulin binding variant
GLB1	Galactosidase beta	AB169680	CM035028	Leu436Phe	Gangliosidosis GM1, modulating effect, assoc. with
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	AB168970	CM012769	His264Arg	Increased plasma FFA and glycerol levels
HTR2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	AB171602	CM960851	Ser34Ser	Schizophrenia, association with
LIPA	Lysosomal acid lipase A, cholesterol esterase	AB171834	CM960946	Leu273Ser	Cholesterol ester storage disease
LMNA	Lamin A/C	AB220427	CM003892	His566His	Metabolic syndrome, association with
MUT	methylmalonyl-CoA isomerase	AB083319	CM920486	His532Arg	Methylmalonic aciduria
OPTN	Optineurin	AB063036	CM020164	Arg545Gln	Glaucoma 1, open angle
PRSS1	trypsin 1	AB179197	CM021670	Asn29Thr	Pancreatitis, hereditary (遺伝性膵炎)
TF	Transferrin	AB170458	CM033984	Pro570Ser	Alzheimer disease, association with
TTR	Transthyretin (prealbumin)	AB169529	CM992976	Arg104His	Amyloidotic polyneuropathy

## 疾患遺伝子 cDNA の発現ベクターを用いた機能解析

分担研究者 高橋 一朗（独）医薬基盤研究所 遺伝子資源室主任研究員

ヒト疾患の原因遺伝子や疾患に関連する遺伝子の機能や発症機構への関与等を明らかにするためモデル動物として使用されるカンクイザルの疾患遺伝子ホモログを単離し、発現ベクターに組み込んでタンパク質を合成させ、遺伝子の機能解析を可能にする。

172種類のプライマーセットでカンクイザル脳由来の total RNA をテンプレートとして RT-PCR を行ったところ以下の8種類の遺伝子が増幅された。これらの遺伝子をさらに 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ン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 totalRNA を抽出し、資源化した。

### A. 研究目的

ヒト疾病のモデル動物であるカンクイザルにおいて疾患関連遺伝子がどのような機能を持ち、生体内でどのような挙動を示すのかを調べることで、発症のメカニズムを解明するため、ヒト疾患遺伝子のカンクイザルホモログを発現ベクターに組み込み、タンパク質として産生されるようなシステムの構築を図る。またそれらの網羅的発現解析に必要なカンクイザルの各種臓器より total RNA を抽出し、研究資源化として収集した。

### B. 研究方法

172種類のヒト神経系の疾患に関する遺伝子配列情報をヒト疾患遺伝子データベース（Human Gene Mutation Database：HGMD）より探索し、5'側はATGから、3'側はストップコドンまでをゲートウェイシステムに組み込めるように設計し、5'側にはさらにSD配列、コザック配列を挿入した。そして、これら172組のプライマーをカンクイザル Total RNA をテンプレートとして RT-PCR を行う。PCR産物をゲートウェイベクターに定法に従って組み込む。

### C. 研究結果

172種類のプライマーセットでカンクイザル Total RNA をテンプレートとして RT-PCR を行ったところ以下の8種類の遺伝子が増幅された。

これらの遺伝子をさらに GST 融合遺伝子として発現させるために、エンテロキナーゼ認識サイトを持つ GST 発現ベクターに入れ替えた。アラビノース誘導発現系大腸菌を用いて GST 融合タンパクの発現を比較すると、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ン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 を年齢の異なる個体、幼年（3才）、成年（10才）、老年（23才）より13種の組織（大脳、小脳、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、心臓、精巣、筋肉）を採取し、total RNA を抽出して資源化をはかった。

得られた13組織16検体（大脳を4部位に分けている。）の total RNA は、バイオアナライザを用いて純度を検定し、分解が少ないことを確認した。

#### D. 考察

現在、ヒト神経疾患で原因遺伝子が同定されたものは515種ある。カニクイザルでは脳を材料にこれまで約50,000クローンが作製され収集されたが、その中には152種類の神経疾患遺伝子ホモログが見つかった。今回、あらたな遺伝子ホモログを単離するため、未収集の遺伝子172種類についてプライマーを設計し、カニクイザル脳 total RNA をテンプレートとして、RT-PCRを行ったところ8遺伝子でDNA断片の増幅がみられた(表1)。増幅された8種類の遺伝子断片について、発現ベクターにクローニングし、そのタンパクの合成を確認することができ、発現システムとして十分使用できることがわかった。今回、脳由来の totalRNA のみを鋳型として使用したため、増幅される遺伝子の種類が少なかったが、あらたに13臓器の組織より RNA を調製したので、これらを利用すれば増幅できる遺伝子の増加するものと思われる(図1および表2)。これによりカニクイザル疾患遺伝子ホモログのほぼすべてのタンパク質を合成できるような発現用遺伝子コレクションの構築の技術基盤が完成した。またカニクイザル各種臓器より抽出した total RNA は、マイクロアレーを用いた網羅的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。

#### E. 結論

疾患遺伝子カニクイザルホモログのタンパク発現システムを構築するため、172種類のプライマーセットでカニクイザル脳由来の totalRNA をテンプレートとして RT-PCR を行ったところ以下の8種類の遺伝子が増幅された。これらの遺伝子をさらに 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 totalRNA を抽出し、資源化した。これによりカニクイザル疾患遺伝子ホモログのほぼすべてのタンパク質を合成できるような発現用遺伝子コレクションの構築の技術基盤が完成した。

#### F. 研究発表

1) 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マイクロアレーの作製と評価、日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋

表1 GST発現ベクターにクローニングした疾患遺伝子カニクイザルホモログ

TIMM8A	X-linked deafness dystonia (DDP)
KCNE3	minK-related peptide 2
SNCA	AD amyloid
PMP22	PMP28 (PAS-II/SRB/Gas3)
DJ1	Parkinson disease (autosomal recessive)
QDPR	Muscle glycogen phosphorylase (PYGM)
HTR1B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B
PSEN2	STM-2

臓器：13種類

サル：3歳、10歳、23歳

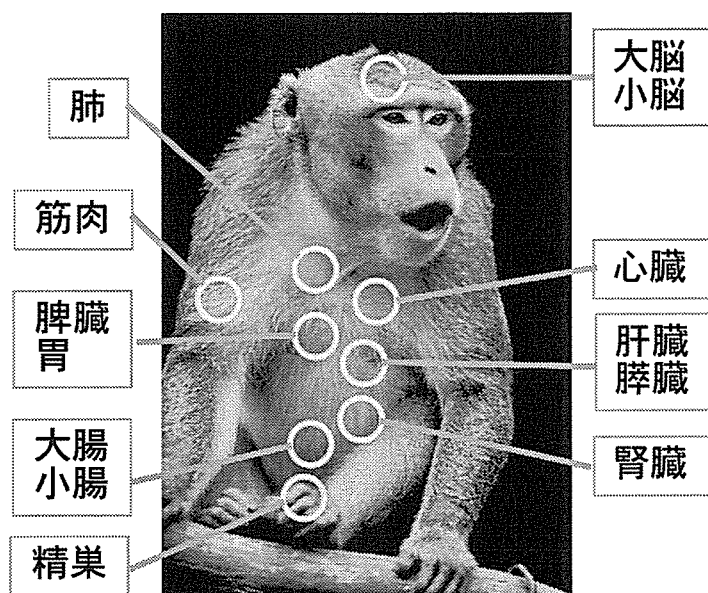


図1 カニクイザル各種臓器の totalRNA の資源化

表2 カニクイザル各種臓器より抽出した totalRNA の収集状況

番号	由来臓器	幼年 (3 歳)	成年 (10 歳)	老年 (23 歳)
1	精 巢	185 $\mu$ g	112 $\mu$ g	165 $\mu$ g
2	脾 臓	136 $\mu$ g	117 $\mu$ g	130 $\mu$ g
3	膵 臓	750 $\mu$ g	30 $\mu$ g	350 $\mu$ g
4	胃	278 $\mu$ g	100 $\mu$ g	204 $\mu$ g
5	小 腸	200 $\mu$ g	108 $\mu$ g	270 $\mu$ g
6	大 腸	446 $\mu$ g	270 $\mu$ g	250 $\mu$ g
7	肝 臓	314 $\mu$ g	350 $\mu$ g	240 $\mu$ g
8	腎 臓	147 $\mu$ g	116 $\mu$ g	260 $\mu$ g
9	心 臓	83 $\mu$ g	54 $\mu$ g	89 $\mu$ g
10	肺	132 $\mu$ g	85 $\mu$ g	104 $\mu$ g
11	大 脳	54 $\mu$ g	115 $\mu$ g	67 $\mu$ g
12	小 脳	46 $\mu$ g	90 $\mu$ g	100 $\mu$ g
13	筋 肉	55 $\mu$ g	37 $\mu$ g	70 $\mu$ g

分担研究報告書

カニクイザル及びチンパンジーのcDNAライブラリー作製

分担研究者 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

本年度は、これまでに得られたカニクイザル完全長cDNAの部分配列情報および全長配列情報をもとに、それらとヒトおよびチンパンジー配列とのホモロジー解析を継続するとともに、カニクイザルユニーククローンの解析を行った。さらに、今後の研究に供するため、保持クローンの中からヒトの疾患関連遺伝子の完全長cDNAを改めて分離し、配列を検討することで、実際に配列確認済みの疾患関連遺伝子クローン739種類を得た。これらのクローンについては遺伝子バンクへの寄託を行った。

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、その祖先型を明らかにすることは治療方法の開発や予防に重要な示唆を与える。ヒトゲノム上にある22,000個の標準遺伝子のうち疾患の原因もしくは発症に関係することが現在まで明らかにされている遺伝子は約1,500個である。これまで、医学薬学実験に広く用いられているカニクイザルに注目し、複数の組織からオリゴキャップ法で完全長cDNAクローンを作成し、その中から疾患遺伝子ホモログを含むクローンを選別してきた。ヒト、チンパンジー、カニクイザルの疾患関連遺伝子を相互に比較することで疾患の原因となる変異の祖先型の確定を効率的に行うことを目的とする。

B. 研究方法

部分配列を決定したカニクイザル脳cDNA約60,000件についてマッピングを行い、ク

ローン数で19,400の異なる転写物を得、そのうちランダムに選んだ4,600クローンにつき全長配列を決定し、ヒトとチンパンジーとの比較を行った。また、これまでの肝臓由来cDNA中のカニクイザルユニーククラスタ数は59クラスタの配列をヒトゲノム配列と比較することで詳細な解析を行なった。さらに、手持ちのヒトcDNAクローンの中から、将来の実験に供するため、疾患関連遺伝子を実際に分離し、配列の確認を行った。

C. 研究結果

カニクイザル、チンパンジー、ヒトの脳cDNAの比較から、予想に反して、脳で発現している遺伝子の作るタンパク質がチンパンジーとヒトで高度に保存されていて、進化上の変化速度が遅いことがわかった。機能的には、ヒトの脳は急速に進化しているため、タンパク質の配列以外の部分（例えば、遺伝子の発現量）が、この急速な機能的進化に関係している可能性が高い。

また、ヒトの疾患関連遺伝子のcDNAクローンを、保持する部分配列決定済みクローンから分離して、配列確認を行った。その結果、約1割のクローンが、スプライズバリエーションであるなど、予想される標準クローンではないことがわかった。今回確認済

みのクローンは739種になる。

#### D. 考察

ヒト脳の急速な機能的進化が、タンパク質の配列の変化以外のところにあることは、意外な結果であるとともに、ヒトの精神神経疾患を考えていく上で重要な示唆を与える。実際、non-codingRNA や DNA の修飾など、タンパク質の配列には影響を与えないが、遺伝子の発現に影響を与える様々な要素が明らかになってきている。今後は、それらの解析も神経精神疾患で重要となろう。

一方、部分配列のみ情報のある cDNA クローンについては注意が必要であることが、改めて確認された。このようなクローンはヒトについては、全世界的に見て 600 万クローンにのぼり、ほとんど全ての遺伝子のクローンを含むと思われる。今回の経験からは、発現量の少ない、したがって、クローン数の少ないものについては、データベースに配列が登録されているものの、それに対応する cDNA が存在しないという事態が充分ありえることを示唆している。

#### E. 結論

カニクイザル完全長cDNA部分配列や全長配列をヒトゲノム配列と比較する方法で様々な遺伝子を解析して行くことは、遺伝子機能研究の基盤を整備する上で有効であるばかりでなく、疾患の研究に重要な示唆を与えると考えられる。

#### F. 研究発表

論文発表

1. 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]
2. 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.

3. Takeda J, Suzuki Y, Nakao M, Barrero RA, Koyanagi KO, Jin L, Motono C, Hata H, Isogai T, Nagai K, Otsuki T, Kuryshev 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.

4. 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.

5. 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 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.

分担研究者 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

非ヒト霊長類の遺伝子資源プロジェクトの一環として、チンパンジー完全長 cDNA クローンに関するデータベースの整備を行い、今後の研究資源として更に有効に用いられるようにまとめることを主眼とした。チンパンジーゲノム配列の概要は 2005 年 9 月に報告されたが、機能単位としての遺伝子の手がかりとなるトランスクリプト配列の情報が少ない。したがってゲノム進化等の研究は進んだが、遺伝子レベルでの両種間の比較解析にはまだ情報が不十分である。本研究では、このギャップを埋めるための研究として、チンパンジーの完全長 cDNA の解析を進めた。オリゴキャッピング法で得たライブラリより合計 15,451 クローンについてその 5'-側から約 600 塩基の配列を決定した。これら配列をチンパンジーゲノム上にマップし、チンパンジー-EST マップとした。ヒト RefSeq mRNA 配列との対応により、5,689 遺伝子が得られたので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'-側の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。一方、RefSeq に対応しない約 5,000 クローン配列について資源整備のために、RefSeq 最新版と比較して再解析したところ、未知の遺伝子候補が見いだされた。現在ヒトゲノム多様性と疾患との関連について注目されている遺伝子コピー変異についても、塩基配列レベルとならんで重要な項目になっているので、その解析のための基礎実験をおこなった。

#### A. 研究目的

非ヒト霊長類の遺伝子資源プロジェクトは最終年度を迎えた。これまで蓄積したチンパンジー完全長 cDNA ライブラリが将来の研究資源として有効に用いられるよう整備しておくため、塩基配列情報のデータベースの整備を行うことを目的とした。いま、ヒトゲノム研究はシーケンス・レベルの解析とならび、遺伝子コピー数変異 (CNV) あるいは多型 (CNP) に関する解析が進んでいる。しかしながら、マイクロアレイを用いた網羅的解析方法にまだ不確実性が残っている。ゲノム配列からみた疾患との関連などの研究には、機能単位としての各遺伝子の構造を正確に知る必要がある。そのためには、比較遺伝学的研究が重要な情報をもたらすことから、他の種、特に近縁の霊長類のゲノムならびに遺伝子クローンの集積と塩基配列情報が必要である。本研究では、チンパンジーの完全長 cDNA の解析を進めた。オリゴキャッピング法で脳、皮膚、肝臓ならびに精巣から得たライブラリより合計 15,451 クローンについてその 5'-側から約 600 塩基の配列を決定

した。その結果、5,659 遺伝子がリストに加えられたほか、ヒト mRNA 配列 (RefSeq) にヒットしないクローン配列も約 5,000 見いだされた。一部遺伝子の全長配列と対応する RefSeq とをヒトゲノム配列上にマッピングした。従来行っていた置換率算定に加え、exon-intron 構造、転写開始点・終了点の位置の比較など、大規模な遺伝子構造における種差の有無について比較解析を行った。この結果は、論文として投稿中 (Gene) である。さらに、今年度は、特定疾患関連の遺伝子群について、比較解析をおこなった。罹病性に関連するといわれるヒトの塩基多型のなかには、他の動物で保存的なものもあるし、ヒトで特異的に生じたものもあるが、そのような生物学的意味を知るうえで、近縁の霊長類の遺伝子との比較解析には重要性がある。本研究における、疾患関連遺伝子のヒトとチンパンジーとの比較解析から有意な情報が得られることが期待される。

最近注目されているコピー数変異と多型 (CNV、CNP) についても系統的に最もヒトに近いチンパンジーとの比較解析は、その表現型への影響を知るう



えで重要となる。ゲノム情報が完備してきても、in silico 解析法では正確な exon-intron 構造の比較や、UTR 領域の役割などの情報がまだ完全には得られない。完全長 cDNA を用いた研究によりはじめてこれらの情報が得られる。また、発現偽遺伝子など、大規模でダイナミックな遺伝子の差異を明らかにすることができる。今後、がん、心臓血管系異常などに関わる遺伝子の解析を進めることが要請されるので、チンパンジー由来の完全長 cDNA クローン資源はさらに重要になると考えられる。また、我々の得ているライブラリ中に、RefSeq に当たらない配列のクローンが多数見いだされていることは、新規遺伝子の情報が得られる可能性を示すものとする。

## B. 研究方法

全長 cDNA のうち、同一遺伝子について得られたクローン中でもっとも長いトランスクリプト配列で、さらにフラップ値が高い正確なシークエンスデータを選択した。その配列をゲノム配列上にマップすることをとおして、種間差を求めることをおこなった。

### (1) 全クローンのチンパンジーゲノム上へのマッピング

データベース充実のため、まず全クローンをチンパンジーゲノム上にマップし、EST分布マップを作成した。

### (2) ヒトRefSeqに当たらなかったチンパンジークローンの再解析

4,911クローンをセルフクラスタリングし4,691配列を得た。これらのうち、複数配列のあるものについて、ヒトゲノムならびにチンパンジーゲノム上にマップし、mRNA、ESTと当たるか否か、repeat 配列との位置対応などを調べた。RefSeqにはヒットしないがヒトESTには対応し、さらにゲノム構造からexon-intron 構造をとることが予測できる配列、すなわち新規遺伝子候補については特に詳しく検討した。

### (3) 疾患関連遺伝子とくに肥満 (obesity) ならびに心臓血管系疾患 (cardiovascular disease) に対応するクローンの解析

NCBI (National Center for Biotechnology Information) の相同遺伝子検索サイトであるHomoloGeneによりヒトに対応するチンパンジーのホモログ配列を得た。これと本研究でのESTとを比較し、ヒトのSNPとの対応

をみた。

## (4) チンパンジー遺伝子コピー数変異解析のための基礎研究

Agilent社のComparative Genome Hybridization (CGH) 44Kアレイを用いた進化的保存遺伝子についてのコピー数解析のために、定法によりチンパンジーのCot-1 DNAを作製した。

### (倫理面への配慮)

本研究で用いたチンパンジー由来の組織の利用については、提供先である三和化学研究所の倫理委員会での承認を得ており、十分に生命倫理について配慮したものである。

## C. 研究結果

(1) 15,491 クローンのうち、ゲノム配列に対応する14,991 クローンをマップした (図1)。マップされなかった500配列については、チンパンジーゲノム上で反復配列の存在する領域やシークエンスデータにNが多い領域に相当するものが大部分であった。

### (2) ヒトRefSeqに当たらなかったチンパンジークローンの再解析

4,691配列クラスターのうち、3クローン以上で構成される配列について解析したところ、1) mitochondria DNA に高い相同性を示し、かつミトコンドリア以外の染色体にも存在している配列、2) SSU-rRNA、3) RefSeqでは未登録だがmRNAが登録されていた遺伝子と alternative splicing 遺伝子、4) 未知 transcript で構成されていた。未知 transcript についてはさらに詳細に解析を進めている。2クローン以下のものについての解析はまだ継続中だが、すでに新規遺伝子候補ならびにチンパンジーでのみ見られる種特異的遺伝子候補が複数見いだされている。

### (3) 疾患関連遺伝子とくに肥満 (obesity) ならびに心臓血管系疾患 (cardiovascular disease) に対応するクローンの解析

#### (a) 心臓血管系疾患関連遺伝子

心臓血管系疾患 (cardiovascular diseases) との関連が報告されている39遺伝子について比較解析を行った (表2)。7遺伝子はチンパンジーのゲノムが不完全で、ESTs もその領域を補完しなかった。9

遺伝子でヒトとチンパンジー間で大きな違いが見られたが、我々の ESTs で調べたところ、そのうち 6 遺伝子はチンパンジー-HomoloGene の誤りであることがわかった。残りの 3 遺伝子は、変化領域を ESTs が含んでいなかったため種差は不明であった。10 遺伝子はヒトとチンパンジーとでアミノ酸配列が 100%一致した。残りの 13 遺伝子内に 62 カ所のアミノ酸置換が見つかり、そのうち 4 カ所がヒト cSNP として報告されていた。cSNP のうち一つはアトピー、喘息との関連が報告されており、チンパンジーは疾患に相關のある SNP 型であった。この遺伝子は血小板タンパクをコードしていて、もっとも多く置換がみられた (711 アミノ酸中で 16 アミノ酸)。イヌ、マウス、ラットの配列を加えて、比較を行ったところ、ヒトのみで変化の見られたものは 16 カ所、チンパンジーのみは 18 カ所であった。また ESTs には、ヒトでは報告されていない新しい alternative splicing が含まれていることがわかった。

#### (b) 肥満関連遺伝子

肥満関連遺伝子 32 のうち、3 遺伝子はチンパンジーのゲノム配列データが不完全で HomoloGene が誤っていると考えられる (表 3)。6 遺伝子でヒトとチンパンジー間で大きな違いが見られたが、我々の ESTs を利用して調べたところ、2 遺伝子はチンパンジー-HomoloGene の誤りであることがわかった。残りの 4 遺伝子に関しては、違いのあった領域を ESTs が含んでいなかったため不明であった。9 遺伝子はヒトとチンパンジーとでアミノ酸配列が 100%一致した。残りの 14 遺伝子でアミノ酸の置換が 45 カ所で見つかり、そのうち 3 置換はヒトの cSNP として報告されていた。cSNP のうち一つは高血圧、血管性痴呆症との関連が報告されており、チンパンジーはヒトではマイナーなリスクの低い型であった。また、イヌ、マウス、ラットの配列を加えて、比較を行ったところ、ヒトのみで変化の見られたものは 12 カ所、チンパンジーのみは 9 カ所であった。

#### (4) チンパンジー遺伝子コピー数変異解析のための基礎研究

チンパンジー-Cot-1 DNA は作製でき、今後の CGH array 用に準備できた。

#### D. 考 察

2005 年に報告された国際的チンパンジーゲノム解析の結果によれば、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 16 見つまっている。そのうちの 15 例は 7 個体の解析ですべての個体がホモ接合になっていた。また 1 例ではチンパンジーでも共通の多型であることも示唆された。これらには心血管疾患 3 遺伝子や糖尿病関連 4 遺伝子などの疾患に関連するものであるという。今回の結果でもヒト多型のうち罹患性に関連するタイプがチンパンジーで見つまっている。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おもわれる。

ヒトゲノムが解読されたといっても表現型との対応に関しては未開拓な部分が多い。また、RefSeq として登録されていない膨大な数の EST の中には、遺伝子としての機能が明確になる可能性の高いものが多量にあると考えられる。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、これらから未知の遺伝子が得られることを期待している。また一方、チンパンジーゲノムでは、まだ未解読領域が残っている。チンパンジーのトランスクリプト解析により得られる配列の中には、そのような領域に対応する配列が含まれる。さらに、ゲノム情報からは偽遺伝子と判定される配列が、実は発現している例や、intergenic でなくエクソン領域内へのトランスポゾンの挿入例も見い出されている。UTR 配列の特定、exon-intron 構造の比較など、ゲノム配列からだけでは得られないような遺伝子構造についての情報が、全長 cDNA を解析することにより解明される。また、ヒトとチンパンジーでの選択的スプライシングの major 型と minor 型が逆転しているものが相当数ある。こういったものの中に、種差に寄与するものがあると考えられる。

一方で、ヒトで現在注目を浴びているコピー数変異についても、その生物学的背景や種の特性への関与を解明する必要がある。このことから、比較ゲノムアレーの研究のための基盤として、本研究で得た霊長類の Cot-1 DNA は有用なものと考える。

## E. 結論

ゲノム研究は、塩基配列情報とその表現型、特に疾患との関連を解析することで、大きな意義をもってくる。全ゲノム解析以来、一塩基多型 (SNP) の解析がマイクロアレイ技術の進展とともに急速に進められたが、今年度に入ってから、遺伝子のコピー数の変異や集団内に1%以上分布するような多型が注目されている。ヒト集団内での多型の存在ならびに多型の維持機序と疾患との関連に興味をもたれている。このような趨勢の中で、研究基盤として機能単位である遺伝子の解析が重要になってくる。本プロジェクトで構築してきたヒトに近縁の霊長類の完全長 cDNA コレクションは、ヒト遺伝子の異常や多様性について研究するうえで、極めて重要である。in silico では得られない、実際に発現しているトランスクリプトに基づく情報があることは、新規遺伝子に関する情報の発掘 (mining) を行う上で大きな強みである。この点を生かして、今後もこの資源の活用にも供することが重要であり、また本事業の目的にかなうものである。さらに、公共の検索サイトである NCBI の HomoloGene や UCSC のデータベースにおける誤りや不備を本研究をとおして指摘することにより、国際的公共データベースの質の向上に寄与できるものとおもわれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Naoki Osada, Katsuyuki Hashimoto, Momoki Hirai, and Jun Kusuda: Aberrant termination of reproduction-related TMEM30C 3 transcripts in the hominoids. *Gene*, in press (2006 Dec. 12 online publication).

Ryuichi Sakate, Yumiko Suto, Tadashi Imanishi, Tetsuya Tanoue, Ikuo Hayasaka, Jun Kusuda, Takashi Gojobori, Katsuyuki Hashimoto and Momoki Hirai: Mapping of chimpanzee full-length cDNAs onto the human genome unveils large potential divergence of the transcriptome. *Gene*, submitted.

### 2. 学会発表

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 大阪コンベンションセンター (大阪) 2006年7月16日

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 大阪コンベンションセンター (大阪) 2006年7月16日

## G. 知的所有権の取得状況

取得なし

図1 チンパンジーのEST マップ

15,491 配列中の 14,991 配列をチンパンジーゲノム上にマップした。

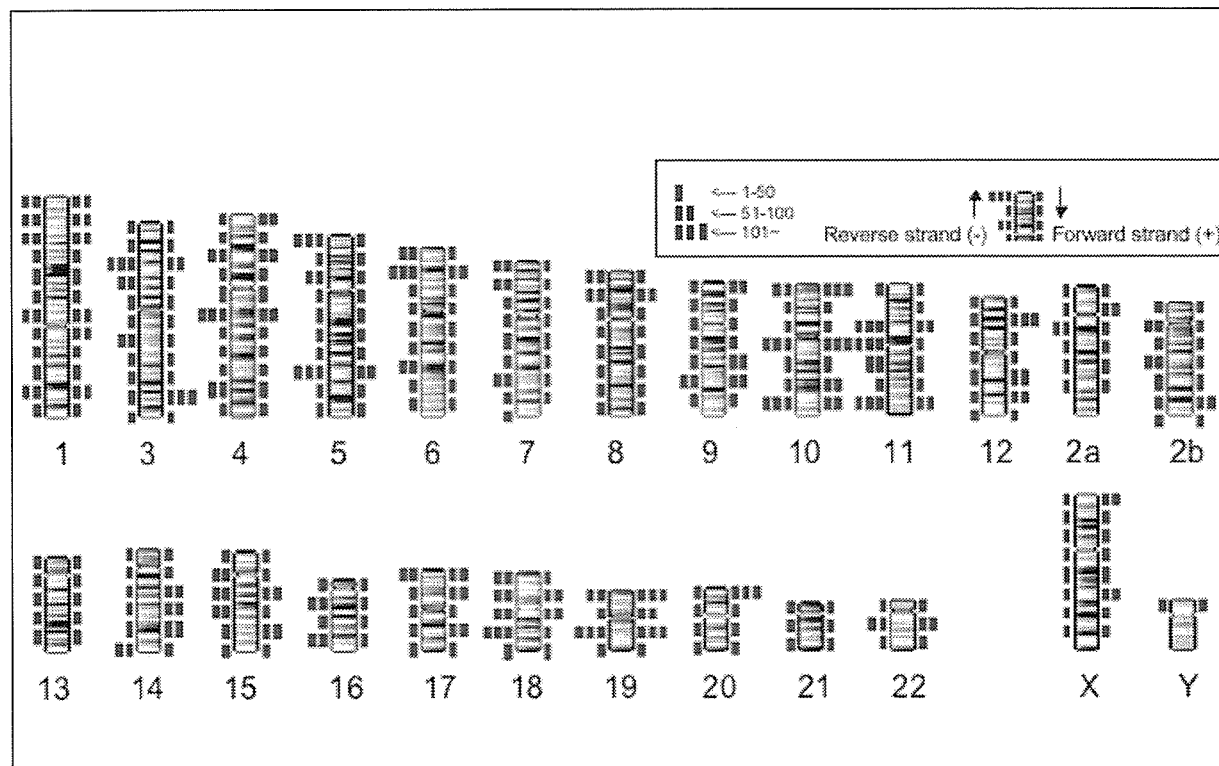


表1 チンパンジーのcDNA ライブラリー

Individuals	Organs or tissues	cDNA libraries	No. of 5'-ESTs
Female, 11 yrs. old	Brain		(10,405)
	Cerebellum cortex	PccA, PccB	2,503
	Cerebrum cortex, frontal lobe (right)	PfIB, PfIC	6,345
	Cerebrum cortex, occipital lobe (right)	PorA, PorB	1,557
	Liver	PlvA	86
Male, 23 yrs. Old	Testis	PtsC	1,447
Male, 19 yrs. old	Skin, epidermal tissue	PstA	3,513
Total			15,451