

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-518485

(P2015-518485A)

(43) 公表日 平成27年7月2日(2015.7.2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 31/7105 (2006.01)	A 61 K 31/7105	4 B 02 4
A 61 P 3/04 (2006.01)	A 61 P 3/04	4 B 06 5
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 O 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 2
C 12 N 15/113 (2010.01)	C 12 N 15/00	Z N A G

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 182 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-507246 (P2015-507246)	(71) 出願人	514266334 アプタミアール セラピューティクス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン ウエスト ブレイcker レーン 3925 アット ザ オースティン テクノロジー インキュベーター
(86) (22) 出願日	平成25年4月22日 (2013. 4. 22)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成26年12月9日 (2014. 12. 9)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/037579	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(87) 國際公開番号	W02013/159091	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成25年10月24日 (2013. 10. 24)		
(31) 優先権主張番号	61/636,059		
(32) 優先日	平成24年4月20日 (2012. 4. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/681,750		
(32) 優先日	平成24年8月10日 (2012. 8. 10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/782,838		
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】熱発生のm i R N A調節剤

## (57) 【要約】

熱発生の調節のための新規な方法および組成物を提供する。このような方法は、対象が食事制限によりカロリー摂取を調整する必要がなく、身体活動を修正する必要がなく、または肥満手術を受ける必要がなく、対象において体脂肪の減少を可能にするという点で、特に有益である。したがって、本発明の方法は、肥満の治療または予防に特に有用である。熱発生制御因子の活性を調節する新規薬剤をスクリーニングする方法もまた提供する。

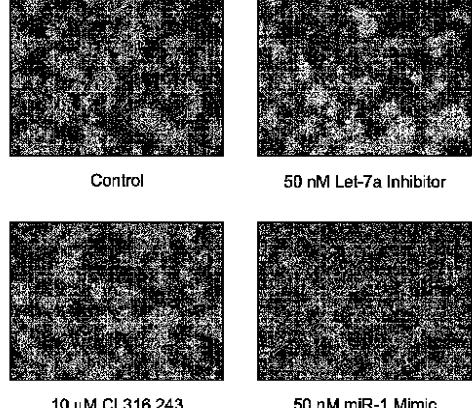


FIG. 22

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞における呼吸鎖脱共役を調節する方法であって、細胞を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性を調節するmiRNA剤と接触させる段階を含む、方法。

**【請求項 2】**

細胞が、前脂肪細胞、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

組織における熱発生を調節する方法であって、組織を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性を調節するmiRNA剤と接触させる段階を含む、方法。 10

**【請求項 4】**

組織が、褐色脂肪、白色脂肪、皮下脂肪組織、肝臓、または筋肉である、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

組織をエクスピボでmiRNA剤と接触させる、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

その治療を必要とするヒト対象において肥満を治療する方法であって、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性または発現を調節するmiRNA剤の有効量をヒト対象に投与する段階を含む、方法。

**【請求項 7】**

治療のために選択されるヒト対象が、肥満に対する遺伝的素因または後成的素因を有する、請求項6に記載の方法。 20

**【請求項 8】**

ミトコンドリア脱共役剤がUCP1またはUCP2である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

miRNA剤が、

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105,

hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143- 30

5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-

mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218- 40

2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-

2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR- 50

3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir- 40

371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir- 422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir- 508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa- 50

mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir- 643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888- 50

3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

からなる群より選択されるmiRNAである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

miRNA剤が、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNA 50

である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 1】**

miRNA剤が、  
hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2,  
miR-19a-b, hsa-miR-105, hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2,  
hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-  
mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218,  
hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p,  
hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331,  
hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-  
367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-  
382, hsa-mir-383, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-  
491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-  
519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-  
568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871,  
hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

10

20

30

からなる群より選択されるmiRNAのアゴミア(agomir)またはアンタゴミア(antagomir)である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 2】**

miRNA剤が、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

miRNA剤が、hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-  
miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、およびhsa-miR-545からな  
る群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、前記請求項のいずれか一項に記載の方  
法。

30

**【請求項 1 4】**

miRNA剤が、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、およびhsa-miR-1179からな  
る群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、前記請求項のいずれか一項に記載の方  
法。

**【請求項 1 5】**

miRNA剤が標的指向部分に連結される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 6】**

標的指向部分がアブタマーである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 7】**

標的指向部分がmiRNA剤を特定の細胞型または組織に送達する、前記請求項のいずれか  
一項に記載の方法。

40

**【請求項 1 8】**

miRNA剤が、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAまたはプロモーター領域に  
直接結合する、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

miRNA剤が、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの5'UTRまたはコード配列  
に直接結合する、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

miRNA剤が、ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性化因子または抑制因子の活性を調

50

節する、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

活性化因子または抑制因子が、表2に記載される活性化因子または抑制因子からなる群より選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項 2 2】

miRNA剤が、活性化因子または抑制因子のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項 2 3】

miRNA剤が、活性化因子または抑制因子のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項 2 4】

ミトコンドリア脱共役タンパク質のmRNAまたはタンパク質発現が上方制御される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

ミトコンドリア脱共役タンパク質のミトコンドリア脱共役活性が上方制御される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

以下を含む、熱発生を調節するmiRNA剤をスクリーニングする方法：

a) ヒトゲノムを含む指標細胞を提供する段階；

b) 該指標細胞を試験miRNA剤と接触させる段階；ならびに

c) 該miRNA剤の存在下および非存在下において、該指標細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の細胞活性を決定する段階であって、試験miRNA剤の存在下における熱発生制御因子の活性の変化により、その試験miRNA剤が熱発生を調節するmiRNA剤として同定される、段階。

【請求項 2 7】

細胞が、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体である、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 8】

段階(c)において決定される熱発生制御因子の細胞活性が、熱発生制御因子のmRNA発現レベル、タンパク質発現レベル、またはミトコンドリア脱共役活性である、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 9】

熱発生制御因子がUCP1である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の活性を調節する、アゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項 3 1】

表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである、請求項30に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項 3 2】

以下：

10

20

30

40

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105,  
hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-  
5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-  
mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-  
2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-  
2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-  
3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-  
371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir-  
422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-  
508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519c, hsa-miR-520a, hsa-  
mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-  
643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-  
3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

10

20

からなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである、請求項30に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項33】

hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、およびhsa-miR-545からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、請求項30に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項34】

hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、およびhsa-miR-1179からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、請求項30に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項35】

標的指向部分に連結される、請求項30～34のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

30

【請求項36】

標的指向部分がアプタマーである、請求項35に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項37】

標的指向部分がアゴミアまたはアンタゴミアを特定の細胞型または組織に送達する、請求項35または36に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項38】

少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する、請求項28～33のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

40

【請求項39】

少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、請求項30～37のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項40】

ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性化因子または抑制因子の活性を調節する、請求項30～37のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項41】

活性化因子または抑制因子が、表2に記載される活性化因子または抑制因子からなる群より選択される、請求項30～37のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項42】

活性化因子または抑制因子のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する、請求項30～

50

37のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項 4 3】

活性化因子または抑制因子のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、請求項30～37のいずれか一項に記載のアゴミアまたはアンタゴミア。

【請求項 4 4】

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される2つ以上のmiRNAを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 5】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項44に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 6】

2つ以上のmiRNAが組換えベクターから発現される、請求項44に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 7】

組換えベクターが、DNAプラスミド、ウイルスベクター、およびDNAミニサークルからなる群より選択される、請求項47に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される2つ以上のmiRNAを含む、請求項44に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 9】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項48に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 0】

2つ以上のmiRNAが組換えベクターから発現される、請求項48に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 1】

組換えベクターが、DNAプラスミド、ウイルスベクター、およびDNAミニサークルからなる群より選択される、請求項48に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 2】

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを前脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、前脂肪細胞を誘導して脂肪細胞に分化させる方法。

【請求項 5 3】

前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる誘導が、前脂肪細胞を100 nMロシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した場合の、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化よりも大きい、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 4】

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 5】

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、脂肪細胞の脂質含量を減少させる方法。

【請求項 5 6】

脂肪細胞の脂質含量が、100 nMロシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した脂肪細胞の脂質含量よりも低い、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 7】

脂肪細胞の脂質含量が、培養期間中100 nMロシグリタゾンに曝露した脂肪細胞の脂質含

10

20

30

40

50

量よりも低い、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 8】

培養期間が8～16日である、請求項57に記載の方法。

【請求項 5 9】

培養期間が10～14日である、請求項58に記載の方法。

【請求項 6 0】

培養期間が14日である、請求項59に記載の方法。

【請求項 6 1】

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、請求項55に記載の方法。

10

【請求項 6 2】

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象においてインスリン感受性を高める方法。

【請求項 6 3】

対象が哺乳動物である、請求項62に記載の方法。

【請求項 6 4】

哺乳動物がヒトである、請求項63に記載の方法。

20

【請求項 6 5】

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、請求項62に記載の方法。

【請求項 6 6】

hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを細胞に投与する段階を含む、細胞における1つまたは複数の脱共役タンパク質の発現または活性を増加させる方法。

【請求項 6 7】

細胞が、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞、皮下脂肪細胞、肝臓細胞、または筋細胞からなる群より選択される、請求項66に記載の方法。

30

【請求項 6 8】

1つまたは複数の脱共役タンパク質がUCP-1またはUCP-2を含む、請求項66に記載の方法。

【請求項 6 9】

hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象において脂肪消失を引き起こす方法。

【請求項 7 0】

対象が哺乳動物である、請求項69に記載の方法。

40

【請求項 7 1】

哺乳動物がヒトである、請求項70に記載の方法。

【請求項 7 2】

肥満を治療するための医薬の製造における、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアの使用。

【請求項 7 3】

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、請求項72に記載の使用。

【請求項 7 4】

50

アゴミアまたはアンタゴミアが標的指向部分に連結される、請求項72に記載の使用。

【請求項 7 5】

標的指向部分がアブタマーである、請求項74に記載の使用。

【請求項 7 6】

肥満を治療するための、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアを含む組成物。

【請求項 7 7】

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、請求項76に記載の組成物。

10

【請求項 7 8】

アゴミアまたはアンタゴミアが標的指向部分に連結される、請求項76に記載の組成物。

【請求項 7 9】

標的指向部分がアブタマーである、請求項76に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年4月20日に出願された米国特許出願第61/636,059号；2012年8月10日に出願された米国特許出願第61/681,750号；および2013年3月14日に出願された米国特許出願第61/782,838号の優先権を主張し、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

肥満は蔓延の域に達し、すべての年齢層および社会経済的集団に影響を及ぼしている。世界保健機関は、2008年には、20歳以上の成人15億人が過体重であり、2億人を超える男性および3億人を超える女性が肥満であると推定した。これらの数値は、2030年までに、過体重の人が21億6千万人および肥満症の人が11億2千万人にまで増加すると推定されている。肥満は、所得の喪失、活動日の制限、長期欠勤、仕事での低生産性（プレゼンティーアイズム）、生活の質の低下、永久的な能力障害、著しい罹患率および死亡率、ならびに寿命の短縮の源である。実際に、医療費、過剰な死亡率および能力障害によってもたらされる、米国およびカナダにおける過体重および肥満の年間の総経済コストは、2009年には約\$3000億であると推定された。肥満の経済コストに関する国際的調査により、それらは総ヘルスケアコストの2%～10%を占めることが示された。

30

【0 0 0 3】

肥満は、エネルギーの摂取と消費との間の慢性的な不均衡の結果である。これによって過剰なエネルギーが脂肪細胞に貯蔵され、脂肪細胞は典型的に肥大（細胞サイズの増加）および過形成（細胞数または脂肪生成の増加）の両方を示す。肥満の最近の悪化は、飽和脂肪および糖が多い高エネルギー食品の過剰消費と身体活動の減少との組み合わせによるものである。

40

【0 0 0 4】

肥満の現在の対症療法は、主に薬物有効性の限界、ならびに生活様式の変更および治療法の患者の順守の低さのために、長期治療目標を達成することができない。いくつかの肥満治療薬は安全性の理由で市場から除去され、また現在開発中の小分子は、短期有効性が中程度であり、安全性プロファイルが未知であるために、規制当局の承認を得るのに苦心している。現在、制限および吸収阻害肥満手術のみが、いくらかの好ましい心血管利点を伴って、体重過剰の顕著な長期的低下を達成することができる。

【0 0 0 5】

したがって、当技術分野において肥満の新規治療法が必要である。

50

**【発明の概要】****【0006】**

肥満は、エネルギーの摂取が消費を上回る慢性的な不均衡の結果であり、この不均衡は白色脂肪細胞内に過剰なエネルギーの貯蔵をもたらす。本開示は、エネルギー貯蔵性の、脂質で満たされた白色脂肪細胞 (WAT) およびエネルギー消費性の、ミトコンドリアリッチな褐色脂肪細胞 (BAT) を含む末梢脂肪細胞を標的化する、肥満の新規治療法に注目する。加えて、本開示は、マイクロRNA (miRNA) 剤を用いて熱発生 (生物における熱産生の過程) を調節する方法を提供する。本明細書に記載される方法は概して、単離されたmiRNA剤を用いた、細胞、組織、および / または対象における少なくとも1つの熱発生制御因子 (例えばミトコンドリア脱共役剤、例えば脱共役タンパク質1 (UCP1、サーモゲニンとしても知られる) または脱共役タンパク質2 (UCP2) など) の直接的および / または間接的調節を含む。UCPは、ATP合成から酸化的リン酸化を脱共役させる。場合によっては、この脱共役反応はエネルギーを熱として消散させる。このような方法は、対象が食事制限によりカロリー摂取を調整する必要がなく、身体活動を修正する必要がなく、または肥満手術を受ける必要がなく、対象において体脂肪の減少を可能にするという点で、特に有益である。したがって、本発明の方法は、肥満の治療または予防に特に有用である。

10

**【0007】**

本発明はまた、熱発生制御因子の活性を調節することができる新規miRNA剤組成物 (例えば、miRNA、アゴミア(agonmir)、およびアンタゴミア(antagonmir)) を提供する。なおさらには、本発明は、熱発生制御因子の活性を調節する新規miRNA剤をスクリーニングする方法を提供する。さらになお、本発明は、miRNA剤の細胞 / 組織特異的送達を提供する新規薬剤組成物 (例えば、アプタマー miRNA複合体または「アプタミア(aptamir)」) を提供する。

20

**【0008】**

したがって、1つの局面において、本発明は、細胞における呼吸鎖脱共役を調節する方法であって、細胞を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の発現レベルおよび / または活性を調節する単離されたmiRNA剤と接触させる段階を含む方法を提供する。いくつかの局面において、本方法は、呼吸鎖脱共役の調節を必要とする対象 (例えば、肥満患者) を選択する段階をさらに含む。1つの態様において、miRNA剤は、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の発現レベルおよび / または活性を上昇させる。ある種の態様において、ミトコンドリア脱共役剤はUCP1またはUCP2である。いくつかの態様において、本方法は、インビボにおいて、細胞における呼吸鎖脱共役を増加させる。他の態様において、本方法は、エクスピボにおいて、細胞における呼吸鎖脱共役を増加させる。ある種の態様において、本方法は、ミトコンドリア脱共役剤の発現 (mRNAまたはタンパク質) のレベルまたは活性を決定する段階をさらに含む。ある種の態様において、細胞は、前脂肪細胞、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体である。任意に、脂肪細胞は白色脂肪脂肪細胞または褐色脂肪脂肪細胞であってよい。

30

**【0009】**

別の局面において、本発明は、組織における熱発生を調節する方法であって、組織を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の発現レベルおよび / または活性を調節する単離されたmiRNA剤と接触させる段階を含む方法を提供する。いくつかの局面において、本方法は、熱発生の調節を必要とする対象 (例えば、肥満患者) を選択する段階をさらに含む。1つの態様において、miRNA剤は、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の発現レベルおよび / または活性を上昇させる。ある種の態様において、ミトコンドリア脱共役剤はUCP1またはUCP2である。ある種の態様において、本方法は、熱発生を増加させる段階を含む。ある種の態様において、本方法は、ミトコンドリア脱共役剤の発現 (mRNAまたはタンパク質) のレベルまたは活性を決定する段階をさらに含む。ある種の態様において、組織は、褐色脂肪、白色脂肪、皮下脂肪組織、肝臓、または筋肉である。ある種の態様では、組織をエクスピボでmiRNA剤と接触させる。

40

**【0010】**

50

別の局面において、本発明はその治療を必要とするヒト対象において肥満を治療する方法であって、概して、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性を調節するmiRNA剤の有効量をヒト対象に投与する段階を含む方法を提供する。ある種の態様において、治療のために選択されるヒト対象は、肥満に対する遺伝的素因または後成的素因を有する。ある種の態様において、ミトコンドリア脱共役剤はUCP1、UCP2、またはUCP3である。

【0011】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、hsa-miR-1-1、hsa-miR-1-2、miR-19a-b、hsa-miR-105、hsa-miR-1283、hsa-mir-129、hsa-miR-133a-1、hsa-miR-133a-2、hsa-miR-143、hsa-mir-143-5p、hsa-mir-147、hsa-mir-149、hsa-mir-199a、hsa-mir-199b、hsa-mir-200c、hsa-mir-204、hsa-mir-205、hsa-miR-206、hsa-mir-21、hsa-mir-211、hsa-mir-218、hsa-mir-218-1、hsa-mir-218-2、hsa-mir-219-2、hsa-mir-219-2-3p、hsa-mir-22、hsa-mir-22-3p、hsa-mir-22-5p、hsa-mir-24-2、hsa-miR-30a-e、hsa-miR-3177-5p、hsa-mir-325、hsa-mir-331、hsa-mir-331-5p、hsa-miR-3613-3p、hsa-mir-362、hsa-mir-362-5p、hsa-miR-3658、hsa-mir-367、hsa-mir-371、hsa-mir-371-5p、hsa-mir-377、hsa-mir-378、hsa-mir-378a-5p、hsa-mir-382、hsa-mir-383、hsa-mir-422a、hsa-mir-425、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-455-5p、hsa-miR-491、hsa-mir-508、hsa-mir-508-5p、hsa-mir-512-1、hsa-mir-512-2、hsa-miR-515-3p、hsa-mir-519e、hsa-miR-520a、hsa-mir-543、hsa-mir-545、hsa-mir-549、hsa-mir-556、およびhsa-miR-568、hsa-mir-620、hsa-mir-643、hsa-mir-654-3p、hsa-miR-7a-g、hsa-mir-765、hsa-mir-871、hsa-mir-888、hsa-mir-888-3p、hsa-mir-92b、hsa-mir-93、hsa-mir-96、およびhsa-mir-99aからなる群より選択される単離されたmiRNAである。上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、上記のmiRNAの配列と80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である単離されたmiRNAである。上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は上記のmiRNAのシード配列である。

【0012】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表1に記載される536個のmiRNAからなる群より選択される単離されたmiRNAである。上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表1に記載されるmiRNAの配列と80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である単離されたmiRNAである。上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表1に記載されるmiRNAのシード配列である。

【0013】

(表1) 昇順に記載された脂肪細胞miRNA (miRBase 19命名法)

hsa-let-7a-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-329	hsa-miR-509-3p
hsa-let-7a-5p	hsa-miR-186-3p	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-511
hsa-let-7b-3p	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-513a-3p
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-513a-5p
hsa-let-7c	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-513b
hsa-let-7d-3p	hsa-miR-18a-3p	hsa-miR-335-3p	hsa-miR-514a-3p
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-515-3p
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-516b-3p
hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-1909-3p	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-516b-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-190a	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-518b
hsa-let-7g-3p	hsa-miR-190b	hsa-miR-338-5p	hsa-miR-518e-3p
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-191-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-518e-5p
hsa-let-7i-3p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-518f-3p
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-33a-5p	hsa-miR-519a-5p
hsa-miR-1	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-33b-5p	hsa-miR-519b-5p
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-340-3p	hsa-miR-519c-3p
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-519c-5p

hsa-miR-101-5p	hsa-miR-193b-5p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-519d
hsa-miR-103a-2-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-520c-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-195-3p	hsa-miR-345-5p	hsa-miR-520e
hsa-miR-103b	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-346	hsa-miR-520f
hsa-miR-105-5p	hsa-miR-196a-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-520g
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-520h
hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-34b-5p	hsa-miR-521
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-198	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-522-5p
hsa-miR-107	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-3545-5p	hsa-miR-523-5p
hsa-miR-10a-3p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-3591-3p	hsa-miR-525-3p
hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-199b-3p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-532-3p
hsa-miR-10b-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-532-5p
hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-3613-5p	hsa-miR-539-5p
hsa-miR-1179	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-3615	hsa-miR-542-3p
hsa-miR-1185-5p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-542-5p
hsa-miR-1208	hsa-miR-200a-5p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-545-3p
hsa-miR-122-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-545-5p
hsa-miR-1227-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-548d-3p
hsa-miR-1228-5p	hsa-miR-202-3p	hsa-mir-365a-3p	hsa-miR-548e
hsa-miR-1229-3p	hsa-miR-203a	hsa-mir-3653	hsa-miR-548i
hsa-miR-124-3p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-3656	hsa-miR-548m
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-550a-5p
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-206	hsa-miR-365a-5p	hsa-miR-551b-3p
hsa-miR-125b-1-3p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-367-3p	hsa-miR-552
hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-mir-3676-3p	hsa-miR-553
hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-554
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-21-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-557
hsa-miR-126-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-563
hsa-miR-1260a	hsa-miR-210	hsa-miR-371a-3p	hsa-miR-564
hsa-miR-1260b	hsa-miR-211-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-567
hsa-miR-1268a	hsa-miR-2110	hsa-miR-373-5p	hsa-miR-569
hsa-miR-127-3p	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-374a-3p	hsa-miR-570-3p
hsa-miR-127-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-572
hsa-miR-1271-5p	hsa-miR-214-5p	hsa-miR-374b-3p	hsa-miR-574-3p
hsa-miR-1273a	hsa-miR-215	hsa-miR-374b-5p	hsa-miR-574-5p
hsa-miR-1277-3p	hsa-miR-216a-5p	hsa-miR-375	hsa-miR-575
hsa-miR-128	hsa-miR-217	hsa-mir-376a-2-5p	hsa-miR-576-3p
hsa-miR-128-2	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-376a-3p	hsa-miR-576-5p
hsa-miR-1285-3p	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-376a-5p	hsa-miR-582-3p
hsa-miR-1287	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-376b-3p	hsa-miR-582-5p
hsa-miR-1288	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-376c-3p	hsa-miR-583

10

20

30

40

hsa-miR-129-5p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-377-3p	hsa-miR-584-5p
hsa-miR-1290	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-585
hsa-miR-1292-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-378a-5p	hsa-miR-586
hsa-miR-1301	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-378c	hsa-miR-589-5p
hsa-miR-1305	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-378d	hsa-miR-590-3p
hsa-mir-1307-3p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-379-5p	hsa-miR-590-5p
hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-223-5p	hsa-miR-380-3p	hsa-miR-595
hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-381-3p	hsa-miR-598
hsa-miR-130b-5p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-382-5p	hsa-miR-601
hsa-miR-132-3p	hsa-miR-2355-3p	hsa-miR-383	hsa-miR-602
hsa-miR-132-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-384	hsa-miR-603
hsa-miR-1323	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-3912	hsa-miR-605
hsa-miR-133a	hsa-miR-23b-5p	hsa-miR-3928	hsa-miR-606
hsa-miR-133b	hsa-miR-24-1-5p	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-609
hsa-miR-134	hsa-miR-24-2-5p	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-611
hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-410	hsa-miR-615-3p
hsa-miR-135b-5p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-411-5p	hsa-miR-619
hsa-miR-136-3p	hsa-miR-26a-2-3p	hsa-miR-421	hsa-miR-625-5p
hsa-miR-136-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-422a	hsa-miR-627
hsa-miR-137	hsa-miR-26b-3p	hsa-miR-422b	hsa-miR-628-3p
hsa-miR-138-1-3p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-628-5p
hsa-miR-138-5p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-629-3p
hsa-miR-139-3p	hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-424-3p	hsa-miR-629-5p
hsa-miR-139-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-630
hsa-miR-140-3p	hsa-miR-27b-5p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-636
hsa-miR-140-5p	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-638
hsa-miR-141-3p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-429	hsa-miR-639
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-431-5p	hsa-miR-641
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-297	hsa-miR-432-5p	hsa-miR-642a-3p
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-298	hsa-miR-433	hsa-miR-642a-5p
hsa-miR-143-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-4421	hsa-miR-646
hsa-miR-144-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-449a	hsa-miR-649
hsa-miR-144-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-651
hsa-miR-145-3p	hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-450b-3p	hsa-miR-652-3p
hsa-miR-145-5p	hsa-miR-29b-1-5p	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-653
hsa-miR-1468	hsa-miR-29b-2-5p	hsa-miR-4510	hsa-miR-654-3p
hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-4516	hsa-miR-659-3p
hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-660-5p
hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-29c-5p	hsa-miR-452-3p	hsa-miR-663a
hsa-miR-147a	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-664a-3p
hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-301b	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-664a-5p

10

20

30

40

hsa-miR-148a-5p	hsa-miR-302a-5p	hsa-miR-454-5p	hsa-miR-668
hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-302b-5p	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-671-5p
hsa-miR-148b-5p	hsa-miR-302c-5p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-675-3p
hsa-miR-149-5p	hsa-miR-302d-3p	hsa-miR-4634	hsa-miR-675-5p
hsa-miR-150-3p	hsa-miR-3065-3p	hsa-miR-4732-5p	hsa-miR-7-2-3p
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-3065-5p	hsa-miR-4792	hsa-miR-7-5p
hsa-miR-151a-3p	hsa-miR-3074-3p	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-708-3p
hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-3074-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-708-5p
hsa-miR-151b	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-484	hsa-miR-718
hsa-miR-152	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-744-5p
hsa-miR-153	hsa-miR-30b-3p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-765
hsa-miR-1539	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-769-5p
hsa-miR-154-3p	hsa-miR-30c-1-3p	hsa-miR-487b	hsa-miR-770-5p
hsa-miR-154-5p	hsa-miR-30c-2-3p	hsa-miR-488-3p	hsa-miR-874
hsa-miR-155-5p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-489	hsa-miR-885-3p
hsa-miR-15a-3p	hsa-miR-30d-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-887
hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-889
hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-492	hsa-miR-890
hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-493-3p	hsa-miR-891a
hsa-miR-16-1-3p	hsa-miR-31-3p	hsa-miR-493-5p	hsa-miR-891b
hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-494	hsa-miR-9-5p
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-3120-3p	hsa-miR-495-3p	hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-17-3p	hsa-miR-3120-5p	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-92b-3p
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-3184-5p	hsa-miR-498	hsa-miR-93-3p
hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-32-3p	hsa-miR-499a-5p	hsa-miR-93-5p
hsa-miR-181a-3p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-500a-3p	hsa-miR-935
hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-942
hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-320b	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-95
hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-320c	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-96-3p
hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-323a-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-96-5p
hsa-miR-181d	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-503-5p	hsa-miR-98-5p
hsa-miR-182-5p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-504	hsa-miR-99a-3p
hsa-miR-183-5p	hsa-miR-325	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-99a-5p
hsa-miR-184	hsa-miR-326	hsa-miR-505-5p	hsa-miR-99b-3p
hsa-miR-185-3p	hsa-miR-328	hsa-miR-506-3p	hsa-miR-99b-5p

## 【 0 0 1 4 】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表11、13、および14に記載される単離されたmiRNAからなる群より選択されるmiRNAである。上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAの配列と80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である単離されたmiRNAである。上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表11、13、および14に記載されるmiRNAのシード配列である。

## 【 0 0 1 5 】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表1に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである。

## 【 0 0 1 6 】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、

10

20

30

40

50

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105, hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

10

20

からなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである。

【0017】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、表11に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである。

【0018】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、およびhsa-miR-545からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである。

【0019】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、およびhsa-miR-1179からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである。

30

【0020】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は標的指向部分（例えば、アブタマー）に連結される。1つの態様において、標的指向部分は、miRNA剤を、特定の細胞型または組織に送達する。

【0021】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する。

40

【0022】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する。

【0023】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの3'UTRに直接結合する。

【0024】

上記局面のすべてのある種の態様において、miRNA剤は、ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性化因子または抑制因子の活性を調節する。1つの態様において、miRNA剤は、活性化因子または抑制因子のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する。1つの態様において、miRNA剤は、活性化因子または抑制因子のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合

50

する。1つの態様において、miRNA剤は、活性化因子または抑制因子のmRNAの3'UTRに直接結合する。1つの態様において、活性化因子または抑制因子は、表2に記載される群より選択される。

【0025】

上記局面のすべてのある種の態様において、ミトコンドリア脱共役タンパク質のmRNAまたはタンパク質発現は上方制御される。

【0026】

上記局面のすべてのある種の態様において、ミトコンドリア脱共役タンパク質のミトコンドリア脱共役活性は上方制御される。

【0027】

別の局面において、本発明は、概して以下を含む、熱発生を調節するmiRNA剤をスクリーニングする方法を提供する：指標細胞を提供する段階；該指標細胞を試験miRNA剤と接触させる段階；ならびに該miRNA剤の存在下および非存在下において、該指標細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の細胞活性を決定する段階であって、試験miRNA剤の存在下における熱発生制御因子の活性の変化により、その試験miRNA剤が熱発生を調節するmiRNA剤として同定される段階。指標細胞は哺乳動物細胞であつてよい。ある種の態様において、指標細胞は、ヒトゲノムの少なくとも一部を含むヒト細胞である。

【0028】

ある種の態様において、細胞は、前脂肪細胞、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体である。

【0029】

ある種の態様において、本方法において決定される熱発生制御因子の細胞活性は、熱発生制御因子のmRNA発現レベル、タンパク質発現レベル、またはミトコンドリア脱共役活性である。

【0030】

ある種の態様において、試験miRNA剤は、該試験miRNA剤の非存在下における熱発生制御因子の活性のレベルと比較して、熱発生制御因子の活性を上昇させる。

【0031】

ある種の態様において、熱発生制御因子はUCP1またはUCP2である。

【0032】

別の局面において、本発明は、細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の活性を調節するアゴミアまたはアンタゴミアを提供する。

【0033】

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、表11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである。

【0034】

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、表1に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである。

【0035】

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、

10

20

30

40

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105, hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

10

20

30

40

50

からなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである。

**【0036】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、およびhsa-miR-545からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである。

**【0037】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、およびhsa-miR-1179からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである。

**【0038】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは標的指向部分に連結される。

**【0039】**

ある種の態様において、標的指向部分はアプタマーである。

**【0040】**

ある種の態様において、標的指向部分は、アゴミアまたはアンタゴミアを特定の細胞型または組織に送達する。

**【0041】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する。

**【0042】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する。

**【0043】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの3'UTRに直接結合する。

**【0044】**

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性化因子または抑制因子の活性を調節する。

**【0045】**

ある種の態様において、活性化因子または抑制因子は、表2に記載される群より選択さ

れる。

【0046】

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、活性化因子または抑制因子のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する。

【0047】

ある種の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、活性化因子または抑制因子のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する。他の態様において、アゴミアまたはアンタゴミアは、活性化因子または抑制因子のmRNAの3'UTRに直接結合する。

【0048】

本開示はまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアより選択される2つ以上のmiRNAを含む薬学的組成物を提供する。ある種の態様において、薬学的組成物はまた、薬学的に許容される賦形剤を含む。ある種の態様において、2つ以上のmiRNAは組換えベクターから発現される。組換えベクターは、DNAプラスミド、ウイルスベクター、およびDNAミニサークルより選択され得る。

【0049】

本開示はまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアより選択される1つまたは複数のmiRNAを前脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、前脂肪細胞を誘導して最初に白色脂肪細胞に、次に褐色脂肪細胞に分化させる方法を提供する。1つまたは複数のmiRNAはまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアより選択され得る。ある種の態様において、前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させるこの誘導は、前脂肪細胞を100 nMロシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した場合の、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化よりも大きい。ある種の態様において、脂肪細胞は褐色脂肪細胞である。他の態様において、脂肪細胞は白色脂肪細胞である。分化の付加的基準は、以下の実施例において見出すことができる。

【0050】

本開示はまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、脂肪細胞の脂質含量を減少させる方法を提供する。ある種の態様において、脂肪細胞のこの脂質含量は、100 nMロシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した脂肪細胞の脂質含量よりも低いか、または培養期間中100 nMロシグリタゾンに曝露した脂肪細胞の脂質含量よりも低い。培養期間は、8~16日、10~14日、または14日であってよい。培養期間はまた、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20日であってよい。脂肪細胞の脂質含量の付加的基準は、以下の実施例において見出すことができる。

【0051】

本開示はまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象においてインスリン感受性を高める方法を提供する。

【0052】

ある種の態様において、対象は哺乳動物である。

【0053】

本開示はまた、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、

10

20

30

40

50

およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つもしくは複数、2つ以上、または3つ以上のmiRNAを細胞に投与する段階を含む、細胞における1つまたは複数の脱共役タンパク質の発現または活性を増加させる方法を提供する。ある種の態様において、細胞は、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞、皮下脂肪細胞、肝臓細胞、または筋細胞からなる群より選択される。他の態様において、1つまたは複数の脱共役タンパク質はUCP1またはUCP2を含む。ある種の態様において、本方法はエクスピボ方法である。他の態様において、本方法はインビボ方法である。ある種の態様において、本方法は、1つまたは複数の脱共役タンパク質（例えば、UCP1、UCP2）の発現レベルまたは活性を上昇させる必要がある対象（例えば、ヒト）を選択する段階を含む。いくつかの態様において、対象は肥満を有するか、または肥満を発症するリスクがある。ある種の態様において、対象は糖尿病を有するか、または糖尿病を発症するリスクがある。ある種の態様において、本方法は、1つまたは複数の脱共役タンパク質の発現レベル（mRNAまたはタンパク質）または活性を決定することをさらに含む。

10

#### 【0054】

本開示はまた、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象において脂肪消失を引き起こす方法を提供する。ある種の態様において、対象は哺乳動物である。他の態様において、哺乳動物はヒトである。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0055】

【図1A】2つの異なるレベルのストリンジエンシーでSTRING 9.0データベースを用いて決定された、83個の熱発生制御因子の相互作用の模式図である。

【図1B】2つの異なるレベルのストリンジエンシーでSTRING 9.0データベースを用いて決定された、83個の熱発生制御因子の相互作用の模式図である。

【図2A】Ingenuity Pathway Analysisソフトウェアプログラムを用いて決定された、83個の熱発生制御因子の相互作用の模式図である。

【図2B】Reactome Functional Interaction Networkプログラムを用いて決定された、83個の熱発生制御因子の相互作用の模式図である。

【図3】ヒトUCP1遺伝子の5'UTR、プロモーター領域、コード配列、および3'UTR中のmiRNA結合部位を予測する複数のmiRNA予測プログラムによる結果の重複の模式図である。

30

【図4】83個の熱発生制御因子の遺伝子の5'UTR、プロモーター領域、コード配列、および3'UTR中のmiRNA結合部位を予測する複数のmiRNA予測プログラムによる結果の重複の模式図である。

【図5】ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の模式図であり、熱を発生させるためのUCP1によるATP合成からの酸化的リン酸化の脱共役を示している。

【図6】他の例示的な熱発生制御因子によるUCP1の転写制御を示す。

【図7】UCP1遺伝子転写の例示的な正(a)および負(b)の転写制御因子を示す。

【図8A】ヒトUCP1遺伝子(NCBI参照配列:gi|237858805|ref|NG\_012139.1|ヒト(Homo sapiens)脱共役タンパク質1(ミトコンドリア、プロトン担体)(UCP1)、第4染色体上のRefSeqGene)の15,910塩基対(bp)配列における転写開始部位(5,001位)に関する様々な調節エレメントの位置を示す。

40

【図8B】第11染色体上の5,000 bp 5'UTRおよび2,000 bp 3'UTRを含むヒトUCP2遺伝子(ENSG00000175567)の15,174 bp配列における転写開始部位(5,001位)に関する様々な調節エレメントの位置を示す。

【図9】非標識の前脂肪細胞、またはDy547標識された非標的指向miRNA模倣物またはヘアピン阻害剤をトランスフェクトした前脂肪細胞における相対蛍光を示す棒グラフである。

【図10】図10Aは、トランスフェクションの4日後の、siRNA対照およびGAPDH siRNAをトラン

スフェクトした前脂肪細胞におけるGAPDH遺伝子発現の減少を示す棒グラフである。

図10Bは、トランスフェクションの12日後の、siRNA対照およびGAPDH siRNAをトラン

50

スフェクトした前脂肪細胞におけるGAPDH遺伝子発現の減少を示す棒グラフである。

エクトした前脂肪細胞におけるGAPDH遺伝子発現の減少を示す棒グラフである。

【図11】図11Aは、維持培地単独中で2週間培養して、オイルレッド0で染色した前脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図11Bは、インスリン、トリヨードチロニン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、およびロシグリタゾンの存在下で2日間培養し、その後維持培地中で12日間培養して、オイルレッド0で染色した前脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図11Cは、実験を通してインスリン、トリヨードチロニン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、およびロシグリタゾンの存在下で培養して、オイルレッド0で染色した前脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図11Dは、hsa-miR-30b模倣物の存在下で培養して、オイルレッド0で染色した前脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図11Eは、非標的指向miRNA模倣物の存在下で培養して、オイルレッド0で染色した前脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図11Fは、非標的指向miRNA阻害剤の存在下で培養して、オイルレッド0で染色した前脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。  
10

【図12A】ロシグリタゾンの存在下における熱発生標的のmRNA発現を示す棒グラフである。

【図12B】hsa-let-7a阻害剤の存在下における熱発生標的のmRNA発現を示す棒グラフである。

【図12C】hsa-miR-1模倣物の存在下における熱発生標的のmRNA発現を示す棒グラフである。

【図12D】hsa-miR-19b模倣物の存在下における熱発生標的のmRNA発現を示す棒グラフである。  
20

【図12E】hsa-miR-30b模倣物の存在下における熱発生標的のmRNA発現を示す棒グラフである。

【図12F】未処理の前脂肪細胞における熱発生標的のmRNA発現を示す棒グラフである。

【図13】x軸に平均遺伝子発現を示し、y軸に対数尺度での対間の差を示しているM-Aプロットである。

【図14】miRNA類似体hsa-let-7a阻害剤、hsa-miR-1模倣物、hsa-miR-19b模倣物、およびhsa-miR-30b模倣物の存在下で有意に上方制御される遺伝子の数が、それぞれ305個、247個、255個、および267個であったことを示すベン図を示す略図である。リストに記載されたmiRNA類似体によって、一組の127個の遺伝子が共通して上方制御された。  
30

【図15】miRNA類似体hsa-let-7a阻害剤、hsa-miR-1模倣物、hsa-miR-19b模倣物、およびhsa-miR-30b模倣物の存在下で有意に下方制御される遺伝子の数が、それぞれ143個、177個、115個、および165個であったことを示すベン図を示す略図である。リストに記載されたmiRNA類似体によって、一組の60個の遺伝子が共通して下方制御された。

【図16】非標識の脂肪細胞、またはDy547標識された非標的指向miRIDIAN模倣物またはヘアピン阻害剤をトランスフェクトした脂肪細胞における相対蛍光を示す棒グラフである。  
40

【図17】図17Aは、トランスフェクションの4日後の、siRNA対照およびGAPDH siRNAをトランスフェクトした細胞におけるGAPDH遺伝子発現の減少を示す棒グラフである。図17Bは、トランスフェクションの12日後の、siRNA対照およびGAPDH siRNAをトランスフェクトした細胞におけるGAPDH遺伝子発現の減少を示す棒グラフである。

【図18】図18Aは、維持培地単独中で2週間培養して、オイルレッド0で染色した成熟脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図18Bは、ロシグリタゾンの存在下で2週間培養して、オイルレッド0で染色した成熟脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図18Cは、非標的指向miRNAの存在下で培養して、オイルレッド0で染色した成熟脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。図18Dは、hsa-miR-30b模倣物の存在下で培養して、オイルレッド0で染色した成熟脂肪細胞の光学顕微鏡写真である。

【図19】様々なmiRNA類似体またはロシグリタゾンに曝露した成熟脂肪細胞における脂質の量（ナイルレッド蛍光色素）を示す棒グラフである。

【図20】様々なトランスフェクション剤に曝露した成熟脂肪細胞から抽出された全RNAの量を示す棒グラフである。  
50

【図21】様々なトランスフェクション剤を用いてGAPDH特異的miRNA模倣物をトランスフェクトした成熟脂肪細胞におけるGAPDH遺伝子発現の減少を示す棒グラフである。

【図22-1】維持培地単独（対照）、50 nM hsa-let-7a阻害剤、10 μM 3アドレナリン受容体アゴニストCL316,243、50 nM hsa-miR-1模倣物中で2週間培養した成熟脂肪細胞の明視野顕微鏡写真を示す。

【図22-2】10 nMの甲状腺ホルモンであるトリヨードチロニン、50 nM hsa-miR-19b模倣物、100 nMロシグリタゾン、または50 nM hsa-miR-30b模倣物中で2週間培養した成熟脂肪細胞の明視野顕微鏡写真を示す。

【図23】ヒト細胞の表面における特有の標的に対して特異的に指向されるアプタマーを単離するために用いられるCell-SELEX過程の模式図である。 10

【図24-1】選択された蛍光アプタマーのヒト肝細胞および脂肪細胞に対する結合を評価するFACS実験の結果を示す。

【図24-2】選択された蛍光アプタマーのヒト肝細胞および脂肪細胞に対する結合を評価するFACS実験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0056】

発明の詳細な説明

#### I. 定義

別段の規定がない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されている意味と同じ意味を有する。 20 矛盾する場合には、定義を含め、本出願が優先する。

【0057】

本明細書で用いられる場合、「miRNA剤」という用語は、熱発生制御因子（例えば、ミトコンドリア脱共役剤またはその活性化因子もしくは抑制因子）の活性を直接的または間接的に調節するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド模倣物を指す。miRNA剤は、標的遺伝子または標的miRNAに作用し得る。

【0058】

本明細書で用いられる場合、「miRNA」という用語は、標的遺伝子（mRNAまたはDNAのいずれか）に結合し、その遺伝子の発現を調節することができる一本鎖RNA分子（またはその合成誘導体）を指す。ある種の態様において、miRNAは生物において天然に発現される。 30

【0059】

本明細書で用いられる場合、「シード配列」という用語は、標的特異性の重要な決定基である、miRNAの5'末端における最初の8ヌクレオチド(nt)（すなわち、シード配列）内の6~8nt長部分列を指す。

【0060】

本明細書で用いられる場合、「アゴミア」という用語は、miRNAを機能的に模倣する合成のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド模倣物を指す。アゴミアは、miRNAまたはmiRNAの一部と同じまたは類似の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドであってよい。ある種の態様において、アゴミアは、それが模倣するmiRNAとの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドの違いを有する。さらに、アゴミアは、それが模倣するmiRNAと同じ長さ、それよりも長い長さ、またはそれよりも短い長さを有し得る。ある種の態様において、アゴミアは、それが模倣するmiRNAの5'末端における6~8ヌクレオチドと同じ配列を有する。他の態様において、アゴミアは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチド長であってよい。他の態様において、アゴミアは、5~10、6~8、10~20、10~15、または5~500ヌクレオチド長であってよい。ある種の態様において、アゴミアは、表1、11、13、および14に示される配列のいずれかを含む。これらの化学修飾された合成RNA二重鎖は、miRISC複合体への効率的な負荷を可能にするために、関心対象のmiRNAと同一であるかまた 40

は実質的に同一であるガイド鎖を含むのに対して、パッセンジャー鎖は、miRISC複合体中のアルゴノートタンパク質へのその負荷を妨げるように化学修飾される (Thorsen SB et al., Cancer J., 18(3):275-284 (2012) ; Broderick JA et al., Gene Ther., 18(12):1104-1110 (2011))。

#### 【0061】

本明細書で用いられる場合、「アンタゴミア」という用語は、特定のマイクロRNAに対する相補性を有し、かつそのmiRNAの活性を阻害する合成のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド模倣物を指す。ある種の態様において、アンタゴミアは、それが阻害するmiRNAとの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドの違いを有する。さらに、アンタゴミアは、それが阻害するmiRNAと同じ長さ、それよりも長い長さ、またはそれよりも短い長さを有し得る。ある種の態様において、アンタゴミアは、それが阻害するmiRNAの5'末端における6~8ヌクレオチドとハイブリダイズする。他の態様において、アンタゴミアは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチド長であってよい。他の態様において、アンタゴミアは、5~10、6~8、10~20、10~15、または5~500ヌクレオチド長であってよい。ある種の態様において、アンタゴミアは、表1、11、13、および14に示される配列のいずれかと相補的なヌクレオチドを含む。アンタゴミアは、特定のmiRNAに堅固に結合し、それを不活化する合成逆相補体である。ヌクレアーゼ耐性および結合親和性を改善するために、様々な化学修飾が用いられる。効力を高めるために最も一般的に用いられる修飾には、2'-O-Me、2'-O-メトキシエチル (2'-MOE)、または2'-フルオロ (2'-F) などの2'糖修飾が含まれる。miRNAの核酸構造はまた、核酸のA型高次構造においてリボースを3'-エンド (North) 高次構造に固定するための、2'酸素と4'炭素との間のメチレン架橋を有するロック核酸 (LNA) となるように修飾することもできる (Lennox KA et al.. Gene Ther. Dec 2011;18(12):1111-1120 ; Bader AG et al. Gene Ther. Dec 2011;18(12):1121-1126)。この修飾により、その分子の標的特異性およびハイブリダイゼーション特性の両方が顕著に向上升する。

#### 【0062】

本明細書で用いられる場合、「アプタミア」という用語は、アプタマー（特定の標的分子に結合するオリゴ核酸またはペプチド分子）と上記で定義したアゴミアまたはアンタゴミアの組み合わせを指し、これによってmiRNA剤の細胞または組織特異的送達が可能になる。

#### 【0063】

本明細書で用いられる場合、「干渉RNA」という用語は、RNA干渉を媒介することによって遺伝子発現を阻害または下方制御することができる任意の二本鎖または一本鎖RNA配列を指す。干渉RNAには、低分子干渉RNA（「siRNA」）および低分子ヘアピン型RNA（「shRNA」）が含まれるが、これらに限定されない。「RNA干渉」とは、配列適合性のメッセンジャーRNA転写物の選択的分解を指す。

#### 【0064】

本明細書で用いられる場合、「低分子干渉RNA」または「siRNA」という用語は、配列特異的様式でRNA干渉を媒介することにより遺伝子発現を阻害または下方制御することができる任意の低分子RNAを指す。低分子RNAは、例えば約16~21ヌクレオチド長であってよい。

#### 【0065】

本明細書で用いられる場合、「shRNA」（低分子ヘアピン型RNA）という用語は、アンチセンス領域、ループ部分、およびセンス領域を含むRNA分子であって、そのセンス領域が、二重鎖システムを形成するためにアンチセンス領域と塩基対合する相補的ヌクレオチドを有する、RNA分子を指す。転写後プロセシングの後、低分子ヘアピン型RNAは、RNase IIIファミリーのメンバーである酵素ダイサーによって媒介される切断事象により、低分子干渉RNA (siRNA) に変換される。

10

20

30

40

50

## 【0066】

本明細書で用いられる場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、DNAまたはmRNA配列（例えば、miRNA）と相補的な合成のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド模倣物を指す。

## 【0067】

本明細書で用いられる場合、「miR-マスク」という用語は、標的mRNA中のmiRNA結合部位と相補的であり、かつmRNA結合部位へのmiRNAの結合を阻害するのに役立つ一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。例えば、その全体が本明細書に組み入れられる、Xiao, et al. 「Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4,」 Journal of Cellular Physiology, vol. 212, no. 2, pp. 285-292, 2007を参照されたい。  
10

## 【0068】

本明細書で用いられる場合、「miRNAスポンジ」という用語は、関心対象のmiRNAに対する複数のタンデム結合部位を含み、かつ関心対象の内因性miRNAを滴定除去し、それによって関心対象のmiRNAのその内因性標的への結合を阻害するのに役立つ合成核酸（例えば、mRNA転写物）を指す。例えば、その全体が本明細書に組み入れられる、Ebert et al., 「MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells,」 Nature Methods, vol. 4, no. 9, pp. 721-726, 2007を参照されたい。

## 【0069】

本明細書で用いられる場合、「呼吸鎖脱共役」という用語は、ミトコンドリア内膜のプロトン勾配の消散を指し、これによって酸化的リン酸化によるミトコンドリアにおけるATPの合成が妨げられる。  
20

## 【0070】

本明細書で用いられる場合、「ミトコンドリア脱共役剤」という用語は、ミトコンドリア内膜のプロトン勾配を消散させることができるタンパク質（またはコード核酸）を指し、これによって酸化的リン酸化によるミトコンドリアにおけるATPの合成が妨げられる。例示的なミトコンドリア脱共役剤には、UCP1およびUCP2が含まれる。

## 【0071】

本明細書で用いられる場合、ミトコンドリア脱共役剤の「活性化因子」または「抑制因子」という用語は、ミトコンドリア脱共役剤の活性をそれぞれ上方制御または下方制御するのに役立つタンパク質を指す。  
30

## 【0072】

本明細書で用いられる場合、「熱発生制御因子」という用語は、熱発生を直接的または間接的に調節するタンパク質（またはコード核酸）を指す。本用語は、ミトコンドリア脱共役剤、ならびにまたミトコンドリア脱共役剤の活性化因子および抑制因子を包含する。例示的な熱発生制御因子は、本明細書の表2に記載される。

## 【0073】

本明細書で用いられる場合、「調節する」という用語は、あるパラメータを増加または減少させることを指す。例えば、あるタンパク質の活性を調節するために、そのタンパク質の活性を増加または減少させることができる。  
40

## 【0074】

本明細書で用いられる場合、ミトコンドリア脱共役剤または熱発生制御因子の「活性」という用語は、非限定的に、mRNA発現、タンパク質発現、または呼吸鎖脱共役を含む、任意の測定可能な生物活性を指す。

## 【0075】

miRNA剤組成物の「有効量」とは、ヒトにおいて障害を治療もしくは予防する上で効果的であるために、または生理的状態を調節するために十分な量である。ある種の態様において、この生理的状態は肥満である。

## 【0076】

10

20

30

40

50

「対象」とは、ヒト、飼育動物および家畜、動物園の動物、運動動物、または愛玩動物、例えば、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、および高等靈長類などを含む、哺乳綱の任意のメンバーを含む脊椎動物である。

#### 【0077】

「哺乳動物」という用語は、齧歯類、靈長類、イヌ、ネコ、ラクダ類、および有蹄動物を含む、哺乳綱のメンバーである任意の種を指す。「齧歯類」という用語は、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、およびウサギを含む、齧歯目のメンバーである任意の種を指す。「靈長類」という用語は、サル、類人猿、およびヒトを含む、靈長目のメンバーである任意の種を指す。「ラクダ類」という用語は、ラクダおよびラマを含む、ラクダ科のメンバーである任意の種を指す。「有蹄動物」という用語は、ウシ、ウマ、およびラクダ類を含む、有蹄上目のメンバーである任意の種を指す。いくつかの態様によれば、哺乳動物はヒトである。10

#### 【0078】

本明細書で用いられる「治療」または「治療すること」とは、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患に対する素因を治癒させる、治す、軽減する、緩和する、変化させる、改善する、回復させる、好転させる、またはそれらに作用することを目的とした、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害に対する素因を有する患者への治療薬（例えば、miRNA剤またはそれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）の適用もしくは投与、またはそのような患者由来の単離された組織もしくは細胞株への治療薬の適用もしくは投与と定義される。20

#### 【0079】

本明細書で用いられる場合の「薬理ゲノミクス」とは、臨床開発中および市販の薬物に対する、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および遺伝子発現解析などのゲノミクス技術の適用を指す。より具体的には、本用語は、患者の遺伝子が、薬物に対するその患者の反応をどのように決定するかに関する研究を指す（例えば、患者の「薬物反応表現型」または「薬物反応遺伝子型」）。20

#### 【0080】

miRNA剤組成物の「有効量」とは、ヒトにおいて障害を治療もしくは予防する上で効果的であるために、または生理的状態を調節するために十分な量である。

#### 【0081】

### II. 熱発生および肥満

ある種の態様において、本発明は、熱発生を調節する方法を提供する。これらの方針は概して、細胞または組織を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤（例えば、UCP1および/またはUCP2）の活性を調節するmiRNA剤と接触させる段階を含む。このような方法および組成物は、肥満の治療に特に有用である。30

#### 【0082】

哺乳動物の脂肪細胞は、それらの機能プロファイルに基づいて2つの主要なカテゴリーに分類され得る：1) エネルギー貯蔵および放出性の、脂質で満たされた白色脂肪細胞 (WAT)、ならびに；2) エネルギー消費性かつ熱産生性の、ミトコンドリアリッチな褐色脂肪細胞 (BAT)。最近まで、BATは幼児期早期に急速に退縮し、成人では痕跡量のみが残っていると考えられていた。しかしながら、トレーサー18F-フルオロデオキシグルコース (18F-FDG) を用いてヒトで行われたポジトロン放出断層撮影 (PET) 研究により、1) BATの複数の貯蔵所が、成人対象の頸部、鎖骨上部、腋窩部、および傍脊椎部になお存在していること；2) 成人におけるBATが、低温への曝露により迅速に活性化され得ること；3) BATの活性と、年齢、肥満度指数 (BMI)、体脂肪率、空腹時血糖値、遮断薬の使用、および戸外温度との間に逆相関があること；ならびに4) BATの増殖が、カテコールアミン産生褐色細胞腫に付随する体重減少を駆動し得るのに対して、受容体機能の低下を招く3アドレナリン受容体多型が、体重増加および2型糖尿病の早期発症と関連していることが実証された。40

#### 【0083】

WATおよびBATは間葉系幹細胞に由来するが、それらは異なる系譜を有し、Myf5（筋原性制御因子5）（筋骨格細胞前駆体と共有される）、PGC-1、およびPRDM16（PRドメイン含有16）の発現が、褐色脂肪細胞前駆体と白色脂肪細胞前駆体とを区別する。古典的な褐色脂肪細胞に加えて、WATが優勢である組織において、異なる種類の褐色脂肪細胞が誘導され得る。「ブライト(brite)」（白色中の褐色）脂肪細胞という用語が作り出され、WAT貯蔵所内の褐色様脂肪細胞の出現は、代謝表現型の改善と関連がある。BATの量および/または活性を増加させることで、肥満からのある程度の防御がもたらされる。BATによる熱产生は、他のすべての組織では1 W/gであるのに対して300 W/gである。わずか50 gほどのBATが1日のエネルギー消費量の20%を占めるため、エネルギーバランスに大きな影響を与えるためには、比較的限られた量のBATが必要である。対象1人の鎖骨上/傍頸部貯蔵所に見出される推定63 gのBATは、1年間で4.1 kgのWATに相当するエネルギーを燃焼し得ると推測された。

10

## 【0084】

ミトコンドリア脱共役タンパク質(UCP)は、ミトコンドリア陰イオン担体タンパク質(MACP)のファミリーのメンバーである。UCPはATP合成から酸化的リン酸化を切り離し、エネルギーを熱として消散させる（「ミトコンドリアプロトン漏出」とも称される）。UCPは、ミトコンドリ膜の内側から外側への陰イオンの移動、およびミトコンドリア膜の外膜から内側へのプロトンの還流移動を促進し、その過程で熱が生じる。UCPは、熱発生および熱消散を担う主要なタンパク質である。脱共役タンパク質1(UCP1)はサーモゲニンとも称され、熱発生および熱消散を担うBAT特異的タンパク質である。UCP2は、やはり脂肪細胞で発現される別の脱共役タンパク質である。UCPは、熱発生制御因子タンパク質のネットワークの一部である（図1を参照されたい）。例示的な熱発生制御因子は表2に記載される。

20

## 【0085】

BATの分化および/またはミトコンドリア脱共役タンパク質を誘導するための熱発生制御因子の調節は、対象において熱產生を誘導し、ひいては肥満を治療する方法を提供する。しかしながら、これらの分子は、伝統的な創薬の「創薬標的となり得る領域」を占める古典的な「標的クラス」（キナーゼ、イオンチャネル、Gタンパク質共役受容体など）に属さないため、化学薬理学的アプローチはこれらの分子を標的化することができない。したがって、本発明は、miRNA剤を用いて、これらの熱產生制御因子を調節するための新規な方法および組成物を提供する。

30

## 【0086】

ある種の態様において、miRNA剤は、ミトコンドリア脱共役剤の活性（例えば、mRNA発現レベル、タンパク質発現レベル、またはミトコンドリア脱共役活性）を上方制御するために使用される。ミトコンドリア脱共役剤の上方制御は、いくつかの方法で達成することができる。1つの態様において、miRNA剤は、ミトコンドリア脱共役剤の活性（例えば、mRNA発現レベル、タンパク質発現レベル）の下方制御を担う天然のmiRNAの活性を直接阻害する。別の態様において、miRNA剤は、ミトコンドリア脱共役剤の活性化因子の活性（例えば、mRNA発現レベルまたはタンパク質発現レベル）を上方制御する。この上方制御は、例えば、活性化因子の発現の下方制御を担う天然のmiRNAの活性を直接阻害することによって達成することができる。さらに別の態様において、miRNA剤は、ミトコンドリア脱共役剤の抑制因子の活性（例えば、mRNA発現レベルまたはタンパク質発現レベル）を下方制御する。この下方制御は、例えば、miRNA剤を用いて、ミトコンドリア脱共役剤の抑制因子の発現を直接阻害することによって達成することができる。

40

## 【0087】

ある種の態様では、複数の熱発生制御因子の活性を同時に調節することができるmiRNA剤が使用される（ユニバーサルmiRNA剤とは対照的に経路特異的miRNA剤）。例えば、複数の熱発生制御因子に結合する単一のmiRNA、アゴミア、またはアンタゴミアを用いることができる。このアプローチは、これによって、単一のmiRNA剤を用いて全シグナル伝達経路の複数のメンバーの調節が可能になるという点で、特に有益である。

50

## 【0088】

ある種の態様では、複数の阻害性miRNA剤（例えば、アンタゴミアまたはmiR-マスク）が使用される。これらの阻害性miRNA剤は、同じまたは異なるmiRNA標的を有し得る。

## 【0089】

## III. miRNA剤

ある種の態様において、本発明は、熱発生制御因子（例えば、UCP1および／またはUCP2などのミトコンドリア脱共役剤）の調節のためにmiRNA剤を使用する。本明細書に開示される方法において使用するのに適したmiRNA剤には、非限定的に、miRNA、アゴミア、アンタゴミア、miR-マスク、miRNA-スポンジ、siRNA（一本鎖または二本鎖）、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、または標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズし、その機能を調節するその他のオリゴヌクレオチド模倣物が含まれる。10

## 【0090】

ある種の態様において、miRNA剤はmiRNA分子またはその合成誘導体（例えば、アゴミア）である。1つの特定の態様において、miRNA剤はmiRNAである。miRNAは、哺乳動物を含む種々の生物に存在し、進化において保存されている低分子（例えば、18~24ヌクレオチド）非コードRNAのクラスである。miRNAは、RNase III酵素ドローシャおよびダイサーによる連続的切断により、一次転写物に由来する約70ヌクレオチドのヘアピン型前駆体からプロセシングされる。多くのmiRNAは、プレmRNAのイントロン内またはncRNA遺伝子内に受け入れられる遺伝子間領域においてコードされ得る。多くのmiRNAはまた、クラスター化され、ポリリストロンとして転写される傾向があり、類似した時空間的発現パターンを有する場合が多い。一般的に、miRNAは、標的遺伝子（mRNAまたはDNA）上の相補的配列に結合し、例えば翻訳抑制または標的分解によって遺伝子サイレンシングをもたらす転写後制御因子である。1つのmiRNAが、多くの異なる遺伝子を同時に標的化し得る。開示される方法において使用するための例示的なmiRNA分子には、非限定的に、20

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, hsa-miR-7a-g, hsa-miR-105, hsa-miR-1283, hsa-mir-129,  
 hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-miR-19a-b, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-miR-3658, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, hsa-mir-99a30

が含まれる。他の態様において、開示される方法において使用するための例示的なmiRNA分子には、本明細書の表1、11、13、および14に開示されているmiRNAが含まれる。1つの特定の態様において、miRNA剤は、ヒトmiR-22またはその機能的誘導体である。40

## 【0091】

別の特定の態様において、miRNA剤はアゴミアである。特定のmiRNAのアゴミアは、本明細書に開示されるスクリーニング方法を用いて同定することができる。1つの特定の態様において、アゴミアは、ヒトmiR-22の機能的模倣物である (Davidson BL et al., Nat. Rev. Genet., 12(5):329-340 (2011)).

## 【0092】

10

20

30

40

50

ある種の態様において、miRNA剤は、1つまたは複数のmiRNAの活性を阻害するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド模倣物である。このような分子の例には、非限定的に、アンタゴミア、干渉RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイザイム、miRNAスponジ、およびmiR-マスクが含まれる。1つの特定の態様において、miRNA剤はアンタゴミアである。一般的に、アンタゴミアは、標的miRNAに結合し、該miRNAのその同族遺伝子標的への結合を妨げることによってmiRNA機能を阻害する、化学修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンタゴミアは、当技術分野で公知の任意の塩基修飾を含み得る。1つの特定の態様において、アンタゴミアはヒトmiR-22の活性を阻害する (van Rooij E et al., Circ. Res., 110(3):496-507 (2012) ; Snead NM et al., Nucleic Acid Ther., 22(3):139-146 (2012) ; Czech MP et al., Nat. Rev. Endocrinol., 7(8):473-484 (2011))。

10

## 【0093】

ある種の態様において、miRNA剤は10~50ヌクレオチド長である。当業者は、これが、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50ヌクレオチド長、またはその中の任意の範囲のアンチセンス部分を有するオリゴヌクレオチドを具体化することを認識するであろう。

## 【0094】

ある種の態様において、miRNA剤は、それぞれが少なくとも1つのヌクレオチドで構成されている、2つ以上の化学的に別個の領域を含むキメラオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは典型的に、1つまたは複数の有益な特性（例えば、ヌクレアーゼ耐性の増加、細胞内への取り込みの増加、標的に対する結合親和性の増加など）を付与する修飾ヌクレオチドの少なくとも1つの領域、およびRNA:DNAハイブリッドまたはRNA:RNAハイブリッドを切斷し得る酵素の基質である領域を含む。本発明のキメラ阻害性核酸は、上記の2つ以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、および／またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成され得る。このような化合物はまた、当技術分野においてハイブリッドまたはギャップマー(gapmer)と称されている。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、それぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,013,830号；第5,149,797号；第5,220,007号；第5,256,775号；第5,366,878号；第5,403,711号；第5,491,133号；第5,565,350号；第5,623,065号；第5,652,355号；第5,652,356号；および第5,700,922号が含まれるが、これらに限定されない。

20

## 【0095】

ある種の態様において、miRNA剤は、糖の2'位で修飾された少なくとも1つヌクレオチド、最も好ましくは2'-O-アルキル、2'-O-アルキル-O-アルキル、または2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。他の好ましい態様において、RNA修飾には、ピリミジン、塩基性残基、またはRNAの3'末端の逆位塩基のリボース上の2'-フルオロ、2'-アミノ、および2'-O-メチル修飾が含まれる。そのような修飾は、通常通りにオリゴヌクレオチドに組み込まれ、これらのオリゴヌクレオチドは、所与の標的に対して2'-デオキシリゴヌクレオチドよりも高いTm（すなわち、より高い標的結合親和性）を有することが示されている。

30

## 【0096】

多くのヌクレオチドおよびヌクレオシド修飾により、オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼ消化に対してより耐性となり、それによってインビボ半減期が延びることが示されている。修飾オリゴヌクレオチドの具体例には、例えば、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間結合、または短鎖ヘテロ原子もしくは複素環糖間結合を含む骨格を含むものが含まれる。最も好ましいのは、ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチド、ならびにヘテロ原子骨格、特にCH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>（メチレン（メチルイミノ）またはMMI骨格として知られる）、CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>、およびO-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>骨格、ここで天然のホスホジエステル骨格はO-P-O-CHと表される；アミド骨格（De Mesmaeker et

40

50

al. *Acc. Chem. Res.* 1995, 28:366-374を参照されたい) ; モルホリノ骨格構造 (Summer-ton and Weller、米国特許第5,034,506号を参照されたい) ; ペプチド核酸 (PNA) 骨格 (この場合、オリゴヌクレオチドのホスホジエステル骨格がポリアミド骨格で置換され、又クレオチドがポリアミド骨格のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している、Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497を参照されたい) を有するオリゴヌクレオチドであり、これらの文献はそれぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられる。リン含有結合には、通常の3'-5'結合を有するホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルホスホネートおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、およびボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、ならびにヌクレオシド単位の隣接対が3'-5'から5'-3'にまたは2'-5'から5'-2'に結合した逆の極性を有するものが含まれるが、これらに限定されない；それぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,687,808号；第4,469,863号；第4,476,301号；第5,023,243号；第5,177,196号；第5,188,897号；第5,264,423号；第5,276,019号；第5,278,302号；第5,286,717号；第5,321,131号；第5,399,676号；第5,405,939号；第5,453,496号；第5,455,233号；第5,466,677号；第5,476,925号；第5,519,126号；第5,536,821号；第5,541,306号；第5,550,111号；第5,563,253号；第5,571,799号；第5,587,361号；および第5,625,050号を参照されたい。モルホリノベースのオリゴマー化合物は、Dwaine A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510) ; *Genesis*, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596；および1991年7月23日に発行された米国特許第5,034,506号に記載されており、これらはそれぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられる。シクロヘキセニル核酸オリゴヌクレオチド模倣物は、Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 8595-8602に記載されており、その内容は全体として本明細書に組み入れられる。

#### 【0097】

その中にリン原子を含まない修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間結合によって形成された骨格を有する。これらには、モルホリノ結合を有するもの（一部はヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシド、およびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドロジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合N、O、S、およびCH<sub>2</sub>成分部分を有するその他のものが含まれる；それぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,034,506号；第5,166,315号；第5,185,444号；第5,214,134号；第5,216,141号；第5,235,033号；第5,264,562号；第5,264,564号；第5,405,938号；第5,434,257号；第5,466,677号；第5,470,967号；第5,489,677号；第5,541,307号；第5,561,225号；第5,596,086号；第5,602,240号；第5,610,289号；第5,602,240号；第5,608,046号；第5,610,289号；第5,618,704号；第5,623,070号；第5,663,312号；第5,633,360号；第5,677,437号；および第5,677,439号を参照されたい。

#### 【0098】

ある種の態様において、miRNA剤は、1つまたは複数の置換された糖部分、例えば、2'位に以下：OH、SH、SCH<sub>3</sub>、F、OCN、OCH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、もしくはO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、式中、nは1～約10である；Cl～ClO低級アルキル、アルコキシアルコキシ、置換低級アルキル、アルカリル、もしくはアラルキル；Cl；Br；CN；CF<sub>3</sub>；OCF<sub>3</sub>；O-、S-

10

20

30

40

50

、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；SOCH<sub>3</sub>；SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>；ONO<sub>2</sub>；NO<sub>2</sub>；N<sub>3</sub>；NH<sub>2</sub>；ヘテロシクロアルキル；ヘテロシクロアルカリル；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノ；置換シリル；RNA切断基；レポーター基；インターラーティー；オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基；またはオリゴヌクレオチドの薬物動態／薬力学特性を改善するための基、および同様の特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。好ましい修飾には、2'-メトキシエトキシ [2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、2'-O-(2-メトキシエチル)としても知られる] が含まれる (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486)。その他の好ましい修飾には、2'-メトキシ (2'-O-CH<sub>3</sub>)、2'-プロポキシ (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、および2'-フルオロ (2'-F) が含まれる。同様の修飾はまた、オリゴヌクレオチドの他の位置、特に3'末端ヌクレオチドの糖の3'位および5'末端ヌクレオチドの5'位でも作製され得る。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシリル基の代わりにシクロブチルなどの糖模倣物を有してもよい。

10

## 【0099】

ある種の態様において、miRNA剤は、1つまたは複数の塩基修飾および／または置換を含む。本明細書で用いられる場合、「未修飾」または「天然」塩基には、アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C)、およびウラシル (U) が含まれる。修飾塩基には、非限定的に、天然核酸において稀にまたは一時的にしか見られない塩基、例えば、ヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン、特に、5-メチルシトシン (5-メチル-2'-デオキシシトシンとも称され、当技術分野においては5-Me-Cと称される場合が多い)、5-ヒドロキシメチルシトシン (HMC)、グリコシリルHMCおよびゲントビオシリルHMC、ならびに合成塩基、例えば、2-アミノアデニン、2-(メチルアミノ)アデニン、2-(イミダゾリルアルキル)アデニン、2-(アミノアルキルアミノ)アデニンまたは他のヘテロ置換アルキルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N6(6-アミノヘキシリル)アデニン、および2,6-ジアミノプリンが含まれる。Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75-77 ; Gebeyehu, G., et al. Nucl. Acids Res. 1987, 15:4513)。当技術分野において公知の「ユニバーサル」塩基、例えばイノシンもまた含まれ得る。5-Me-C置換もまた含まれ得る。これらは、核酸酸二重鎖の安定性を0.6~1.2だけ増加させることができて示されている (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。さらなる適切な修飾塩基は、米国特許第3,687,808号、ならびに第4,845,205号；第5,130,302号；第5,134,066号；第5,175,273号；第5,367,066号；第5,432,272号；第5,457,187号；第5,459,255号；第5,484,908号；第5,502,177号；第5,525,711号；第5,552,540号；第5,587,469号；第5,596,091号；第5,614,617号；第5,750,692号；および第5,681,941に記載されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

20

## 【0100】

所与のオリゴヌクレオチドにおけるすべての位置が一様に修飾される必要はなく、実際、前述の修飾のうちの2つ以上が単一のオリゴヌクレオチド中に、またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシド中にさえ組み込まれ得る。

30

## 【0101】

ある種の態様では、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合、すなわち骨格の両方が新たな基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのこのようなオリゴマー化合物、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸 (PNA) と称される。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、例えばアミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子と直接的または間接的に結合している。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；および第5,719,262号が含まれるが、これらに限定されない。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500において

40

50

見出すことができる。

#### 【0102】

ある種の態様において、miRNA剤は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強する1つまたは複数の部分または複合物に連結される（共有結合的または非共有結合的）。このような部分には、非限定的に、コレステロール部分（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556）、コレル酸（Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060）、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309；Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基（Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330；Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54）、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスノネット（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654；Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Mancharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973）、またはアダマンタン酢酸（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654）、パルミチル部分（Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-tオキシコレステロール部分（Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937）などの脂質部分が含まれ、これらの文献はそれが全体として参照により本明細書に組み入れられる。それが全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,828,979号；第4,948,882号；第5,218,105号；第5,525,465号；第5,541,313号；第5,545,730号；第5,552,538号；第5,578,717号、第5,580,731号；第5,580,731号；第5,591,584号；第5,109,124号；第5,118,802号；第5,138,045号；第5,414,077号；第5,486,603号；第5,512,439号；第5,578,718号；第5,608,046号；第4,587,044号；第4,605,735号；第4,667,025号；第4,762,779号；第4,789,737号；第4,824,941号；第4,835,263号；第4,876,335号；第4,904,582号；第4,958,013号；第5,082,830号；第5,112,963号；第5,214,136号；第5,082,830号；第5,112,963号；第5,214,136号；第5,245,022号；第5,254,469号；第5,258,506号；第5,262,536号；第5,272,250号；第5,292,873号；第5,317,098号；第5,371,241号、第5,391,723号；第5,416,203、第5,451,463号；第5,510,475号；第5,512,667号；第5,514,785号；第5,565,552号；第5,567,810号；第5,574,142号；第5,585,481号；第5,587,371号；第5,595,726号；第5,597,696号；第5,599,923号；第5,599,928号、および第5,688,941号もまた参照されたい。

#### 【0103】

1つの特定の態様において、miRNA剤は核酸アプタマーに連結される（共有結合的または非共有結合的）。アプタマーとは、特定の標的分子に結合する合成オリゴヌクレオチドまたはペプチド分子である。本明細書において提供されるmiRNA剤との使用に適したアプタマーは、8/31/2012に出願され、全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国仮特許出願第61/695,477号に記載されている。

#### 【0104】

したがって、第1の局面において、本発明は、I) ヒトにおける脂肪標的細胞上の細胞表面マーカーに選択的に結合する標的指向部分と、II) 熱発生miRNA調節剤部分とを含む脂肪細胞特異的miRNA調節剤組成物を提供し、この場合、該標的指向部分によって、標的細胞によるmiRNA調節部分の取り込みが促進され、miRNAが標的細胞において熱発生経路を標的化し、熱発生を上方制御できるようになる。

#### 【0105】

1つの態様において、該組成物は、標的指向部分としてアプタマーを含むアプタミアを含む。

#### 【0106】

10

20

30

40

50

ある種の態様において、本明細書に開示されるmiRNAと共に用いられるアプタマーは、脂肪組織間葉系幹細胞(ATMSC)、白色脂肪組織(WAT)脂肪細胞、および褐色脂肪組織(BAT)脂肪細胞上の細胞表面マーカータンパク質に特異的に結合する。ATMSCの細胞表面マーカーには、CD9、CD10、CD13、CD29、CD36、CD44、CD49d、CD54、CD55、CD59、CD73、CD90、CD91、CD105、CD137、CD146、CD166、およびHLA-ABCが含まれる。WAT脂肪細胞の細胞表面マーカーには、アディポネクチン、カベオリン1、カベオリン2、CD36(FAT)、CLH-22(クラスリン重鎖Chr 22)、FABP4(脂肪細胞タンパク質2、aP2)、SLC27A1(FATP1)、SLC27A2(FATP2)、GLUT4(グルコース輸送体4)、ペリリピン2、またはレジスチンが含まれる。すべての脂肪細胞の細胞表面マーカーには、ネブリライシン(CD10)、FAT(CD36)、Thy-1(CD90)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1(LRP1またはCD91)、カベオリン1、カベオリン2、脂肪酸結合タンパク質4(FABP4)、細胞表面糖タンパク質MUC18(CD146)、活性化白血球細胞接着分子(CD166)、およびナトリウム利尿ペプチド受容体A(NPR1)が含まれる。他の態様によれば、本明細書に開示されるmiRNAと共に使用するためのアプタマーはまた、アディポネクチン、レブチン、レジスチン、FGF 17、FGF 19、BMP7、PYY、MetAP2、RBP4、エンドスタチン、およびアンジオスタチンを含む、脂肪組織のマーカーに特異的に結合し得る。

10

## 【0107】

ある種の態様において、アプタマーは、生細胞全体を標的として使用するCell-SELEX技術によって選択され、この技術により、増幅および生細胞への結合の繰り返しによって、無傷細胞の表面上の自然環境において天然高次構造にある特定分子を認識するアプタマーが選択される。この細胞ベースの選択では、特定の細胞表面分子または未知の膜受容体でさえも、それらの天然環境において直接標的化することができ、細胞特異的アプタマーの直接的な濃縮が可能になる。

20

## 【0108】

ある種の例示的な態様において、miRNA調節剤は、「アプタミア」組成物を作製するためにアプタマーと結合される。アプタマーとmiRNA類似体を結合してアプタミアを作製するための多くの異なる方法が存在する。それらには、例えば、アプタマー-miRNA類似体キメラ、アプタマー-スプライススイッチオリゴヌクレオチドキメラ、およびmiRNA類似体を含むナノ粒子またはリポソームに複合化されたアプタマーが含まれる。それぞれが多くのmiRNA類似体を保有し得る機能的ポリマー、リポソーム、およびナノ粒子の表面に、「エスコートアプタマー(Escort Aptamer)」を挿入することができる。例えば、チオアプタマー複合化リポソームのサイズは約120 nmである。ナノ粒子アプローチは、例えば、細胞取り込み、膜を通過する能力、およびナノ粒子分解の誘発を含むいくつかの機能利点を有する。

30

## 【0109】

1つの態様において、アプタミア組成物は、miRNA調節剤に直接連結または融合されたアプタマーを含む。このようなアプタミアは完全に化学合成され、これによって複合物の組成のさらなる制御が提供される。例えば、化学量論(アプタマー当たりのmiRNA類似体の割合)および付着部位が正確に規定され得る。複合物の結合部分は、アプタマーとmiRNA類似体の反応付着部分として役立つ、複数(2つ以上)の求核および/または求電子部分を示す。加えて、アプタミアは、アプタマーとmiRNA類似体との間にリンカーをさらに含み得る。いくつかの態様において、リンカーは、ポリアルキレンゲリコール、特にポリエチレンゲリコールである。他の態様において、リンカーは、リポソーム、エキソソーム、デンドリマー、または櫛形ポリマーである。ビオチンストレプトアビジン架橋またはリボ核酸を含む他のリンカーも、アプタマーとmiRNA類似体との間の複合化を媒介し得る。例示的な非共有結合リンカーには、miRNA部分の一本鎖部分またはオーバーハングと、アプタマー部分の相補的な一本鎖部分またはオーバーハングとの塩基対合によって形成されるリンカーが含まれる。

40

## 【0110】

別の特定の態様において、アプタマーは、リポソームベースのアプタミアの形態でmiRN

50

A類似体と結合される。リポソームは、miRNAなどの医薬品を負荷することができる、脂質二重層で作られた球状ナノ構造である。さらに、リポソーム表面において、ポリエチレンギリコール（それらの全身半減期を延ばす）、または標的化細胞への特異的結合のためのアブタマーのような分子認識部分などの、異なる物質を負荷することもできる。例えば、アブタマーで修飾されたリポソームが開発されており、各リポソームは、標的結合を促進するためにその表面に繋留されたおよそ250個のアブタマーを提示する。好みしい態様において、リポソームは、miRNA類似体を封入し、かつ脂肪細胞およびATMSCの表面において高度に発現される分子（例えば、脂質輸送体）に高い親和性および特異性で特異的に結合するアブタマーをそれらの表面において提示するように作製される。リポソームと標的化細胞の融合により、miRNA類似体の細胞質中への放出が起り、これによって次に特定の細胞内経路が変化する。あるいは、標的化ATMSCおよび脂肪細胞へのリポソームmiRNA類似体負荷物の送達を導くために、安定したチオアブタマーをリポソームの表面において挿入することもできる。

10

#### 【0111】

さらなる特定の態様において、アブタマーは、担体ベースのアブタミアの形態でmiRNA類似体と結合される。例示的な担体には、ナノ粒子、リポソーム、またはエキソソームが含まれる。そのような担体ベースのアブタミア組成物は、単一の担体で、複数のmiRNA調節剤の積荷を標的細胞に送達する能力を有する。標的指向および蓄積を達成するために、担体はそれらの外部表面上に標的指向部分を提示するように製剤化され、そして担体は、脂肪標的細胞上の選択された細胞表面抗原または受容体と反応／結合することができるようになる。一例として、担体は、脂肪細胞およびATMSCの表面において高度に発現される分子（例えば、脂質輸送体）に高い親和性および特異性で特異的に結合するアブタマーをそれらの表面において提示しつつ、miRNA調節剤を封入するように作製することができる。内部移行したエキソソームは、細胞質内でmiRNA類似体負荷物を放出し、これによって特定の細胞内経路が変化する。

20

#### 【0112】

1つの態様において、担体はエキソソームである。後期エンドソームに由来するエキソソームは、タンパク質、mRNA、またはmiRNAが特異的に負荷される天然のナノ粒子であり、細胞によって内因的に分泌される。エキソソームは、宿主細胞によって放出され、細胞毒性はなく、それらの組成およびエキソソーム内／上の物質に基づいて特定の細胞に情報を伝達し得る。エキソソームは直径およそ20～100 nmの粒子であるため、エキソソームは単核食細胞系(> 100 nmのサイズの循環粒子を排除する)による排除を回避し、標的組織に非常に効率的に送達される。

30

#### 【0113】

さらに、合成エキソソームは、他の担体に勝るいくつかの利点をもたらし得る。例えば、エキソソームは、それらが不活性であることで細胞外環境において攻撃および排除を回避しつつ、それらの積荷をサイトゾル中に直接送達することができる。エキソソームの構造成分は、数ある中でも、シグナル伝達、膜輸送、抗原提示、標的指向／接着のような過程を担う小分子を含み得る。

40

#### 【0114】

miRNA剤は、所望の効果をもたらすために、標的mRNAと十分に相補的でなければならない、すなわち十分な特異性で十分に良好にハイブリダイズしなければならない。「相補的」とは、天然または非天然の塩基またはその類似体を含む2つの配列間の、水素結合を介した対合の能力を指す。例えば、miRNA剤のある位置の塩基が、標的核酸配列の対応する位置の塩基と水素結合することができる場合、それらの塩基はその位置で互いに相補的であると見なされる。ある種の態様において、100%の相補性は必要ではない。他の態様においては、100%の相補性が必要である。

#### 【0115】

本明細書に開示される方法において使用するためのmiRNA剤は、通常の方法を用いて設計することができる。ある種の例示的な標的核酸配列およびmiRNA剤の特定の配列を本明

50

細書において記載するが、当業者は、これらが本発明の範囲内にある特定の態様を説明し記載するのに役立つことを認識するであろう。付加的な標的セグメントは、本開示を考慮して、当業者により容易に同定可能である。シード配列内にあるかまたはそれに直接隣接する少なくとも5個(5)の連続したヌクレオチドのひと続きを含む、5、6、7、8、9、10ヌクレオチド長、またはそれ以上の標的セグメントが、遺伝子を標的化するのに適していると考えられる。いくつかの態様において、標的セグメントは、シード配列の1つの5'末端からの少なくとも5個の連続したヌクレオチドを含む配列を含み得る(残りのヌクレオチドは、シード配列の5'末端のすぐ上流から始まり、miRNA剤が約5~約30ヌクレオチドを含むまで続く、同じRNAの連続したひと続きである)。いくつかの態様において、標的セグメントは、シード配列の1つの3'末端からの少なくとも5個の連続したヌクレオチドを含むRNA配列によって表される(残りのヌクレオチドは、標的セグメントの3'末端のすぐ下流から始まり、miRNA剤が約5~約30ヌクレオチドを含むまで続く、同じmiRNAの連続したひと続きである)。本明細書において提供される配列を有する当業者は、過度の実験を行うことなく、miRNA剤を用いて標的化するためのさらなる好ましい領域を同定することができるであろう。1つまたは複数の標的領域、セグメント、または部位が同定されたならば、所望の効果をもたらすために、標的と十分に相補的である、すなわち十分な特異性で(すなわち、他の非標的核酸配列に実質的に結合しない)十分に良好にハイブリダイズする阻害核酸化合物が選択される。

10

#### 【0116】

ある種の態様において、本発明を実施するために用いられるmiRNA剤は、組換えベクターから発現される。適切な組換えベクターには、非限定的に、DNAプラスミド、ウイルスベクター、またはDNAミニサークルが含まれる。ベクター構築物の作製は、非限定的に、例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (1989)、Coffin et al. (Retroviruses. (1997)、および「RNA Viruses: A Practical Approach」(Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000))に記載されているような、PCR、オリゴヌクレオチド合成、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製、およびDNA配列決定の標準的技法を含む、当技術分野で周知の任意の適切な遺伝子操作技法を用いて達成され得る。当業者に明らかであるように、種々の適切なベクターが、本発明の核酸を細胞に導入するのに利用可能である。核酸を送達するのに適したベクターの選択、および選択された発現ベクターを細胞に挿入するための条件の最適化は、過度の実験を必要とせずに、当業者の技術の範囲内である。ウイルスベクターは、パッケージング細胞において組換えウイルスの產生のための配列を有するヌクレオチド配列を含む。本発明の核酸を発現するウイルスベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、またはアルファウイルスを含むがこれらに限定されないウイルス骨格に基づいて構築することができる。組換えベクターは、本明細書に記載されるように送達することができ、標的細胞中に存続する(例えば、安定した形質転換体)。

20

#### 【0117】

ある種の態様において、本発明を実施するために用いられるmiRNA剤は、例えば、それが全体として参照により本明細書に組み入れられる、Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68: 109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22: 1859; 米国特許第4,458,066号に記載されているような化学合成技法を用いて、インビトロで合成される。

30

#### 【0118】

#### IV. 治療方法

1つの局面において、本発明は、ヒト対象において肥満を治療する方法を提供する。本方法は概して、少なくとも1つの熱発生制御因子(例えば、UCP1および/またはUCP2などのミトコンドリア脱共役剤)の活性を調節するmiRNA剤の有効量をヒト対象に投与する段

40

50

階を含む。

【0119】

このような治療方法は、薬理ゲノミクスの分野から得られた知識に基づいて、特異的に個別に調整するかまたは修正することができる。したがって、本発明の別の局面は、本発明の標的遺伝子分子または標的遺伝子調節剤のいずれかによる個体の予防的または治療的処置を、その個体の薬物応答遺伝子型に応じて個別に調整する方法を提供する。薬理ゲノミクスにより、臨床医または内科医は、予防的または治療的処置から最も恩恵を受ける患者をその処置の標的とし、毒性の薬物関連副作用を経験する患者の処置を回避することができるようになる。

【0120】

miRNA剤は、適切な動物モデル、例えばob/obマウス (Lindstrom P., Scientific World Journal, 7:666-685 (2007) およびdb/dbマウス (Sharma K et al., Am J Physiol Renal Physiol., 284(6):F1138-1144 (2003)) を含む肥満モデルにおいて試験することができる。例えば、本明細書に記載されるmiRNA剤（またはそれをコードする発現ベクターまたは導入遺伝子）を動物モデルにおいて使用して、該薬剤による治療の効率、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、治療薬を動物モデルにおいて使用して、そのような薬剤の作用機序を決定することができる。例えば、miRNA剤を動物モデルにおいて使用して、そのような薬剤による治療の効率、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、薬剤を動物モデルにおいて使用して、そのような薬剤の作用機序を決定することができる。

【0121】

本開示はまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアより選択される1つまたは複数のmiRNAを前脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、前脂肪細胞を誘導して白色脂肪細胞に、そして白色脂肪細胞を誘導して褐色脂肪細胞に分化させる方法を提供する。ある種の態様において、前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させるこの誘導は、前脂肪細胞を100 nMロシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した場合の、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化よりも大きい。ある種の態様において、脂肪細胞は褐色脂肪細胞である。他の態様において、脂肪細胞は白色脂肪細胞である。

【0122】

本開示はまた、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象においてインスリン感受性を高める方法を提供する。ある種の態様において、対象は哺乳動物である。

【0123】

本開示はまた、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象において脂肪消失を引き起こす方法を提供する。ある種の態様において、対象は哺乳動物である。他の態様において、哺乳動物はヒトである。

【0124】

細胞（例えば、脂肪細胞）内への取り込みを増加させるために修飾されたmiRNA剤は、kg体重当たり約15 mg未満、またはkg体重当たり10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、もしくは0.00001 mg未満、およびkg体重当たり200 nモル未満のmiRNA剤（例えば、約 $4.4 \times 10^{16}$ コピー）、またはkg体重当たり1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015 nモル未満のRNAサイレンシング剤の単位用量で投与することができる。例えば、単位用量は、注射（例えば、静脈内または筋肉内）、吸入投与、または局所適用によっ

10

20

30

40

50

て投与することができる。特に好ましい投薬量は、2、1、または0.1 mg/kg体重未満である。

#### 【0125】

miRNA剤の器官または組織への直接的な（例えば、脂肪組織への直接的な）送達は、およそ、器官／組織当たり約0.00001 mg～約3 mg、または好ましくは器官／組織当たり約0.0001～0.001 mg、器官／組織当たり約0.03～3.0 mg、器官／組織当たり約0.1～3.0 mg、もしくは器官／組織当たり約0.3～3.0 mgの投薬量におけるものであってよい。投薬量は、肥満を治療もしくは予防するのに、またはインスリン感受性を高めるのに効果的な量であってよい。1つの態様では、単位用量を、1日に1回よりも低い頻度で、例えば2、4、8、または30日に1回よりも少なく投与する。別の態様では、単位用量を頻度で投与しない（例えば、規則正しい頻度で投与しない）。例えば、単位用量を単回投与することができる。1つの態様では、有効量を他の伝統的な治療様式で投与する。

10

#### 【0126】

ある種の態様では、対象にmiRNA剤の初回用量および1回または複数回の維持用量を投与する。1回または複数回の維持用量は、一般に初回用量よりも少なく、例えば初回用量の半分未満である。維持投与計画は、1日当たり0.01 mg/kg～1.4 mg/kg体重の範囲、例えば、1日当たり10、1、0.1、0.01、または0.00001 mg/kg体重の1回または複数回の用量で対象を治療することを含み得る。維持用量は、5、10、または30日に1回以下で投与することが好ましい。さらに、治療投与計画はある期間にわたって続いてよく、その期間は、特定の疾患の性質、その重症度、および患者の全身状態に応じて変わる。好ましい態様において、投薬量は、1日に1回以下、例えば、24、36、48時間、またはそれを超える時間に1回以下、例えば、5日または8日に1回以下で送達することができる。治療後、状態の変化、例えば体脂肪率の変化について、患者をモニターすることができる。患者が現在の投薬量レベルに対して有意に応答しない場合には、化合物の投薬量を增量してもよく、または体脂肪の減少が認められる場合、もしくは望ましくない副作用が認められる場合には、用量を減量してもよい。

20

#### 【0127】

特定の状況下で所望されるか、または適切と見なされる場合には、有効量を単回用量または2回以上の用量で投与することができる。反復注入または頻回注入を容易にすることが望ましい場合には、送達装置、例えば、ポンプ、半永久ステント（例えば、皮下、静脈内、腹腔内、大槽内、または関節内）、

30

またはリザーバーの埋め込みが賢明と考えられる。1つの態様において、薬学的組成物は複数のmiRNA剤種を含む。別の態様において、miRNA剤種は、天然の標的配列に関して、別の種と重複せずかつ隣接しない配列を有する。別の態様において、複数のmiRNA剤種は、天然の異なる標的遺伝子に特異的である。別の態様において、miRNA剤は対立遺伝子特異的である。別の態様において、複数のmiRNA剤種は、2つ以上のSNP対立遺伝子（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれを超える数のSNP対立遺伝子）を標的化する。

#### 【0128】

治療が奏効した後は、患者に維持療法を行って疾患状態の再発を予防することが望ましいと考えられ、その場合、本発明の化合物を0.01 mg/kg～100 mg/kg体重の範囲の維持用量で投与する（米国特許第6,107,094号を参照されたい）。

40

#### 【0129】

投与されるmiRNA剤の濃度または量は、該薬剤について決定されたパラメータ、および例えば経鼻、頬側、または経肺などの投与方法に依存する。例えば、経鼻製剤は、鼻腔通過の刺激または熱傷を避けるために、一部の成分の濃度をかなり低くする必要がある傾向がある。適切な経鼻製剤を提供するために、経口製剤を10～100倍まで希釈することが望ましい場合もある。

#### 【0130】

ある種の要因が、対象を効果的に治療するために必要な投薬量に影響を及ぼす場合があり、こうした要因には、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全身の健康状態お

50

および／または年齢、ならびに存在する他の疾患が含まれるが、これらに限定されない。さらに、miRNA剤の治療有効量を用いた対象の治療は、単回治療を含んでよく、または好ましくは一連の治療を含んでもよい。治療のためのmiRNA剤の有効な投薬量が、特定の治療の期間中に増減可能であることもまた、認識されるであろう。投薬量の変更が起こる場合があり、これは本明細書に記載されるような診断アッセイの結果から明らかになると考えられる。例えば、miRNA剤組成物を投与した後に、対象をモニターすることができる。このモニタリングからの情報に基づいて、miRNA剤組成物の追加量を投与することができる。

### 【0131】

投与は治療される疾患状態の重症度および反応性に依存し、治療期間は数日間から数ヶ月間、または治癒が達成されるまで、もしくは疾患状態の縮小が達成されるまで続く。最適な投与スケジュールは、患者の体内の薬物蓄積の測定値から見積もることができる。通常の技術を有する人であれば、最適な投薬量、投与方法、および反復率を容易に決定することができる。最適な投薬量は、個々の化合物の相対的効力によって異なると考えられ、一般的にインビトロおよびインビボ動物モデルで有効であることが見出されたEC50に基づいて推定することができる。いくつかの態様において、動物モデルには、ヒト遺伝子、例えば標的mRNAを産生する遺伝子（例えば、熱発生制御因子）を発現するトランスジェニック動物が含まれる。トランスジェニック動物は、対応する内因性mRNAが欠損していてもよい。別の態様において、試験のための組成物は、動物モデルにおける核酸配列とヒトにおける標的核酸配列との間で保存されている配列に、少なくとも内部領域において相補的であるmiRNA剤を含む。

### 【0132】

いくつかの研究により、miRNA剤を用いて奏効した哺乳動物の投与が報告されている。例えば、Esau C, et al., *Cell Metabolism*, 3(2): 87-98 (2006) は、12.5～75 mg/kgの範囲のmiR-122アンチセンスオリゴヌクレオチドの4週間にわたる週に2回の腹腔内投与による正常マウスの投与を報告した。マウスは、体重が減少することもまたは食物摂取が減少することもなく、治療の終了時に健康でかつ正常であるように見えた。血漿トランスアミナーゼレベルは、ALTレベルおよびASTレベルの非常に軽度の増加を示した75 mg/kg用量のmiR-122 ASOを除いて、すべての用量について正常範囲内 (AST 3/4 45, ALT 3 / 4 35) であった。著者らは、50 mg/kgが有効で非毒性の用量であると結論づけた。Krutzfeldt J ., et al., *Nature*, 438, 685-689 (2005) による別の研究では、マウスにおいてmiR-122をサイレンシングするため、80、160、または240 mg/kg体重の総用量を用いてアンタゴニアを注射した。最も高い用量によって、miR-122シグナルが完全に消失した。さらなる別の研究では、miR-122をサイレンシングするために、靈長類においてロック核酸（「LNA」）が首尾よく適用された。Elmen J., et al., (2008) *Nature* 452, 896-899は、10 mg/kg LNA-抗miRの3回用量によって、靈長類においてmiR-122の効果的なサイレンシングが達成され、実験動物においてLNA関連毒性または組織病理学的变化についてのいかなる形跡もなく、総血漿コレステロールの持続的かつ可逆的低下をもたらしたことを報告している。

### 【0133】

ある種の態様において、本発明を実施するために用いられるmiRNA剤は、組換えベクターからの発現を通して投与される。適切な組換えベクターには、非限定的に、DNAプラスミド、ウイルスベクター、またはDNAミニサークルが含まれる。ベクター構築物の作製は、非限定的に、例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* (1989))、Coffin et al. (*Retroviruses.* (1997))、および「*RNA Viruses: A Practical Approach*」 (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)) に記載されているような、PCR、オリゴヌクレオチド合成、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製、およびDNA配列決定の標準的技法を含む、当技術分野で周知の任意の適切な遺伝子操作技法を用いて達成され得る。当業者に明らかであるように、種々の適切なベクターが、本発明の核酸を細胞に導入するのに利用可能である。核酸を送達するのに適したベクターの選択、および選択された発現ベクターを細胞に挿入するための

10

20

30

40

50

条件の最適化は、過度の実験を必要とせずに、当業者の技術の範囲内である。ウイルスベクターは、パッケージング細胞において組換えウイルスの產生のための配列を有するヌクレオチド配列を含む。本発明の核酸を発現するウイルスベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、またはアルファウイルスを含むがこれらに限定されないウイルス骨格に基づいて構築することができる。組換えベクターは、本明細書に記載されるように送達することができ、標的細胞中に存続する（例えば、安定した形質転換体）。

## 【0134】

miRNA剤は、細胞（例えば、脂肪細胞）中に直接導入するか；または空洞、間質腔中へ、生物の循環中へと細胞外に導入するか、経口的に導入するか、もしくは核酸を含む溶液中に細胞もしくは生物を浸すことにより導入することができる。血管または血管外の循環、血液系またはリンパ系、および脳脊髄液が、核酸を導入することができる部位である。

10

## 【0135】

本発明のmiRNA剤は、核酸を含む溶液の注射、核酸によって被覆された粒子による衝突、核酸の溶液中に細胞もしくは生物を浸漬すること、または核酸の存在下での細胞膜のエレクトロポレーションを含む、当技術分野で公知の核酸送達方法を用いて導入することができる。脂質媒介性の担体輸送、化学物質媒介性の輸送、およびリン酸カルシウムなどの陽イオン性リポソームトランスフェクションなどのような、核酸を細胞に導入するための当技術分野において公知の他の方法を用いてもよい。miRNA剤は、他の成分、例えば細胞によるmiRNA剤の取り込みを増強する化合物と共に導入することもできる。

20

## 【0136】

ある種の態様において、本明細書に記載される方法は、miRNA剤と、他の薬物または医薬品、例えば、熱発生を調節するための組成物、糖尿病を治療するための組成物、肥満を治療するための組成物との同時投与を含む。熱発生を調節するための組成物には、3アドレナリン受容体アゴニスト、甲状腺ホルモン、PPARGアゴニスト、レプチン、アディポネクチン、およびオレキシンが含まれる。

## 【0137】

## V. スクリーニング方法

別の局面において、本発明は、熱発生を調節する、肥満を減少させる、またはインスリン感受性を高めるmiRNA剤をスクリーニングする方法を提供する。本方法は概して、指標細胞を提供する段階；該指標細胞を試験miRNA剤と接触させる段階；ならびに該miRNA剤の存在下および非存在下において、該指標細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の発現レベルおよび／または細胞活性を決定する段階であって、試験miRNA剤の存在下における熱発生制御因子の活性の変化により、その試験miRNA剤が熱発生を調節する、肥満を減少させる、またはインスリン感受性を高めるmiRNA剤として同定される段階を含む。ある種の態様において、本方法は、熱発生制御因子（例えば、UCP1、UCP2）の発現レベルおよび／または活性の増加を判定する段階を含む。指標細胞は哺乳動物細胞であってよい。ある種の態様において、哺乳動物細胞は、ヒトゲノムの少なくとも一部を含むヒト細胞である。

30

## 【0138】

本明細書に開示される方法において、任意の熱発生制御因子をアッセイすることができる。例示的な熱発生制御因子は表2に記載される。好ましい態様において、熱発生制御因子は、ミトコンドリア脱共役タンパク質、例えばUCP1および／またはUCP2である。

40

## 【0139】

熱発生制御因子の活性を測定することができる任意の細胞は、本明細書に開示される方法における使用に適している。例示的な細胞には、前脂肪細胞、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体が含まれる。

## 【0140】

非限定的に、熱発生制御因子のmRNA発現レベル、タンパク質発現レベル、またはミトコンドリア脱共役活性を含む、熱発生制御因子の任意の活性をアッセイすることができる。

50

このような活性を決定する方法は、当技術分野で周知である。

【0141】

非限定的に、miRNA、アゴミア、アンタゴミア、アプタミア、miR-マスク、miRNAスponジ、siRNA（一本鎖または二本鎖）、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、または標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズし、その機能を調節するその他のオリゴヌクレオチド模倣物を含む、任意のmiRNA剤をスクリーニングすることができる。

【0142】

## VI. 薬学的組成物

1つの局面において、本明細書に開示される方法は、少なくとも1つの熱発生制御因子の活性を調節することができるmiRNA剤を含む薬学的組成物および製剤の投与を含み得る。

10

【0143】

ある種の態様において、本組成物は薬学的に許容される担体と共に製剤化される。薬学的組成物および製剤は、非経口的に、局所的に、胃腸管への直接投与により（例えば、経口的にまたは直腸に）、またはエアロゾルによるかもしくは経皮的ななどの局所投与により投与することができる。薬学的組成物は任意の方法で製剤化することができ、状態または疾患および疾病の程度、各患者の全身の医学的状態、もたらされる好ましい投与方法などに応じて、種々の単位剤形で投与することができる。医薬品の製剤化および投与の技法に関する詳細は、科学文献および特許文献に十分に記載されている、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005を参照されたい。

20

【0144】

miRNA剤は、単独で、または薬学的製剤（組成物）の成分として投与することができる。化合物は、ヒトおよび獣医薬における使用のための任意の簡便な方法で、投与のために製剤化することができる。湿潤剤、乳化剤、ならびにラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、ならびに着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤および芳香剤、保存剤、ならびに抗酸化剤もまた、組成物中に存在し得る。

【0145】

本発明の組成物の製剤には、皮内、吸入、経口／経鼻、局所、非経口、直腸、および／または腔内投与に適したものが含まれる。製剤は簡便に単位剤形で提供されてよく、薬学の分野で周知の任意の方法によって調製することができる。単一の剤形を生成するために担体材料と混合され得る有効成分（例えば、本発明の核酸配列）の量は、治療される宿主、特定の投与様式、例えば皮内または吸入によって異なる。単一の剤形を生成するために担体材料と混合され得る有効成分の量は、一般的に、治療効果、例えば、抗原特異的T細胞または液性応答を生じる化合物の量である。

30

【0146】

本発明の薬学的製剤は、医薬品の製造に関する分野に公知の任意の方法に従って調製することができる。このような薬物は、甘味剤、香味剤、着色剤、および防腐剤を含み得る。製剤は、製造に適した非毒性の薬学的に許容される賦形剤と混合することができる。製剤は、1つまたは複数の希釈剤、乳化剤、保存剤、緩衝剤、賦形剤などを含んでよく、液剤、散剤、乳剤、凍結乾燥粉末、スプレー剤、クリーム剤、ローション剤、放出制御製剤、錠剤、丸剤、ゲル剤、パッチ剤上、植込錠中などの形態で提供され得る。

40

【0147】

経口投与用の薬学的製剤は、当技術分野で周知の薬学的に許容される担体を用いて、適正かつ適切な投薬量で製剤化することができる。そのような担体により、医薬品が、患者による摂取に適した錠剤、丸剤、散剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ロゼンジ剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして単位剤形で製剤化されることが可能になる。経口使用のための薬学的調製物は、固体賦形剤として製剤化し、任意に、得られた混合物を粉碎し、必要に応じて適切な付加的化合物を添加した後に顆粒の混合物を加工して、錠剤または糖衣錠コアを得ることができる。適切な固体賦形剤は、炭水化物またはタンパク質充填剤であり、これには、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプ

50

ン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；ならにアラビアおよびトラガントを含むゴム；ならびにタンパク質、例えはゼラチンおよびコラーゲンが含まれる。架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤または可溶化剤を添加してもよい。押し込み型カプセル剤は、ラクトースまたはデンプンなどの充填剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および任意に安定剤と混合した活性薬剤を含み得る。軟カプセル剤では、活性薬剤を、安定剤と共に、または安定剤を含めずに、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体中に溶解または懸濁することができる。

## 【0148】

10

水性懸濁剤は、活性薬剤（例えは、本発明の核酸配列）を、例えは水性皮内注射用の水性懸濁液の製造に適した賦形剤と混合して含み得る。そのような賦形剤には、懸濁剤、例えは、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴムおよびアカシアゴムなど、ならびに分散剤または湿潤剤、例えは、天然のホスファチド（例えは、レシチン）、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えは、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えは、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物（例えは、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの縮合生成物（例えは、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）が含まれる。水性懸濁剤はまた、1つまたは複数の保存剤、例えはp-ヒドロキシ安息香酸エチルまたはp-ヒドロキシ安息香酸n-プロピルなど、1つまたは複数の着色剤、1つまたは複数の香味剤、および1つまたは複数の甘味剤、例えは、スクロース、アスパルテーム、またはサッカリンなどを含み得る。製剤は、モル浸透圧濃度について調整することができる。

20

## 【0149】

30

ある種の態様において、miRNA剤の投与には油性の医薬品が用いられる。油性懸濁剤は、活性薬剤を、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、もしくはヤシ油などの植物油中、または流動パラフィンなどの鉱物油中；またはこれらの混合物中に懸濁することによって製剤化することができる。例えは、経口投与した疎水性薬学的化合物の生体利用能を増加させ、個体間および個体内の変動性を減少させるための精油または精油成分の使用を記載している、米国特許第5,716,928号を参照されたい（米国特許第5,858,401号もまた参考されたい）。油懸濁剤は、蜜蠟、固体パラフィン、またはセチルアルコールなどの増粘剤を含み得る。口当たりのよい経口調製物を提供するために、グリセロール、ソルビトール、またはスクロースなどの甘味剤を添加することができる。これらの製剤は、アスコルビン酸などの抗酸化剤を添加することによって保存することができる。注射用油媒体の例としては、Minto (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102を参照されたい。

## 【0150】

40

ある種の態様において、薬学的組成物および製剤は、水中油型乳剤の形態である。油性相は、上記の植物油もしくは鉱物油またはそれらの混合物であってよい。適切な乳化剤には、天然のゴム、例えはアカシアゴムおよびトラガカントゴムなど、天然のホスファチド、例えはダイズレシチンなど、脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来するエステルまたは部分エステル、例えはソルビタンモノオレエートなど、ならびにこれらの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えはポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートなどが含まれる。乳剤はまた、シロップ剤およびエリキシル剤の製剤と同様に、甘味剤および香味剤を含み得る。このような製剤はまた、粘滑剤、保存剤、または着色剤を含み得る。代替の態様において、本発明のこれらの注射用水中油型乳剤は、パラフィン油、ソルビタンモノオレエート、エトキシ化ソルビタンモノオレエート、および／またはエトキシ化ソルビタントリオレートを含む。

50

## 【0151】

ある種の態様において、薬学的組成物および製剤は、坐剤、吹送法、散剤、およびエアロゾル製剤をはじめとして、鼻腔内、眼内、および膣内経路により投与される（ステロイド吸入剤の例については、例えば、Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35: 1 187-1193 ; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75: 107-111）を参照されたい）。坐剤製剤は、薬物を、常温では固体であるが体温で液体であり、したがって体内で融解して薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤と混合することによって、調製することができる。そのような材料は、カカオバターおよびポリエチレングリコールである。

## 【0152】

ある種の態様において、薬学的組成物および製剤は、塗布棒、液剤、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤、ペースト剤、ゼリー剤、ペイント剤、散剤、およびエアロゾル剤として製剤化され、局所経路により経皮的に送達される。10

## 【0153】

ある種の態様において、薬学的組成物および製剤は、体内での徐放のためにミクロスフェアとして送達される。例えば、ミクロスフェアは、皮下にゆっくりと放出する薬物の皮内注射により；Rao (1995) J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645を参照されたい；生分解性の注射用ゲル製剤として、例えば、Gao (1995) Pharm. Res. 12:857-863 (1995) を参照されたい；または経口投与用のミクロスフェアとして、例えば、Eyles (1997) J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674を参照されたい、投与することができる。

## 【0154】

ある種の態様において、薬学的組成物および製剤は、静脈内(IV)投与、または体腔もしくは器官の管腔への投与などにより、非経口投与される。これらの製剤は、薬学的に許容される担体中に溶解した活性薬剤の溶液を含み得る。使用され得る許容される媒体および溶媒は、水およびリンゲル液、等張塩化ナトリウムである。加えて、滅菌不揮発性油を溶媒または懸濁媒として使用することができる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の無菌性不揮発性油を使用することができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸も、注射剤の調製において同様に使用することができる。これらの溶液は滅菌されており、通常は望ましくない物質を含まない。これらの製剤は、従来の周知の滅菌技法によって滅菌することができる。製剤は、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどのような、生理的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助物質を含み得る。これらの製剤中の活性薬剤の濃度は、大きく異なってよく、選択される特定の投与様式および患者の必要性に従って、主に液量、粘性、体重などに基づいて選択される。30 IV投与のために、製剤は、滅菌注射用水性懸濁剤または油性懸濁剤などの滅菌注射用調製物であってよい。この懸濁剤は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて製剤化することができる。滅菌注射用調製物はまた、1,3-ブタンジオール溶液のような非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の懸濁剤であってもよい。投与は、ボーラスまたは持続注入（例えば、特定の期間にわたる血管内への実質的に中断することのない導入）によるものであってよい。

## 【0155】

ある種の態様において、薬学的化合物および製剤は凍結乾燥される。阻害性核酸を含む安定した凍結乾燥製剤は、本発明の医薬品、および充填剤、例えば、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、およびスクロース、またはそれらの混合物を含む溶液を凍結乾燥することによって作製することができる。安定した凍結乾燥製剤を調製するための工程は、約2.5 mg/mLの核酸、約15 mg/mLのスクロース、約19 mg/mLのNaCl、および5.5より高いが、6.5未満のpHを有するクエン酸ナトリウム緩衝剤の溶液を凍結乾燥することを含み得る。例えば、U.S. 20040028670を参照されたい。40

## 【0156】

ある種の態様において、薬学的組成物および製剤は、リポソームを用いて送達される。リポソームを使用することにより、特にリポソーム表面が標的細胞に特異的なリガンドを50

保有するか、または別の方法で特定の器官に優先的に指向される場合、インピボにおいて活性薬剤の送達を標的細胞に集中させることができる。例えば、米国特許第6,063,400号；第6,007,839号；Al-Muhammed (1996) J. Microencapsul. 13 :293-306；Chonn (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708；Ostro (1989) Am. J. Hosp. Pharm. 46: 1576-1587を参照されたい。

#### 【0157】

本発明の製剤は、予防的および／または治療的処置のために投与することができる。ある種の態様では、治療適用のために、障害またはその合併症の臨床症状を治癒させる、軽減する、または部分的に停止させるのに十分な量；これは治療有効量と称され得る、の組成物が、トリグリセリドレベルの低下を必要とする、または本明細書に記載される障害のリスクがあるかもしくはその障害を有する対象に投与される。例えば、ある種の態様において、本発明の薬学的組成物は、対象において肥満を治療するのに十分な量で投与される。

10

#### 【0158】

これを達成するのに適切な薬学的組成物の量が治療有効量である。この使用に有効な投薬のスケジュールおよび量、すなわち投与計画は、疾患または状態の段階、疾患または状態の重症度、患者の健康の一般状態、患者の身体状況、年齢などを含む種々の要因に依存する。患者のための投薬計画を見積もる際には、投与様式も考慮される。

#### 【0159】

投薬計画また、当技術分野において周知の薬物動態パラメータ、すなわち、活性薬剤の吸収速度、生物学的利用能、代謝、クリアランスなども考慮に入れる（例えば、Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617；Groning (1996) Pharmazie 51:337-341；Fotherby (1996) Contraception 54:59-69；Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84: 1 144-1 146；Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613；Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24: 103-108；Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005を参照されたい）。最新技術により、臨床医は、個々の患者、活性薬剤、および治療される疾患または状態の各々について、投薬計画を決定することができる。医薬品として用いられる類似組成物について提供される指針を手引きとして用いて、本発明の方法を実施する際に行われる投薬計画、すなわち投与スケジュールおよび投薬量レベルが正確かつ適切であると判断することができる。例えば、患者に必要とされかつ許容される投薬量および頻度、各投与後に生じるコレステロール恒常性の程度および量などに応じて、製剤の単回または複数回投与を実施することができる。製剤は、状態、疾患、または症状を効果的に治療する、予防する、もしくは回復させるのに、例えば肥満を治療するのに十分な量の活性薬剤を提供するべきである。

20

#### 【0160】

ある種の態様において、経口投与用の薬学的製剤は、1日当たり体重1キログラムにつき約1～100 mgまたはそれを超える1日量である。経口投与とは対照的に、血流、体腔、または器官の管腔内には、より低い投薬量を用いることができる。局所もしくは経口投与、または散剤、スプレー剤、もしくは吸入剤による投与においては、実質的により高い投薬量を用いることができる。非経口または経口投与が可能な製剤を調製するための実際の方法は、当業者に公知または明らかであり、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005などの出版物により詳細に記載されている。

30

#### 【実施例】

#### 【0161】

#### VII. 例証

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、実施例はさらなる限定と解釈されるべきではない。本出願を通じて引用した配列リスト、図面、ならびにすべての参考文献、特許、および公開済み特許出願の内容は、参照により本明細書に明確に組み入れられる。

40

#### 【0162】

さらに、本発明においては、従来の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技法を、

50

当業者の技術の範囲内で使用することができる。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (本明細書では「Sambrook et al, 1989」と表示) ; DNA Cloning : A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985) ; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984) ; Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)] ; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, E ds. (1984)] ; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)] ; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)] ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994) を参照されたい。  
10

#### 【0163】

##### 実施例1. 热発生制御因子のインシリコ解析

利用可能な科学情報および本発明者ら自身の実験データの批判的評価および再検討に基づいて、热発生の調節に関する83個のタンパク質を選択した。これらのタンパク質は、それらの機能に基づいて、热発生の活性化因子または抑制因子として分類した。これらの热発生制御因子タンパク質を表2に記載する。

#### 【0164】

##### (表2) 热発生制御因子タンパク質

活性化因子			
	名称	Entrez遺伝子ID	Ensembl遺伝子ID
1	ALDH1A1	216	ENSG00000165092
2	ANP (NPPA)	4878	ENSG00000175206
3	AZGP1	563	ENSG00000160862
4	BMP7	655	ENSG00000101144
5	BMP8B	656	ENSG00000116985
6	CEBPA	1050	ENSG00000245848
7	CEBPB	1051	ENSG00000172216
8	CEBPD	1052	ENSG00000221869
9	CIDEA	1149	ENSG00000176194
10	COX7A1	1346	ENSG00000161281
11	CRAT	1384	ENSG00000095321
12	CREB1	1385	ENSG00000118260
13	CREBBP	1387	ENSG00000005339
14	CTBP1	1487	ENSG00000159692
15	CTBP2	1488	ENSG00000175029
16	DIO2	1734	ENSG00000211448
17	ELOVL3	83401	ENSG00000119915
18	FGF16	8823	ENSG00000196468
19	FGF19	9965	ENSG00000162344
20	FGF21	26291	ENSG00000105550
21	FNDC5	252995	ENSG00000160097
22	FOXC2	2303	ENSG00000176692
23	GDF3	9573	ENSG00000184344
24	HCRT (OREXIN)	3060	ENSG00000161610
25	HOXC8	3224	ENSG00000037965
26	INSR	3643	ENSG00000171105
27	IRS1	3667	ENSG00000169047
28	KDM3A (JMJD1A)	55818	ENSG00000115548
29	KLF5	688	ENSG00000102554
30	KLF11	8462	ENSG00000172059
31	KLF15	28999	ENSG00000163884

10

20

30

32	LRP6	4040	ENSG0000070018
33	MAPK14	1432	ENSG00000112062
34	MED13	9969	ENSG00000108510
35	NCOA1	8648	ENSG00000084676
36	NCOA2	10499	ENSG00000140396
37	NCOA3	8202	ENSG00000124151
38	NR4A3	8013	ENSG00000119508
39	NRF1	4899	ENSG00000106459
40	PLAC8	51316	ENSG00000145287
41	PPARA	5465	ENSG00000186951
42	PPARD	5467	ENSG00000112033
43	PPARG	5468	ENSG00000132170
44	PPARGC1A	10891	ENSG00000109819
45	PPARGC1B	133522	ENSG00000155846
46	PRDM16	63976	ENSG00000142611
47	PRDX3	10935	ENSG00000165672
48	PRKAA1 (AMPKA1)	5562	ENSG00000132356
49	PRKAA2 (AMPKA2)	5563	ENSG00000162409
50	PRKACA	5566	ENSG00000072062
51	PRKACB	5567	ENSG00000142875
52	PRKAR1A	5573	ENSG00000108946
53	SIRT1	23411	ENSG00000096717
54	SIRT3	23410	ENSG00000142082
55	SLC27A2 (FATP2)	11001	ENSG00000140284
56	SREBF1	6720	ENSG00000072310
58	SREBF2	6721	ENSG00000198911
58	STAT5A	6776	ENSG00000126561
59	TRPM8	79054	ENSG00000144481
60	UCP1 (SLC25A7)	7350	ENSG00000109424
61	UCP2 (SLC25A8)	7351	ENSG00000175567
62	UCP3 (SLC25A9)	7352	ENSG00000175564

## 抑制因子

	名称	Entrez遺伝子ID	Ensembl遺伝子ID
1	ATG7	10533	ENSG00000197548
2	BMP2	650	ENSG00000125845
3	BMP4	652	ENSG00000125378
4	CIDE1	63924	ENSG00000187288
5	CTNNB1	1499	ENSG00000168036
6	DLK1 (Pref-1)	8788	ENSG00000185559
7	E2F4 (p107)	1874	ENSG00000205250
8	EIF4EBP1	1978	ENSG00000187840
9	ESRRA (NR3B1)	2101	ENSG00000173153
10	IKBKE	9641	ENSG00000143466
11	NR1H3 (LXRA)	10062	ENSG0000025434
12	NRIP1 (RIP140)	8204	ENSG00000180530

10

20

30

40

13	RB1 (pRb)	5925	ENSG00000139687
14	NR0B2 (SHP)	8431	ENSG00000131910
15	RPS6KB1	6198	ENSG00000108443
16	RUNX1T1	862	ENSG00000079102
17	RUNX2	860	ENSG00000124813
18	TNFRSF1A	7132	ENSG00000067182
19	TWIST1	7291	ENSG00000122691
20	WNT5A	7474	ENSG00000114251
21	WNT10B	7480	ENSG00000169884

10

## 【 0 1 6 5 】

既知および予測のタンパク質相互作用のSTRING 9.0データベース (string-db.org/) を用いて、これら83個の候補分子を試験した。相互作用には、直接的（物理的）関係および間接的（機能的）関係が含まれる；これらは、4つの情報源：ゲノム状況；ハイスクロット実験；同時発現；および以前の知識から導き出される。STRINGは、多数の生物についてこれらの情報源からの相互作用データを定量的に統合し、適用できる場合には、これらの生物間で情報を伝達する。このデータベースは、現在、1,133種の生物からの5,214,234個のタンパク質を網羅している。一例として、83個の熱発生制御因子分子間の関係はUCP1を中心とし、UCP1と直接的関係を有する分子と間接的関係を有する分子は、0.90という最も高い信頼スコアを用いて識別することができる。この関係を図1Aに模式形式で記載する。この解析から、9個の分子（CEBPB、CIDEA、KDM3A、NRIP1、PRDM16、PPARG、PPARGC1A、PPKAA2、およびUCP2）がUCP1と直接関係があり、多くのさらなる分子がUCP1と二次的にまたはそれに続く度合いで関係があることが見出された。

20

## 【 0 1 6 6 】

信頼度をスコア0.70の高さに設定した場合、8個の付加的なタンパク質がUCP1と直接関係あることが見出された（AZGP1、DI02、KLF11、KLF15、NR1H3、PPARA、PPARD、およびPPARGC1B）、図1B。

30

## 【 0 1 6 7 】

同様に、これら83個の熱発生制御因子分子間の相互作用を、他のソフトウェアプログラムを用いて独立して評価した。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアプログラム ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) によって予測された相互作用を図2Aに示す（UCP1は黄色、活性化因子は緑色、および抑制因子は紫色で表示）。Reactome Functional Interaction (Reactome IF) ソフトウェアプログラム (<http://wiki.reactome.org>) によって予測された相互作用を図2Bに示す（UCP1は黄色、活性化因子は緑色、および抑制因子は紫色で表示）。IPAネットワークおよびReactome IFネットワークは、STRINGプログラムで得られた図1Aおよび1Bに記載されるものとは異なる。これらのアルゴリズムは、異なる所定のパラメータ、情報源、および選択基準に依存しているため、それらの結果が異なることは、驚くことではない。

30

## 【 0 1 6 8 】

実施例2. 関連miRNA標的のインシリコ選択

40

miRNA剤の標的として適切な熱発生制御因子を選択するために、いくつかのインターネットベースの資源を使用して、miRNAとそれらの標的を一致させた（「マイクロノーム（micronome）」）。例示的なツールを表3に記載する。

## 【 0 1 6 9 】

（表3）miRNAおよびそれらの標的を選択するために用いられた例示的なバイオインフォマティクスツール

分野および名称	ウェブアドレス
統合データマイニング(8)	
BioCarta	<a href="http://www.biocarta.com/">http://www.biocarta.com/</a>
Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp">http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp</a>
GeneOntology	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	<a href="http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp">http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp</a>
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
PubGene	<a href="http://www.pubgene.org/">http://www.pubgene.org/</a>
Reactome	<a href="http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html">http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html</a>
STRING	<a href="http://string-db.org/">http://string-db.org/</a>
miRNAマイニングおよびマッピング(8)	
deepBase	<a href="http://deepbase.sysu.edu.cn/">http://deepbase.sysu.edu.cn/</a>
Human microRNA disease database (HMDD)	<a href="http://202.38.126.151/hmdd/mirna/md/">http://202.38.126.151/hmdd/mirna/md/</a>

10

20

miRBase V19	<a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>
miRGen 2.0	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/mirgen/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/mirgen/</a>
miRNAMap	<a href="http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/">http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/</a>
miRSel	<a href="http://services.bio_ifi.lmu.de/mirsel/">http://services.bio_ifi.lmu.de/mirsel/</a>
miRStart	<a href="http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/home.php">http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/home.php</a>
miR2Disease	<a href="http://www.mir2disease.org">http://www.mir2disease.org</a>
miRNA標的および発現 (21)	
DIANA-microT 3.0	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/</a>
DIANA-mirExTra	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/hexamers/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/hexamers/</a>
GSEA Molecular Signatures Database v3.0	<a href="http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp">http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp</a>
MicroCosm Targets	<a href="http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/download.pl">http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/download.pl</a>
MicroInspector	<a href="http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/">http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/</a>
microRNA.org (ex. miRanda)	<a href="http://www.microrna.org/microrna/home.do">http://www.microrna.org/microrna/home.do</a>
miRDB	<a href="http://mirdb.org/miRDB/">http://mirdb.org/miRDB/</a>
miRTarBase	<a href="http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.html">http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.html</a>
miRTar.Human	<a href="http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/download.php">http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/download.php</a>
miRvestigator	<a href="http://mirvestigator.systemsbiology.net/">http://mirvestigator.systemsbiology.net/</a>
mirZ	<a href="http://www.mirz.unibas.ch/ElMMo2/">http://www.mirz.unibas.ch/ElMMo2/</a>
MultiMiTar	<a href="http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/multimitar.htm">http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/multimitar.htm</a>
PhenomiR	<a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/index.gsp">http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/index.gsp</a>
PicTar	<a href="http://pictar.mdc-berlin.de/">http://pictar.mdc-berlin.de/</a>
PITA	<a href="http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html">http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html</a>
RepTar	<a href="http://bioinformatics.ekmd.huji.ac.il/reptar/">http://bioinformatics.ekmd.huji.ac.il/reptar/</a>

10

20

30

40

RNAhybrid	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/</a>
RNA22	<a href="http://cbcdrv.watson.ibm.com/rna22.html">http://cbcdrv.watson.ibm.com/rna22.html</a>
Sylamer	<a href="http://www.ebi.ac.uk/enright/sylamer/">http://www.ebi.ac.uk/enright/sylamer/</a>
TarBase 6.0	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php? r=tarbase/index</a>
TargetScanHuman 6.2	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>
統合miRNA標的および 発現ツール (13)	
GOMir	<a href="http://www.bioacademy.gr/bioinformatics/projects/GOMi&lt;br/&gt;r/">http://www.bioacademy.gr/bioinformatics/projects/GOMi r/</a>
MAMI (MetaMiR:Target Inference)	<a href="http://mami.med.harvard.edu/">http://mami.med.harvard.edu/</a>
mimiRNA	<a href="http://mimirna.centenary.org.au/mep/formulaire.html">http://mimirna.centenary.org.au/mep/formulaire.html</a>
MMIA (microRNA and mRNA Integrated Analysis)	<a href="http://147.46.15.115/MMIA/index.html">http://147.46.15.115/MMIA/index.html</a>
mirDIP	<a href="http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/">http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/</a>
miRGator V3.0	<a href="http://mirgator.kobic.re.kr">http://mirgator.kobic.re.kr</a>
miRecords	<a href="http://mirecords.biolead.org/">http://mirecords.biolead.org/</a>
MIRNA-DISTILLER	<a href="http://www.ikp-stuttgart.de/content/language1/html/10415.asp">http://www.ikp- stuttgart.de/content/language1/html/10415.asp</a>
MiRonTop	<a href="http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index">http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index</a>
miRrror	<a href="http://www.proto.cs.huji.ac.il/mirror">http://www.proto.cs.huji.ac.il/mirror</a>
miRSystem	<a href="http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/">http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/</a>
miRWalk	<a href="http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html">http://www.ma.uni- heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html</a>
StarBase	<a href="http://starbase.sysu.edu.cn/index.php">http://starbase.sysu.edu.cn/index.php</a>
miRNA二次構造 (5)	

10

20

30

40

OligoWalk	<a href="http://rna.urmc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi">http://rna.urmc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi</a>
PicTar RNA Studio	<a href="http://www.pictar.org/">http://www.pictar.org/</a>
RNA2D	<a href="http://protein3d.ncifcrf.gov/shuyun/rna2d.html">http://protein3d.ncifcrf.gov/shuyun/rna2d.html</a>
Vienna RNA Package	<a href="http://www.tbi.univie.ac.at/ivo/RNA/">http://www.tbi.univie.ac.at/ivo/RNA/</a>
Whitehead siRNA algorithm	<a href="http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAAext/">http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAAext/</a>
ネットワーク検索および解析 (8)	
ARIADNE Pathway Studio	<a href="http://www.riadnegenomics.com/products/pathway-studio/">http://www.riadnegenomics.com/products/pathway-studio/</a>
Cytoscape	<a href="http://www.cytoscape.org/">http://www.cytoscape.org/</a>
Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp">http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp</a>
Genego MetaCore	<a href="http://www.genego.com/metacore.php">http://www.genego.com/metacore.php</a>
Ingenuity Systems IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	<a href="http://www.ingenuity.com/products/IPA/microRNA.html">http://www.ingenuity.com/products/IPA/microRNA.html</a>
MATISSE (Module Analysis via Topology of Interactions and Similarity Sets)	<a href="http://acgt.cs.tau.ac.il/matisse/">http://acgt.cs.tau.ac.il/matisse/</a>
MIR@NT@N	<a href="http://mironton.uni.lu">http://mironton.uni.lu</a>
NAViGaTOR	<a href="http://ophid.utoronto.ca/navigator/index.html">http://ophid.utoronto.ca/navigator/index.html</a>
分子可視化 (4)	
Foldit	<a href="http://fold.it/portal/info/science">http://fold.it/portal/info/science</a>
PyMOL	<a href="http://www.pymol.org/">http://www.pymol.org/</a>
Qlucore Omics Explorer	<a href="http://www.qlucore.com/ProdOverviewmiRNA.aspx">http://www.qlucore.com/ProdOverviewmiRNA.aspx</a>

10

20

30

40

WebMol	<a href="http://www.cmpharm.ucsf.edu/cgi-bin/webmol.pl">http://www.cmpharm.ucsf.edu/cgi-bin/webmol.pl</a>
情報統合 (1)	
TIBCO Spotfire	<a href="http://spotfire.tibco.com/">http://spotfire.tibco.com/</a>

## 【 0 1 7 0 】

具体的には、これらのツールを用いて、1) 統合データマイニング(8ツール)；2) miRNAマイニングおよびマッピング(6ツール)；3) miRNA標的の発見(21ツール)；4) 統合miRNA標的の発見(13ツール)；5) miRNA二次構造予測および比較(5ツール)；6) ネットワーク検索および解析(8ツール)；7) 分子可視化(4ツール)；ならびに8) 情報統合および利用(1ツール)を実施した。

10

## 【 0 1 7 1 】

単一の遺伝子標的是いくつかのmiRNAによって制御され得る一方で、単一のmiRNはいくつかの遺伝子標的を制御し得る。標的疾患に最も関連のあるmiRNAを選択するために、精巧なバイオインフォマティクス資源が開発された(Gallagher IJ, et al. *Genome medicine*. 2010; Fujiki K, et al. *BMC Biol.* 2009; Okada Y, et al., *J Androl.* 2010; Hao T, et al., *Mol Biosyst.* 2012; Hao T, et al., *Mol Biosyst.* 2012)。しかしながら、これらのアルゴリズムの結果は実際に所定のパラメータに依存し、これらのアルゴリズム間の収束の程度はかなり限定される。したがって、miRNA / 標的関係の同定に関する感度、特異性、および選択性が改善された、より良く実行できるバイオインフォマティクスツールを開発する必要がある。

20

## 【 0 1 7 2 】

miRNAとそれらの標的との相互作用は、そのドライバー鎖のシード領域(5'側塩基2~7)が標的mRNAの3'UTR領域における相補的配列に結合し、通常は翻訳抑制または標的分解および遺伝子サイレンシングをもたらすという、転写後制御因子としてのmiRNAの元の説明を超える。この相互作用はまた、miRNAのドライバー鎖またはパッセンジャー鎖の様々な領域、ならびにmRNAの5'UTR、プロモーター、およびコード領域を含み得る。

30

## 【 0 1 7 3 】

利用可能なデータの解析に際しては、多くのシグナル伝達経路、機能、または過程に関与するユニバーサルmiRNAよりも、1つの分離したシグナル伝達経路内の複数の遺伝子を標的化する経路特異的miRNAを優遇することに決定した。miRNA標的を予測する34の公的に利用可能なインターネットツールを用いて、実施例1で選択された83個の熱発生制御因子分子(36個の転写因子を含む)の中のいくつかの標的を潜在的に調節し得る特異的ヒトmiRNAを検索した。

## 【 0 1 7 4 】

いくつかのパラダイムを考慮した。

## 【 0 1 7 5 】

A) 1マイクロRNA 複数mRNAの経路特異的パラダイム

40

A1. 1マイクロRNA 複数mRNAの経路特異的パラダイムの第1例

ヒストンのメチル化状態は、ヒストンメチルトランスフェラーゼおよびデメチラーゼによって動的に調節され得る。ヒトリジン(K)特異的デメチラーゼ3A(KDM3A)は、代謝遺伝子の発現を調節するのに極めて重要である。その機能喪失は、マウスにおいて肥満および高脂血症をもたらす。UCP1遺伝子のPPAR応答エレメント(PPRE)へのKDM3A結合のアドレナリン刺激は、PPREにおけるH3K9me2(ヒストンH3のリジン9のジメチル化)のレベルを低下させるのみならず、PPREへのPPARGおよびRXRAならびにこれらのコアクチベーター-PARGC1A、CREBBP、およびNCOA1の動員を促進する。TargetScan Humanデータベース(リリース6.0)の問い合わせにより、ヒトKDM3A 3'UTR 29~35領域がhsa-miR-22の保存された標的であることが明らかになった。いくつかの他のmiRNA標的データベースからも、hsa-m

50

iR-22とKDM3Aとのこの一致が確認された。したがって、hsa-miR-22アンタゴミアによるデメチラーゼKDM3Aの産生増加は、UCP1遺伝子プロモーター領域の脱メチル化をもたらし、よっていくつかの調節エレメントの結合およびUCP1産生の増加を促進するはずである。

【 0 1 7 6 】

加えて、本発明者らは、34のmiRNA標的および発現ツール（表4）を用いて、所与のmiRNAのmRNA標的を同定した。

【 0 1 7 7 】

（表4）miRNAおよびそれらの標的を選択するために用いられたバイオインフォマティクスツール

メタツールは太字で表示 (13)

メタツールによってコールされるエンジンはイタリック体で表示 (13)

## 【 0 1 7 8 】

上記のインシリコ戦略を適用したところ、hsa-miR-22-3pおよびhsa-miR-22-5pがそれぞれ、選択された83個の熱発生標的のうちの合計42個および8個と相互作用することが見出された。このデータを表5に記載する。

## 【 0 1 7 9 】

(表5) hsa-miR-22の予測されたおよび／または検証された標的として同定された熱発生制御因子

<b>hsa-miR-22-3p</b>							
ALDH1A1	DIO2	NCOA1	PRKAA1	STAT5A			
BMP4	FGF19	NPPA	PRKACA	TNFRSF1A			
BMP7	FGF21	NRF1	PRKACB	TRPM8			
CEBPA	FOXC2	NRIP1	PRKAR1A	UCP2			
CEBDP	INSR	PPARA	RUNX1T1	WNT10B			
CIDEC	KDM3A	PPARGC1A	RUNX2	WNT5A			
CREB1	KLF11	PPARGC1B	SIRT1				
CREBBP	LRP6	PRDM16	SREBF1				
CTNNB1	MAPK14	PRDX3	SREBF2				
<b>hsa-miR-22-5p</b>							
BMP7	DIO2	FNDC5	IKBKE	INSR	MAPK14	NR1H3	PPARA

## 【 0 1 8 0 】

## A2. 1マイクロRNA 複数mRNAの経路特異的パラダイムのその他の例

本発明者らはまた、34のmiRNA標的および発現ツール(表4)を用いて、脂肪細胞の536個のmiRNA(表1)のうちのいずれかと83個の熱発生標的(表2)との間の潜在的関係を探索した。

## 【 0 1 8 1 】

多くの脂肪細胞miRNAが、83個の熱発生標的のうちの少なくとも1つと相互作用すると考えられる(予測および／または検証)。例えば、miR-17-3pおよびhsa-miR-17-5pはそれぞれ、選択された熱発生の83個の標的のうちの合計23個および65個と相互作用する。このデータを表6に記載する。

## 【 0 1 8 2 】

(表6) hsa-miR-17の予測されたおよび／または検証された標的として同定された熱発生制御因子

10

20

30

<b>hsa-miR-17-3p</b>				
ATG7	CTBP2	KLF11	PPARD	TNFRSF1A
BMP2	E2F4	MAPK14	PRDM16	TWIST1
BMP4	FGF19	NCOA3	RB1	WNT10B
CEBPB	IKBKE	PLAC8	RUNX1T1	
CREB1	IRS1	PPARA	STAT5A	
<b>hsa-miR-17-5p</b>				
ALDH1A1	CREB2	IKBKE	NRIP1	RB1
ATG7	CTNNB1	INSR	PLAC8	RPS6KB1
BMP2	CTBP1	IRS1	PPARA	RUNX1T1
BMP4	CTBP2	KLF11	PPARD	RUNX2
BMP7	DIO2	MAPK14	PPARG	SIRT1
BMP8b	ELOVL3	MED13	PPARGC1A	SIRT3
CEBPA	FGF19	NCOA1	PPARGC1B	SREBF1
CEPB	FGF21	NCOA2	PRDX3	STAT5A
CEBD	FNDC5	NCOA3	PRKAA1	TNFRSF1A
CIDEC	FOXC2	NPPA	PRKAA2	TWIST1
COX7A1	GDF3	NR1H3	PRKACA	UCP1
CRAT	HCRT	NR4A3	PRKACB	UCP3
CREB1	HOXC8	NRF1	PRKAR1A	WNT5A

10

20

30

40

## 【 0 1 8 3 】

関心対象のmiRNAとそれらのmRNA標的のリストが作成された時点で、以下のフィルターをかけてその結果を精緻化した：

## パラメータ

- 1 関心対象の組織 / 細胞におけるmiRNAの発現
- 2 所与の遺伝子または遺伝子セットに対して1つのmiRNAを予測するアルゴリズムの数
- 3 アルゴリズムからのスコア / パーセント
- 4 1つのmiRNAによって標的化される好ましい遺伝子の数
- 5 標的遺伝子における1つのmiRNAに対する結合部位の数
- 6 標的遺伝子におけるいくつかのmiRNAに対する結合部位の数
- 7 標的遺伝子の間での1つのmiRNAのシード相補的配列の過剰提示 (miRvestigator)
- 8 検証されたmiRNA-mRNA標的対
- 9 miRNA結合部位のゲノム位置 (5'UTR プロモーター CDS 3'UTR)
- 10 miRNAのイントロン位置
- 11 miRNAのクラスター化
- 12 関心対象の特定の組織 / 細胞におけるmiRNAの存在量

## 【 0 1 8 4 】

上記のパラメータを適用したところ、229個のmiRNAがこれらの基準のうちの少なくとも2つを満たすことが見出された。このデータを表7に記載する。

## 【 0 1 8 5 】

(表7) 選択基準の数の減少によるmiRNAの順位

hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-let-7a-3p
hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-126-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-519d	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-20a-3p
hsa-miR-22-3p	hsa-miR-96-5p	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-499a-5p
hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-23a-3p	hsa-let-7g-5p
hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-152
hsa-miR-132-3p	hsa-miR-98-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-181b-5p	hsa-let-7c	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-124-3p
hsa-miR-211-5p	hsa-let-7d-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-203a
hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-421	hsa-miR-24-3p
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-301b
hsa-miR-182-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-590-3p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-196a-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-1179
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-325
hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-552
hsa-miR-204-5p	hsa-miR-302c-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-185-5p
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-455-3p
hsa-miR-1	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-545-3p	hsa-miR-583
hsa-miR-9-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-122-5p
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-216a-5p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-1305
hsa-miR-138-5p	hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-133a	hsa-miR-139-5p
hsa-miR-217	hsa-let-7d-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-146a-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-494	hsa-miR-18a-5p
hsa-miR-382-5p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-498	hsa-miR-18b-5p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-513a-5p	hsa-miR-199b-5p
hsa-miR-107	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-340-5p
hsa-miR-135a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-495-3p	hsa-miR-34c-5p
hsa-miR-93-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-503-5p	hsa-miR-423-3p
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-539-5p	hsa-miR-489
hsa-miR-515-3p	hsa-miR-134	hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-520f
hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-137	hsa-miR-302b-5p	hsa-miR-520g
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-605
hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-153	hsa-miR-99a-3p	hsa-miR-668

10

20

30

hsa-let-7a-5p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-136-3p	hsa-miR-376a-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-335-3p	hsa-miR-150-3p	hsa-miR-378a-5p
hsa-miR-10a-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-154-3p	hsa-miR-424-3p
hsa-miR-135b-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-15a-3p	hsa-miR-451a
hsa-miR-144-3p	hsa-miR-429	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-452-3p
hsa-miR-181d	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-16-1-3p	hsa-miR-487b
hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-513a-3p	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-493-5p
hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-500a-3p
hsa-miR-218-5p	hsa-miR-653	hsa-miR-186-3p	hsa-miR-502-3p
hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-122-3p	hsa-miR-195-3p	hsa-miR-516b-3p
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-101-5p	hsa-miR-20b-3p	hsa-miR-518e-3p
hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-1178-3p	hsa-miR-223-5p	hsa-miR-518f-3p
hsa-miR-383	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-519a-5p
hsa-miR-202-3p	hsa-miR-214-5p	hsa-miR-24-1-5p	hsa-miR-519b-5p
hsa-miR-381-3p	hsa-miR-302d-5p	hsa-miR-24-2-5p	hsa-miR-521
hsa-miR-377-3p	hsa-miR-572	hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-523-5p
hsa-miR-452-5p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-27b-5p	hsa-miR-545-5p
hsa-miR-501-3p	hsa-miR-26a-2-3p	hsa-miR-29b-1-5p	hsa-miR-585
hsa-miR-514a-3p	hsa-miR-611	hsa-miR-302a-5p	hsa-miR-7-2-3p
hsa-miR-654-3p	hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-3065-5p	hsa-miR-93-3p
hsa-let-7b-3p	hsa-let-7i-3p	hsa-miR-30d-3p	hsa-miR-96-3p
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-99b-3p
hsa-miR-133b	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-371a-3p	
hsa-miR-192-5p	hsa-miR-132-5p	hsa-miR-373-5p	
hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-135b-3p	hsa-miR-374a-3p	

## 【 0 1 8 6 】

B) 複数マイクロRNA 1 mRNAのパラダイム

## B1. UCP1を含む1つの例示的な複数miRNA 1 mRNAのパラダイム

脂肪細胞において、重要な熱発生制御因子は最終的にはUCP1（サーモゲニンとも命名された）であり、したがってすべての熱発生制御因子は最終的にUCP1活性に影響を及ぼさなくてはならない。UCP1は、ミトコンドリア内膜を介してプロトン漏出を生じ、ひいてはATP合成から酸化的リン酸化を切り離すミトコンドリア輸送タンパク質である。結果として、エネルギーは熱という形で消散される（適応熱発生）（図5を参照されたい）Lowell et al., Nature (2000); Friedman et al., Bioinformatics (2010); Hsu et al., Nucleic acids research (2011); Rieger et al., Frontiers in Genetics (2011))。

## 【 0 1 8 7 】

UCP1生合成は、主に転写レベルで制御される。図6は、他の例示的な熱発生制御因子によるUCP1の転写制御を示す。UCP1遺伝子のプロモーター領域は多くの異なる調節部位を含み、広範なタンパク質がその転写に正（図7aを参照されたい）および負（図7bを参照されたい）の両方の影響を及ぼすことが可能となる。

## 【 0 1 8 8 】

メンデルランダム化とは、非実験研究において、機能公知の遺伝子における測定された変異を用いて、疾患に対する変更可能な曝露の因果効果を調べる方法である。メンデルランダム化は、「天然の」ランダム化臨床試験と考えられる。

## 【 0 1 8 9 】

UCP1のエキソン2内のプロモーターにおける-3826 A/G—塩基多型などのUCP1遺伝子の遺伝子多型は、mRNA発現の減少および肥満と関連することが報告されている。G/G遺伝子型を有する健常小児は、高脂肪食および急性寒冷曝露に応答した熱発生に関してより低い能

10

20

30

40

50

力を有した。若年女性では、この同じ-3826 A/G UCP1遺伝子多型により、安静時エネルギー消費量および体温調節交感神経系活動が減少する。367名の韓国人女性の試験において、-3826 A>GのG対立遺伝子および-412 A>CのC対立遺伝子は、優性モデルにおいて腹部皮下脂肪のより大きな領域と有意に関連していた（それぞれ、 $p<0.001$ および $p<0.0004$ ）；それらを共に組み合わせると(ht2[GC])、この有意性は向上した( $p<0.00005$ )。100名の重度肥満成人(BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>)および100名の標準体重対照対象(BMI範囲 = 19 ~ 24.9 kg/m<sup>2</sup>)の試験により、プロモーター領域における7つの変異が同定され、4つはUCP1遺伝子のイントロン領域に、および4つはエキソン領域に存在した。これらの変異は肥満の発生に寄与し得、特にg.-451C>T、g.940G>A、およびg.IVS4-208T>Gは、エネルギー貯蔵を促進する「僕約」因子を表し得る。最後に、UCP1遺伝子の上流プロモーター領域に位置する2つの多型(A-3826GおよびC-3740A)は、遺伝子発現に影響を及ぼし、ヒトの長寿命と関連づけられる。

10

#### 【0190】

前述の情報はすべて、適応熱発生に変化を起こし、その結果としてヒト肥満を治療するための有意義な方法として、UCP1の発現および活性を標的化することを支持する。この目的を果たすために多くの戦略を実行することができるが、本発明の方法で使用される戦略では、miRNA剤を用いて熱発生経路内のいくつかのエレメントを同時に調節して、UCP1の合成および活性を増加させる。miRNAとUCP1遺伝子との間の直接的相互作用および間接的相互作用の両方が考慮される。直接的相互作用とは、UCP1遺伝子の様々な領域に対するmiRNAの直接結合を意味し、これによってUCP1 mRNAの転写、翻訳、安定性、および／または分解の変化が起こる。間接的相互作用とは、miRNAが熱発生mRNAの転写、翻訳、安定性、および／または分解を変化させ、その熱発生mRNAの発現されたタンパク質がUCP1遺伝子の転写を変化させることを意味する。さらに、間接的相互作用とは、miRNAが、UCP1遺伝子の転写を変更する他のmiRNAの転写、翻訳、安定性、および／または分解を変化させることを意味する。

20

#### 【0191】

ヒトUCP1遺伝子(gi|237858805|ref|NG\_012139.1|ヒト脱共役タンパク質1(ミトコンドリア、プロトン担体)(UCP1)、第4染色体上のRefSeqGene)のプロモーター領域は、特に調節エレメントモチーフが豊富である(表8)。

30

#### 【0192】

(表8) UCP1遺伝子調節エレメント

	調節エレメントの名称	配列	数	ヌクレオチド位置
1	BRE1 (褐色脂肪応答エレメント1)	CCTCTCTGCTTCTTCT	1	1,129～1,144
2	BRE2 (褐色脂肪応答エレメント2)	CTCCTTGAA	1	1,269～1,278
3	<b>CRE2</b>	ATTCTTTA	4	1,121～1,128; 3,631～3,638; 10,982～10,989; 15,881～15,888
4	<b>CREB</b>	ACGTCA	5	1,082～1,087; 1,345～1,350; 1,348～1,343; 11,439～11,434; 13,831～13,836
5	<b>DR1</b>	TTGCCCTTGCTCA	1	1,099～1,111
6	<b>DR4</b>	ACGTCAAAAGGGTCA	1	1,082～1,097
7	<b>DR4型 RARE</b>	RGKTCANNNRGKTCA	1	1,316～1,301
8	<b>ERE</b>	GCTCATACTGACCT	1	1,107～1,120
9	<b>PRE</b>	GTAAATGTGTTCT	1	1,009～1,021
10	<b>RARE</b>	TGACCACAGTTGATCA	1	983 -> 999
11	<b>RXR</b>	AGGTCA	12	1,120～1,115; 1,316～1,311; 3,517～3,522; 3,560～3,555;

10

20

				3,813 ~ 3,808; 5,318 ~ 5,313; 6,233 ~ 6,238; 6,831 ~ 6,836; 8,122 ~ 8,127; 9,966 ~ 9,971; 11,339 ~ 11,334; 11,412 ~ 11,407	
12	<b>GC ボックス1</b>	CGCCC	7	4,593 ~ 4,589; 4,615 ~ 4,619; 4,615 ~ 4,619; 4,747 ~ 4,751; 4,765 ~ 4,769; 5,914 ~ 5,910; 13,715 ~ 13,711	10
13	<b>GC ボックス2</b>	GCGGG	9	4,463 ~ 4,459; 4,585 ~ 4,589; 4,593 ~ 4,597; 4,639 ~ 4,643; 4,883 ~ 4,887; 5,176 ~ 5,172; 5,929 ~ 5,933; 5,940 ~ 5,944; 14,994 ~ 14,990	20
14	<b>GT ボックス1</b>	CACCC	25	194 ~ 190; 452 ~ 448; 1,184 ~ 1,188; 1,803 ~ 1,807; 2,428 ~ 2,424; 3,037 ~ 3,041; 3,330 ~ 3,334; 4,137 ~ 4,141; 4,566 ~ 4,562; 4,599 ~ 4,595; 4,869 ~ 4,865; 5,104 ~ 5,108; 5,461 ~ 5,457; 6,237 ~ 6,241; 6,293 ~ 6,289; 8,096 ~ 8,092; 8,198 ~ 8,194; 9,649 ~ 9,645; 9,912 ~ 9,908; 12,962 ~ 12,958; 13,136 ~ 13,132;	30 40

				13,723～13,719; 14,404～14,400; 14,960～14,964; 15,576～15,572
15	GTボックス2	GTGGG	20	25～21; 1,805～1,801; 1,809～1,805; 2,119～2,123; 3,854～3,850; 4,310～4,314; 4,339～4,343; 4,765～4,761; 4,867～4,871; 6,291～6,295; 7,554～7,558; 8,280～8,284; 8,681～8,685; 9,615～9,619; 9,689～9,693; 9,906～9,910; 10,363～10,359; 13,074～13,070; 13,640～13,644; 13,941～13,945
16	CpGメチル化アイランド	CG	366	4,519～5,258; 5,639～6,694

## 【0193】

図8Aは、15,910塩基対ヒトUCP-1遺伝子（FASTAアクセスション番号：`>gi|237858805|ref|NG_012139.1|`ヒト脱共役タンパク質1（ミトコンドリア、プロトン担体）（UCP1）、第4染色体上のRefSeqGene；NCBI参照配列：NG\_012139.1）のヌクレオチド5,001位のUCP1転写開始部位に関するこれらの様々な調節エレメントの位置を示す。

## 【0194】

miRNAによるこれらの調節エレメントの直接的または間接的な活性化または抑制は、UCP1遺伝子の発現および活性の変化をもたらす。通常の状態では、UCP1遺伝子の発現および活性は、エネルギー浪費を回避するために、調節エレメントの豊かなネットワークによって抑制されている。寒冷環境への曝露などのストレス下では、UCP1遺伝子の発現は、いくつかのmiRNAの制御下にある様々な活性化因子および抑制因子を介して上方制御される。

## 【0195】

microRNA.orgを含むいくつかのプログラムを用いて、ヒトUCP1 3'UTRを標的化するmiRNAを最初に調査したところ、陰性であった。しかしながら、UCP1 Ensembl 1,462塩基対転写物ENST00000262999を標的として用いて、MicroCosm Targetsを含む他のプログラムにより、表9に示されるような、UCP1 3'UTRの28の位置における27個のmiRNAに対する結合部位が明らかになった。

## 【0196】

（表9）MicroCosm Targets を用いて決定された、UCP1（NCBI参照配列NG\_012139.1）の3'UTRにおけるmiRNAの結合部位

10

20

30

40

名称	配列	起点bp	終点bp	長さ
hsa-miR-21	AATGTAATGCAGATAAGCTA	14143	14162	20
hsa-miR-219-2-3p	ACATTTTAATTACAATTTC	14217	14236	20
hsa-miR-22	GATTGGCAGCTT	14857	14868	12
hsa-miR-222a	GATTTTAATGTTAGAGTCCAG	14500	14522	23
hsa-miR-290-3p	TTTAGAGCTGGAGGGTACTT	14621	14640	20
hsa-miR-292-3p	TTTAGAGCTGGAGGGTACTT	14621	14640	20
hsa-miR-292-5p	GACAGAGGAACAGTTGAG	14648	14666	19
hsa-miR-325	ATTTGGCAGGATTGCTACTAG	14568	14589	22
hsa-miR-331-5p	TTTGAGATCTATACCTGG	14383	14401	19
hsa-miR-362-5p	ATTTAACGCTAAATCCAAGGATT	14838	14860	23
hsa-miR-367	TGACCATTCTGGAGTGCAATT	14170	14191	22
hsa-miR-371-5p	ACAGTTGAT	988	997	10
hsa-miR-371-5p	ACAGTTGAG	14657	14666	10
hsa-miR-377	CTGGAGTGCAATTGTGTGA	14179	14197	19
hsa-miR-378	TTTAATGTTAGAGTCCAG	14503	14522	20
hsa-miR-382	TGATGACATCTCTAACAACTTC	14526	14547	22
hsa-miR-460	AGAAACTGAGTGAAATGCAG	14250	14269	20
hsa-miR-508-5p	TGACCATTCTGGAGTG	14170	14186	17
hsa-miR-543	TACTCTGAATGTT	14478	14490	13
hsa-miR-549	TTAACCAACAGTTGTCA	14321	14336	16
hsa-miR-643	CAAGTTCACTAGAACATACAAG	14412	14431	20
hsa-miR-654-3p	AAGGTTACAGGCTGCCAGACAT	14880	14901	22
hsa-miR-664	GTGTGAATGAATG	14192	14204	13
hsa-miR-871	TAGGCATGAACCTACTCTGAATG	14466	14488	23
hsa-miR-883a-3p	AAACTGAGTGAAATGCAGTT	14252	14271	20
hsa-miR-883b-3p	AAACTGAGTGAAATGCAGTT	14252	14271	20
hsa-miR-888-3p	TTTATTAACCACAGTTGTCAGTT	14317	14339	23
hsa-miR-92b	GAGTGCAAT	14182	14190	9

## 【 0 1 9 7 】

UCP1 Ensembl 1,462塩基対転写物 (ENST00000262999)、UCP1 Ensembl 9,371塩基対遺伝子配列 (ENSG00000109424)、または15,910塩基対UCP1配列 (NCBI参照配列 : NG\_012139.1) を標的として用いて、miRWalk、miRGen、miRGator-miRanda、およびDIANA microTなどの他のプログラムにより、表10に示されるような、UCP1 3'UTRの69の位置における合計50個のmiRNAに対する結合部位が明らかになった。

## 【 0 1 9 8 】

(表10) いくつかのプログラムによる、UCP1 (NCBI参照配列、NG\_012139.1) の3'UTRにおけるmiRNAの結合部位

10

20

30

40

	名称	配列	起点bp	終点bp	長さ
1	hsa-miR-1179	AAGTATCCTTT	15346	15356	11
2	hsa-miR-1302	ATGGGACACA	15021	15030	10
3	hsa-miR-130b	TTATTTCCCT	15161	15171	11
4	hsa-miR-146a	TGACAACTGT	14327	14336	10
	hsa-miR-146a	AGGGAAGTGA	15231	15240	10
	hsa-miR-146a	TGTGAAGTGG	15679	15688	10
5	hsa-miR-181c	AACCATAAGT	15304	15312	9
6	hsa-miR-19b-2	ACTTTGCGG	14991	15000	10
7	hsa-miR-203	TTAAATGTT	15584	15592	9
8	hsa-miR-204-5p	TTCCTTTATC	14006	14015	10
	hsa-miR-204-5p	TTCCTCTGTC	14648	14657	10
9	hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCT	14153	14162	10
10	hsa-miR-211-5p	TTCCCTATCTC	14779	14789	11
11	hsa-miR-214	CAGCAAGCA	15052	15060	9
12	hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAA	14859	14868	10
	hsa-miR-22-5p	AGTTCTTCACA	14203	14213	11
13	hsa-miR-26a-2-3p	CATTTCCTTG	13918	13927	10
	hsa-miR-26a-2-3p	CCAATCCTTG	14853	14862	10
	hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTTCATG	15616	15625	10
14	hsa-miR-30b	GTAACCTTCC	14878	14887	10
15	hsa-miR-325	CAGAGTAGGT	14475	14484	10
	hsa-miR-325	CCTTGTAGGC	15378	15387	10
16	hsa-miR-328	CTGTTCCCT	14651	14660	10
17	hsa-miR-362-5p	ATCCTTGGAT	14850	14859	10
18	hsa-miR-367-3p	AATTGCACTC	14182	14191	10
19	hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCTGC	15435	15444	10

10

20

30

	hsa-miR-371a-5p	TCTCAAACTG	14658	14667	10
20	hsa-miR-378a-3p	ACTGGCCTTG	15816	15825	10
21	hsa-miR-382-3p	ATTCATTACAC	14194	14203	10
22	hsa-miR-382-5p	GAAGTTGTTAGAGAT	14533	14547	15
23	hsa-miR-383	AGATTAGAA	14545	14553	9
24	hsa-miR-421	ATTAACGTGAC	14333	14342	10
	hsa-miR-421	CTCAAAAGAC	14380	14389	10
25	hsa-miR-422a	ACTGGCCTT	15817	15825	9
26	hsa-miR-431	TGTCTGGCA	14892	14900	9
27	hsa-miR-452	TTATCTGC	14151	14158	8
	hsa-miR-452	TCTTCTGC	14773	14780	8
	hsa-miR-452	ACATCTGC	15009	15016	8
28	hsa-miR-455-3p	CAGTCCAT	13893	13900	8
	hsa-miR-455-5p	TGTGTGCCTT	15641	15650	10
29	hsa-miR-491-5p	AATGGGGAAAG	14975	14984	10
30	hsa-miR-501-3p	ATGCATCAGG	15547	15556	10
31	hsa-miR-504	AGACCCTGT	15325	15333	9
32	hsa-miR-508-5p	TATTCTAGTGAACTTGACTCTTA	14405	14427	23
33	hsa-miR-512-5p	CACTCAG	14255	14261	7
34	hsa-miR-514a-3p	TTGACTCTT	14406	14414	9
35	hsa-miR-515-3p	GACTGCCTT	15539	15547	9
	hsa-miR-515-3p	GTGTGCCTT	15641	15649	9
36	hsa-miR-517a-3p	ATGGTGCATT	15650	15659	10
37	hsa-miR-545	CAGCAAGCACT	15050	15060	11
38	hsa-miR-549	TGACAACGT	14327	14336	10
39	hsa-miR-552	CACAGGTGA	15130	15138	9
40	hsa-miR-616-5p	ACTCTAAC	14510	14518	9
41	hsa-miR-620	ATGAATATAG	14560	14569	10
42	hsa-miR-643	ACTGGTATGT	13933	13942	10
	hsa-miR-643	TCTTGTATTTC	14423	14432	10
	hsa-miR-643	CCTTGTAGGC	15378	15387	10
	hsa-miR-643	ACATGCATGC	15553	15562	10
43	hsa-miR-651	TTAAAATAAG	13988	13997	10
	hsa-miR-651	TTAGGTTAAA	13993	14002	10
	hsa-miR-651	TCATGATAAG	15700	15709	10
44	hsa-miR-654-3p	TATCTCTTCT	14775	14784	10
	hsa-miR-654-3p	TATGTATACT	15493	15502	10
45	hsa-miR-655	GTAATACAT	15593	15601	9
46	hsa-miR-767-3p	CCTGCTCAT	14871	14879	9
47	hsa-miR-888-3p	GACTGACTCC	15772	15781	10

48	hsa-miR-92b-3p	ATTGCACTCC	14181	14190	10
49	hsa-miR-941	CACCCAGGT	14396	14404	9
50	hsa-miR-99a-3p	AAGCTGGCTC	15117	15126	10

【 0 1 9 9 】

ヒトUCP1遺伝子の配列といくつかのmiRNA配列とのアライメントにより、UCP1遺伝子

10

20

30

40

50

の5'UTR、プロモーター領域、およびコード領域における一致が得られた。UCP1遺伝子の様々な領域を標的化するmiRNAを予測する公的に利用可能なインターネットツールの問い合わせにより、いくつかのヒットが導き出された。驚いたことに、これらの予測ツール間の重複は、図3に示されるようにゼロであった。

【0200】

それにもかかわらず、アライメントプログラムGeneiousを用いてmiRNAデータベースをスクリーニングした。UCP1遺伝子配列において相補的な450個の結合部位を有する合計191個のヒトマイクロRNAが見出された（表11）。一致の長さは、7塩基～12塩基（例えば、hsa-miR-24-2-5pおよびhsa-miR-192-5p）である。miRNA当たりのヒットの数は1個から数個まで様々である（例えば、hsa-miR-19b2（豊富な脂肪細胞miRNA）については9個、hsa-miR-26a-2-3pについては14個、hsa-miR-181cについては11個、およびhsa-miR-620については12個）。

【0201】

（表11）UCP1遺伝子配列（NCBI参照配列：NG\_012139.1）中に予測される結合部位を有するmiRNA

miRNA	配列	起点bp	終点bp	長さ
hsa-let-7c	TAGAGTTTC	5918	5926	9
hsa-let-7e	GGAGGTAGG	13283	13291	9
hsa-let-7e	TGAAGTAGG	7612	7620	9
hsa-let-7e	AGAGGTAGG	3306	3314	9
hsa-let-7i-3p	CTGTGCAAG	3588	3596	9
hsa-miR-17	CAAAGTGCT	12200	12208	9
hsa-miR-17	CAAAGTGCT	9931	9939	9
hsa-miR-17	CAAAGTGCT	218	226	9
hsa-miR-19a	TGTGCAAAT	3916	3924	9
hsa-miR-19a	TGTGCAAAT	834	842	9
hsa-miR-19b-2	ACTTTGCGG	14991	15000	10
hsa-miR-19b-2	AGTTTACAA	11998	12007	10
hsa-miR-19b-2	AGTTTTGTAT	10023	10032	10
hsa-miR-19b-2	AGTCTTGAAG	9399	9408	10
hsa-miR-19b-2	AGGTTTGTAG	7758	7767	10

10

20

30

hsa-miR-19b-2	AGTATTGAAG	7159	7168	10
hsa-miR-19b-2	AGGCTTGCAG	3546	3555	10
hsa-miR-19b-2	AATTGGCAG	529	538	10
hsa-miR-19b-2	AGTTTGAA	312	321	10
hsa-miR-20b	CAAAGTGCT	12200	12208	9
hsa-miR-20b	CAAAGTGCT	9931	9939	9
hsa-miR-20b	CAAAGTGCT	218	226	9
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCT	14153	14162	10
hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAA	14859	14868	10
hsa-miR-22-3p	AAGCTTCCAG	1482	1491	10
hsa-miR-22-5p	AGTTCTTCACA	14203	14213	11
hsa-miR-22-5p	AATTCTTCAGG	8032	8042	11
hsa-miR-22-5p	GGTTCTTCAGC	5389	5399	11
hsa-miR-24-2-5p	TGCCTACTGGCC	8651	8662	12
hsa-miR-25-3p	CATTGCAC	11565	11572	8
hsa-miR-25-5p	AGGCGGAG	5963	5970	8
hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTTCATG	15616	15625	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCAATCCTTG	14853	14862	10
hsa-miR-26a-2-3p	CATTTTCTTG	13918	13927	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCTACTCTTC	13505	13514	10
hsa-miR-26a-2-3p	ACGATTCTTG	13192	13201	10
hsa-miR-26a-2-3p	TCTATTCTTT	12883	12892	10
hsa-miR-26a-2-3p	CATATTTTTG	10197	10206	10
hsa-miR-26a-2-3p	GCTAGTCTTG	9978	9987	10
hsa-miR-26a-2-3p	CATATTTTTG	9890	9899	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTCTTT	6631	6640	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCCATTCTCG	4709	4718	10
hsa-miR-26a-2-3p	TTTATTCTTG	3893	3902	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTACTTG	1885	1894	10
hsa-miR-26a-2-3p	GCGATTCTTG	376	385	10
hsa-miR-27-5p	AGAGCTTAGG	2949	2958	10
hsa-miR-30b	GTAACCTTCC	14878	14887	10
hsa-miR-30b	GTAACCATCA	12991	13000	10
hsa-miR-30b	GTAATCATAC	12831	12840	10
hsa-miR-30b	GTCAACATCA	11401	11410	10
hsa-miR-30b	GTAAACATAA	9365	9374	10
hsa-miR-30b	GTACTCATCC	9016	9025	10
hsa-miR-30b	CTATACATCC	8586	8595	10
hsa-miR-30b	CTAACACATCT	7495	7504	10
hsa-miR-31	GGCTATGCC	7712	7720	9

10

20

30

40

hsa-miR-32	ATTGCACA	11564	11571	8
hsa-miR-92b	ATTGCACTCC	14181	14190	10
hsa-miR-92b	ATTGCACTAG	11282	11291	10
hsa-miR-93	CAAAGTGCTG	12199	12208	10
hsa-miR-93	CAAAGTGCTG	217	226	10
hsa-miR-93-3p	ACTCCTGGGCT	12356	12366	11
hsa-miR-93-3p	ACTGATAAGCT	11055	11065	11
hsa-miR-93-3p	ACTCCTGACCT	9966	9976	11
hsa-miR-96-3p	AATCATGTGCC	8659	8669	11
hsa-miR-99a-3p	AAGCTGGCTC	15117	15126	10
hsa-miR-99a-3p	AAACTCTTTC	13344	13353	10
hsa-miR-99a-3p	AATCTTGTTC	11952	11961	10
hsa-miR-99a-3p	AAGCTCCTTT	11050	11059	10
hsa-miR-99a-3p	AAGCTCCTTT	8099	8108	10
hsa-miR-99a-3p	AAGCTCTGTC	7523	7532	10
hsa-miR-99b-3p	CAACCTCGAG	13666	13675	10
hsa-miR-99b-3p	CGAGCTCCTG	13660	13669	10
hsa-miR-99b-3p	GAAGCTTGTG	6436	6445	10
hsa-miR-99b-3p	CAAACTCCTG	257	266	10
hsa-miR-100	TCCAGTAGAT	11866	11875	10
hsa-miR-100	ACGCGCAGAT	5634	5643	10
hsa-miR-106b-5p	CAAAGTGCTG	12199	12208	10
hsa-miR-106b-5p	CAAAGTGCTG	217	226	10
hsa-miR-126-3P	TCATACAGT	12828	12836	9
hsa-miR-126-3P	TTGTACTGT	11542	11550	9
hsa-miR-126-3P	TGGTCCCCTG	7922	7930	9
hsa-miR-126-3P	TCATACAGT	932	940	9
hsa-miR-130b	TTATTTCCCT	15161	15171	11
hsa-miR-130b	CTCTTTTCAGT	9670	9680	11
hsa-miR-130b	CTCTCTTCACT	8977	8987	11
hsa-miR-130b	CTCTTTTCCCC	8444	8454	11
hsa-miR-130b	CTTTTTCCCCT	6624	6634	11
hsa-miR-130b	CTATTTCCGT	5742	5752	11
hsa-miR-130b	TTCCTTTCCCT	5007	5017	11
hsa-miR-130b	CTCTTTGCCCT	1845	1855	11
hsa-miR-130b	CTCCTTTCCTT	1033	1043	11
hsa-miR-133a-1	TTTGGTGCCC	7393	7402	10
hsa-miR-140-3p	TACCACAG	5893	5900	8
hsa-miR-141	TAACACTG	5852	5859	8
hsa-miR-143	GGTGCAGTG	4132	4140	9

10

20

30

40

hsa-miR-143-3p	TGAGATGAGG	13727	13736	10
hsa-miR-143-3p	TGAGATGGAG	10172	10181	10
hsa-miR-143-3p	TTAGATGAAG	9572	9581	10
hsa-miR-144-3p	TACAGTATT	12825	12833	9
hsa-miR-144-3p	TACAATATA	8859	8867	9
hsa-miR-144-3p	GACAGTATA	1491	1499	9
hsa-miR-146a	CCTCTGAAA	3499	3507	9
hsa-miR-146a	TGTGAACCTGG	15679	15688	10
hsa-miR-146a	AGGGAACCTGA	15231	15240	10
hsa-miR-146a	TGACAACTGT	14327	14336	10
hsa-miR-146a	TAAGAACCTAA	8935	8944	10
hsa-miR-146a	TTAGAACAGA	7908	7917	10
hsa-miR-146a	TGAGAACGTGC	6926	6935	10
hsa-miR-146a	TGAAAACCTTA	3883	3892	10
hsa-miR-146a	ACAGAACCTGA	2259	2268	10
hsa-miR-146a	TGAGACCAGA	2235	2244	10
hsa-miR-146a	TGAGAAATAA	1614	1623	10
hsa-miR-147	TGTGTGGATAA	7223	7233	11
hsa-miR-147	TTTGTGCAAAT	3916	3926	11
hsa-miR-154	AATCATAACA	12830	12838	9
hsa-miR-154	AATCATAACA	934	942	9
hsa-miR-181c	AACCATACT	15304	15312	9
hsa-miR-181c	AACCAAAGA	13244	13252	9
hsa-miR-181c	AACCATCAC	12990	12998	9
hsa-miR-181c	ATCCAGCGA	11466	11474	9
hsa-miR-181c	AAACATCTA	7494	7502	9
hsa-miR-181c	AAAAATCGA	6201	6209	9
hsa-miR-181c	AACCCCCGA	5540	5548	9
hsa-miR-181c	AACCCTCTA	3614	3622	9
hsa-miR-181c	AGCCAGCGA	3471	3479	9
hsa-miR-181c	AACCATAAGG	2801	2809	9
hsa-miR-181c	AACCATCAC	194	202	9
hsa-miR-185	TGGAGAGAA	2979	2987	9
hsa-miR-192-5p	CTAACATATGAA	114	125	12
hsa-miR-194-1	TGTAACAGCA	1895	1904	10
hsa-miR-196a	AGGTAGTTT	12139	12147	9
hsa-miR-199a-5p	CCCTGTGTT	5753	5762	10
hsa-miR-200a	TAACACTG	5852	5859	8
hsa-miR-200b	TAATAATGCC	11184	11193	10
hsa-miR-200b	GAATACTGCC	10340	10349	10

10

20

30

40

hsa-miR-200c-3p	TAATACTGT	12466	12474	9
hsa-miR-200c-3p	TAATAATGC	11185	11193	9
hsa-miR-200c-3p	GAATACTGC	10341	10349	9
hsa-miR-200c-3p	TAATACAGC	7594	7602	9
hsa-miR-203	TTAAATGTT	15584	15592	9
hsa-miR-203	TGAAATTTC	9782	9790	9
hsa-miR-203	TGAAAGGTT	4495	4503	9
hsa-miR-204-5p	TTCCTCTGTC	14648	14657	10
hsa-miR-204-5p	TTCCTTTATC	14006	14015	10
hsa-miR-205	TCCTTCATT	10659	10667	9
hsa-miR-208b	ATAAGAAGA	9493	9501	9
hsa-miR-208b	ATAAGAAGA	1770	1778	9
hsa-miR-211-5p	TTCCCTATCTC	14779	14789	11
hsa-miR-211-5p	TCCCCTCTGTC	5238	5248	11
hsa-miR-211-5p	TTCCCTTGCTC	5002	5012	11
hsa-miR-211-5p	TTCCCATTCTC	4710	4720	11
hsa-miR-214	CAGCAAGCA	15052	15060	9
hsa-miR-214	CAGAAGGCA	6918	6926	9
hsa-miR-214	CCGCAGGCA	5935	5943	9
hsa-miR-214	CACCAGGCA	2087	2095	9
hsa-miR-218	TGTGCTTGA	10385	10393	9
hsa-miR-302c	TTTAACATG	2932	2940	9
hsa-miR-324-5p	CGCGTCCCCT	4876	4885	10
hsa-miR-325	CCTTGTAGGC	15378	15387	10
hsa-miR-325	CAGAGTAGGT	14475	14484	10
hsa-miR-325	CCAAGTAGCT	10066	10075	10
hsa-miR-325	CCAAGTAGCT	354	363	10
hsa-miR-328	CTGTCCTCT	14651	14660	10
hsa-miR-328	CTGGCTCCCT	8215	8224	10
hsa-miR-328	CTGGCCCTTC	8062	8071	10
hsa-miR-328	CTGGCACTCA	6653	6662	10
hsa-miR-328	CTGGCTTTCT	6496	6505	10
hsa-miR-328	CTGCCCTCC	6048	6057	10
hsa-miR-328	CTGGGCCGCT	4804	4813	10
hsa-miR-328	CTGGAGCTCT	4477	4486	10
hsa-miR-328	CTGACCCCTT	1089	1098	10
hsa-miR-330	CAAAGCACAC	13845	13854	10
hsa-miR-330	CAAAGCACAC	11657	11666	10
hsa-miR-331-5p	CTAGGTGTGG	7719	7728	10
hsa-miR-361-3p	CCCCCAGG	5112	5119	8

10

20

30

40

hsa-miR-362-5p	ATCCTTGGAT	14850	14859	10
hsa-miR-367-3p	AATTGCACTC	14182	14191	10
hsa-miR-367-3p	AAATGCACCT	999	1008	10
hsa-miR-369	AATAATACA	2266	2274	9
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCTGC	15435	15444	10
hsa-miR-371a-3p	AAGAGCCGAC	11455	11464	10
hsa-miR-371a-3p	ACGTGCCACC	10044	10053	10
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCTCT	7047	7056	10
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCACCC	5457	5466	10
hsa-miR-371a-5p	TCTCAAAC TG	14658	14667	10
hsa-miR-372	AAAGTGCTG	12199	12207	9
hsa-miR-372	AAAGTGCTG	217	225	9
hsa-miR-374a-3p	TCATCAGATT	10606	10615	10
hsa-miR-377-3p	AGCACACAAA	13842	13851	10
hsa-miR-378a-3p	ACTGGCCTTG	15816	15825	10
hsa-miR-378a-3p	ACTGGTCTTG	11837	11846	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTGCCTC	12216	12225	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTGCCTC	10082	10091	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTGTCTC	8207	8216	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTAACTC	7650	7659	10
hsa-miR-382-3p	ATTCA TTCAC	14194	14203	10
hsa-miR-383	AGATTAGAA	14545	14553	9
hsa-miR-383	AGATTAGAA	7912	7920	9
hsa-miR-383	AGAACAGAA	5801	5809	9
hsa-miR-412	ACTTCACCT	737	745	9
hsa-miR-421	CTCAAAAGAC	14380	14389	10
hsa-miR-421	ATTA ACTGAC	14333	14342	10
hsa-miR-421	AACATCAGAC	11398	11407	10
hsa-miR-421	ATCAA CTGAG	3427	3436	10
hsa-miR-421	ATCAA CAGGT	2443	2452	10
hsa-miR-421	ATCAA AAAGAT	2333	2342	10
hsa-miR-422a	ACTGGCCTT	15817	15825	9
hsa-miR-422a	ACTGGTCTT	11838	11846	9
hsa-miR-422a	ACTGGACGT	5847	5855	9
hsa-miR-425	AGCGGGAAGGT	5167	5177	11
hsa-miR-431	TGTCTGGCA	14892	14900	9
hsa-miR-431	TGTCTAGCA	9218	9226	9
hsa-miR-432-5p	TCCTGGAGT	13624	13632	9
hsa-miR-432-5p	TATTGGAGT	10785	10793	9
hsa-miR-432-5p	TCTTAGAGT	9263	9271	9

10

20

30

40

hsa-miR-432-5p	TCTTAGAGT	6666	6674	9
hsa-miR-432-5p	TCTTGGAGC	2180	2188	9
hsa-miR-452	ACATCTGC	15009	15016	8
hsa-miR-452	TCTTCTGC	14773	14780	8
hsa-miR-452	TTATCTGC	14151	14158	8
hsa-miR-452	TCCTCTGC	13488	13495	8
hsa-miR-452	TCATGTGC	8660	8667	8
hsa-miR-452	TCATCTGG	8221	8228	8
hsa-miR-452	TCATGTGC	7945	7952	8
hsa-miR-452	ACATCTGC	7508	7515	8
hsa-miR-452	CCATCTGC	6787	6794	8
hsa-miR-452	TCATCCGC	5912	5919	8
hsa-miR-452	TCATCTGT	4053	4060	8
hsa-miR-452	TCATCTCC	3667	3674	8
hsa-miR-452	TCCTCTGC	3457	3464	8
hsa-miR-452	TCTTCTGC	2210	2217	8
hsa-miR-455-3p	CAGTCCAT	13893	13900	8
hsa-miR-455-5p	TGTGTGCCTT	15641	15650	10
hsa-miR-455-5p	TCTGTGCCTT	11203	11212	10
hsa-miR-455-5p	TATGTGCTTT	10522	10531	10
hsa-miR-483-3p	CACTCCTC	13536	13543	8
hsa-miR-483-3p	CACTCCTC	10333	10340	8
hsa-miR-483-3p	CACTCCTC	6101	6108	8
hsa-miR-486-5p	TCATGTACT	9835	9843	9
hsa-miR-486-5p	TCCTGTCCT	6526	6534	9
hsa-miR-487a	AATCATAACAG	12829	12838	10
hsa-miR-487a	AATCATAACAG	933	942	10
hsa-miR-491-5p	AATGGGGAAG	14975	14984	10
hsa-miR-491-5p	AGAGGGGACC	12315	12324	10
hsa-miR-491-5p	AGTTGGGCAC	11555	11564	10
hsa-miR-491-5p	AGTAGAGAAC	6909	6918	10
hsa-miR-491-5p	GGTGAGGAAC	6005	6014	10
hsa-miR-491-5p	AGCGGGGCAC	4455	4464	10
hsa-miR-491-5p	AGTGGGAAAT	3846	3855	10
hsa-miR-496	TTAGTATTA	10948	10956	9
hsa-miR-496	TGAGTATAA	10768	10776	9
hsa-miR-496	TCAGTATTA	9666	9674	9
hsa-miR-501-3p	ATGCATCAGG	15547	15556	10
hsa-miR-501-3p	ATCCACCGGG	11497	11506	10
hsa-miR-501-3p	AGGCACCAAGG	2089	2098	10

10

20

30

40

hsa-miR-504	AGACCCCTGT	15325	15333	9
hsa-miR-504	AGCCCCTGG	12898	12906	9
hsa-miR-504	AGTCCCTGG	10591	10599	9
hsa-miR-504	AGACCCGGG	4767	4775	9
hsa-miR-508-3p	TGATTATAGC	13565	13574	10
hsa-miR-508-3p	TGAGTGTAGC	3231	3240	10
hsa-miR-512-3p	CAGTGCTGTC	13211	13220	10
hsa-miR-512-3p	AAGTGCTCTC	7688	7697	10
hsa-miR-512-3p	AAGTGCTCTC	3184	3193	10
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	14255	14261	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	13591	13597	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	12291	12297	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	6652	6658	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	5067	5073	7
hsa-miR-514a-3p	TTGACTCTT	14406	14414	9
hsa-miR-514a-3p	TTGACAGTT	13870	13878	9
hsa-miR-514a-3p	TTAACACTT	11237	11245	9
hsa-miR-514a-3p	ATGACACTT	10617	10625	9
hsa-miR-515-3p	GTGTGCCTT	15641	15649	9
hsa-miR-515-3p	GACTGCCTT	15539	15547	9
hsa-miR-515-3p	GAGTGACTT	1371	1379	9
hsa-miR-516a-3p	TGCTTCCT	10301	10308	8
hsa-miR-517a-3p	ATGGTGCATT	15650	15659	10
hsa-miR-517a-3p	ATCTTGCTTC	10303	10312	10
hsa-miR-519b-3p	AAAGTGCAT	13782	13790	9
hsa-miR-519e-3p	AAGTGCCTC	7048	7056	9
hsa-miR-520a-5p	CTCCAGATGG	6274	6283	10
hsa-miR-545	CAGCAAGCACT	15050	15060	11
hsa-miR-545	CAGAACACATT	11639	11649	11
hsa-miR-545	CTGCAAACACT	3450	3460	11
hsa-miR-549	TGACAACGT	14327	14336	10
hsa-miR-551b-3p	GCTACCCAT	2411	2419	9
hsa-miR-552	CACAGGTGA	15130	15138	9
hsa-miR-552	AACAGGTCA	11407	11415	9
hsa-miR-552	AACATGTGA	9513	9521	9
hsa-miR-552	AACAGGTTA	2441	2449	9
hsa-miR-552	AACAGGTAA	1569	1577	9
hsa-miR-583	AAAAGAGGA	2921	2929	9
hsa-miR-583	CAAATAGGA	2833	2841	9
hsa-miR-583	CAACGAGGA	1824	1832	9

10

20

30

40

hsa-miR-583	CAAAGAAGA	1139	1147	9
hsa-miR-593-3p	TGTCTCTGT	8204	8212	9
hsa-miR-593-3p	TGGCTCTGC	6852	6860	9
hsa-miR-593-3p	TGCCTCTGC	231	239	9
hsa-miR-593-5p	AGGCACCAG	2090	2098	9
hsa-miR-593-5p	AGGCACCAG	2083	2091	9
hsa-miR-598	ACGTCATC	11432	11439	8
hsa-miR-611	GCGAGGTCTC	4779	4788	10
hsa-miR-611	GAGAGGCCCC	2121	2130	10
hsa-miR-611	GAGAGGACCT	1546	1555	10
hsa-miR-616-5p	ACTCTAAC	14510	14518	9
hsa-miR-619	GACCTGGA	5824	5831	8
hsa-miR-620	ATGAATATAG	14560	14569	10
hsa-miR-620	ATGGAAATAT	12111	12120	10
hsa-miR-620	TTGGATATAG	11026	11035	10
hsa-miR-620	GTGGAGATGG	10397	10406	10
hsa-miR-620	ATGGAGATCC	6268	6277	10
hsa-miR-620	ATGGAGGGAG	5626	5635	10
hsa-miR-620	CTGGAGAAAG	3827	3836	10
hsa-miR-620	ATCCAGATAG	2959	2968	10
hsa-miR-620	ATGGGGCTAG	2843	2852	10
hsa-miR-620	AGGGAGAGAG	1551	1560	10
hsa-miR-620	CAGGAGATAG	1430	1439	10
hsa-miR-620	TTGGAGAGAG	1201	1210	10
hsa-miR-623	TCCCTTGC	8306	8313	8
hsa-miR-623	TCCCTTGC	5004	5011	8
hsa-miR-631	CACCTGGCC	9900	9908	9
hsa-miR-631	GACATGGCC	8632	8640	9
hsa-miR-634	AACCAGCAC	4520	4528	9
hsa-miR-636	TGTGCTTG	10386	10393	8
hsa-miR-638	ACGGAGCGCG	4905	4914	10
hsa-miR-638	AGGGAGGGCG	4615	4624	10
hsa-miR-642a-5p	ATCCCTCTC	8983	8991	9
hsa-miR-642a-5p	GTCCCTCCC	4722	4730	9
hsa-miR-643	ACATGCATGC	15553	15562	10
hsa-miR-643	CCTTGTAGGC	15378	15387	10
hsa-miR-643	TCTTGTATT	14423	14432	10
hsa-miR-643	ACTGGTATGT	13933	13942	10
hsa-miR-643	ACTTCTATT	12886	12895	10
hsa-miR-643	ACTTTCTGC	12044	12053	10

10

20

30

40

hsa-miR-643	GCTTGTAAAGC	11698	11707	10
hsa-miR-643	AGTTGTATGT	10531	10540	10
hsa-miR-643	ACTTGGAAAGC	8105	8114	10
hsa-miR-643	ACTTGTGTGG	7227	7236	10
hsa-miR-643	ACTTGTGTTGA	1880	1889	10
hsa-miR-643	ACATGTTTGC	1695	1704	10
hsa-miR-650	AGGAGGCAC	9647	9655	9
hsa-miR-650	AGAAGGCAG	6917	6925	9
hsa-miR-650	AGGAGCCAG	3474	3482	9
hsa-miR-650	ATGAGGCAG	3052	3060	9
hsa-miR-651	TCATGATAAG	15700	15709	10
hsa-miR-651	TTAGGTTAAA	13993	14002	10
hsa-miR-651	TTAAAATAAG	13988	13997	10
hsa-miR-651	TTAGCATAAC	12788	12797	10
hsa-miR-651	TTATGATGAG	12617	12626	10
hsa-miR-651	TTTGGATGAG	11069	11078	10
hsa-miR-651	TGAGTATAAG	10767	10776	10
hsa-miR-651	TTACAATAAG	10546	10555	10
hsa-miR-651	TAAGGATAAA	8265	8274	10
hsa-miR-651	TGTGGATAAG	7222	7231	10
hsa-miR-651	GTAGGATAAG	5553	5562	10
hsa-miR-651	CTAGGAAAAG	2823	2832	10
hsa-miR-651	CTATGATAAG	1635	1644	10
hsa-miR-651	TAAGGATAGG	1562	1571	10
hsa-miR-654-3p	TATGTATACT	15493	15502	10
hsa-miR-654-3p	TATCTCTTCT	14775	14784	10
hsa-miR-654-3p	TCTATCTGCT	8354	8363	10
hsa-miR-654-3p	AATGTCTGGT	6720	6729	10
hsa-miR-654-3p	TATGTTTCCT	6638	6647	10
hsa-miR-654-3p	TTTTTCTGCT	6586	6595	10
hsa-miR-654-3p	TATGTCTTTT	6534	6543	10
hsa-miR-654-3p	TATATCTGCA	6214	6223	10
hsa-miR-654-3p	TATGTAGGCT	97	106	10
hsa-miR-655	GTAATACAT	15593	15601	9
hsa-miR-655	ATAGTACAT	4200	4208	9
hsa-miR-655	ATAAGACAT	3642	3650	9
hsa-miR-655	ATAATACAG	2265	2273	9
hsa-miR-655	ACAATACAT	1757	1765	9
hsa-miR-656	AATATTATA	657	665	9
hsa-miR-664-3p	TATTCATTTC	9385	9393	9

10

20

30

40

hsa-miR-765	TGGAGGA	5020	5026	7
hsa-miR-766	CTCCAGCCCC	12901	12910	10
hsa-miR-766	CTCCAGCCCC	5032	5041	10
hsa-miR-767-3p	CCTGCTCAT	14871	14879	9
hsa-miR-767-3p	TCTTCTCAT	9155	9163	9
hsa-miR-875	CCTGGAAATA	5820	5829	10
hsa-miR-875	CCTAGAAACA	5294	5303	10
hsa-miR-876	TGGATTCT	6366	6374	9
hsa-miR-876	TGGATTCT	142	150	9
hsa-miR-888-3p	GACTGACTCC	15772	15781	10
hsa-miR-888-3p	GACTGACAGC	9119	9128	10
hsa-miR-890	TACTTGGAAG	8106	8115	10
hsa-miR-940	AAGGCAGTG	1807	1815	9
hsa-miR-941	CACCCAGGT	14396	14404	9
hsa-miR-941	CACCCTGCC	13715	13723	9
hsa-miR-941	CACCCCTCT	13128	13136	9
hsa-miR-941	CACTCAGCT	12289	12297	9
hsa-miR-941	CTCCCGGGT	10102	10110	9
hsa-miR-941	CAGCCTGCT	10034	10042	9
hsa-miR-941	CACCCACCT	9904	9912	9
hsa-miR-941	CACCTGGCC	9900	9908	9
hsa-miR-941	CATCTGGCT	8219	8227	9
hsa-miR-941	CACTCGACT	8148	8156	9
hsa-miR-941	CTCCCAGCT	6840	6848	9
hsa-miR-941	CTCACGGCT	6031	6039	9
hsa-miR-941	CAGCCCGCT	5928	5936	9
hsa-miR-941	CACCTGACT	5510	5518	9
hsa-miR-941	CACGCCGCT	5142	5150	9
hsa-miR-941	CTCCCTGCT	3983	3991	9
hsa-miR-941	CACCAAGCA	2087	2095	9
hsa-miR-941	CTCCCGGGT	390	398	9
hsa-miR-941	CACCCAGCC	186	194	9
hsa-miR-941-2	ATCCGACTGT	9657	9666	10
hsa-miR-941-2	TCCCTGCTGT	8726	8735	10
hsa-miR-941-2	TCCCAGCTGT	6838	6847	10
hsa-miR-941-2	AGCCCGCTGT	5926	5935	10
hsa-miR-941-2	ACCCGGGCGT	4764	4773	10
hsa-miR-1179	AAGTATCCTTT	15346	15356	11
hsa-miR-1179	ATGCATTCTGT	3357	3367	11
hsa-miR-1179	ATGCATTCTCT	1854	1864	11

10

20

30

40

hsa-miR-1207-5p	TGGCAGGG	11441	11448	8
hsa-miR-1224-3p	CTCCACCTCC	399	408	10
hsa-miR-1228-3p	TCCCACCTG	13637	13645	9
hsa-miR-1228-3p	TCACGCCTG	4992	5000	9
hsa-miR-1231	GTGTCTGGC	12807	12815	9
hsa-miR-1231	GTGTCCGGG	4739	4747	9
hsa-miR-1245	AAGTGATCT	8341	8349	9
hsa-miR-1245	AAGTGATCT	2020	2028	9
hsa-miR-1249	CGCCCTTC	5907	5914	8
hsa-miR-1251	ACTCTAGGT	12854	12862	9
hsa-miR-1251	ACTCTATCT	8357	8365	9
hsa-miR-1251	ACTCCAGCT	4044	4052	9
hsa-miR-1251	AGTCTAGCT	457	465	9
hsa-miR-1252	AGAGGGAAAT	3819	3828	10
hsa-miR-1252	GGAAGGAAAT	1625	1634	10
hsa-miR-1268	CGGGCGTGG	4762	4770	9
hsa-miR-1270	CTGGAAATA	5820	5828	9
hsa-miR-1270	CTGGAGATG	5055	5063	9
hsa-miR-1270	CTGGAGAAA	3828	3836	9
hsa-miR-1270	CAGGAGATA	1431	1439	9
hsa-miR-1272	GATGATGA	10622	10629	8
hsa-miR-1275	GTAGGGGAGA	1189	1198	10
hsa-miR-1302	ATGGGACACA	15021	15030	10
hsa-miR-1302	TTTGGATATA	11027	11036	10
hsa-miR-1302	TTAGGGCATA	8421	8430	10
hsa-miR-1302	TTGGAACAGA	6076	6085	10
hsa-miR-1302	CTGGGACTTA	4819	4828	10
hsa-miR-1302	GTGGGAAATA	3845	3854	10
hsa-miR-1302	TTGTGAGATA	1944	1953	10
hsa-miR-1302	CTGGGAAATA	867	876	10
hsa-miR-1324	TCAAGACAGA	9426	9435	10
hsa-miR-1827	TGAGGCAGT	3051	3059	9
hsa-miR-1911-3p	CACCAGGCA	2087	2095	9
hsa-miR-1915	CCCCAGGG	5111	5118	8
hsa-miR-2909	TTTAGGGGCC	3728	3736	9

## 【0202】

B2. UCP2を含む別の例示的な複数miRNA 1 mRNAのパラダイム

UCP2は、WAT、骨格筋、臍島、および中枢神経系において発現されるミトコンドリア輸送タンパク質である。UCP1と同様に、これはミトコンドリア内膜を介してプロトン漏出を生じ、ひいてはATP合成から酸化的リン酸化を切り離す（適応熱発生、図5を参照されたい）(Lowell et al., *Nature* (2000))。

## 【0203】

2つの最近のメタ解析は、UCP2のプロモーター領域における多型と肥満との関連性を報告している(Liu et al., *Gene* (2013); Andersen et al., *Int. J. Obes.* (2013))。第1のメタ解析は14の試験(7,647例の症例および11,322例の対照)を含み、特にヨーロッパ人集団において、UCP2 -866G/A多型のA対立遺伝子と肥満のリスク低下との有意な関連性があると結論づけた。12,984名の対象を含む第2のメタ解析において、一般的なUCP2 -866

10

20

30

40

50

G対立遺伝子は肥満と関連している。この同じUCP2 -866G対立遺伝子は、17,636名のデンマーク人対象においてインスリン感受性の低下と関連している。ある試験において、内臓脂肪におけるUCP2 mRNAレベルは、GG表現型を有する対象において低下していた (Esterbauer et al., Nat. Genet. (2001))。別の試験において、皮下脂肪細胞UCP2 mRNAと体脂肪率との負の相関関係の傾向が見出された (Wang et al., American Journal of Physiol. (2004))。この情報は、適応熱発生に変化を起こし、その結果としてヒト肥満を治療するための有意義な方法として、UCP2の発現および活性を標的化することを支持する。この目的を果たすために多くの戦略を実行することができるが、本発明の方法で使用される戦略では、miRNA剤を用いて熱発生経路内のいくつかのエレメントを同時に調節して、UCP2の合成および活性を増加させる。miRNAとUCP2遺伝子との間の直接的相互作用および間接的相互作用の両方が考慮される。直接的相互作用とは、UCP2遺伝子の様々な領域に対するmiRNAの直接結合を意味し、これによってUCP1 mRNAの転写、翻訳、安定性、および／または分解の変化が起こる。間接的相互作用とは、miRNAが熱発生mRNAの転写、翻訳、安定性、および／または分解を変化させ、その熱発生mRNAの発現されたタンパク質がUCP2遺伝子の転写を変更することを意味する。さらに、間接的相互作用とは、miRNAが、UCP2遺伝子の転写を変更する他のmiRNAの転写、翻訳、安定性、および／または分解を変化させることを意味する。

10

#### 【0204】

ヒトUCP2遺伝子 (ENSG00000175567、ヒト脱共役タンパク質2 (ミトコンドリア、プロトン担体) (UCP2)、第11染色体上のRefSeqGene) のプロモーター領域は、調節エレメントモチーフが豊富である (表12)。

20

#### 【0205】

(表12) UCP2遺伝子調節エレメント

	調節エレメントの名称	配列	数	ヌクレオチド位置
1	<b>RXR/T3RE</b>	AGGTCA	8	1,074～1,079; 3,083～3,088; 3,239～3,244; 4,304～4,309; 6,965～6,970; 7,420～7,425; 7,677～7,682; 13,319～13,324
2	<b>GC ボックス 1</b>	CGCCC	16	2,605～2,609; 4,323～4,327; 4,523～4,527; 4,933～4,937; 4,959～4,963; 5,048～5,052; 5,066～5,070; 5,146～5,150; 5,155～5,159; 5,387～5,391; 5,483～5,487; 6,067～6,071; 8,523～8,527; 9,790～9,794; 10,819～10,823; 11,754～11,758
3	<b>GC ボックス 2</b>	GCGGG	5	4,263～4,267; 4,757～4,761; 4,860～4,864; 7,619～7,623; 11,262～11,266
4	<b>GT ボックス 1</b>	CACCC	30	1,421～1,425; 1,677～1,681; 1,761～1,765; 1,825～1,829; 1,833～1,837; 2,036～2,040; 3,003～3,007; 4,903～4,907; 4,947～4,951; 5,210～5,214; 6,204～6,208; 6,247～6,251; 6,469～6,473; 6,828～6,832; 7,681～7,685; 8,048～8,052; 8,437～8,441; 8,572～8,576; 8,599～8,603; 8,702～8,706; 11,077～11,081; 11,235～11,239; 12,006～12,010; 12,374～12,378; 13,475～13,479; 13,666～13,670; 13,687～13,691; 13,838～13,842; 14,410～14,414; 14,545～14,549
5	<b>GT ボックス 2</b>	GTGGG	26	123～127; 1,006～1,010; 2,105～2,109; 4,562～4,566; 5,793～5,797; 6,029～6,033; 6,034～6,038; 6,040～6,044; 6,150～6,154; 7,271～7,275; 7,392～7,396; 9,040～9,044; 9,697～9,701; 10,227～10,231; 10,238～10,242; 10,247～10,251; 11,817～11,821; 12,410～12,414; 12,414～12,418; 12,678～12,682; 13,047～13,051; 13,238～13,742; 13,743～13,747; 14,252～14,256; 14,969～14,973; 15,104～15,108
6	<b>CpGメチル化アイランド</b>	CG	295	4,071～5,212

## 【 0 2 0 6 】

図8Bは、15,174塩基対ヒトUCP2遺伝子のヌクレオチド5,001位のUCP2転写開始部位に関するこれらの様々な調節エレメントの位置を示す。miRNAによるこれらの調節エレメントの直接的または間接的な活性化または抑制は、UCP2遺伝子の発現および活性の変化をもたらす。

## 【 0 2 0 7 】

10

20

30

40

50

UCP2 Ensembl 2,113塩基対転写物ENST00000310473を標的として用いて、いくつかの予測プログラムにより、ヒトUCP2 3'UTRを標的化するmiRNAを調査したところ、表13に示されるような、161個のmiRNAに対する結合部位が明らかになった。

## 【0208】

(表13) UCP2転写物配列の3'UTR中に予測される結合部位を有するmiRNA

hsa-miR-1	hsa-miR-1275	hsa-miR-149	hsa-miR-219-1
hsa-miR-1-2	hsa-miR-1276	hsa-miR-150-3p	hsa-miR-219-2
hsa-miR-101-1	hsa-miR-1278	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-221-5p
hsa-miR-101-2	hsa-miR-1285-1	hsa-miR-1538	hsa-miR-23b
hsa-miR-103	hsa-miR-1286	hsa-miR-155	hsa-miR-24-1
hsa-miR-105-1	hsa-miR-1293	hsa-miR-15a	hsa-miR-24-2
hsa-miR-105-2	hsa-miR-1300	hsa-miR-15b	hsa-miR-27b-5p
hsa-miR-106b	hsa-miR-1302-1	hsa-miR-16-1	hsa-miR-28
hsa-miR-107	hsa-miR-1302-10	hsa-miR-16-2	hsa-miR-296-3p
hsa-miR-1204	hsa-miR-1302-11	hsa-miR-184	hsa-miR-296-5p
hsa-miR-1207	hsa-miR-1302-2	hsa-miR-185-3p	hsa-miR-3064
hsa-miR-1208	hsa-miR-1302-3	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-323a
hsa-miR-1226	hsa-miR-1302-4	hsa-miR-186	hsa-miR-328
hsa-miR-1246	hsa-miR-1302-5	hsa-miR-188	hsa-miR-330
hsa-miR-1252	hsa-miR-1302-6	hsa-miR-18a	hsa-miR-331
hsa-miR-1253	hsa-miR-1302-7	hsa-miR-18b	hsa-miR-338
hsa-miR-1255a	hsa-miR-1302-8	hsa-miR-193a	hsa-miR-342
hsa-miR-1255b-1	hsa-miR-1302-9	hsa-miR-195	hsa-miR-3619
hsa-miR-1255b-2	hsa-miR-1303	hsa-miR-199b	hsa-miR-370
hsa-miR-1260a	hsa-miR-130a	hsa-miR-200a	hsa-miR-377
hsa-miR-1262	hsa-miR-1321	hsa-miR-203	hsa-miR-378a
hsa-miR-1263	hsa-miR-138-1	hsa-miR-206	hsa-miR-383
hsa-miR-1265	hsa-miR-138-2	hsa-miR-214	hsa-miR-411

10

20

30

hsa-miR-412	hsa-miR-638	
hsa-miR-422a	hsa-miR-645	
hsa-miR-424	hsa-miR-646	
hsa-miR-425	hsa-miR-647	
hsa-miR-4291	hsa-miR-652	
hsa-miR-432-3p	hsa-miR-654	
hsa-miR-4505	hsa-miR-658	
hsa-miR-450b	hsa-miR-663a	
hsa-miR-453	hsa-miR-663b	
hsa-miR-4533	hsa-miR-664-5p	10
hsa-miR-4539	hsa-miR-675	
hsa-miR-4745	hsa-miR-7-1	
hsa-miR-4747	hsa-miR-7-2	
hsa-miR-485-5p	hsa-miR-7-3	
hsa-miR-486	hsa-miR-708	
hsa-miR-490	hsa-miR-761	
hsa-miR-491	hsa-miR-765	
hsa-miR-493	hsa-miR-769	
hsa-miR-497	hsa-miR-770	
hsa-miR-498	hsa-miR-876	
hsa-miR-503w	hsa-miR-877	
hsa-miR-505	hsa-miR-921	
hsa-miR-508-3p	hsa-miR-922	
hsa-miR-532	hsa-miR-92a-1	
hsa-miR-539	hsa-miR-92a-2-5p	
hsa-miR-541	hsa-miR-92b	
hsa-miR-5481		
hsa-miR-552		30
hsa-miR-563		
hsa-miR-575		
hsa-miR-577		
hsa-miR-580		
hsa-miR-583		
hsa-miR-584		
hsa-miR-608		
hsa-miR-612		
hsa-miR-613		
hsa-miR-615-3p		40
hsa-miR-618		
hsa-miR-625		
hsa-miR-626		
hsa-miR-634		
hsa-miR-635		

## 【 0 2 0 9 】

さらに、5,000 bp 5'UTRを含むヒトUCP2遺伝子（ENSG00000175567、15,174塩基対（bp）を標的として用いて、いくつかの予測プログラムにより、ヒトUCP2 5'UTRを標的化するmiRNAを調査したところ、表14に示されるような、UCP2 5'UTRにおける54個のmiRNAに対する結合部位が明らかになった。

【 0 2 1 0 】

(表14) UCP2遺伝子配列の5'UTR中に予測される結合部位を有するmiRNA

マイクロRNA	シード長	起点	配列	終点	P値
hsa-let-7c	9	3052	UAGAGUUAC	3044	0.0374
hsa-let-7i-3p	9	3051	CUGCGCAAG	3043	0.0374
hsa-miR-1228-5p	9	3419	UGGGCGGGG	3411	0.0374
hsa-miR-1229-3p	9	3419	UCUCACCAC	3411	0.0374
hsa-miR-129-1-3p	10	2784	AGCCCUUACC	2775	0.0095
hsa-miR-1302	9	4219	UGGGACAUA	4211	0.0374
hsa-miR-1303	9	2159	UUAGAGACG	2151	0.0374
hsa-miR-136	9	4486	CUCCAUUUG	4478	0.0374
hsa-miR-155	9	2160	UUAAUGCUA	2152	0.0374
hsa-miR-16	10	3603	UAGCAGCACG	3594	0.0095
hsa-miR-18a-3p	10	3603	ACUGCCCUAL	3594	0.0095
hsa-miR-190	9	2428	UGAUUAUGUU	2420	0.0374
hsa-miR-191	9	3052	CAACGGAAU	3044	0.0374
hsa-miR-192	9	4390	CUGACCUAU	4382	0.0374
hsa-miR-194	9	1643	UGUAACAGC	1635	0.0374
hsa-miR-197	9	5001	UCACCACCU	4993	0.0374
hsa-miR-19b-2-5p	10	3052	AGUUUUGCAG	3043	0.0095
hsa-miR-203	9	3051	UGAAAUGUU	3043	0.0374
hsa-miR-218	10	3603	UUGUGCUUGA	3594	0.0095
hsa-miR-218-1-3p	9	5001	UGGUUCCGU	4993	0.0374
hsa-miR-219-1-3p	9	3614	AGAGUUGAG	3606	0.0374
hsa-miR-26a-2-3p	9	2163	CCUAUUCUU	2155	0.0374
hsa-miR-27a-3p	10	3603	UUCACAGUGG	3594	0.0095
hsa-miR-27a-5p	11	3336	AGGGCUUAGCU	3326	0.0024
hsa-miR-28-5p	10	3603	AAGGAGCUA	3594	0.0095
hsa-miR-331-3p	9	4134	GCCCCUGGG	4126	0.0374
hsa-miR-337-5p	10	115	GAACGGCUUC	106	0.0095
hsa-miR-340-3p	9	1872	CCGUCUCAG	1864	0.0374
hsa-miR-34c-3p	11	2162	AAUCACUAACC	2152	0.0024
hsa-miR-373-5p	11	530	ACUCAAAUUGG	520	0.0024

10

20

30

hsa-miR-425	9	1013	AAUGACACG	1005	0.0374
hsa-miR-497	9	3661	AGCAGCACA	3653	0.0374
hsa-miR-501-5p	9	4164	AUCCUUUGU	4156	0.0374
hsa-miR-505	9	1015	GUCAACACU	1007	0.0374
hsa-miR-508-3p	9	1274	GAUUGUAGC	1266	0.0374
hsa-miR-509-3p	12	2554	UGAUUGGUACGU	2543	0.0006
hsa-miR-512-5p	10	987	ACUCAGCCUU	978	0.0095
hsa-miR-514	9	5001	UUGACACUU	4993	0.0374
hsa-miR-515-5p	9	59	UUCUCCAAA	51	0.0374
hsa-miR-518a-3p	9	19	GAAAGCGCU	11	0.0374
hsa-miR-519e-5p	11	2525	UCUCCAAAAGG	2515	0.0024
hsa-miR-548a-3p	10	680	CAAAACUGGC	671	0.0095
hsa-miR-550a-3p	9	4312	GUCUUACUC	4304	0.0374
hsa-miR-571	9	739	UGAGUUGGC	731	0.0374
hsa-miR-578	9	1377	CUUCUUGUG	1369	0.0374
hsa-miR-606	9	4420	AACUACUGA	4412	0.0374
hsa-miR-615-5p	10	1140	GGGGGUCCCC	1131	0.0095
hsa-miR-638	9	2710	GGGAUCGCG	2702	0.0374
hsa-miR-657	12	1316	GCAGGUUCUCAC	1305	0.0006
hsa-miR-658	9	3673	GGC GGAGGG	3665	0.0374
hsa-miR-877-3p	9	4349	UCCUCUUCU	4341	0.0374
hsa-miR-93-3p	9	799	ACUGCUGAG	791	0.0374
hsa-miR-96-3p	9	799	AAUCAUGUG	791	0.0374
hsa-miR-99b-3p	9	2163	CAAGCUCGU	2155	0.0374

## 【 0 2 1 1 】

## C) 複数マイクロRNA 複数mRNAのパラダイム

表2において選択された83個の熱発生制御因子分子を、高ストリンジエンシーの複数miRNA 複数mRNA関連性についてスクリーニングした。7つの主要な予測ツールによるこれらの解析の結果を図4に示す。これら7つのツールを併せることで、4439個のmiRNA 遺伝子対が得られた。これらのツール間の重複は、ツール数が増加するにつれて減少していく、7つのツールを考慮した場合には、わずか15個のmiRNA 遺伝子対に達した。

## 【 0 2 1 2 】

## D) 同時調節されるmRNA標的の間での1つのマイクロRNAシード配列モチーフの過剰提示のパラダイム

いくつかのアプローチを用いて、経路特異的miRNAを同定することができる。例えば、推定的に同時調節される遺伝子の3'-UTRを、miRNAシード領域に由来する過剰提示される配列について検索することにより、共通の調節性miRNAを同定することができる。特定のmiRNAシード配列が、選択された83個の熱発生標的の3' UTRの間で過剰提示されるかどうかを判定するために、miRvestigatorウェブアプリケーション (miRvestigator. systemsbiology.net/) を使用した。以下のパラメータ（モチーフサイズ8 bp、デフォルトWeederモデル、シードモデル8mer、100%の相補性相同性、および0.25のゆらぎ塩基対許容）を用いて、hsa-miR-19a/19bによって認識されるモチーフ5'-UUUGUACA-3'が、表15に示されるように $1.7 \times 10^{-4}$ の相補性p値を有して、83個の熱発生標的のうちの15個の間で過剰提示されると判断された。注目すべきことは、hsa-miR-19が豊富なヒト脂肪細胞miRNAとして報告されていることである。

## 【 0 2 1 3 】

(表15) 共通モチーフUUUGUACAとhsa-miR-19a/19bとの間の相補性

10

20

30

40

50

miRNA名	miRNAシークエンス(ナントリル)	相補性の長さ	相補的配列内容	相補性P値
hsa-miR-19a hsa-miR-19b	UGUGCAAA	8mer	8 モチーフ 5' UUUGGUACA 3' 3' AAGCGGUGU 5' mXXXX シード	1.7e-04

## 【 0 2 1 4 】

miRvestigatorによって同定されたhsa-miR-19 mRNA/miRNA二重鎖の最小自由エネルギーは極めて低く、堅固な結合を支持する。したがって、相補性のより低いストリンジェントレベルを用いて、miRvestigator解析を繰り返した。この解析により、コンセンサスhsa-miR-19モチーフと95%の類似性を有するさらなる10個の付加的な標的（CEBPD、PRKAA1、TWIST1、IRS1、NCOA1、NCOA2、NCOA3、KLF5、RPS6KB1、NRIP1）が同定された。興味深いことに、hsa-miR-19は、脂肪組織中で最も豊富なmiRNAの中の1つである。hsa-miR-19シード領域と相補的な配列を含むとして同定された遺伝子を、表16に記載する。

10

## 【 0 2 1 5 】

(表16) hsa-miR-19の標的として同定された熱発生制御因子

遺伝子	遺伝子記号	部位の配列	終止コードなしに 大さな読点 (BD)	コンピュータ予測スコアに対する 類似性(%) (算出中)	mRNA-miRNA二重鎖の 最小自由エネルギー (MFE)
882	BMP2	UUUGUACA	386	100.00	-6.80
3952	CEBPD	UUUGUAAA	263	95.44	-3.40
2132	TNFRSF1A	UUUGUACA	510	100.00	-6.80
6662	PRKAA1	UUUGUAAA	2400	95.44	-3.40
6663	PRKAA2	UUUGUACA	542	100.00	-6.80
6355	BMP7	UUUGUACA	1927	100.00	-6.80
832	BMP4	UUUGUACA	770	100.00	-6.80
133522	PPARGC1B	UUUGUACA	7199	100.00	-6.80
2474	WNT5A	UUUGUACA	1414	100.00	-6.80
6720	SREBF1	UUUGUACA	510	100.00	-6.80
2321	TWIST1	UUUGUAAA	649	95.44	-3.40
2682	IRS1	UUUGUAAA	992	95.44	-3.40
10492	NCOA2	UUUGUAAA	1381	95.44	-3.40
8301	NRIP1	UUUGUACA	1718	100.00	-6.80
8204	NRIP1	UUUCUAAA	1935	95.44	-3.40
8202	NCOA3	UUUGUAAA	965	95.44	-3.40
1385	CREB1	UUUGUAAA	1973	95.44	-3.40
1386	CREB1	UUUGUACA	2822	100.00	-6.80
1385	CREB1	UUUGUACA	2822	100.00	-6.80
1385	CREB1	UUUGUAAA	4175	95.44	-3.40
3843	INSR	UUUGUAAA	2105	95.44	-3.40
8012	NR4A3	UUUGUACA	2347	100.00	-6.80
860	RUNX2	UUUGUACA	2425	100.00	-6.80
3275	STAT5A	UUUGUACA	1214	100.00	-6.80
1874	E2F4	UUUGUACA	755	100.00	-6.80
869	KLF5	UUUGUAAA	549	95.44	-3.40
8648	NCOA1	UUUGUAAA	381	95.44	-3.40
8138	RPS6KB1	UUUGUAAA	2531	95.44	-3.40

## 【 0 2 1 6 】

したがって、相補性のより低いストリンジエントレベルを用いて、miRvestigator解析を繰り返した（モチーフサイズ8 bp、デフォルトWeederモデル、シードモデル8mer、95%の相補性相同性、および0.25のゆらぎ塩基対許容）。この解析により、コンセンサスhsa-miR-19モチーフと95%の類似性を有するさらなる10～12個の付加的な標的（CEBPD、CREB1、PRKAA1、TWIST1、INSR、IRS1、NCOA1、NCOA2、NCOA3、KLF5、RPS6KB1、NRIP1）が同定された。興味深いことに、hsa-miR-19は、脂肪組織中で最も豊富なmiRNAの中の1つである。hsa-miR-19シード領域と相補的な配列を含むとして同定された遺伝子を、表17に記載す

10

20

30

40

50

る。

【 0 2 1 7 】

(表17) コンセンサスモチーフと95%～100%の類似性を有する、hsa-miR-19a/bの標的として同定された熱発生制御因子

遺伝子	遺伝子記号	部位の配列	終止コトノンに 対する起点 (bp)	コンセンサスモチーフに対する 類似性(%) (値二重) [十分]	miRNA-前iRNA二重鎖の 最小自由エネルギー (MFE)
636	BMP2	UUUGUACA	386	100.00	-6.80
3022	CEBPD	UUUGUAAA	263	95.42	-3.40
7132	TNFRSF1A	UUUGUACA	510	100.00	-6.80
4040	LRP6	UUUGUACA	151	100.00	-6.80
4040	LRP6	UUUGUAAA	4965	95.42	-3.40
3382	PRKAA1	UUUGUAAA	2400	95.42	-3.40
5582	PRKAA2	UUUGUACA	542	100.00	-6.80
636	BMP7	UUUGUACA	1927	100.00	-6.80
632	BMP4	UUUGUACA	770	100.00	-6.80
133522	PPARGC1B	UUUGUACA	7193	100.00	-6.80
3874	E2F4	UUUGUACA	755	100.00	-6.80
7474	WNT5A	UUUGUACA	1414	100.00	-6.80
9320	SREBF1	UUUGUACA	510	100.00	-6.80
1331	TWIST1	UUUGUAAA	649	95.42	-3.40
3367	IRS1	UUUGUAAA	992	95.42	-3.40
10402	NCOA2	UUUGUAAA	1381	95.42	-3.40
8004	NRIP1	UUUGUACA	1718	100.00	-6.80
8204	NRIP1	UUUGUAAA	1935	95.42	-3.40

10

20

30

8203	NCOA3	UUUGUAAA	965	95.42	-3.40
8643	INSR	UUUGUAAA	2105	95.42	-3.40
8233	NR4A3	UUUGUACA	2347	95.50	-5.80
6778	STAT5A	UUUGUACA	1214	95.50	-5.80
888	KLF5	UUUGUAAA	549	95.42	-3.40
8848	NCOA1	UUUGUAAA	381	95.42	-3.40
889	RUNX2	UUUGUACA	2425	95.50	-5.80
1585	CREB1	UUUGUAAA	1973	95.42	-3.40
1385	CREB1	UUUGUACA	2822	95.50	-5.80
1385	CREB1	UUUGUAAA	4175	95.42	-3.40
8198	RPS6KB1	UUUGUAAA	2531	95.42	-3.40

10

20

30

## 【0218】

ゆらぎがない場合には、この同じモチーフ5'-UUUGUACA-3'は、 $1.4 \times 10^{-4}$ の相補性p値を有して、hsa-miR-1283の標的の間で過剰提示される。さらに、hsa-miR-1283は、ABCA1（コレステロール輸送体）、アディポネクチン受容体、および遺伝性ヒト肥満に関与する転写因子TCF7L2のような関心対象の他のmRNAに結合する。

## 【0219】

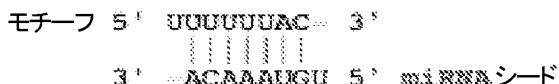
同様に、脂肪細胞において発現されるmiRNAについて、その他のmiRNA過剰提示シード配列が同定された。数例を挙げると、それらには、ユニバーサルhsa-let-7ファミリー（配列CUAUACAA、p値 = 7.5e-04）および脂肪細胞リッチhsa-miR-30ファミリー（配列UGUAAAC A、p値 =  $1.9 \times 10^{-3}$ ）が含まれる。

## 【0220】

STRINGソフトウェアパッケージに準じてUCP1と直接関係があるPRDM16、CIDEA、NRIP1、KDM3A、CEPPB、PPARG、PPARGC1A、およびPPKAA2について、それらはすべて、以下のようにhsa-miR-3658（p値 = 1.9e-003）およびhsa-miR-30ファミリー（p値 = 6.3e-003）を含むいくつかのmiRNAとコンセンサス配列を共有する（モチーフサイズ8 bp、デフォルトWeederモデル、シードモデル8mer、95%の相補性相同性、および0.25のゆらぎ塩基対許容について）と考えられる。

**hsa-miR-3658:****hsa-miR-30a/b/c/d/e:**

10

**【0 2 2 1】****E) イントロンmiRNA 複数mRNAの経路特異的パラダイム**

多くの哺乳動物miRNAは、それら自体の特有の転写単位よりもむしろ、タンパク質コード遺伝子のイントロン内に位置する。イントロンmiRNAは典型的に、それらが属する前駆体mRNAと共に発現され、プロセシングされる。イントロンmiRNAおよびそれらの宿主遺伝子は独立して調節され得るが、イントロンmiRNAは、宿主遺伝子のUTRを標的化することによって、それ自体の宿主タンパク質コード遺伝子を下方制御することができる。宿主タンパク質コード遺伝子に対するフィードバック調節は、miRNA標的である転写因子を選択することによって、またはイントロンmiRNA宿主遺伝子産物とmiRNA標的遺伝子産物とのタンパク質間相互作用によって達成することができる。一例として、miR-33はSREBP宿主遺伝子と協調して作用してコレステロール恒常性を制御し、miR-33aおよびmiR-33bの薬理学的阻害は、脂質異常症の治療のために血漿HDLレベルを上昇させかつ血漿VLDLトリグリセリドレベルを低下させるための有望な治療戦略である。

20

**【0 2 2 2】**

83個の熱発生標的遺伝子の調査により、2つのイントロンmiRNA：PPARGC1B遺伝子中に位置するmiR-378およびPRDM16遺伝子中に位置するmiR-4251が明らかになった。

30

**【0 2 2 3】**

miRNA標的を予測するインターネットツールのマイニングによって、miR-378標的には、BMP2、PPARA、PPARGC1A、PRDM16、STAT5、およびWNT10A、ならびにADIPOQおよびIGFR1が含まれること；ならびにmiR-4251標的には、BMP2、CTBP1、CTBP2、MAPK14、NCOA3、PLAC8、PPARA、PPARD、TRPM8、ならびにABCA5、ABCA13、ADIPOQR2、KDM5B、KLF-12、KLF-14、およびTCF7L2が含まれることが示される。

40

**【0 2 2 4】****実施例3. ハイコンテンツ細胞表現型スクリーニング**

ハイコンテンツスクリーニング法を用いて、熱発生制御因子（例えば、UCP1およびUCP2）の活性を調節する新規miRNA剤をスクリーニングする。ハイコンテンツスクリーニングは、分子の発見を容易にするために生細胞の画像を使用する、薬物発見の方法である。このような自動画像ベースのスクリーニング法は、細胞表現型を変化させる薬剤を同定するのに特に適している。

**【0 2 2 5】**

WAT細胞は大きな脂肪滴を含むのに対して、BAT細胞は多くのより小さな液滴およびはるかにより多くのミトコンドリアを含み、BAT細胞は鉄を含むために褐色に見える。BAT中の多数のミトコンドリアは、WATと比較して酸素消費の増加を招く。したがって、これらの細胞表現型に基づいて、BAT細胞とWAT細胞を識別することが可能である。

**【0 2 2 6】**

したがって、ハイコンテンツスクリーニング法を用いて、熱発生制御因子の活性を調節

50

する新規miRNA剤をスクリーニングした。具体的には、miRNAアゴニストまたはアンタゴニストの存在下および非存在下で増殖させた培養ヒト脂肪細胞および脂肪組織由来間葉系幹細胞の表現型の様子を、培養細胞の位相差顕微鏡観察、細胞脂質含量（オイルレッドO染色またはナイルレッド蛍光を使用）；ミトコンドリア含量（例えば、Life Technologies Mito-Tracker Red FMを使用）、および／またはインビトロでの酸素消費（例えば、Seahorse Bioscience Extra-Cellular Flux Instrumentを使用）の測定により、2週間にわたって評価した。mRNA発現は、標的化q-RT-PCR、NanoString、およびユニバーサルRNA配列決定によって測定する。タンパク質発現は、標的化ウェスタンプロットティングおよびユニバーサルプロテオミクスプロファイリングによって測定する。

## 【0227】

10

## A. ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化

## 1. 分化プロトコール

ヒト前脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化に及ぼすmiRNA類似体の効果を評価するために、ヒト皮下前脂肪細胞（8匹の雌ドナー由來のSuperLot 0048、ZenBio、NC）を0日目に96ウェルプレートにプレーティングし、前脂肪細胞培地（DMEM/Ham's F-12（1:1、v/v）、HEPES緩衝液、ウシ胎仔血清、および抗生物質）中で一晩付着させた。翌日（1日目）、培地を除去し、分化培地（DMEM/Ham's F-12（1:1、v/v）、100 μMアスコルビン酸、0.85 μMインスリン、20 nM亜セレン酸ナトリウム、0.2 nMトリヨードチロニン、1 μMデキサメタゾン、100 μMイソブチルメチルキサンチン、100 nMロシグリタゾン、および抗生物質と交換した。細胞を37 °C、5% CO<sub>2</sub>にて2日間インキュベートした。2日後（3日目）、培地を除去し、新鮮な維持培地（DMEM/Ham's F-12（1:1、v/v）、100 μMアスコルビン酸、0.85 μMインスリン、20 nM亜セレン酸ナトリウム、0.2 nMトリヨードチロニン、および抗生物質）と交換した。3日目に、トランスフェクション剤Dharmafect1を用いて、細胞にmiRNA類似体（Dharmacon特異的miRIDIAN模倣物およびヘアピン阻害剤）をトランスフェクトした。処理はすべて3つ組で行った。トランスフェクション後、陰性対照は維持培地のみであり、陽性対照は、100 nMのPPARGアゴニストであるロシグリタゾンを含む維持培地であった。2日後、培地を除去し、新鮮な維持培地と交換した。その後、処理期間の終了時（15日目）まで2日ごとに維持培地を交換した。処理（合計15日間の培養）の終了時に、表現型決定および遺伝子型決定スクリーニングのために細胞を処理した。

20

## 【0228】

30

## 2. 前脂肪細胞のトランスフェクション

miRNA類似体の標的細胞への浸透を促進するために、トランスフェクション試薬を使用する。一例として、本発明者らがトランスフェクション剤Dharmafect 1（Dharmacon、CO）を用いて前脂肪細胞において達成したトランスフェクション効率の程度を、本明細書に示す。トランスフェクション効率は2つの方法で評価した：

## a. 蛍光miRNA類似体を用いたトランスフェクション後の細胞の落射蛍光の測定

Dy547標識された非標的指向miRIDIAN模倣物およびヘアピン阻害剤（100 nM）を3日目にトランスフェクトした細胞において、15日目に蛍光を測定した（540励起 / 590放射）。図9に示されるように、トランスフェクションの12日後でさえ、蛍光miRNA類似体をトランスフェクトした細胞の有意により高い蛍光が認められた：

40

## b. 対照遺伝子発現の減少

前脂肪細胞のトランスフェクションの成功を確認するために、対照遺伝子GAPDH（「八ウスキーピング遺伝子」）の発現の減少を、GAPDH特異的siRNAを前脂肪細胞にトランスフェクトしてから4日後（7日目）（図10A）および12日後（15日目）（図10B）に測定した。細胞溶解物を得て、Cells-to-Ct試薬によって得られた純粋RNAを用いてRT-PCRを行った。図10Aおよび10Bに示されるように、トランスフェクション後の4日目および12日目に、GAPDH mRNA発現の91%および86%のノックダウンが観察され、いずれも高度に有意であった。

## 【0229】

40

## 3. ヒト前脂肪細胞が脂肪細胞に分化する過程における表現型変化

処理（15日間の培養）の終了時に、脂質含量を評価するために細胞をオイルレッドOで

50

染色した。図11A～Fに示されるように、ロシグリタゾンを含まない培地の存在下では、前脂肪細胞は、脂質を負荷した成熟脂肪細胞への分化をほとんど示さなかった。2日間にわたり100 nMロシグリタゾンを含む分化培地、およびその後12日間にわたり維持培地が存在した場合（陰性対照）、脂質を負荷した成熟脂肪細胞へのいくらかの分化が認められる。実験を通して100 nMロシグリタゾンが存在した場合（陽性対照）、細胞の大部分が、脂質を負荷した成熟脂肪細胞になった。一例として、25 nM hsa-miR-30b模倣物の存在下では、細胞の約半数が、脂質を負荷した成熟脂肪細胞になった。非標的指向miRNA模倣物および阻害剤は、陰性対照と同様のパターンを示した。

## 【0230】

## 4. ヒト前脂肪細胞が脂肪細胞に分化する過程における遺伝子型変化

10

ロシグリタゾンまたはmiRNA類似体によって誘導されるヒト前脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化中に起こるmRNA変化のプロファイリングを、RNA-Seq技術により行った。低分子RNA配列決定（RNA-Seq）は、現在、事前の配列情報も二次構造情報も必要とせずに、公知および未知の全低分子RNAのトランスクリプトーム全域にわたるプロファイリングを可能にするハイスループット次世代配列決定プラットフォームである。

## 【0231】

前脂肪細胞（前脂肪細胞陰性対照）から、および100 nMロシグリタゾン（分化陽性対照）または25 nM miRNA模倣物もしくは阻害剤の存在下で12日間培養した前脂肪細胞から、RNA試料を抽出した。Illumina Hi-Seq 2000装置において、RNA配列決定を実施した。その結果をヒトゲノム19 (<http://genome.ucsc.edu/>) に対してマッピングした。miRNA類似体の存在下では、前脂肪細胞を参照した場合に313～449個のmRNAが有意に差次的に発現されると考えられる。ロシグリタゾンを参照した場合、有意に差次的に発現される遺伝子の数は111～216個減少し、よってmiRNAとPPARG類似体との間の脂肪細胞分化の活性化の共通経路が示唆される。

20

## 【0232】

本発明者らの83個の熱発生活性化因子および阻害因子に関して、それらのうちの73個の発現が、ロシグリタゾンまたはmiRNA類似体の存在下で変化する。ロシグリタゾン（図12A）、またはmiRNA類似体hsa-let-7a阻害剤、hsa-miR-1模倣物、hsa-miR-19b模倣物、hsa-miR-30b模倣物の存在下、または対照脂肪細胞における熱発生標的のmRNA発現の変化をそれぞれ図12B～Fに示す）。

30

## 【0233】

以下の表18に示されるように、UCP1、2、および3のmRNA発現の変化もまた、ロシグリタゾンまたはmiRNA類似体の存在下で測定した。

## 【0234】

（表18）熱発生mRNA発現の変化

薬剤	mRNA発現変化（対数比）		
	UCP1	UCP2	UCP3
ロシグリタゾン	15.70	263	0.26
hsa-let-7a 阻害剤	2.23	173	0.65
hsa-miR-1 模倣物	0.41	110	0.40
hsa-miR-19b 模倣物	0.18	33	0.26
hsa-miR-30b 模倣物	0.76	119	0.28
前脂肪細胞におけるベースラインレベル	0.02	1.35	0.30

40

## 【0235】

3つの脱共役タンパク質の発現レベルは、前脂肪細胞において低かった。UCP1の発現は、1日おきに培地と共に新しくした100 nMロシグリタゾンの存在下で有意に増加した。miRNA類似体によるUCP1 mRNA上昇の大きさは、ロシグリタゾンの場合よりも低かったが、使用したmiRNA類似体濃度（25 nM）、およびRNA抽出の12日前にトランスフェクションを1回だけ行ったという事実に留意されたい。主な発見は、ロシグリタゾンおよびmiRNA類似体

50

の存在下におけるUCP2発現の劇的な増加である。UCP3の発現は、主に筋細胞で発現される遺伝子に関して予測される通り、いずれの条件においても変化しなかった。UCP1およびUCP2発現のこの増加から、これらのmiRNAの投与により、熱発生の大きな可能性を有する脂肪細胞への細胞分化が生じ、よっておそらくは肥満およびその他の代謝疾患および障害を治療するための有効な医薬品であることが示唆される。

#### 【0236】

さらに、本発明者らは、miRNA類似体の存在下における前脂肪細胞の培養中に差次的に発現される遺伝子を調べた。図13に示される一例として、M-Aプロットを作成して、維持培地中で増殖させた前脂肪細胞とhsa-miR-19b模倣物の存在下で増殖させた前脂肪細胞とのmRNAの発現の差を可視化した。x軸は平均遺伝子発現であり、y軸は対数尺度での対間の差である。赤色ドットは、差次的に発現される遺伝子である（ゼロを超えて上方制御されるおよびゼロを下回って下方制御される）。灰色ドットは、対照とhsa-miR-19b模倣物との間で差次的に発現されない遺伝子である（ゼロを超えて上方制御されるおよびゼロを下回って下方制御される）。

10

#### 【0237】

図14に示される一例として、維持培地のみで培養した前脂肪細胞を参照した場合、miRNA類似体hsa-let-7a阻害剤、hsa-miR-1模倣物、hsa-miR-19b模倣物、およびhsa-miR-30b模倣物の存在下で有意に差次的に発現される遺伝子の数は、それぞれ406個、382個、370個、および433個であった。これら4つのmiRNA類似体によって、一組の127個の遺伝子が共通して上方制御された（ベン図、図14）。

20

#### 【0238】

それらには、ALDH1A1、AZGP1、CEBPA、PPARGC1A、UCP1、およびUCP2のような、本発明者らの83個の熱発生標的のうちのいくつかのみならず、脂質代謝および脂肪細胞分化に関与する多くの遺伝子が含まれる（表19）。

#### 【0239】

（表19）4つのmiRNA類似体によって共通して上方制御される一組の127個の遺伝子

ABCC6	CHI3L2	KCNE3	PPL
ABCD2	CILP	KCNK3	PPP1R1A
ACACB	CKB	KIT	PRKAR2B
ACHE	CKMT1B	KLB	PTGDS
ACSF2	CLCA2	LBP	QPRT
ACSM5	CLMN	LEP	RASL12
ACSS2	COL14A1	LGALS12	RNF157
ADH1B	COL21A1	LIPE	S100B
AIF1L	CPB1	LPL	SDPR
AKR1C3	CYB5A	LRRC4C	SELENBP1
ALDH1A1	CYP4F12	LRRN4CL	SEMA3G
AOC3	CYP4F22	MAN1C1	SEPP1
AOC4	DARC	MAOA	SLC2A4
APCDD1	DGAT2	MAOB	SLC2A5
APOC1	DHCR24	MARCO	SLC40A1
AQP3	DPT	MCAM	SLCO4C1
AQP7	DTX4	METTL7A	SMOC2
AQP9	EPHB6	MGP	SNCG
AZGP1	FABP4	MLXIPL	SPARCL1
BBOX1	FADS2	MOBKL2B	SPRY1
BHLHE22	FAM65C	MOSC1	SVEP1
C11orf87	FMO1	MVD	TF
C14orf180	FMO2	NAT8L	TM7SF2
C1orf115	G0S2	NKD2	TMEM132C
C1orf95	GPD1	PCSK9	TMEM176B
C3	GPR109A	PFKFB1	TMEM37
CA2	GPR109B	PKD1L2	TNMD
CADM3	HAVCR2	PLA2G2A	TPRG1
CDO1	HRASLS5	PLIN1	TRIL
CEBPA	IGSF10	PLIN4	UCP1
CFD	ITIH1	PLXDC1	UCP2
CFHR1	ITIH5	PPARGC1A	

## 【 0 2 4 0 】

これら4つのmiRNA類似体によって、一組の60個の遺伝子が共通して下方制御された（ベン図、図15）。

## 【 0 2 4 1 】

それらには、多くのケモカイン遺伝子、ならびに細胞増殖およびに関与する遺伝子が含まれる（表20）。

## 【 0 2 4 2 】

（表20）4つのmiRNA類似体によって共通して下方制御される一組の60個の遺伝子

10

20

30

40

ACTC1	CENPF	ID1	KRTAP2-1
ANLN	CKAP2L	ID3	MALL
ARSI	CXCL1	IER3	MMP3
ATOH8	CXCL2	IL13RA2	NCAPH
AURKB	CXCL3	IL6	PHLDA1
BLM	CXCL5	IL8	PLK1
BRCA2	CXCL6	INHBA	PPAPDC1A
BUB1	E2F7	IQGAP3	PTGS2
BUB1B	ESCO2	KIAA1244	RELN
CASC5	FAM83D	KIF11	SHCBP1
CCL26	GABBR2	KIF14	SLC17A9
CDC6	GREM2	KIF18B	SLC6A17
CDCA5	GTSE1	KIF2C	THBD
CDCA8	HAS1	KIFC1	TMSL3
CDH15	HJURP	KRT34	TOP2A

## 【0243】

## B. ヒト白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化

## 1. 分化プロトコール

ヒト白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化に及ぼすmiRNA類似体の効果を評価するためには、ヒト皮下前脂肪細胞（8匹の雌ドナー由来のSuperLot 0048、ZenBio、NC）を0日目に96ウェルプレートにプレーティングし、前脂肪細胞培地（DMEM/Ham's F-12 (1:1, v/v)、HEPES緩衝液、ウシ胎仔血清、および抗生物質）中で一晩付着させた。翌日（1日目）、培地を除去し、分化培地-2（DMEM/Ham's F-12 (1:1, v/v)、HEPES緩衝液、ウシ胎仔血清、ビオチン、パントテン酸、ヒトイインスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、専売PPARGアンタゴニスト、および抗生物質と交換した。細胞を37 °C、5% CO<sub>2</sub>にて7日間インキュベートした。7日後（7日目）、AM-1脂肪細胞維持培地（DMEM/Ham's F-12 (1:1, v/v)、HEPES緩衝液、ウシ胎仔血清、ビオチン、パントテン酸、ヒトイインスリン、デキサメタゾン、および抗生物質）との部分的培地交換を行った。細胞を37 °C、5% CO<sub>2</sub>にてさらに7日間インキュベートした。17日目に、トランスフェクション剤Dharmafect 3を用いて、細胞にmiRNA類似体（Dharmacon特異的miRIDIAN模倣物およびヘアピン阻害剤）をトランスフェクトした。処理はすべて3つ組で行った。トランスフェクション後、陰性対照は維持培地のみであり、陽性対照は、100 nMのPPARGアゴニストであるロシグリタゾンを含む維持培地であった。2日後、培地を除去し、新鮮な維持培地と交換した。その後、処理期間の終了時（30日目）まで2~3日ごとに維持培地を交換した。処理（合計30日間の培養）の終了時に、表現型決定および遺伝子型決定スクリーニングのために細胞を処理した。

## 【0244】

## 2. 脂肪細胞のトランスフェクション

miRNA類似体の標的細胞への浸透を促進するために、トランスフェクション試薬を使用する。

## 【0245】

一例として、本発明者らがトランスフェクション剤Dharmafect 3 (Dharmacon、CO) を用いて脂肪細胞において達成したトランスフェクション効率の程度を、本明細書に示す。トランスフェクション効率は2つの方法で評価した：

## a. 蛍光miRNA類似体を用いたトランスフェクション後の細胞の落射蛍光の測定

Dy547標識された非標的指向miRIDIAN模倣物およびヘアピン阻害剤（100 nM）を17日目にトランスフェクトした細胞において、30日目に蛍光を測定した（540励起 / 590放射）。図16に示されるように、トランスフェクションの12日後でさえ、蛍光miRNA類似体をトランスフェクトした細胞の有意により高い蛍光が認められた。

b. 対照遺伝子発現の減少

脂肪細胞のトランスフェクションの成功を確認するために、対照遺伝子GAPDH（「ハウスキーピング遺伝子」）の発現の減少を、GAPDH特異的siRNAによる脂肪細胞のDharmafect 3 (Dharmacon、CO) 媒介性トランスフェクトションの4日後（22日目）および12日後（30日目）に測定した。細胞溶解物を得て、Cells-to-Ct試薬によって得られた純粋RNAを用いてRT-PCRを行った。トランスフェクション剤Dharmafect 3を用いて、成熟脂肪細胞（トランスフェクトすることが難しいことが知られている細胞型）の効率的なトランスフェクションが達成された。図17に示されるように、トランスフェクション後の4日目および12日目に、GAPDH mRNA発現の54%および73%のノックダウンが観察され、いずれも高度に有意であった。

10

【0246】

3. 30日間の培養におけるヒト脂肪細胞の維持中の表現型変化

処理（30日間の培養）の終了時に、脂質含量を評価するために細胞をオイルレッドOで染色した（図18）。16日目から30日目まで維持培地のみが存在した場合（対照）、脂肪細胞には大きな脂肪滴が負荷されているようである。実験を通して100 nMロシグリタゾンが存在した場合（陽性対照）、赤色染色の強度は減少しているように見え、脂肪滴はより小さいようである。一例として、25 nM hsa-miR-30b模倣物の存在下では、赤色染色の強度は同様に減少しているように見え、脂肪滴はより小さいようである。非標的指向miRNA類似体の存在下では、このような変化は認められなかった。

20

【0247】

蛍光ナイルレッド色素を用いて、30日目の成熟脂肪細胞中に存在する脂質の量を測定した。図19に示されるように、15日目から30日目までロシグリタゾンに曝露しなかった脂肪細胞において、最も高い蛍光が認められた。同様の蛍光レベルは、非標的指向miRNA模倣物および阻害剤をトランスフェクトした細胞においても認められた。細胞をロシグリタゾンに2日間曝露した場合、蛍光は有意に低下し、15日目から30日目までロシグリタゾンが存在した場合にはさらに低下した。試験したmiRNA阻害剤の存在下では、蛍光レベルは、2日間から全期間中のロシグリタゾンで観察された範囲の中にある。miRNA模倣物の存在下では、蛍光レベルはより低いようであり、脂質含量がより低いことが示唆される。

30

【0248】

4. ヒト成熟脂肪細胞トランスフェクションの最適化

成熟脂肪細胞の効率的なトランスフェクションは達成が難しいことが知られているため、本発明者らは11種の異なるトランスフェクション剤を試験し、対照遺伝子GAPDHのmRNA発現の減少の程度を評価した。上記のプロトコールに従って、ヒト皮下前脂肪細胞を6ウェルプレートにプレーティングし、2週間かけて分化させた。その後、トランスフェクション剤をそれらの製造業者のプロトコールに従って使用して、GAPDHを標的化するmiRNA模倣物（50 nM）を分化した脂肪細胞に導入した。トランスフェクトした細胞を試薬およびmiRNA模倣物と共に72時間インキュベートし、その後維持培地に切り換えた。トランスフェクションの14日後に、RNeasyミニキットを用いてRNAを単離し、対照遺伝子GAPDHおよび参照遺伝子18SについてのRT-PCR反応を、ウェル当たり100 ngのcDNAを用いて3つ組で行った。

40

【0249】

ウェル当たり抽出されたRNAの量は、この実験条件において潜在的細胞毒性を生じ得るトランスフェクション剤TransIT TKOおよびTransIT siQuestを除いて、非常に類似していた（図20）。

【0250】

Dharmafect 1およびsiPORT NeoFXを用いてトランスフェクトした細胞は、18S発現のレベルが有意に低下しており、RT-PCR実験解析から除外した。解析した残りの7種のトランスフェクション剤の中で、頻繁に使用されるトランスフェクション剤であるLipofectamine RNAiMAXは、トランスフェクション後の14日目にGAPDH発現の66%の減少をもたらし、Dharmafect 3およびDharmafect 4はそれぞれ、GAPDH発現の60%および75%の減少をもたらした

50

(図21)。

【0251】

5. miRNA類似体または脂肪生成および/もしくは熱発生の公知の活性化因子の存在下で2週間培養したヒト成熟脂肪細胞の表現型変化

上記の通りに、ヒト皮下脂肪細胞をウェル当たり391,000個細胞の密度で6ウェルプレートにプレーティングした。Dharmafect 4を用いて、14日目にこれらの脂肪細胞に以下のものをトランスフェクトした：

1. 以下のmiRNA類似体のうちの1つ (50 nM) :

hsa-let-7a阻害剤 (hsa-let-7aは、脂肪生成を調節することが報告されているユニバーサルmiRNAである)

hsa-miR-1模倣物 (hsa-miR-1は、PRDM16およびUCP1を調節することが報告されている)

hsa-miR-19b模倣物 (hsa-miR-19bは、本発明者らのインシリコ研究に従って、本発明者らの83個のmRNA標的のうちの多くと相互作用することが予測される、豊富な脂肪細胞miRNAである)、または

hsa-miR-30b模倣物 (hsa-miR-30bは、本発明者らのインシリコ研究に従って、本発明者らの83個のmRNA標的のうちの多くと相互作用することが予測され、その過剰発現が脂質生成を促進するmiRNAである)

2. 隠性対照 (模擬トランスフェクション)

3. 3つの陽性対照 (脂肪生成および/または適応熱発生を変化させることが知られている、PPARGアゴニストであるロシグリタゾン (100 nM)、3アドレナリン受容体アゴニストCL316,243 (10 μM)、または甲状腺ホルモンであるトリヨードチロニン (10 nM))。

【0252】

17日目に細胞を維持培地に切り換え、その後28日目まで2~3日ごとにその培地を交換し、28日目に細胞の明視野顕微鏡観察写真を撮影した。

【0253】

図22に示されるように、対照条件を参照すると、陽性対照CL316,243およびロシグリタゾンの存在下で、ならびにhsa-let-7a阻害剤、has-miR-19b模倣物、およびhsa-miR-30b模倣物の存在下で、細胞密度の増加および「褐色化」の様子が認められる。異なる薬剤の細胞密度、脂質含量、脂肪滴の数およびサイズに及ぼす影響を表21に要約する。

【0254】

(表21)

薬剤	脂肪細胞によつて覆われた写真視野(対照に対する割合(%))	脂肪滴によつて占有される細胞領域(%)	細胞当たりの脂肪滴の数	脂肪滴の平均サイズ
対照	基準	42%	68	基準
50 nM hsa-let-7a 阻害剤	+ 147%	56%	103	-13%
10 μM CL316,243	+ 24%	44%	124	-44%
50 nM hsa-miR-1 模倣物	+ 15%	36%	69	-16%
10 nM T3	+ 13%	42%	94	-27%
50 nM hsa-miR-19b 模倣物	+ 145%	58%	91	+3%
100 nM ロシグリタゾン	+ 198%	57%	113	-19%
50 nM hsa-miR-30b 模倣物	+ 246%	53%	140	-63%

【0255】

実施例4. ルシフェラーゼ活性およびqRT-PCRによるハイスループットmiRNA標的スクリーニング

10

20

30

40

50

ルシフェラーゼレポーターアッセイ構築物を使用するハイスループットスクリーニングを用いて、熱発生に関与する新規miRNA標的を同定する。

#### 【0256】

ルシフェラーゼは、関心対象のプロモーターの制御下にあるルシフェラーゼ遺伝子を含む遺伝子構築物をトランسفェクトした細胞におけるその転写活性を評価するためのレポーターとしてよく用いられる。SwitchGear Genomicsは、LightSwitch（商標）ルシフェラーゼアッセイシステムの成分としての、SwitchGearのRenSPレポーターカセットを含む最適化ルシフェラーゼレポータベクターシステム中にクローニングされた、18,000個を上回るヒトプロモーターおよび12,000個を上回るヒト3'UTR領域のゲノム全域にわたるライプラリー（GoClone（商標））を作製した。この改変型のルシフェラーゼによって、そうでなければレポータタンパク質の蓄積によって曖昧になる可能性のある詳細な動態研究、特に抑制に焦点を当てた詳細な動態研究が著しく促進される。

10

#### 【0257】

UCP1を単一の熱発生標的遺伝子として用いて、SwitchGear Genomic GoCloneシステムによって、複数マイクロRNA 1 mRNAのパラダイムを試験した。HeLa細胞およびHepG2細胞において、様々なヒトmiRNAとヒトUCP1遺伝子の3'UTR領域、5'UTR領域、およびプロモーター／エンハンサー領域との相互作用の可能性を探査するために、3つのレポーター構築物を作製した：

20

1. レポーター遺伝子の3'UTR領域にヒトUCP1配列の2,218 bp 3'UTR断片がクローニングされている、強力な構成的プロモーター（RPL10-prom）によって駆動されるレポーター遺伝子を含むヒトUCP1 3'UTR構築物。推定上のUCP1 3'UTR構築物に特異的な効果を同定するために、このレポーター活性に及ぼす特異的miRNA模倣物、阻害剤、または非標的指向対照の効果を、空 3'UTRおよびアクチン 3'UTRのものと比較する。

2. ヒトUCP1遺伝子配列のメチル化領域およびエンハンサー領域を網羅する転写開始部位および上流領域に及ぶ、ヒトUCP1配列の4,147 bp 5'UTR断片によって駆動されるレポーター遺伝子を含むヒトUCP1プロモーター構築物。推定上のUCP1 5'UTR構築物に特異的な効果を同定するために、このレポーター活性に及ぼす特異的miRNA模倣物、阻害剤、または非標的指向対照の効果を、アクチン プロモーターのものと比較する。

3. HSV-TK遺伝子座由来の短い最小プロモーターと、ヒトUCP1遺伝子配列のエンハンサー領域に及ぶヒトUCP1配列の601 bp 5'UTR断片とによって駆動されるレポーター遺伝子を含むヒトUCP1エンハンサー領域構築物。推定上のUCP1 5'エンハンサー構築物に特異的な効果を同定するために、このレポーター活性に及ぼす特異的miRNA模倣物、阻害剤、または非標的指向対照の効果を、空5'エンハンサー領域のものと比較する。

30

#### 【0258】

加えて、miRNAxxx\_3'UTR構築物を作製した。それらは、レポーター遺伝子の3'UTR領域にmiRNAxxxの標的配列との完全一致物がクローニングされている、強力なプロモーター（RPL10\_prom）によって駆動されるレポーター遺伝子を含む。miRNA模倣物または阻害剤の活性がこの実験用細胞型において合理的に検出され得るかどうかを判定するために、このレポーター活性に及ぼすmiRNA模倣物、阻害剤、または非標的指向対照の効果を、空\_3'UTRおよびアクチンB 3'UTRのものと比較することができる。この細胞型が問題のmiRNAの内因性発現を有さない場合には、模倣物の添加はこのレポーターの活性をノックダウンするはずであり、阻害剤の添加は有意な影響を及ぼさないはずである。この細胞型が問題のmiRNAの内因性発現を有する場合には、阻害剤の添加はこのレポーターの活性を増加させるはずであり、模倣物の添加は有意な影響を及ぼさないはずである。HeLa細胞型およびHepG2細胞型における内因性miRNA発現の範囲は広く、よって合成標的の活性変化はこの変動性を反映する可能性が高い。

40

#### 【0259】

それぞれのmiRNA候補（合計38個）について、以下の条件を試験した。

HeLa細胞においてmiRNA模倣物（特異的） \* レポーター構築物8個

50

HepG2細胞においてmiRNA模倣物（特異的） \* レポーター構築物8個

HeLa細胞においてmiRNA模倣物非標的指向対照 \* レポーター構築物8個  
HepG2細胞においてmiRNA模倣物非標的指向対照 \* レポーター構築物8個  
HeLa細胞においてmiRNA阻害剤（特異的） \* レポーター構築物8個  
HepG2細胞においてmiRNA阻害剤（特異的） \* レポーター構築物8個  
HeLa細胞においてmiRNA阻害剤非標的指向対照 \* レポーター構築物8個  
HepG2細胞においてmiRNA阻害剤非標的指向対照 \* レポーター構築物8個

【0260】

UCP1配列に結合し得るmiRNAの広範なリストに対して、試験するためのmiRNA候補の数を減らすために、10件のフィルターをかけた（UCP1 3'UTR領域への結合の必要性に加えて）。これらのフィルターは、結合部位の長さ、結合部位の数、5'UTR領域への結合、他のmiRNAとの染色体クラスター化、イントロン位置、ゆらぎ、種を超えた発現、エンハンサー領域への結合、メチル化領域への結合、およびUCP1との関係の実験的証拠の証明であった。これらの基準のうちの少なくとも3つを満たした38個のmiRNAを試験した（表22）。

10

【0261】

（表22）UCP1遺伝子配列中に推定結合部位を有するmiRNA

	miRNA	基準数	結合長	部位数	3'UTR	5'UTR	染色体 クラスター	イントロン	ゆらぎ	種間	エンハン サー領域	メチル化 領域	実験的 証拠
1	hsa-miR-130b-5p	7	11	3	+	+	22			+	+	+	+
2	hsa-miR-328	6	10	4	+	+				+	+	+	+
3	hsa-miR-655	6	10	5	+	+	14			+	+	+	+
4	hsa-miR-19b-2-5p	5	10	4	+	+	X					+	+
5	hsa-miR-26a-2-3p	5	10	7	+	+					+	+	+
6	hsa-miR-367-3p	5	10～18	3	+	+	4			+	+	+	+
7	hsa-miR-371-a-5p	5	10～12	9	+	+	19			+	+	+	+
8	hsa-miR-377-3p	5	10～14	5	+	+	14			+	+	+	+
9	hsa-miR-378a-3p	5	7～13	19	+	+				+	+	+	+
10	hsa-miR-382-3p/5p	5	15	2	+	+	14			+	+	+	+
11	hsa-miR-421	5	10	5	+	+	X					+	+
12	hsa-miR-515-3p	5	9	3	+	+	19			+	+	+	+
13	hsa-miR-620	5	10	7	+	+							
14	hsa-miR-941/2	5	9	5	+	+	20			+	+	+	+
15	hsa-miR-1179	4	11	3	+	+	15			+			
16	hsa-miR-1302	4	10	5	+	+				+			
17	hsa-miR-146a	4	9～10	8	+	+							+
18	hsa-miR-181c	4	9	5	+	+	19						+
19	hsa-miR-203	4	9	1	+		14						+
20	hsa-miR-331-5p	4	8～15	6	+	+	12			+			+
21	hsa-miR-422a	4	7～14	6	+	+				+			+
22	hsa-miR-452	4	8	7	+	+	X						+
23	hsa-miR-491-5p	4	10	3	+	+							
24	hsa-miR-501-3p	4	10	2	+	+	X						+
25	hsa-miR-543	4	10～14	4	+	+	14			+			+
26	hsa-miR-545	4	11	2	+	+	X						+
27	hsa-miR-549	4	13～14	3	+	+							+

28	hsa-miR-643	4	10 ~ 14	9	+	+
29	hsa-miR-651	4	10	6	+	+
30	hsa-miR-654-3p	4	8 ~ 10	11	+	14
31	hsa-miR-21-5p	3	10 ~ 14	2	+	+
32	hsa-miR-211-5p	3	11	1	+	+
33	hsa-miR-22-3p	3	9	5	+	+
34	hsa-miR-30b-5p	3	10	1	+	+
35	hsa-miR-325	3	7 ~ 8	11	+	+
36	hsa-miR-362-5p	3	10	1	+	X
37	hsa-miR-504	3	9	2	+	+
38	hsa-miR-552	3	9	3	+	+

【 0 2 6 2 】

10

20

30

40

50

これらのルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ実験において、阻害剤／模倣物比1.5およびまたはp値 < 0.05で、特異的miRNA阻害剤がルシフェラーゼシグナルを増加させる場合、および特異的miRNA模倣物がルシフェラーゼシグナルを減少させる場合の両方について、miRNA候補はUCP1と相互作用すると見なされた。これらの選択基準によって、9個のmiRNA ( hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、およびhsa-miR-545 ) が同定される（表23）。さらに数個が、これらの選択基準にわずかに届かなかつた；それらは、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、およびhsa-miR-1179である。

## 【0263】

（表23）HeLa細胞および／またはHepG2細胞におけるルシフェラーゼレポーターアッセイによってUCP1遺伝子発現の制御因子であると同定されたmiRNA

細胞株	miRNA
HeLa	hsa-miR-130b-5p
HeLa + HepG2	hsa-miR-19b-2-5p
HepG2	hsa-miR-382-3p/5p
HeLa	hsa-miR-515-3p
HeLa	hsa-miR-543
HepG2	hsa-miR-545
HeLa + HepG2	hsa-miR-21-5p
HeLa	hsa-miR-211-5p
HeLa + HepG2	hsa-miR-325

## 【0264】

選択されたこれら9個のmiRNAのうち、3個は、試験されたUCP1の3つの領域に結合すると考えられ（hsa-miR-21-5p、hsa-miR-211、およびhsa-miR-515-3p）；3個はUCP1の2つの領域に結合すると考えられ（hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-130b-5p、およびhsa-miR-325）、および3個はUCP1の単一の領域に結合する（hsa-miR-331-5p、hsa-miR-543、およびhsa-miR-545）。hsa-miR-331-5pを除くすべてが、UCP1の3'UTR領域に結合すると考えられる（表24）。

## 【0265】

（表24）ルシフェラーゼレポーターアッセイによってUCP1遺伝子発現の制御因子であると同定されたmiRNA

	miRNA	UCP1 3' UTR	UCP1 エンハンサー	UCP1 プロモーター
1	hsa-miR-21-5p	X	X	X
2	hsa-miR-211	X	X	X
3	hsa-miR-515-3p	X	X	X
4	hsa-miR-19b-2-5p	X		X
5	hsa-miR-130b-5p	X	X	
6	hsa-miR-325	X	X	
7	hsa-miR-331-5p		X	
8	hsa-miR-543	X		
9	hsa-miR-545	X		

## 【0266】

細胞培養下のヒト脂肪細胞または脂肪由来間葉系幹細胞へのプロモーター／3'UTRライプラリーのトランスフェクション、およびその後の細胞培養物へのmiRNA剤（例えば、アゴミアまたはアンタゴミア）の添加により、さらなるスクリーニングを行う。トランスフェクションおよびmiRNA剤の添加の24時間後に、ルシフェラーゼ活性の測定およびmRNAの

10

20

30

40

50

同定を行う。

【0267】

より長い時間枠で上記のトランスフェクション実験の結果を確認するために、関心対象のmiRNA剤を含むレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルス形質導入実験を行う（copGFP蛍光マーカーの発現を可能にするpMIRNA1 SBIベクターにおいて発現されるmiRNA前駆体のSystem Biosciences (SBI) 収集物による）。具体的には、供給業者の説明書に従って、プロモーター / 3'UTRライブラリーを含む細胞に1:10のMOIでレンチウイルス粒子を形質導入し、GFP陽性細胞をFACSによって選別する。対照細胞（HEK293細胞）、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞、ヒト皮下前脂肪細胞、およびヒト増殖皮下脂肪細胞において、成熟miRNAおよびそれらの標的化mRNAの発現レベルを、Taqman定量的リアルタイムPCRによりいくつかの時点（0、3、および6時間；1、4、および7日）で評価する。形質導入後の5つの異なる時に由来するRNAを任意にプールして、検出感度を維持したまま、qRT-PCRベースのスクリーニングアプローチの複雑さを軽減する。10

【0268】

実施例5. プロテオミクスプロファイリング

熱発生に関する新規miRNA標的を同定するために、プロテオミクスプロファイリングもまた使用する。

【0269】

ショットガンプロテオミクスとは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を質量分析 (MS) と組み合わせて用いて、複雑な混合物中のタンパク質を同定する方法である。miRNA剤およびプロモーター / 3'UTRライブラリーをトランスフェクトおよび形質導入した細胞（実施例4に記載される）を回収して溶解し、粗製可溶性（サイトゾル）画分および不溶性（核）画分を得る。次にこれらの画分に由来するペプチドをHPLCによって分離し、タンパク質存在量を定量するために同位体標識技法SILACを用いて、ナノエレクトロスプレーアイオン化タンデムMSを使用して解析する。Sequest (Bioworksバージョン3.3.1、Thermo Scientific) を用いて、スペクトルをEnsembleリリース54ヒトタンパク質コード配列データベースに対して検索する。20

【0270】

存在量の少ないタンパク質を見逃さないようにするために、標的化プロテオミクスアプローチもまた使用して、脂質生成、脂肪細胞分化、およびBAT機能の公知の制御因子である一組のタンパク質を正確に定量する。いくつかの例には、UCP1、KDM3A、PRDM16、PPARA、PPARGC1A、CEBPB、CIDEA、BMP7、COX7A1、SIRT1、SIRT3、D102、FABP4、およびADIPOQが含まれる。これらのタンパク質は、市販の抗体を用いて、ELISAベースまたはLuminexベースの免疫測定法により解析する。30

【0271】

任意に、プロテオミクスプラットフォームにおいて多重反応モニタリング 質量分析を用いてタンパク質画分を解析し、これにより熱発生経路の1個のタンパク質（例えば、UCP1）のみがLC-MS-MSを用いて正確に定量される。

【0272】

実施例6. ヒト脂肪細胞を特異的に標的化するクローンDNAアブタマーの開発および特徴づけ40

本発明者らは、Cell-SELEX技術を用いて、成熟ヒト皮下脂肪細胞を特異的に認識するDNAアブタマーを開発し、特徴づけた。Cell-SELEXにより、増幅および生細胞への結合の繰り返しによって、無傷細胞の表面上の自然環境において天然高次構造にある特定分子を認識するアブタマーが選択される。図23に図示されるこの細胞ベースの選択では、特定の公知および未知の細胞表面マーカーまたは膜受容体を、それらの天然環境において直接標的化することができ、細胞特異的アブタマーの直接的な濃縮が可能になる。Cell-SELEXは、標的細胞を用いた陽性選択と非標的化細胞を用いた陰性選択の組み合わせからなる。本発明の場合には、新たに単離されたヒト肝細胞を用いて陰性選択を行い、陽性選択ではヒト皮下脂肪細胞の初代培養物を使用した。32 merライブラリーからの2ラウンドの陰性選択50

および5ラウンドの陽性選択を完了した。単離されたアプタマーを配列決定し、結合試験のために合成し、6-フルオレセインアミダイト(FAM)で標識した。ヒト肝細胞(陰性細胞)および脂肪細胞(陽性細胞)を飽和濃度(1μM)のFAM結合アプタマーで室温にて15分間標識し、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって解析した。図24に示されるように、いくつかのアプタマー(例えば、アプタマー974)は脂肪細胞にも肝細胞にも結合せず、いくつかのアプタマー(例えば、アプタマー975)は脂肪細胞と肝細胞の両方に結合する、比:2.69)および他のアプタマーは、脂肪細胞に優先的に結合する(例えば、アプタマー972および973、それぞれ非:4.76および5.40)。これらの脂肪細胞特異的アプタマーのさらなる特徴づけは進行中である。

## 【0273】

10

## 実施例7. 表現型、遺伝子型、およびプロテオミクスデータセットの照合

本明細書の実施例3~5に記載されるインピトロ実験の結果を照合する。具体的には、マイクロRNA、mRNA、および標的タンパク質、ならびに経路の最初のセットを、関連性がありさらに管理可能な数の標的にさらに絞るために、ネットワーク検索および解析パッケージ(DAVID、Ingenuity Systems IPA、およびARIADNE Pathway Studio)を用いて実験データを統合する。

## 【0274】

本明細書の実施例3~5に記載されるインピトロ実験の結果の網羅的解析は、ビジネスインテリジェンスツールTIBCO Spotfireを用いて行う。これによって、miRNA剤と標的遺伝子との関係の可視化が可能になる。

20

## 【0275】

## 実施例8. 肥満の動物モデル

肥満のいくつかの動物モデルが開発され、検証されている(Kanasaki K et al., J. Biomed. Biotechnol., 2011:197636 (2011); Speakman J et al., Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity, 8 Suppl 1:55-61 (2007))。最もよく用いられるのは、レブチンシグナル伝達欠損Lep<sup>ob/ob</sup>マウスマodelおよびLep<sup>db/db</sup>マウスマodel、ならびにC57BL/6Jマウスにおける高脂肪食モデルである(Wang CY et al., Methods in molecular biology, 821:421-433 (2012))。この食事誘導性肥満(DIO)モデルは、現代社会における高脂肪食/高密度食の利用可能性の増加を密接に模倣している。

30

## 【0276】

DIOマウスマodelは、熱発生の増加ならびに/または肥満および他の代謝障害の治療に対する、本明細書に記載されるmiRNA類似体の有効性のインピボ検証に用いられる(Yin H et al., Cell Metab., 17(2):210-224 (2013))。

## 【0277】

DIOマウスに、hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアのうちの1つまたは複数を投与する。ロシグリタゾンを陽性対照として使用する。処置の前および後に、マウスにおいて、食物摂取、血液代謝パラメータ、体組成(体重、体脂肪、骨塩、および除脂肪体重、体脂肪分布、体温、O<sub>2</sub>消費およびCO<sub>2</sub>生成、運動誘発性熱発生、寒冷誘発性熱発生、ならびに安静時熱発生を測定する。体重もしくは体脂肪の減少または体温もしくは任意の種類の熱発生の増加により、投与された組成物のインピボ有効性が示される。

40

## 【0278】

## 実施例9. ヒトUCP1およびUCP2の遺伝子および転写物の核酸配列

## 【0279】

(表25)ヒトUCP1遺伝子の1,462塩基対(bp)転写物ENST00000262999の核酸配列(6つのエキソンは大文字で表示)

番号	エキソン/イントロン	起点	終点	長さ	配列
	5' 上流配列				.....gtcggttcaaaaaacagaaatcggtttgctg ccggcgacaggegtga
1	ENSE00001081761	141,489,959	141,489,758	202	AGAGCAAGGGAAAGGAACCTCC TCCACCTTCGGGGCTGGAGCCCT TTCCCTCTGCATCTCAGTCTCTG AGTGAAGATGGGGGGCCTGACA GCCTCGGACGTACACCCGACCC GGGGTCCAGCTCTCAGCTG GAATAGCGCGTGTGCTTGGCGGAC GTGATCACCTCCCGCTGGACAC GCCAAAGTCCGGCTCCAG
	イントロン 1-2	141,489,757	141,489,132	626	gtagctaggcagagggtaagacaa.....tgttct gcaccttcttatttcag
2	ENSE00001009006	141,489,131	141,488,933	199	GTCCAAGGTGAATGCCGACGTC CAGTGTATTAGGTATAAAGGTG TCCTGGAACAAATCACCCTGTG GTAAAAAACAGAACAGGGCGGATGA AACTCTACAGCGGGCTGCCTGCG GGGCTTCAGCGCAAATCAGCTC CGCCTCTCTCAGGATCGGCCTCT ACGACACGGTCCAGGAGTTCTC ACCGCAGGGAAAGAAA
	イントロン 2-3	141,488,932	141,484,673	4,260	gtaagecgtgagcgttctggagg.....aataat tttttctctctggatag
3	ENSE00001081759	141,484,672	141,484,472	201	CAGCACCTAGTTAGGAAGCAAG ATTTAGCTGGTCTAACGACTGG AGGAGTGGCAGTATTCAATTGGGC AACCCACAGAGGTCTGTAAAGTC AGACTTCAAGCACAGAGCCATCT CCACGGAATCAAACCTCGCTACA CGGGGACTTATAATGCGTACAGA ATAATAGCAACAACCGAAGGCTT GACGGGTCTTGGAAAG
	イントロン 3-4	141,484,471	141,484,366	106	gtaactaacttcaaaatggttta.....acatttctt tttttttccccag

10

20

30

4	ENSE00001081762	141,484,365	141,484,264	102	GGACTACTCCCAATCTGATGAGA AGTGTACATCATCAATTGTACAGA GCTAGTAACATATGATCTAATGA AGGAGGCCTTGTGAAAAACAAAC ATATTAGCAG
	イントロン4-5	141,484,263	141,483,528	736	gtaacttccatccatataacaaa.....gacctgttt catcgatccattttag
5	ENSE00001081763	141,483,527	141,483,347	181	ATGACGTCCCCTGCCACTTGGTG TCGGCTCTTATCGCTGGATTTCGC GCAACAGCTATGTCCTCCCCGGT GGATGTAGTAAAACCAGATTTA TTAATTCTCCACCAGGACAGTAC AAAAGTGTGCCAACTGTGCAAT GAAAGTGTTCACTAACGAAGGAC CAACGGCTTCTTCAAGGG
	イントロン5-6	141,483,346	141,481,165	2,182	gtaagatatgtatcttgttatctgt.....cgaaacgt gacatgcactttctag
6	ENSE00001081760	141,481,164	141,480,588	577	GTGGTACCTCCTTCTGCGACT TGGATCCTGGAACGTCATTATGT TTGTGTGCTTGAACAACGTGAAA CGAGAACTGTCAAAGTCAAGGC AGACTATGGACTGTGCCACATAA TCAGCTTCAAGAAAATGATGTA CATACCACTGGGAATCTTGTGA CTGGATCATAAAAACAAACAAA ACTTATTCACTTATTAACTAA AAAGATAAAGGAATTTGGCAG AGAATTGGACTTTTATATAA AAAAGAGGAAAATTAATGCCTAT TTCATATAACTTTTTTTCTC AGTGTCTTAAGAAGGGGAAAGC AAAACATTCACTGGGAAAG CAAATGTAATGCAGATAAGCTAC TGCATTGACCATTCTGGAGTG CAATTGTGTGAATGAATGTGAAG AACTTAAACATGTTTAATTACA ATTCCAATGGTGGAAAAGAAAC TGAGTGAATGCAGTTATATT ATAAAACTTAAAAATGAAGTTA TTAAAAATATTAGTTTATTAAAC CACAGTTGTCAGTTAATATATT AATAAAAGTATTGCTAATACCTTT T
	3' 下流配列				aaagttgtctttgagatctatacctgggtgaagagtc aagtcacta.....

【 0 2 8 0 】

40

(表26)ヒトUCP1遺伝子(ENSG00000109424)の9,371塩基対(bp)の核酸配列、(エキソンは太字で表示)：

>染色体：GRCh37:4:141479988:141490559:-1

10

20

30

AGAGAAGGCCGCAAGGTGCCTGCAAGATGTCTGGGGAGTTGGAGGAATGGAAGAG  
TGCCCCGCTCTTCTTCTGGAGAGCTCCAGCTAGGCAGAACCTTCACCAAGGCTC  
TGATATCGTGCCTGGTTCCGAAAGCCCCAGCCGAAGGTGTGCAGCAAAGGGTGAC  
AGAAGGTGAGGCACGTGCGGGGGCGCGGGTGCTGACCGCCGCCGCGCCCTCCCT  
CCGACGTGCGTGTGCGGGCGCAGACAACCAGCGGCCGCCAGGGCTTCGGGGA  
GCGAAGCAGGGCTCCCAGGCACCGAGCGAGAATGGGAATGGGAGGGACCCGGTG  
CTCCCGGACACGCCCGCAGGTCCCACGCCGGTCTGAGACCTCGCGCGC  
CCAGCCCCGGAGCGGCCAGCTATAAGTCCCAGCGGAAGACCGAACGCAGAG  
GGTCCTGCTGGCGCGAGGGTAGGAGGGACGCGGGACTCGGCCGGTCGGTCAA  
CGCGCTCCGTCTGCAGCCGCCCTGCACCGCCGCTGCCGGCGTCGGTCAA  
AAACAGAAATCGGGTTGCTGCCCGCGACAGCGTAAGAGCAAGGGAAAGGA  
ACTTCCTCACCTCGGGCTGGAGCCCTTTCCTCTGCATCTCCAGTCTGA  
**GTGAAGATGGGGGGCCTGACAGCCTCGGACGTACACCCGACCCTGGGGTCC**  
**AGCTCTCTCAGCTGGAATAGCGCGTGCTTGGCGGACGTGATCACCTCCG**  
CTGGACACGGCAAAGTCCGGCTCCAGGTAGCTAGGCAGAGGGTAAGACAAGG  
GGTCTCAGGACAGAGGGACGCTGTTGCGTCATTCCATTATTCTCTGCTTGGTGT  
AACCACTGTTCTAGGTAGGGTAGGTGACCTCAAAGCAGTCTGGCCTGTCCCAG  
GGCTGGTGCTTAGGATGGAAACTGGAACTTTCTGGGATTAGCTGAAGAACAC  
CAGGGCCACAGAGAATGGGTTGACCATGACTACTACCAAATTCTCCAAAATTAG  
GGTGCACTTAGTATTAAAGAGCTGAGAATATTGGCCTCTCCTGAGTTACTAGTCA  
GGTGTCTTCTTCTTGATTCTCGGGGTTCTGCTCATCCTACTGCCCTAGGGG  
TTCTGGAGAGTTCTGGGAGGGGATATTCAAATGTGCATTGTAGCCAGCCTCCC  
TCCATCTGCGCGTGAACACACACACACACACACACACACACACACA  
CACACACACACGGTAGAGGGAGGTGGATGGAAGAGGAATGTTGCTGAGAAAAGAA  
ACGGAAAATAGGAACACAGGGGAAATCTGGCTTAAGAGTGAACCTCAATTGCT  
CCCTCTGTTCTGCACCTTCTTATTCCAGGTCCAAGGTGAATGCCGACGTCCA  
**GTGTTATTAGGTATAAAGGTGTCCTGGAACAAATCACCCTGTGGTAAAAACA**  
**GAAGGGCGGATGAAACTCTACAGCGGCTGCCTGCCGGGCTTCAGCGGCAAAT**  
**CAGCTCCGCCTCTCAGGATCGGCCTCTACGACACGGTCCAGGAGTTCTCA**  
**CCGCAGGGAAAGAAAGTAAGCCGTGAGCGTTCTGGAGGGCAGAAAAGCCTG**  
GGCTCCGCTCTGTTCCAAAAGTGTAAACACACAGAGGAGTGGTTTCATAACAAATT  
GGCGAGAAAACATTCAATTGAACCTCCCTCCCAAACATTAGCTATTGTTCAT  
AGAAAAAAAGTATGCAAATCGATTAGATGCAAGATATAACTTGTAAAGGTAC  
CCAGTCATGGAAGTTGTGCCAGTTGGATCTCCATCTGGAGAATATGGTGGC  
TACAGAAAAATGTTAACTTAAAGTTCTCAAAGAGGGAGTATATCAGAAACATC  
TATGGAGCTTGTCAAAACGAGGACTACCATGGCCTCTGAGTCTGAATCC  
TCAGGCTAGAGACCAGAGTGTCTTCCACAAGCTCCCTCATCATTGTATGCAA  
CAAAGTTCAAAGCCTCTGTTGAAGCAAAGAAAGCCAGACTTGTGAAGAGAGTT  
GAAAGGACAGGAAAAGACATATTCCCTTAAAGAGGTTCTCATCAGGTCCAGGAA  
AGACCAGAGCAGAAAAAGTGGACGAATGCTGCAGGGAGTTGTTAGGGAAAAAA  
GAAAAGGAAACATATTCCCTGAGTGCAGTGCACCTAAGAATTCTGTCACTTAG  
GTAGCATTATTGAGGGCTTAACATGAACCAGACATTGTTCTAAGTGCCTCAGAT

10

20

30

40

ACATTATAACTGGAAGGGTATTAGTACCATTATCCCTGGCAGATGGGAAAAGTGAA  
 CACAGAGCAGATTCACTGCCAAGGTACACAGCTGGGAGGGGCAGAGCCA  
 GGGTCAAACCCAGGCAGTCTGGCCTCGGACTCCAGGCTCTAACCCCTGTTCTAC  
 TGCCTCTGCACCTCTCATATGATTCTGCCATCATTCAAACCGACAACACTGCTGT  
 GAGTAAAAAGTGTAGCCGAATATCAGGGTAGTTAAGTAACATGCACAAAATACA  
 CAGCTAACATCACAGAGGCACCTTCATGTGGAGTAGACAAGCCAGAGAGAAGAT  
 GTGCTGATGGCACAATGAATACTTAAGTGAATCCACCTGTAGATTCTACATTT  
 CTGCTGTAGTAACCTCAACTATAATTATGGGATAATTATAAAATGTTGCTA  
 TACAAATATATAAGTTACTTATCCACACAAGTACTTCAAAGTGAAGATAAGTC  
 TGGATGTTACTAGATCAAAACTGCATTTTATTAGTGTAGCAAGAGAGGAA  
 ACACAAAGGAGGTAAAGCTGCCGTTCAGGTGGTTCTCACAGATTGACTGTTCT  
 ACCAATTGTTGTGGACTTGGCACCAATTAAATAGGATATATGTTGGCAGTGTCT  
 ATGTTATATAGATTCAAGTTAGTAGGCTTATTGAACTGCCATGTGCCAGTAAC  
 TATGTTAGATGTTAGATGGCAGATGTCTCTAGACAGAGCCTACAGTTGAGAGTA  
 TGGGTTGTGGGGAGAAGTGAATAGATGACTATATTCCATGATACTGCTGTATTA  
 CAATACAGTCCTACTTCACTAACGATGGGATACATTCTCAGAAATGAGTTAGGAG  
 GCAAATTGGTTGTGAATGAACATCACAGAGAGCACTACACAAACCTAGATGGCA  
 TAGCCACACCTAGGCTATATGGTATAATCTATTGCTCTAGGCTACAAACCTGTGCA  
 GCATGTTGGTATTGAATACTACAGGCAATTGTTACATAAAAGTTAAGTGTGTTGAC  
 CTAAAAATAGAAAAGGTAATGCATTACACTACAGTCTTATGGGCTGGATGTCACT  
 AGGTGATAGGAATTTCAGCTCTGTTCAATCTTACGGGACCACATCATGTATGC  
 AGCACATGACTAACTGTAATTACAAGATGGTGGCTATATTAAACAGAACTACTTAAG  
 CTAGCCATGGAGGTATGGTCCGTGAGATTTCCTGAAGAATTACGTCTGGATCAAT  
 TCTGGAAGGGCCAGCAGGAGTACTCCAGGCAAAGGGTGAGAAAGGAGCTTCAA  
 GTAGAGTGAAGGTATGTGCAAAGACTCAGTGAGGAGTCAGTGAACATAGCACAG  
 GGAGGACATGTTGGTGAGGAAGGAGGGTGAAAGCCACAGAGACAGGAGGGAGCCA  
 GATGACAGAAGGCCCTGCAGGCGGTGCTAAGGAGTTGGATTTCCTACAGTGG  
 TGGGAAGTCATTGAAAAATTAAAGCAAGGGAGTGGCATAAACATTACATTTC  
 AAAAGATCACTTGGCAGCAGATAGAGTATATGTAAAAGGAGTAAGAAAGAGGT  
 AAGTTAGAAAAGCAAGAAATGATCAGGGTATGCCCTAAAACACTGGCAATAGGGAA  
 AAGAGATGTCAATCAGAAAGATTGAGAAAGTATAATTGAATTGACTTGGTGAACAA  
 ATAGAAGTAAGGCATAAGGGACAGGTAGAAATATGAGATGACTTCCAAGTTCTGT  
 TTAAAGATACCTTATTGAGAGAGGATGTATAGAAGCTGTCTAGGGGAAGACA  
 AGAAATTGGTTAGGCCATGTCAACAGGTATGCCAGTAGGCACATGATTCAAGTT  
 TATTAGTGGCTCCTTATTGAGGAAAATCTGAGCCAGATTCCAGGAAGTCACAGCA  
 GGGACTACCAATAGGTCAAACAGCAGAGAGTGTGGAAAGGACTGAAAAGTGTAC  
 ATTGTACATAACAAATAGAAGCTCACTGATTCTAGCAAAACATCTCAGCAGAG  
 TAGCGTGGTATAAGCTATTGTAGGGACTGAGGAAGAAATGGCTCTGAGAAGT  
 AAAGACAAACAATATGTTGAAATAATTCTTATTGCTTAAAGGAGCCT  
 CTTTCCAGCTGATTGGAGTGAAGAGAGGGATTGAAAGTGGAGATTGGAGG  
 ATAGGATGAGTACATCAAGATACTACGTTGTAGTGCAGTGCATTACAAATGTGA  
 GCTAAAAGTGAAGGCATTGTAATCATGATATTGCTAATTAAAAGACAGCTGTCA  
 GTCATATGCCAGCTCCTGGTAAAGCATGATGAGAAGAGTACAATCATGGTAGTGA  
 TTTAAAAATTGCTGCCAGTTGTGGATTTCCTTATGCTAGACAGTGTAAAGCTCTT  
 ATCAATATTATTAACTCACACAACCTAAAGAGGTAGATATTATTATCCCTTTGAC  
 AAATTAGGAAACAGAATTATAATGACTGAGAAAGTCTCTGCTGAGTAAATGTTACT  
 GAACCTTAATTATGTTACTTAATGATAGAAATGAATATTGGGCTCAAGACTATT  
 TGTACTTAATGAAATCTGCTTGAGCAACATAAGCTATTTCAAAATTAAAGAC

10

20

30

40

AAAAATCACTTCTCTCCTGCTTCTTATTGGTCCCTCACATGTTGTAGCCT  
 AACACTACTGATGGCCCATTGGTGCAGTTGTCACGGACTGGGCTCATCTAAGGCC  
 ACCAAGTCCCATAATTAAACATGATCATTGTCAGGGAGAAAGATCAAGCCTCATTGGTG  
 ATGGGTGCCTCCTCACAGTCGGATAATACTGAAAAGAGAGCTAAATGTGGGAAAGA  
 ACCAAGTTGAACACAGGAAAGAACAGGCCACTGTGAAAATAAGCATTGTGTTTC  
 TTGTTCTGAAAGTCTTCATTAAAAAATTCAGACACCTGAAGGTTCTAGCCT  
 TACTCTGAGTTGACGCACATTAGTACATGATCAACACATAAACAAAGCATTAGAGAA  
 ATAGAAAAGCTGTAAGAACACAAAAATGGGCCAGGGCTGGCTACACCTGTA  
 ATCCTAGCACTTGGGAGGCCGAGGCAGACGGATCACCTGAGGTGAGGAGTTCAAG  
 ACTAGCCTGGCCAATATAGTGAACACCCTGTCCTACTAAAATAACAAACTAGCAG  
 GCTGGTGGCACGTGCCTATAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAT  
 CTCTGAACCCGGGAGGCCGAGATTGAGCTGAGGCCAGACACCAGTCACACT  
 AGCCTAGATAACAGAGCAAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAACAAAAATATG  
 AACCACTGAAAATTAAAAAGACATGCATGCATTCTAGGTCTTAAATTTTCTTAA  
 TAATTCTCTCTGGATAGCAGCACCTAGTTAGGAAGCAAGATTAGCTG  
 GTCTAACGACTGGAGGAGTGGCAGTATTCACTGGCAACCCACAGAGGTGCGT  
 AAAGTCAGACTTCAGCACAGGCCATCTCACGGAATCAAACCTCGCTACAC  
 GGGGACTTATAATGCGTACAGAATAATAGCAACAAACCGAAGGCTTGACGGGTC  
 TTTGGAAAGGTAACTAACCTCAAAATGGGTTTATAACCACAAAGCACATACATA  
 CAACTAGCAACTTATTGTAAGTAGAGTTAATAAACATTCTTTTTCCCCA  
 GGGACTACTCCCACATCTGATGAGAAGTGTACATCAATTGTACAGAGCTAGTA  
 ACATATGATCTAATGAAGGAGGCCTTGTGAAAAACAAACATATTAGCAGGTAAC  
 TTCCCATTCTCATATAACAAACAGGTCGCACCTTAGAAGTTCATCTGGAGCTCTGC  
 AGCCACCTTACTCAATCTTAACACTCCAAATAGTTCTTTAAAAATTAAAGTA  
 ATTGAAACCATATATAACTTGTGAGAAGCAGGAAAAGACCAAAATTTAAAGTTA  
 AGAAGTTTGCCACAACAAAAATTTGCAACACAAAATAACAGGCAATTCTATGTC  
 AGCATTATTCTCATTAATACTAATATGGACTTTGTTAGAATCTTATTCTTAT  
 ACAGCAGAATTCACTGGAGGTAAGTCCATCCTGCATACTATATCCAAAAGATCTAGTTA  
 TAAAAGGAGCTTACAGTGGCTCATCCAAAAGTAATACCATAAGATAGGTTCTTA  
 AAAATAATATTCTAACAAACTCTAGAGACATTGAAATTCCCTATTCAATAAAA  
 AGTATTAGATGCTCATATTAGGCATTATTACAGGCCTTAAAGGCACAGAGGAAAC  
 TAACAGTTACTTCCTAAAGTGTAAACATCTTAAAGCCATTACTCTTACCTTC  
 TTTTCTAGTGCACATACCTTCTTATTATTATTTATAAGACATCTTCATTG  
 ACCTACTGTTATCAATAGGTTATAAGATATGACAGATAACTAAATTGCAAGCCCC  
 CAAAAGTCTGATGTTGACCTGTTCATCGATCCATTAGATGACGTCCCCGCA  
 CTTGGTGTGGCTCTTATCGCTGGATTGCGCAACAGCTATGTCCTCCCCGGT  
 GGATGTAGTAAAAACCAAGATTATTAAATTCTCCACCAGGACAGTACAAAGTGT  
 GCCCAACTGTGCAATGAAAGTGTCACTAACGAAGGACCAACGGCTTCTCAA  
 GGGGTAAGATATGATCTGTATCTGTAATGTTCTGGCTGTGCTGCTTGG  
 GACACTCTCATGTCAGCAACCGACATTAGCTTACAAGCCTTACTATATTCAATA  
 CTTAGTATTGACTTTCTTGCACAGATTCTCCAATCCACCAATTCAACTGTGCCA  
 GAAAGTAAAAGCCATGATATTCAAATTCTCAACTTGTACAAAGGCTCATTCAA  
 GACCACTGCTTCCACTGGCTTCAATCTACTGGAAATGCAGACAGTATTGCTT  
 CTCTGGGCAAGAAAGTTATAAGTAGAGGGAAATCATAATAGAGAGCTATGAGAGA  
 ACAAGATTGATTGATTAAATTGATGGACTCAAGTTAACATTGAAACTAGA  
 GATAAGACATCACCACCAATCTAGAAAAGTGTGAGCAGAAAAGTATTGATTGGT  
 AATTATTACACTCACCTAGAAACAAGTGTGTAATAGATTACATATTCCATAAT  
 GCAATGTTGATCAGAAACTACCTTCTAAGAAAATATAGTATGGCTGGCGTGGT

10

20

30

40

GGCTCGCACCTGTAATCCCAGCACTTGGGAGATGGAGGCAGGAGGATCACTTGAG  
 CCCAGACTGGCAACAAAGCGAGACCCCTGTCTCAACAAAAAATTAAAAATTAGCT  
 GAGTGTGGTGGCACGCAGTGGTCCCCCTACTTGGGAAGCTGAGGAAGAGGA  
 TCTCCTGAGCCCAGGAGTTCAAGGTTCAGCGAGCTATGATTGTGCCACTGCAC  
 AGCCTGGGAGACAGAGCAAGTCCCTGTCTCAAAAAGAAGAAGGAGAAGGAGGAG  
 AAAATACAGTATTAAGTAATCTGTCAATATATTCCACAAGGATTACACTAGTGGTT  
 AATAATAAAATTATTAACCTTTAAATTGTAAGGCCATTCTCAAGCTTATAAAAT  
 TAAGCATGAATGCATCATAACACATTATAAAAAGTTCCAACTCATCATAATCTGTA  
 CTTATGATACATTAATACAAATGAAGTTCATTATAAAATTAACTTAAATGGATATA  
 CCAGTTATTAAACCATTAAACCATTAAATAATTTATTCTCAAATTAAAAACCTT  
 TTGGGGAGAACAAACTACAACATGGATGAACCTGAAAACGTTATGCTAAGTGA  
 TAAGCCAGACACAAAAGGACAAATACTGTATGATTACACTTAAATGAGGTACCTAG  
 AGTAGTCAAATTCATAGAGACAGAAAGAATAGAAGTTACCAGGGCTGGAGGTAGG  
 AAAAATGGAGAGCTGTTAATGGGTAGAGAGTTCTTTGGGGTACAAAAAGG  
 TTCTAGAGATGGATAGTGGTATGGTACACACAATGTGTGTACTTAATGCTACT  
 GAAATGTAATTATGATTTTTTGCAGAAAATACCCACATTGGGAAGTGA  
 AGAGAAACATGTTAAGAGACTTGAAGGAAAAAAATTGGGGCAGAGGGGTGTTTT  
 ATAGGTTAACAAATAAAAGCCATTAAACAGTAACAATTCTCTAAGGACAAGAAT  
 CGTCAAGATTGAGACAGCACTGATTCTGACTCTACTCAATAACTCTTGGTTCTC  
 TTCTCCTCCCCCTCTAATAGTTCTACCTCCATTCAAGAAAGCAAAGCAAACAA  
 AGCAAAATTCCCCCTCCCTCAAAAAGGAAAGAGTTTGAAAAAGTTCATGTCA  
 GTGAAGAAAAGACATGTTGGAGTGAAGGATATTGTGGATTGTAGATGTGA  
 TCATCAGGGCTGTGTTGTTGAAGTAATATAGGACATCTAGAGGAAAATTATT  
 CAGCAGAGGAGGGAAAGATGAAGAGTAGGTACTTTAAGCATCTCAGTGAGGAG  
 TGGCAAAATGAGAACGATAACCTGCTATAATCACTTAAGAATTCAAGGCTGAGTGT  
 GGTGGTGCAGTCTAGTCCCAGTTACTCCAGGAGGCTCAGGTGGAGGATCACTTA  
 AGCCCCAGGAGCTGAGGTTGCAGTGAGCTATGATTACACTGCATTCCAGCCTGG  
 GCGGCAGGGTGAAGCCTCATCTCAAAAATTAAAAAAAAAAATCAAACAAATT  
 ATCGAACGATGACATGCACTTTCTAGGTTGGTACCTTCCTTCTGCAGTGGAT  
 CCTGGAACGTCAATTGTTGTGCTTGAACAACTGAAACGAGAACTGTCAA  
 AGTCAAGGCAGACTATGGACTGTGCCACATAATCAGCTCAAGAAAATGATGT  
 AACATACCAAGTGGAAATCTGCTGACTGGATCATAAAAACAAACAAACTTATT  
 CACTTATTAAACCTAAAAAGATAAAGGAATTGGCAGAGAATTGGACTTT  
 TTTATATAAAAAGAGGAAATTAAATGCCTATTCATATAACTTTTTTCT  
 CAGTGTCTTAAGAAGGGAAAGCAAACATTCAAGCATACCCCTGGCAAATGT  
 AATGCAGATAAGCTACTGCATTGACCATTCTGGAGTGCAATTGTGTGAATGA  
 ATGTGAAGAACTTAAACATGTTAATTACAATTCAACTGGTGGAAAAGAAC  
 TGAGTGAATGCAGTTATATTATAAAACTTAAAATGAAGTTATTAAAAT  
 ATTAGTTTATTAAACCACAGTGTCACTTAATATATTCAATAAAAGTATTGCTAA  
 TACCTTTAAAGTTGTCTTTGAGATCTACCTGGGTGAAGAGTCAAGTTCACT  
 AGAATACAAGACTGCCAATAGCAAATGCAGGTCTTAGAATCATAGGCATGAACC  
 TACTCTGAATGTTATTAGTATAGATTAAATGTTAGAGTCCAGATTGATGACATC  
 TCTAACAACTCTAAATCTAAGACACTATATTCTTTGGCAGGATTGCTACTAGAGTC  
 TTGGTATCTGTGCTAGCATCACATAATTAGAGCTGGAGGGTACTCTGGGAAGAC  
 AGAGGAACAGTTGAGATTCTACTGAGATGAAAACGAATCTCATGGAATCTTCA  
 GCAAAGCCAAATTCAAATTCTACATTAGCACCTGTAGTAACCTTTCAATGCCTACA  
 AACTGCATGCAGAAGAGATAGGGAAACAGTAAAACAGATATTAAAAGAAGTTTA  
 AGACAAAGCCCAGCCTGATTTAAGCTAAATCCAAGGATTGGCAGCTGGATGAGC  
 AGGAAGGTTACAGGCTGCCAGACATCATTCTAGTTCTGTTAATCAACTCCATGTT  
 ACATTACTATCAGGGATTCTCACCTC ACCCTCATGCAT

【 0 2 8 1 】

(表27)ヒトUCP1遺伝子(NCBI参照配列:NG\_012139.1、第4染色体上のRefSeqGene

10

20

30

40

50

## ) の 15,910 塩基対 (bp) の 核 酸 配 列

CTGTACAGCT	CTCCGACAAT	CCCACATCTA	GATGCCAAGC	TGAGGTTGGC	ATTCTCACTA	61
ATTTGCTGTT	ATAAAATATTA	AGCTATCATA	AGCGTTAGCC	TACATATGAC	TCTTCATAT	121
GTTAGTTAAT	TATTTTAGGG	TAGAAATCCA	AAAGTGGAGT	TACCAGAAGT	GGATATAGAC	181
ATTCTGGCTG	GGTGTGATGG	TTCATGCCTG	TAATCCCAGC	ACTTGGGAG	GCAGAGGCAG	241
GC GGATCACT	TGAGGCCAGG	AGTTTGAGAT	CAGCCTGGC	CAACACAGCG	AAACCCCATC	301
TCTACTAAAA	ATTCCAAAAC	TAGCCAGGCA	TAGTGGCACA	TGCCTGTACT	CCCAGCTACT	361
TGGGAGGCTA	AGACACAAGA	ATCGCTGAA	CCCAGGAGGG	AGGTGGAGGT	TGCGGTGAGC	421
TGAGATTGTG	CCACCGTACT	CCAGCCTGGG	TGACACAGCT	AGACTCTGTT	TCAAAAAAAA	481
AAAGAAAAAG	AAAAGAAAAA	AATAGACTTT	CTCTGGCTC	AGTGTATACT	GCCAAATTGT	541
TTTCCAAAAA	AATTGTGTCA	ATGTATAACA	CCATCACTAA	TATAGTATTG	ATATTATGGT	601
TATTACATT	AAAATTCTAT	AATTGTGAAT	TATAACATTC	ATAATTATT	ACTATTATA	661
ATATTAATGT	AAATGTATAT	TATATATAAA	TGTTATAGTA	ATTATAACCT	TGGTAGTGAC	721
AAAGTATTAA	TTTATTAGGT	GAAGTATATG	CTTTTTATT	AGTGTATAAA	AATATATCCT	781
CTCTCCCATT	ATAAAAGTTT	GTATTCTTC	TTTTAGAAAT	TGATTCTTCT	GTCATTGCA	841
CATTATCTG	TATAATTATA	ACAGGGTATT	TCCCAGTGGT	GGCTAATGAG	AGAATTATGG	901
GAAAGTATAG	AACACTATT	AAATGCAAAG	CACTGTATGA	TTTTTATT	ATAGGAAGAC	961
ATTTGTGCA	GCGATTCTG	ATTGACCACA	GTGGATCAA	GTGCATTGTT	TAATGTGTT	1021
TACATTTCA	AAAAGGAAAG	GAGAATTGTT	TACATTAGA	ACTTGCTGCC	ACTCCTTGC	1081
TACGTCATAA	AGGGTCAGTT	GCCCTTGCTC	ATACTGACCT	ATTCTTACC	TCTCTGCTTC	1141
TTCTTTGTGC	CAGAAGAGTA	GAAATCTGAC	CCTTTGGGGA	TACCACCCCTC	TCCCCCTACTG	1201
CTCTCTCCAA	CCTGAGGCAA	ACTTCTCCT	ACTTCCCAGA	GCCTGTCAGA	AGTGGTGAAG	1261
CCAGCCTGCT	CCTTGGAAATC	CAGAACTACT	TTCAGAATCT	TGAACCTCTG	TGACCTCTCA	1321
GGGTCCCCCT	GTGTGAAGTT	TTTGACGTCA	GCTTCTCCTG	TGACCCCTAG	AAAGTCACTCT	1381
TGTGTCTAGC	ACATCCCAGG	TGCTCAGTCA	CCATTGAAC	ACAGTCATAC	TATCTCCTGG	1441
CAAAGGCTCT	TAACTGTCCA	TGTTAGCCTG	ATATTAATAT	CCTGGAAGCT	TATACTGTCG	1501
TTCTTCCTTC	CAGGTTTAAA	TAAGGCAGCC	CCTTTATCCT	GTCACAGGTC	CTCTCTCCCT	1561
ACCTATCCTT	ACCTGTTTTG	GATAACAAAC	TTTCTTATT	CTAATAGATT	TATTATTTC	1621
TCACATTTC	TTCCCTTATC	ATAGTTTCC	TCTCACTTTC	TCCTCTAGTT	TGTCATACTC	1681
TGGCTTAAA	ACATGCAAAC	ATGTGCCTTA	TGGGGAAAAA	AAGACAATT	TAATTTACCT	1741
TGCTTCTCT	TTACAAATGT	ATTGTGGCTT	CTTCTTATAG	TCCAAATCTA	AAACTCTTTA	1801
CCCACCCACT	GCCTTGAAC	CCTTCCTCGT	TGTGAAAGTA	GGATGGGGCA	AAGAGAGAAT	1861
GCATGCCCT	CCCAACTGCT	CAAACAAGTA	AAGGTGCTGT	TACAGTTATC	TTTGCTTAC	1921
TTAATACAAT	AATTATTTA	TTATATCTCA	CAATTTATG	GATCAGGAAT	TTAGACTGGG	1981
CTCAGCTAGG	CGATTCTTCT	GCTTACTGA	CATCATAGGA	GATCACTTGG	TGGTATTCAA	2041
CTGTCAGGTA	GGCTTATCTG	GAGGGTCCAA	GATAGCTGTA	CTCTGGTGCC	TGGTGCCTTG	2101
GTAAAGAGGG	ATGATGATGT	GGGGCCTCTC	CAGCATGAAC	AGCCTCAGAG	AAGTTTGCTT	2161
TCTTACATGC	TGGCCCAAGGG	CTCCAAGAGC	AAATGTTGCA	GTGAGTAAAG	CAGAAGATAC	2221
AAGGACTTTT	ATAATCTGGT	CTCAGAAGCC	ACATGGCATC	AGTTCTGTAT	TATTCTATTG	2281
GTCAAAACAT	TCATAAGCCT	GCCAGATGCA	AGGGGAAGGC	ATATGTACCC	TCATCTTTG	2341
ATGGGAGGAA	TGTGATGGAT	TTGCAATTAT	TTTTTAAAC	TACTACAGAC	AGAACCACTG	2401
AGAAAGATTC	ATGGGTAGCT	TTGGGGTGAG	GAATGGGAAT	TAACCTGTTG	ATAGCAGAGG	2461
TTCACTAGAG	TCAACAAGGA	ATAAGGTCTC	CTCTTGTACA	CTTGTAGTCAT	ACTATACCAA	2521
CATTCTTAAC	CACTGCTTAG	CCATCAGCCT	CACAACATAA	CAACTCCATC	ATAGTTGTAC	2581
TCCCTAAGAT	CACCAACAAT	GTTAGAGTCA	AATCCGGTAG	TTTTTCTTT	GTTTTTGTCC	2641
TCCTGACATT	TTTTCTAAAC	TTGACACTGG	TCAGACCCAA	TCTTTCTTA	ATCATATTCT	2701
TAAATACCAG	TTCTATCACT	GGATATGTTA	CTGTTTCTG	TTCTCACTCT	ACCTTTGACA	2761
AAGCCATTCT	TTCCAGACTA	TAACTCTGGG	TCTGGGTCCC	CCTATGGTT	GGCCCTTGAA	2821
TTCTTTCTCCT	AGTCCTATT	GACTAGCCCC	ATTTCCCGT	GAAAGCATG	CCCCTTCAT	2881
TGCATCCATA	TCATGACTAC	CAAATACCTC	CTCTATTCT	TCCTCTTTA	GCATGTTAAA	2941

10

20

30

40

TGCAGCTTCC	TAAGCTCTCT	ATCTGGATAT	CAACAGTATT	CTCTCCAAAT	AATTCTAAGA	3001
CTTTAAAAAT	TGGTTAACATC	TTCTTACCCC	TAAAATCACC	CCCCTTACCA	ACTGCCTCAT	3061
GACAATCATT	GGTACTGTCA	CTGAGCTTGC	AACCCATGTT	CTTAAACATA	GAGTAATCTT	3121
TGACTCCACA	TCTAATCATT	CATAAAAGCTG	TATTGTCTAT	CAAATTAAAT	CTGACATTTA	3181
TGTGAGAGCA	CTTCATAGTC	TGTAAGCAC	TACACAGGTG	ATAACATGAA	GCTACACTCA	3241
TAATGGATT	GCAGGGCTTG	CTTCTCATT	GGCTCTACA	GCCTCATCCC	TCACCCAACCTT	3301
CTTGCCTAC	CTCTCTCTT	CTTCCCCATC	ACCCAATTTC	CCAGTCAGTC	AGGCCAACAG	3361
AATGCATTCT	ATATACGCGA	CTTGCTTCC	CCAACATCTT	TGCCTGTATG	CATGCCACTT	3421
ATTTGCCTCA	GTTGATCTT	ATTCAACAA	GTGTTGCAG	AGGAGAAACC	TCGCTGGCTC	3481
CTTCTCCTT	CTATTTTTT	TCAGAGGCTA	CCCCTCAGGT	CAACATTGCC	TTTTCAGGG	3541
AAGCTCTGCA	AGCCTGACCT	CCCTTGGAAAG	TGCCTTAGGA	CTGGCTTCTT	GCACAGTACA	3601
CAACCTTAC	TTATAGAGGG	TTTGGAGATT	ATTCTTTATT	CATGTCTTAT	TTCTCCTGCT	3661
CCTGGAGGAG	ATGACTCTGA	CTTCCACTGA	CTCTTTGGG	GGGCTTAAGT	CAGGGTTGAG	3721
TACCAGAGGC	CCTAAATAGC	TGGACGTGGA	TTCTGGTAAT	ATCAAATCCA	TCTTGGCTT	3781
AACTGAGAGG	TTCTGAAAGC	TGGGACCTGA	CCTTGTCAT	TTCCCTCTT	CTCCAGTTTC	3841
CTATTATTC	CCACTGTTT	TTTAAAAGT	TTTTGTTTT	CTTAAGTTTT	CACAAGAATA	3901
AACATTGAAA	ATAAAATTTG	CACAAAGATC	GAACCTAGGAA	AGGCCACACA	ACCAACACAT	3961
ATTACATCAT	TATAGTAAG	TTAGCAGGGA	GATTTCAGAC	CTGGGCTAGC	TCTGGAACCA	4021
CATTTTACAC	TGTTGAAAAT	AAAAGCTGGA	GTACAGATGA	CTTCCCAGG	TTCACAGAGT	4081
TGGTAAGCTG	GAGAGCTGCA	CCTGGAGCCA	AGCAACCTGC	CCTGTCCTT	CCACTGCACC	4141
CTCTAAGAAA	TCTAATTAGA	AGGAACAGGT	GGTATCTCAT	TTTGTACGGT	GCTTTAGCAA	4201
TGTACTATT	GCTTTCTAGT	GTGTCTATTG	TCTCGTTGA	CATCTTCTCT	CAAAAAGTGA	4261
TGAAACGAAA	CGCTCTTTT	GACAAGTTCA	GAGTGCTCTT	GGTCCTGTG	TGGGATTCTT	4321
CCAAGTCTGA	ATTTGGTAGT	GGGAAGAGAA	GGAATCCGGA	GGAAGGAGGA	TGAGAAGTTT	4381
AAAGGAGAGG	AAAGGGAAGC	AGAGAAGGCC	GCAAGGTGCC	TGCAAGATGT	CTGGGGAGTT	4441
GGAGGAATGG	AAGAGTGCCTC	CGCTCTTCC	TCTGGGAGAG	CTCCAGCTAG	GCAGAACCTT	4501
TCACCAAGGC	TCTGATATCG	TGCTGGTTTC	CGAAAGCCCC	AGCCGAAGGT	GTGCAGCCAA	4561
AGGGTGACAG	AAGGTGAGGC	ACGTGCGGGG	GCGCGGGTGC	TGACCGCCGC	GGTGCGCCCT	4621
CCCTCCGACG	TGCGGTGTGC	GGGGCGCAGA	CAACCAGCGG	CCGGCCCAAGG	GCTTCGGGG	4681
AGCGAAGCAG	GGCTCCCGAG	GCACCGAGCG	AGAATGGAA	TGGGAGGGAC	CCGGTGCTCC	4741
CGGACACGCC	CCCGGCAGGT	CCCACGCCCG	GGTCTTCTGA	GACCTCGCGC	GGCCCCAGCCC	4801
GGGAGCGGCC	CAGCTATATA	AGTCCCAGCG	GAAGACCGGA	ACGCAGAGGG	TCCTGCTGGC	4861
GCGAGGGTGG	GTAGGAGGGG	ACGCGGGGAC	TCGGCCCCA	ACACCGCGCT	CCGTCCTGCAG	4921
CCGCCGCCTC	TGCACCGCCG	CTGCCCGGCG	GTCGGTTCAA	AAAACAGAAA	TCGGGTTTGC	4981
TGCCCGGCCG	ACAGGCGTGA	AGAGCAAGGG	AAAGGAACCTT	CCTCCACCTT	CGGGGCTGGA	5041
GCCCTTTCC	TCTGCATCTC	CAGTCTCTGA	GTGAAGATGG	GGGGCCTGAC	AGCCTCGGAC	5101
GTACACCCGA	CCCTGGGGGT	CCAGCTCTTC	TCAGCTGGAA	TAGCGCGGTG	CTTGGCGGAC	5161
GTGATCACCT	TCCCCTGGA	CACGGCCAAA	GTCCGGCTCC	AGGTAGCTAG	GCAGAGGGT	5221
AAGACAAGGG	GTCTCAGGAC	AGAGGGGACG	CTGTTGCGTG	CATTCCATT	ATTCTCTGCT	5281
TTGGTGTAACT	CACTGTTCT	AGGTAGGGTA	GGTGACCTTC	CAAAGCAGTC	TGGCCTTGTC	5341
CCAGGGCTGG	TGCTTTAGGA	TGGGAAACTG	GAACCTTTTC	TGGGATTAGC	TGAAGAACCA	5401
CCAGGGCCAC	AGAGAATGGG	TTGACCATGA	CTACTACCAA	ATTCTCCCAA	AATTTAGGGT	5461
GCACCTAGTA	TTTAAGAGC	TGAGAATATT	GGCCTCTCCT	GAGTTTACTA	GTCAGGTGCT	5521
TTTCTTTTC	TTTGATTCTT	CGGGGGTTCT	GTCCTATCCT	ACTGCCCTAG	GGGTTCTGGA	5581
GAGTCCTGG	GGAGGGGGAT	ATTCAAAATG	TGCATTGTAG	CCAGCCTCCC	TCCATCTGCG	5641
CGTGAGCGAA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACGGT	5701
AGAGGGAGGT	GGATGGAAGA	GGATGTTGC	TGAGAAAAGA	AACGGAAAAT	AGGAACACAG	5761
GGGAAATCT	TGGCTTAAGA	GTGAACCTAA	TTTCGCTCCC	TTCTGTTCTG	CACCTTCTT	5821
ATTTCCAGGT	CCAAGGTGAA	TGCCCGACGT	CCAGTGTAT	TAGGTATAAA	GGTGTCTGG	5881
GAACAATCAC	CGCTGTGGTA	AAAACAGAAG	GGCGGATGAA	ACTCTACAGC	GGGCTGCCTG	5941
CGGGCTTCA	CGGGCAAATC	AGCTCCGCCT	CTCTCAGGAT	CGGCCTCTAC	GACACGGTCC	6001
AGGAGTTCC	CACCGCAGGG	AAAGAAAGTA	AGCCGTGAGC	GTTCCTGGGA	GGGGCAGAAA	6061
AGCCTTGGGC	TCCGCTCTGT	TCCAAAAAGT	GTAACACACA	GAGGAGTGGT	TTTCATAACA	6121
AATTGGCGAG	AAAACATTCA	TATTGAACT	CTCCCTTCCC	CAAACATTAG	CTCATTGTT	6181
ATAGAAAAAA	GTATGAAAAA	TCGATTTTTT	AGATGCAGAT	ATATACTTGT	AAAGGTCACC	6241
CAGTCATGGA	AGTTTGTGC	CCAGTTTGGG	TCTCCATCTG	GAGAATATGG	GTGGGCTACA	6301
GAAAAATGTT	TAACCTAAAG	TTCTCCAAAG	AGGGAAGTAT	ATCAGAAACA	TCTATGGAGC	6361
TTGTCAGAAA	TCCAAACGAG	GACTACCAG	GTCCTCTGAG	TCTGAATCCT	CAGGCTAGAG	6421

ACCAAGAGTGT	CTTTCCACAA	GCTTCCCTCA	TCATTGTTG	ATGCAACAAA	GTTCAAAGCC	6481	
TTCTGTTGA	AGCAAAGAAA	GCCAGACTTT	GTGAAGAGAG	TTGAAAGGAC	AGGAAAAGAC	6541	
ATATTCCTC	TTAAGAGGTT	CCTCATCAGG	TCCAGGAAAG	ACCAGAGCAG	AAAAAGTGG	6601	
CGAATGCTGC	AGGGAGTTG	TTTAGGGGAA	AAAGAAAAGG	AAACATATT	CCTGAGTGCC	6661	
AGTGCACCT	AAGAATTCT	GTCACTTAG	GTAGCATT	TTTGAGGGCT	TAACTATGAA	6721	
CCAGACATTG	TTCTAAGTGC	TTCAGATACA	TTATAACTGG	AAGGGTATTA	GTACCATTT	6781	
CCCTGGCAG	ATGGGAAAAC	TGAACACAGA	GCAGATTCA	CACTTGCCC	AGGTCACACA	6841	
GCTGGGAGGG	GGCAGAGCCA	GGGTTCAAAC	CCAGGCAGTC	TGGCCTCGGA	CTCCAGGCTC	6901	
CTAACCCCTGT	TCTCTACTGC	CTTCTGCACT	TCTCATATGA	TTCTGCCCAT	CATTCAAACC	6961	
GCACAACACT	GCTGTGAGTA	AAAAGTGT	GCCGAATATC	AGGGTAGT	AGTAACATGC	7021	
ACAAAATCAC	ACAGCTAATC	AAACATCAGAG	GCAC	TTCAT	GTGGAGTAGA	CAAGCCAGAG	7081
AGAAGATGTG	CTGATGGCAC	AATGAATACA	TTAAGTGAA	TCCACCTTG	AGATTTCATC	7141	
ATTCTGCTG	TGAGTAACCT	TCAACTAT	AATTTATGG	GATAATT	AAATGTTGTC	7201	
TATACAAATA	TATAAGTTAT	ACTTATCCAC	ACAAGTACTT	TC	AAAGTGA	GATAAAAGTCT	7261
GGATGTTACT	AGATCAAAAC	TGCATTTTT	TATTTATAGA	TGTAGCAAGA	GAGGAAACAC	7321	
AAAGGAGGTA	AAGCTGCCG	TTCAAGGTGGT	TTTCTTCACA	GATTGACTGT	TCTACCAATT	7381	
GTTGTGGACT	TTGGGCACCA	AATTAATAGG	ATATATGTT	GCAGTGT	TCAT	ATGTTATATA	7441
GATTCA	TTTTAGTAGG	CTTATTGAA	CTGCCATGTG	CCAGTA	TGTTAGATGT	7501	
TTAGATGGCA	GATGTGTCTC	TAGACAGAGC	TTACAGTTGA	GAGTATGGGT	TGTGTGGGGA	7561	
GAAGTGAATA	GATGACTATA	TTCCATGATA	CATGCTGTAT	TACAATACAG	TCCTACTTCA	7621	
CTTAACGATG	GGGATACATT	CTCAGAAATG	AGTTAGGAGG	CAAATGGTT	GTTGAATGAA	7681	
CATCACAGAG	AGCACTTACA	CAAACCTAGA	TGGCATAGCC	ACACCTAGGC	TATATGGTAT	7741	
AATCTATTGC	TCCTAGGCTA	CAAACCTGTG	CAGCATGTT	GTATTGAATA	CTACAGGCAA	7801	
TTGTTACATA	AAGTTAAGT	TTTGTGTACC	AAAAAATAGA	AAAGGTAATG	CATTACACTA	7861	
CAGTCTTATG	GGGCTGGGAT	GTCACTAGGT	GATAGGAATT	TTTCAGCTC	GTTCTAATCT	7921	
TACGGGACCA	CCATCATGTA	TGCA	GACAT	ACTGT	AATTACAAGA	TGGTGGCTAT	7981
ATTAAACAGA	ACTACTTAAG	CTAGCCATGG	AGGTATGGTC	CGT	GAGATT	TCCTGAAGAA	8041
TTAACGTCTG	GATCAATTCT	GGAAGGGCCA	GCAGGAGTAC	TCCAGGCAA	GGGGTGAGAA	8101	
AGGAGCTTCC	AAGTAGAGTG	AAGGTATG	GCAAAGACTC	AGT	GAGGAGT	CGAGTGAACA	8161
TAGCACAGGG	AGGACATGTT	GGTGAGGAAG	GAGGGGTGAA	GCCACAGAGA	CAGGAGGGAG	8221	
CCAGATGACA	GAAGGCCTTG	CAGGCGGTG	TAAGGAGTT	GGATT	TTTATC	CTTACAGTGG	8281
TGGGAAGTCA	TTGTAAAAAT	ATTAAGCAAG	GGAGTGGCAT	AAACAA	TTA	CATTTCAAA	8341
AGATCACTT	GGCAGCAGAT	AGAGTATATA	TGTAAAAGGA	GTAAGAAAGA	GTTAAGTTAG	8401	
AAAGCAAGAA	ATGATCAGGG	TATGCCCTAA	AAACACTGGCA	ATAGGGAAA	AGAGATGTCA	8461	
ATCAGAAAGA	TTGAGAAAGT	ATAATTGAAT	TGACTTGGT	AA	CAAATAGA	AGTAAGGCAT	8521
AAGGGACAGG	TAGAAATATG	AGATGACTTC	CAAGTTCTG	TTTAAAGATA	CCCTTTATTG	8581	
AGAGAGGATG	TATAGAAGCT	GTCTTAGGG	GAAGACAAGA	AATTG	GGTT	AGGCCATGTC	8641
AACAGGTAAT	GGCCAGTAGG	CACATGATT	AGTTATT	GTGGGCTC	TTT	AGGAGAA	8701
AATCTGAGCC	AGATTCCAGG	AAGTCACAGC	AGGGACTACC	AA	AGGGTCA	AACAGCAGAG	8761
AGTGTGGAAA	GGACTGAAAA	GTGATCATTG	TACATAACAA	ATAGAAGCTC	ACTGATTTC	8821	
TAGCAAAAC	ATCTTCAGCA	GAGTAGCGT	GTATAAGCTA	TATTG	TAGGG	GACTGAGGAA	8881
GAAATGGGCT	CTGAGAAGTA	AAGACAAACA	ATATGTTT	TA	AAATAAATT	TCTTTAGTT	8941
CTTAAAAAAA	AAGCCTCTT	TCCAGCTTG	TTGGGAAGTG	AAGAGAGGGA	TTT	GAAGAGTT	9001
GGAGATTGGA	GGATAGGATG	AGTACATCAA	GATACACTAC	GTG	TAGTGC	AGTGCATTAC	9061
AAATGTGAGC	AAAAGTGAA	GGCATTGTA	ATCATATGAT	ATTG	GCTAATT	AAAAGACAGC	9121
TGTCAGTCAT	ATGCCAGCT	CCTGGTAAAG	CATGATGAGA	AGAGTACA	AT	CATGGTAGTG	9181
ATTAAAAAT	TGCTGCCAGT	TTTGTGGATT	TTCTTATGC	TAGACAGT	GT	AAGCTTTA	9241
TCAATATTAT	TTAACTCACA	CAACTCTAAG	AGGTAGATAT	TATTATCC	TTT	TGACAAA	9301
TTAGGAAACA	GAATTATAAT	GA	CTGAGAAA	GTCTCTG	AGTAA	ATGAAAC	9361
AATT	TTACTTAATG	ATAGAAATGA	ATATTGGCT	TCAAGACTAT	TTG	TACTTAA	9421
TGAAATCTGT	CTTGAGCAAC	ATAAGCTATT	TTTTCAAA	TTTTAAGACA	AAAATCA	TT	9481
TCTTCTCTCC	TGTCTCTTA	TTTTGTTCC	CTTCACATGT	TGTAGC	CTA	CTACTTG	9541
TGGCCATT	TGGTGCAGTT	TGTC	ACTGG	GCTTC	CATCTA	AGGCCACCAA	9601
TAACATGATC	ATTCGTGGGA	GAAAGATCAA	GCCTCATTG	TGATGGGTG	CTC	CTCACAG	9661
TCGGATAATA	CTGAAAAGAG	AGCTAAATGT	GGGAAAGAAC	CAAGTTG	ACAGGAAAGA	9721	
ATCAGGCCAC	TGTGAAAATA	AGCATTG	TTTCTG	CTTGAAAGTC	TTC	ATTTTTTA	9781
AAAAATTCA	GACACCTGAA	GT	TTCTAGC	TTTAC	CTG	AGCAGC	9841
TGATCAACAC	ATAAACACAAGC	ATTAGAGAAA	TAGAAAAGCT	GTAAGAATAC	AAAATATGG	9901	

GCCAGGTGGG	TGGCTCATAC	CTGTAATCCT	AGCACTTGG	GAGGCCGAGG	CAGACGGATC	9961
ACCTGAGGTC	AGGAGTCAA	GACTAGCCTG	GCCAATATAG	TGAAACCCCTG	TCTCTACTAA	10021
AAATACAAAAA	CTTAGCAGGC	TGTGGTGGCA	CGTGCCCTATA	ATCCCAGCTA	CTTGGGAGGC	10081
TGAGGCAGGA	GAATCTCTG	AACCCGGGAG	GCGGAGATTG	CAGTGAGCCA	AGATCACACC	10141
ACTGCACTCT	AGCCTAGATA	ACAGAGCAAG	ACTCCATCTC	AAAAAAAAAAA	AAAATACAAA	10201
AATATGAACC	ACTGAAAATT	AAAAAGACAT	GCATGCATTC	TAGGTCTTA	ATTTTTTTTC	10261
TTAATAATT	TTTTCTCTC	TGGATAGCAG	CACCTAGTTT	AGGAAGCAAG	ATTTTAGCTG	10321
GTCTAACGAC	TGGAGGAGTG	GCAGTATTCA	TTGGGCAACC	CACAGAGGTC	GTGAAAGTCA	10381
GACTTCAAGC	ACAGAGCCAT	CTCCACGGAA	TCAAACCTCG	CTACACGGGG	ACTTATAATG	10441
CGTACAGAAT	AATAGCAACA	ACCGAAGGCT	TGACGGGTCT	TTGGAAAGGT	AACTAACTTC	10501
AAAATGGGTT	TTATAACCAC	CAAAGCACAT	ACATACAAC	AGCAACTTAT	TGTAAAGTAG	10561
AGTTAATAAA	CATTTCTTT	TTTTTTTCC	CCAGGGACTA	CTCCCAACT	GATGAGAAGT	10621
GTCATCATCA	ATTGTACAGA	GCTAGTAACA	TATGATCTAA	TGAAGGAGGC	CTTTGTGAAA	10681
AACAACATAT	TAGCAGGTAA	CTTCCCATT	CATATAACAA	ACAGGTCTGC	ACCTTTAGAA	10741
GTTCATCTG	GAGCTCTGC	AGCCACCTA	TACTCAATCT	CTTAACCTCA	ATAGTTTCT	10801
CTTTTAAAAA	ATTAAGTAAT	TTTGAACCAT	ATATAACTTT	GTGAGAAGCA	GGAAAAGACC	10861
AAAATATTAA	GTAAAGAAG	TTTGCCACA	ACAAAAATAT	TTTGAACAA	AAATAACAGG	10921
CAATTTCATG	TCAGCATTAT	TCTCATTAA	TACTAATATA	TGGGACTTTT	GTTAGAATCT	10981
TATTCTTTAT	ACAGCAGAAT	TCAGGAGGTA	AGTCCATCCT	GCATACTATA	TCCAAAAGAT	11041
CTAGTTATAA	AAGGAGCTTA	TCAGTGGTCT	CATCCAAAAA	GTAATACCAT	AAGATAGGTT	11101
CTTAAAATAA	ATATTCTAAC	AACTCTAGA	GACATTGAAA	TTTCCCTTAT	TTCAATAAAA	11161
AAGTATTAGA	TGCTCATATA	TTAGGCATTA	TTACAGGCCT	AAAGGCACA	GAGGAAACTA	11221
ACAGTTTACT	TTCCTAAAGT	GTTAACAACTC	TATTAAGCCA	TTTACTCTTT	ACCTCTTTT	11281
TCTAGTGCAA	TACCTTCTT	ATTTTATTTT	ATTTATTTAT	AAGACATCTT	CATTGACCTA	11341
CTGTTATCAA	TAGGTTATA	AAGATATGAC	AGATAACTAA	ATTGCAAGCC	CCCCAAAGTC	11401
TGATGTTGAC	CTGTTTCATC	GATCCATT	AGATGACGTC	CCCTGCCACT	TGGTGTGCGC	11461
TCTTATCGCT	GGATTTGCG	CAACAGCTAT	GTCCTCCCCG	GTGGATGTAG	TAAAAACCAG	11521
ATTTATTAAT	TCTCCACCAG	GACAGTACAA	AAAGTGTGCC	AACTGTGCAA	TGAAAGTGT	11581
CACTAACGAA	GGACCAACGG	CTTCTCAA	GGGGTAAGAT	ATGATCTTGT	GTATCTGTAA	11641
TGTGTTCTGG	CTGTCGTGT	GCTTGGGAC	ACTCTCATGT	CAAGCAACCG	ACATTTAGCT	11701
TACAAGCCTT	AGTATATTCA	TATACTTAGT	ATTGACTTTT	CCTGCCACA	GATTCTCCA	11761
ATCCACCAAT	TCCACTGTGC	CAGAAAGTAA	AAAGCCATGA	TATTCAAATT	TTCTCAACTT	11821
TGATCAAAGG	CTCATTCAAG	ACCAAGTGCCT	TTTCCACTGG	TCCCAATCTA	CTGGAAATGC	11881
AGACAGTATT	TTGCCTTCTC	TGGGCAAGAA	AGTTATAAAG	TAGAGGGAAA	TCATAATAGA	11941
GAGCTATGAG	AGAACAAAGAT	TTGATTGAT	TTAATTGAT	GGACTCAAGT	TTAACATTG	12001
TAAAACCTAGA	GATAAGACAT	CACCAACAA	CTAGAAAAGT	GATGCAGAAA	AGTATTGAT	12061
TTGGGTAATT	ATTACACTCA	CCTAGAAACA	AGTGTGTGT	AATAGATTAC	ATATTTCCAT	12121
AATGCAATGT	TGTATCAGAA	ACTACCTTCC	TAAGAAAATA	TAGTATGGC	TCGGCGTGGT	12181
GGCTCGCACC	TGTAATCCCA	GCACCTTGGG	AGATGGAGGC	AGGAGGATCA	CTTGAGCCCA	12241
GAATGGGCAA	CAAAGCGAGA	CCCTGTCTCA	ACAAAAAATT	AAAAAATTAG	CTGAGTGTGG	12301
TGGCACGCAC	TGATGGTCCC	CTCTACTTGG	GAAGCTGAGG	CAAGAGGATC	TCCTGAGGCC	12361
AGGAGTTCAA	GGTTTCAGCG	AGCTATGATT	GTGCCACTGC	ACTCCAGCCT	GGGAGACAGA	12421
GCAAGTCCCT	GTCTAAAAAA	AGAAGAAGGA	GAAGGAGGAG	AAAATACAGT	ATTAAGTAAT	12481
CTGTCAATAT	ATTCCACAAAG	GATTACACTA	GTGGTTAA	AATAAAATT	TATTACCTT	12541
TTAAATTGTA	AGGCCATTCC	TCAAGCTT	AAATTAAGC	ATGAATGCAT	CATACACATT	12601
TTATAAAAAG	TTCCAACCTCA	TCATAATCTG	TACTTATGAT	ACATTAATAC	AAATGAAGTT	12661
CATTATAAAA	TTAACTTAA	ATGGATATAC	CAGTTATTAA	ACCATTAACC	ATTAAATAAT	12721
TTTATTTTTT	TCAAATTAA	AAACCTTTG	GGGAAGAAAT	ACTACAACAT	GGATGAACCT	12781
TGAAAACGTT	ATGCTAAGTG	AAATAAGCCA	GACACAAAG	GACAAATACT	GTATGATTAC	12841
ACTTAAATGA	GGTACCTAGA	GTAGTCAAAT	TCATAGAGAC	AGAAAGAATA	GAAGTTACCA	12901
GGGGCTGGAG	GTAGGAAAAA	ATGGAGAGCT	GTTTAATGGG	TAGAGAGTT	CTTTTGGGG	12961
TGACAAAAAG	GTTCTAGAGA	TGGATAGTGG	TGATGGTTAC	ACACAATGTG	TGTGTACTTA	13021
ATGCTACTGA	AATGTAATT	TATGATTTT	TTTTTTGCA	GCAAATACC	CCACATTGGG	13081
AAGTGAAGAG	AAACATGTTA	AGAGACTTGA	AGGAAAAAAA	TTGGGGCAGA	GGGGTGT	13141
TTATAGGTTA	AAACATAAAAA	GCCATTAAA	CAGTAACAAT	TTCTCTAAGG	ACAAGAATCG	13201
TCAAGATTGA	GACAGCACTG	ATTCTTGAC	TCTACTCAAT	ACTTCTTGG	TTTCTCTTCT	13261
TCCTTCCCCC	TTCTAATAGT	TTCCCTACCTC	CCATTCAAGAA	AGCAAAGCAA	AAACAGCAA	13321
AATTCCCCCT	TCCTCAAAAA	AAGGAAAGAG	TTTTGAAAAA	AGTTCATGTC	AGTGAAGAAA	13381

10

30

40

AGACATGTT TGGGAGTGAA GGATATTGT GGATTTGTAT AGATGTGATC ATCAGGGCTG 13441  
 TGTTGTTTG AAGTAATATA GGACATCTAG AGGAAAATT ATTTCAGCA GAGGAGGGAA 13501  
 AGATGAAGAG TAGGTACTT TAAGCATCTT CACTTGAGGA GTGGCAAAT GAGAACATA 13561  
 ACCTGCTATA ATCACTTTAA GAATTTCAGG CTGAGTGTGG TGGTGCAGTC TCTAGTCCC 13621  
 GTTACTCCAG GAGGCTCAGG TGGGAGGATC ACTTAAGCCC AGGAGCTCGA GGGTGCAGTG 13681  
 AGCTATGATT ACACTACTGC ATTCCAGCCT GGGCGGCAGG GTGAAGCCTC ATCTAAAAA 13741  
 TTAAAAAAA AAAAATCAA ACAAAATTAAT CGAACGATGA CATGCACCTT TCTAGGTTGG 13801  
 TACCTCCTT CTTGCGACTT GGATCCTGGA ACGTCAATTAT GTTTGTGTGC TTTGAACAAC 13861  
 TGAAACGAGA ACTGTCAAAG TCAAGGCAGA CTATGGACTG TGCCACATAA TCAGCTTCAA 13921  
 GAAAATGATG TAACATACCA GTGGGAATCT TGCTGACTGG ATCATAAAA CAAACAAAAC 13981  
 TTATTCACCT ATTAAACTT AAAAAGATAA AGGAATTTC GCAGAGAATT TTGGACTTTT 14041  
 TTATATAAAA AAGAGGAAA TTAATGCCTA TTTCATATAA CTTTTTTTTT TTCTCAGTGT 14101  
 CTTAAGAAGG CGAAAGCAA ACATTCAGCA TATACCCCTGG CAAATGTAAT CCAGATAAGC 14161  
 TACTGCATTT GACCATTCT GGAGTGCAAT TGTGTGAATG AATGTGAAGA ACTTTAACAT 14221  
 GTTTAATTA CAATTCCAAC TGGTGGAAA GAAACTGAGT GAAATGCAGT TTATATTTAT 14281  
 AAATACTTAA AAATGAAGTT ATTAAAATA TTAGTTTTA TTAACACACAG TTGTCAGTTA 14341  
 ATATATTCAA TAAAGTATTG CTAATACCTT TTAAAGTTG TCTTTTGAGA TCTATACCTG 14401  
 GGTGTAAGAG TCAAGTTCAC TAGAACACAA GACTGCCAA TAGCAAATGC AGGTCTTAG 14461  
 AATCATAGGC ATGAACCTAC TCTGAATGTT ATTAGTATAG ATTAAATATG TTTAGAGTCC 14521  
 AGATTGATG ACATCTCTAA CAAACTCTAA TCTAACGAC TATATTCTATT TTGGCAGGAT 14581  
 TGCTACTAGA GTCTTGGTAT CTGTGCTAGC ATCACATAAT TTAGTAGCTG GAGGGTACTT 14641  
 CTGGGAAGAC AGAGGAACAG TTTGAGATTCTACTGAGAT GAAAACGAAT CTTCATGGAA 14701  
 TCTTCAGCA AAGCCAAATT CAAATTCATC ATTACGACCT GTAGTAACCT TTCAATGCC 14761  
 TACAAACTGC ATGCAGAAGA GATAGGGAAA CAGTAAAACA GATATTTAAA GAAGTTTTA 14821  
 AGACAAAGCC CAGCCTGATT TTAAGCTAA TCCAAGGATT GGCAGCTTGG ATGAGCAGGA 14881  
 AGGTACAGG CTGCCAGACA TCATTCTAGT TCTGTTTTA TCAACTCCAT GTTACATTAA 14941  
 CTATCAGGGA TTCTCACCTC ACCCTCATGC ATGTCTTCCC CATTCAATTAC CCGCAAAAGT 15001  
 GTCTGTAGC AGATGTCTC TGTGTCCCAT ACATACCATT TTGCTCTTTA GTGCTTGCTG 15061  
 GCCTGACTTC CTATTGTCTAT GTCAGCATCT GCCCTTTTA GGGTCTCTGG CCACCAAGAGC 15121  
 CAGCTTACT CACCTGTGCA TGGCATTCTA GAAGAGCAGC AGGGAAAATA ACACAGCCCC 15181  
 AGTGCAGCCC TTAACCACCA ATAACCTGGTA GTAGTTGGTG TACAAATATC TCAGTTCCCT 15241  
 CAACTGTCAG GTGGAATACC GCTGAGGGAT CAAACTCTAG TAACACACAG TAGTGTGTTG 15301  
 CTTACTATGG TTAACTAAA AATCACAGGG TCTTCATGCA TTTGGAAAGG ATACTTTATT 15361  
 TCTTACAAAG GGTACAGGC TACAAGGTGG TCATTCTGCA GGCTAGAAAG CGTAACCTCC 15421  
 AGCAAAGACC GGAGGCAGGC ACTTCAGGG AAGGAAGAGT AAGACAGAAA TTTAAATTGA 15481  
 ATGGGTTGGC CAAGTATAACA TATTCAACAG GCTACAGGTG GATTCAATGAA TATTCAATGAA 15541  
 GGCAGTCCTG ATGCATGCAT GTTACACCTT GGGGTGGAGG CTTAACATTT AATGTATTA 15601  
 CAGTTAGGCC CTATACATGA AAAGGTGAAG CAGTAACACG AAGGCACACAA ATGCACCATT 15661  
 TCTGTAAACA GGCCAGAGCC AGTTCACAGT GGTTGGTCTC TTATCATGAG AAAGCTACTA 15721  
 AAATCCTCTT GTCCAGTTAA AACTGTAGTT ATGGCTGGTG GAAAATGGGC TGGAGTCAGT 15781  
 CAACACTTGG TGAAGCTGCA GTTGCTTCAG ACACCAAGG CCAGTGTGTTG TTTAGCTGCT 15841  
 CGAGAAAAAG AAAATCTTG TGGCAGTTAG AACATAGTTT ATTCTTAAG TGTAGGAGTG 15901  
 TGTGACTTAA // 30

## 【 0 2 8 2 】

(表28)ヒトUCP2遺伝子の2,113塩基対(bp) 転写物ENST00000310473の核酸配列(8つのエキソンは大文字で表示)

番号	エキソン/イントロン	起点	終点	長さ	配列
	5' 上流配列				.....aatcgacagcgaggccggtcgcgaggccc cagtccgcctgcaggagcc
1	ENSE00002287650	73,694,352	73,693,766	587	AGCCGCGCGCTCGCTCGCAGGAG GGTGGGTAGTTGCCAGCGTAG GGGGCTGGCCCATAAAAGAG GAAGTGCACITAAAGACACGGCCC

					CGCTGGACGCTGTTAGAAACCGT CCTGGCTGGAAAGGCAAGAGGT GTGTGACTGGACAAGACTTGT CTGGCGGTCAAGTCTGCCATCCT CACAGAGGTTGGCGGCCGAGA GAGTGTGAGGCAGAGGCGGGGA GTGGCAAGGGAGTGACCATCTG GGAACAGAAGGAGTAACCGCG TGATGGGACGCACGGAAACGGG AGTGGAGAAAGTCATGGAGAGA ACCTAGGCAGGGCGGTCCCCGC GGAAAGGCGGCTGCTCCAGGGT CTCCGCACCCAAGTAGGAGCTGG CAGGCCCGCCCCGCCCCGCAGG CCCCACCCGGGCCCCGCCCCCG AGGCTTAAGCCGCCGCCGCCT GCGCGGAGCCCCACTGCGAAGCC CAGCTGCAGCCTGGGATTG ACTGTCCACGCTCGCCGGCTCG TCCGACGCGCCCTCCGCCAGCCG ACAGACACAGCCGACGCAGTC CGTGTCTCCCTGCGGCTCG
	イントロン 1-2	73,693,765	73,692,678	1,088	gtgagcctggccccagccctgcgcc.....acttc tgcctttgtcaccacacag
2	ENSE00001184362	73,692,677	73,692,521	157	GACACATAGTATGACCATTAGGT GTTCGTCTCCCACCCATTTC TGGAAAACCAAGGGGATGGC CATGATAGCCACTGGCAGCTT AAGAACGGGACACCTTAGAGA AGCTTGTCTGGAGGCCTCACC GTGAGACCTTACAAAGCCGG
	イントロン 2-3	73,692,520	73,689,523	2,998	gtaagagtccagtc当地aaaggagg.....tgggg cttttc当地cttggcttag
3	ENSE00001184370	73,689,522	73,689,298	225	ATTCCGGCAGAGTTCCTCTATCT CGTCTTGTGCTGATTAAAGGTG CCCTGTCTCCAGTTTCTCCAT CTCCTGGGACGTAGCAGGAAATC AGCATCATGGTTGGGTTCAAGGC CACAGATGTGCCCTACTGCCA CTGTGAAGTTCTGGGGCTGGC ACAGCTGCCTGCATCGCAGATCT CATCACCTTCCTCTGGATACTGC TAAAGTCCGGTTACAG
	イントロン 3-4	73,689,297	73,689,142	156	gtgaggggatgaaggctggagtc.....tageta ccctgtcttggcttgag
4	ENSE00001252503	73,689,141	73,688,931	211	ATCCAAGGAGAAAGTCAGGGC CAGTGCAGCCTACAGCCAGCGCC

10

20

30

40

					CAGTACCGCGGTGTGATGGCAC CATTCTGACCATGGTGCGTACTG AGGGCCCCCGAAGCCTCTACAAT GGGCTGGTTGCCGGCTGCAGCG CCAAATGAAGCTTGCCCTGTCC GCATCGGCCGTGATGATCTGTC AAACAGTTCTACACCAAGGGCTC TGAGC
	イントロン4-5	73,688,930	73,688,063	868	gtgagatggagaagggttaggc.....cactg acccatggctgcccacag
5	ENSE00001184355	73,688,062	73,687,868	195	ATGCCAGCATTGGGAGCCGCC CTAGCAGGCAGCACCAAGGTGC CCTGGCTGTGGCTGTGGCCCAGC CCACGGATGTGGTAAGGTCCGA TTCCAAGCTCAGGCCGGGCTGG AGGTGGTCGGAGATAACCAAAGC ACCGTCAATGCCCTACAAGACCAT TGCCCGAGAGGAAGGGTCCGG GGCCTCTGAAAG
	イントロン5-6	73,687,867	73,687,788	80	gtgttaccatgtttcccttc.....acccagga tcttctccctcacag
6	ENSE00003361285	73,687,787	73,687,686	102	GGACCTCTCCCAATGTTGCTCGT AATGCCATTGTCAACTGTGCTGA GCTGGTACCTATGACCTCATCA AGGATGCCCTCCTGAAAGCCAAC CTCATGACAG
	イントロン6-7	73,687,685	73,686,717	969	gtgagtcatgaggtagacggtgctg.....tgccctg cctgctcccttgccag
7	ENSE00001184349	73,686,716	73,686,536	181	ATGACCTCCCTGCCACTTCAC CTGCCTTGGGCAGGCTTCTGC ACCACTGTCATGCCCTCCCCTGT AGACGTGGTCAAGACGAGATAC ATGAACCTGCCCTGGCCAGTA CAGTAGCGCTGCCACTGTGCC TTACCATGCTCCAGAAGGAGGG CCCCGAGCCTCTACAAAGG
	イントロン7-8	73,686,535	73,686,167	369	gtgacccttgttcccccacca.....atgacct gtgattttctcccttag
8	ENSE00001184368	73,686,166	73,685,712	455	GTTCATGCCCTCCTTCTCCGCTT GGGTTCTGGAACGTGGTATGT TCGTCACCTATGAGCAGCTGAAA CGAGCCCTCATGGCTGCCTGCAC TTCCCGAGAGGCTCCCTCTGAG CCTCTCCTGCTGCTGACCTGATC ACCTCTGGCTTGTCTCTAGCCG GCCATGCTTCCCTTTCTCCT CTTCTCTCCCTCCCTCCCT

10

20

30

40

					CTCCTTCCCTCTTCCCCACCTCT TCCTCCGCTCCTTACCTACCAC CTTCCCTCTTCTACATTCTCATC TACTCATTGTCTCAGTGCTGGTG GAGTTGACATTGACAGTGTGGG AGGCCTCGTACCAAGCCAGGATCC CAAGCGTCCCCTGAAAG TTCAGGCCAGAATCTCGTCCTGC CCCCGACAGCCCAGCCTAGCCCA CTTGTCAATCCATAAAGCAAGCTC AACCTGGCGTC
	3' 下流配列				tcctccctcttttagcttaccagaggcttggtcca atggccttt.....

## 【0283】

(表29) 5,000 bp 5'UTRおよび2,000 bp 3'UTRを含むヒトUCP2遺伝子 (ENSG00000175567) の15,174塩基対 (bp) の核酸配列、(8箇所のエキソンは強調表示)

TCCAGCCTGGCAACAAGAGTGAAACTCGGTCTCAAAAAAAAAAAAAGAGAAGA  
AGAAGAAAGAAAAGTAGGTGGAGTGTGGTGGCTTGACCTATAATCCCAGCAC  
GGGAGGCCGAGGTGGGTGGATCTATTGAGGCTAGGAGTTCAAGATCAACCTGCC  
CATGACGAAACCCCACCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCACGGCGTGGTGT  
GTGCCCTGTAATCCTAGCTACTTGAAGGCTGAGGCAGGAATCGCTTGAACCTGGG  
GGCAGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCTTGCCTACTGCACCTCAGGCTGGCGAC  
GCACAACTCTATCTCAAAAAAAAAGAAAAACAAAAGAAAACAAATATATCAA  
AATAATTCTAGTTAGTTGGATTCTCACTTATTCAATTCAATGACTTATTGAATTATC  
ATATATTACTAGTGTCTTITAATACATACCTCTACAATTTCACACTGAAAATTACT  
TCATTGATCAGGGCTCTTAAACTGATCTCCATTGCTTACTAATTAGTT  
ATTATTCTATGTATTAGCACTCTGAGCCTACTGTAATGATGTGTACCTTAATAAGAA  
CTGAATATTGTAATGGCTGGCAGTGAATTAGTTAGTCTTGAATTAGAGCTAAA  
ATATGGGAGTAATTGCTGCTTATTCCCTTGAGAGGTAATAGAGGAAAACAGAA  
TCTAATAACAATCACAGATTTCGGAAAGCACTGTAAAACCATATGATCAATTCTA  
GCTCTTATGTAAACATGGAAAGATTGCCAGCTGAACACCTGTCTGCTAAGAAG  
TTGGGGAGAATTGCAATTAGACTGTGAGCAAAATGAGAACGACTGCTATGTT  
ATGCTTGTGAATTAGCTTATTTCATTACACACAATTGATGGAAAAATGCATCTT  
TTAACTCGGTGTTTCATTCAACTTTAAACATACAGGAGTGGGCCAGACCCGGTG  
GCTCACACCTGTAATCTCATACTTGGGAGGCCAGGTGGACCACAAGGTC  
AAGAGATAGACACCATTGGCCAACATGGTGAACACCCATCTCCACTAAAATAC  
AAAAATTAGCTGGCATGTTGGCACGTACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGACTGA  
GGCAGGAGAATCGCTGAACCTGGGAGATGGAGGTACAGTAAGCCGAGATCGCGC  
CACTGCACCTCCAGCCTGGCAGAGCAAGACTCCATCTCAAAAAAAA  
AAAAAAAACCAAGGATGTGTTACCAAGGAAAATTCAATT  
AATGGTTAATTATGTGACAAACATGTCAAGTAATTCCATCTGGCTTGTGTCACCATT  
TCCCCACCCCTTTCAAGAAACCAAGAAGAAGAACATCAAAATGGA  
CATGGAAATTAACAAATATGATTCAATTAACTCCTAAGAGGTTTTAAAATT

10

20

30

ATTTTATTTGAGACGGAGTCTGCTCTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGGAT  
 CTCAGCTCACTGCAACCTCCATCTCCCAGGTTCAAGCGATTCTCCTGCTTCAGCCTCC  
 CAAGTAGCTGGAACTACAGGCAAGCACCACACCACAGCTAATGTTGTATTTTG  
 GTAGAGATGGGGTTTACCATGTTGCCAGGATGGTCTCGATCTCTGACCTCATGA  
 TCCACCCGCCCTGGCCTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTATTTTATTTTTGA  
 GACAGGGTCACCCGTCAACCCAGGCTGGAGTGTAGTGGCACAAATCATGGCTCACTG  
 CAGCCTCAACCTCCCAGGCTCAGGTGATCCTCCATGTCAGCCTCCAAGTAGCTGGA  
 ACTATAGCGTGCAACACCATGCCAGCTAATTTGTATTTTAGAGAGACAGGG  
 ATTTGCCATGTTGCCAGGCTGGTCTCAACTCCTGCCCAAGTGATCCACCCGTCT  
 CAACCTCCAAACTGCTAGGATTACAGGTGTAGGCCACCGTCCCCATCTCTGCT  
 10 AAGTGGGTTAAAGAAATTCACTGTTATGTCAATTTAAAATGTATGGTTATCAA  
 TTCGACTTCTTTAAAAATGCAATCAGATAACTGTATGCTTGTGAGGGGAG  
 GAAAGTTAATATAGCCAATCTACTCAATATTTAGCAGAAATTATCAGAGACTAAG  
 GAAATGTTAAGTTTCTATGTTGGTTAATTACCTAATGTTTCAGTTCTCT  
 TCATTCTTGTGTCTTTTCACTTCAGTGTCAAATACAGTTGTATTAAAGATT  
 TAGAAGTCCAAAATGTAAGCACAGTGGATTGTTCTGGATGATGTTAAAATT  
 TACAACAAAATATGAAACTTGTCAATTGGTTATTGGCACATACAAAATTTA  
 CAAATAAACGTGTGTGTGCGTGTACACACAATTCAATGAAATAGATGTGAAA  
 CAAGTTTCTTTTTTTGAGACAGAGTCAGCTGCTCTGCCAGGCTGGAGT  
 20 GCAATGTCGCACTCAGCTCACTGCAACCTCTGCCCTGGTCAAGCGATTCTC  
 CTGCCCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGACTACAGGCACCTACCACCACTCCAGCTAA  
 TTTTGTGTTTACTAGAGACAGGGTTCAACATGTTAGCCAGGCTAGTCTCAA  
 CCTGACCTCAGGTGATCTGCCGCCCTCAGCCTCCAAAGTGCTGGATTGCAAGGCGT  
 GAGCCACCTCACCTGGTACAAGTTCAAATACATTATCTGTACCCATACATTCT  
 CCAGTTGTCCACAGGACATCTTATGACTTGAGCAAGCTGCTAAAATCCAAGGGTG  
 CAGCGTTGTATGCTATAGGATTGCTCAGATCTGCCCCACCCGAAAGAATTAA  
 GAGAATTCTTGAGGCCAGGCACAGTGGTCACACCTGTAATTCCAGTACTGTGAGA  
 GTCCGAGGTCAGAGGACTGCTTGAGGCCAGGAGTTCAAGAGCAGCCTGGACAACAT  
 AGGGAGACCTGTCACTACAAAGAATAAAATTAGCCAGGCTAGTGGCTCATCC  
 CTGTGGTCCCAGCTACTAGGGAGGCAGAAGTAGGACTGCTTGCCAGGAGGTCAA  
 GACTGCAGTGAGCTGAGACCCAGGCCACCTGCATTCCAGCTGGCAACAAAAAGAG  
 ACCCTGTCTAAAAATAAGTTAAATAATAAAAAATAGTTAAACCCCTA  
 AACACATCTTCTTTCAAAGAGGACTTCTTAAGGACTTCATGCTGCGTCTGTTGAT  
 CTCACCTCCCTTTCACTGCTCCACACTTTAACAGTCTCTTGCCTGCAAGGATAATAA  
 GTATATAGTTCTGGAATCCAGATTCTCCCTGTTGGACAGCCAGGGGACAATT  
 TTGGTCTGCAGGCCTTGCATCTGTTCTGCTGCTCAGCAATCTCACAGCAAATT  
 GCCGAGCCTCTCCGAATGCACAGCCAGACAGAGCTCAGCGAAAAGCTAGAGAAC  
 CTGGCGGAGGGAGACTCACAGTGCCACAAAAAAACTTATCTTCTCTCTGTCTTTC  
 30 TTTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT  
 TGCCTTGACTCTGTTCCACGCTGCTCTGCCAGGACCATGCGCTGGCGTGT  
 CTTCCGCTATAATTATCCAGGCCATCCCAGCTCTGGTCCCCTCAGCTGTTCCCTGG  
 CAGTCCCTCTGCTGGTAAAACACATATGGCGCCGGCTGACCAGGGTGTAAAGTGT  
 GTGAATATCAGGAAGATGACTGAACGTCTTGGACTCCGTTCTCATTGTAAAAT  
 GGAGGTTAATACCAGCCTCTTCACTCCCCAACGCACGTGTTGTCCCGGCCAGA  
 GGGCCAATTGTTGGCTGTTCACCGCTCAGTTACCCCCACAGGACGGGTCAGCCAAT  
 TAAAGGCGAACCAAGGCCGGTCCATCTCCTGACGCCCTTCTCATCCCAGGGCTGGA  
 CAGGCAGCTGCCCTGGGCCGGCTGCTGCCCTGTCACGTGCGGGGCCGGCTTGT

10

20

30

40

CTTGTCTGTGTAGGAGCGTGAGGTCACGCTGGTGCTCCGCCCGCCGGGCCT  
 TTAGTGTCTGGTCCCTAAACGCCAGGCCGCTCCACCGGGGGAGAAGGCCGAACC  
 CCAGCCGAGCCCACGGCTGTTGCGGTGCGGGCACCTGTTGCTGCAGTTCTGA  
 TTGGTTCTTCCCCGACAACGCCGGCTGTAACCAATCGACAGCGAGGCCGGTCG  
 CGAGGCCAGTCCGCCCTGCAGGAGCCAGCCGCCGCTCGCAGGAGGGTG  
 GGTAGTTGCCAGCGTAGGGGGCTGGGCCATAAAAGAGGAAGTGCACTTAAGA  
 CACGGCCCCGCTGGACGCTGTTAGAAACCGCTGGCTGGGAAGGAAAGGAGGTG  
 TGACTGGACAAGACTGTTCTGGCGTCAGTCTGCCATCCTCACAGAGGTTGGCG  
 GCCCGAGAGAGTGTGAGGCAGAGGCCGGAGTGGCAAGGGAGTGACCATCTCGG  
 GAACGAAGGAGTAAACGCCGTGATGGGACGCACGGAAACGGGAGTGGAGAAAGTC  
 ATGGAGAGAACCTAGGCCGGCGGTCCCCGCCGGAAAGGCCGGCTGCTCCAGGGTCT  
 CCGCACCCAAGTAGGAGCTGGCAGGCCGCCGCCGCCAGGCCGGGG  
 CCCCAGGCCGGCTAACGCCGCCGCCCTGCCGGAGGCCACTGCGAAGC  
 CCAGCTGCCGCCCTGGGATTGACTGTCCACGCTGCCGGCTCGTCCGAC  
 GCGCCCTCCGCCAGCCACAGACACAGCCGACGCACGCCGGCTTCTCCCTG  
 CGGCTCGGTGAGCCTGGCCCCAGCCCTGCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 CGTGCCTGCCGCTCTCCATTACCTCTCTCCACCCAAGTTGTACTCTTTCTT  
 TCTCTCGGTTTATTTTGTGTTGTTGTTGAGACAGGCTTCGCTCTGTCTC  
 CCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCATCTGGCTCACTGCAGCCTCACCTCCCAGGTT  
 CAAGCGATCCGCCGCCAGTAGCTGGGATTACAGGCCGCCACCACGCCGG  
 TAATTTTGTGTTGAGAGATGGGTTCGCCATGTTGCCAGGCTGGCTCGAAC  
 TGCTGAGCTCAAGCAATCCGCCCTCGGCCTCACAAAGTCCTAGAATTAGGCA  
 TGAGCCTCCGGGCTCCGGCTGTGCTAACCTTCTGTCCCTGGTTCTTATTCTCTC  
 TCTCTTTCTTAGTCCCTTGTGTTCTTCCCTCCGGCTCAGTGGCTGCTGGTGA  
 GCCTCCACCTTTCACTCCCTCCCTCACGATGCCGAGCCCTGCCCTGGATGGG  
 GACCATCAGCGATGACCACAATGACCTCCCTTACCAAGGCAGCTCCAGGCAGTGT  
 CCTGCACCGCCTTCCCAGGGCTGGGGCTTTCTAGTGGCTTGAGCTGCTCAA  
 TCTGGCCTCTGCAGGGCCGGCTCCAGCCCTCAACCTCCTCACAGCCGACCTGG  
 GACCTAGCCAATTCCCGAGAGTCTGTCCCCTACGTGACCCCTCACAACTCTCCC  
 ACTCACCAAAGTCTGATGACTGTGCTAGGGGTGCTTATAGAGTACTGAGTGT  
 CAAAAGCAGAAGTCTGGATGAGAACCAATTGTGATATTAGCAGGTGGGTGGGG  
 GTGGGGAGTGTACCTAGGTTATTCCGCCCTGCTTCCCTCCAGTGTGTGCA  
 CTTAACCAAGTCCCTGGGCCCTGTTCCCCATCCCCCTCCAAGGCATGGATTGGGG  
 CTTGTGTCTGGGCAGGTGGCCCTTCTAAACTCTGCCTTGCTCACCCACAG  
 GACACATAGTATGACCAATTAGGTGTTCTGCTCCACCCATTCTATGGAAA  
 CCAAGGGATCGGGCATGATAGCCACTGGCAGCTTGAAGAACGGGACACCT  
 TTAGAGAAGCTGATCTGGAGGCCCTACCGTGAGACCTAACAGCCGGGTA  
 AGAGTCCAGTCCAAGGAAGAGGTCTTGCTGCCTCTAACCCCTGTGGTCTAGGGC  
 AGGAGTCAGCAGGGCATTAAACAAAAATAATTACCATCCCCACCCCGACAGTGAAG  
 TGGCTTTCCAGTTACAGAGCACTCTCACACCTCCCGCTCTATTCTGGCCCTC  
 AGCTGACTCGGACAAGCCAAGGATCTGGTCCCATTATAAGGAGAAAATG  
 GGCCACGTGTAACAGTATTGGCCCAAGTCATCCGGAGGCCAGCAGAACAGAGCT  
 AGGACAGGAACCTATTGTTCTAACCTCATATTGATGCTAGCTTGAATCCCTGAA  
 ACCGAGATTGTAATCAGCCGGCTCTGAAACTGGTTATTGCTGGGACTGTAAAA  
 TAGGATTAACTATTCTAGTCCCTGCATTAAATTGCTGTTAGTAGGGCCATCTTACCC  
 ACCCTCTGAAGGACCTGACTTGGCAAGGCCAACATTAGAATATGGCAGCT  
 GAAACCTCTGTGCACTTGTCTTGGCAGCAGCTGGTCTTATTCTCTGGCCTTCA  
 CAACATCCTGCAACCCAGCTAACGGTCAAGGATGTGACAGACTCATGTCATCATATC

10

20

30

40

TCTGATGCCAGAGAAGGGATACCATTGCCTGAGCCTCTCAGTACTGTTAAC  
 GCCTGTGAGAACTTCCTGTGAAAGGCCCTGTCGTGCCTGGGCTGATAAAACAG  
 CAAGAACGAACGTAGGGAGCTGGCAGCAGTGCAAAGCAAATACTACCAGCTTG  
 GCCTGTAAGTGTGGCTTACTCATCTCACATGGAAATAAGGGCAGCCACCTGCAG  
 GGCTGCTCTGAGGATTGAGCTAATACAGTGCCCTGGCGTTGGGTGGGGAAAGTT  
 GTGGAGCACCTCCTGGGGAAGGGGGTGTCAAGAGCAGGAAATCTGGGAGTCCGAG  
 GGCACCTTCATCAACCCAATCTGTCATTGAGCACCAGTCTCACTGAGCCTCG  
 GCAAGCTGGAGGGAAACAGGAATAAGGTCAAGGCCCTGTTCTATAGGTCCCAGTGT  
 GTTGCTATGGTGAGTATCTCATTCCCTGCTTGCCCCAGCCACCTGGAGTGAGAAG  
 CCCAAGAGGAAGCTGGGTGAGCTGTTGTTCCATGGGTCTGTGTTCACAGCTGA  
 CTCCCTCACCAAGCCAGCCCTTCACCTGAGCCCCAGCAACAAAGGCAGTCAGGC  
 GGCTCAAAGCAGCTGCTCCAATGAAGTCAAAGAAATAAGCTCAGGGAAAGAAGCA  
 GGTCAACCCCCCACTAGGGTGTGGCTACTTCCTCTGGGCAGTGGAGGAGG  
 GTGTGGTTCCAACTCAGAACAAAATGGGGCTTTGGTTACTTATCACTCTCACAG  
 CTCTGACCTGGACCCCTCATCCCTGCCTGTTGTGGTAAGTGGGATCCCCCTAA  
 GTTGGAGGAAAGGAAACTGGCCAAACAAAAAGGAGAGCAGTTTCTGCATCAC  
 ATGGTAGGCCAGGAGGAGTCTAATGCCAGAGTTACTCTCAGCCCCAAATCA  
 CCTAGCTAAATGTACCTATCTAAGAAGTCCTAGGTTTTGGGTTGTTTTTT  
 TTTTGAGACAAGGTCTCACTCTCACCCAGACTGGAGCACAGTGGCACAATCAC  
 AGCTCACTGCAGCCTAACCTCCTGGCTCAAGCAATGTCCAAGTAGCTGGACT  
 ATAGGCCTGCACCAACATGTCAGCTAATTATTATTATTTAGACAGGG  
 TCTCATTATGTTGCCCTGGCTGGTCTTGAACCTCTGGGTTCAAGCAGTCCTCCCACCT  
 CTGCCTCCCAAAGTGCTAGGTTTTTGTGTTGTCTGTTTGAACACAGAGTC  
 TTGCTCTGCGCCTAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTCAGCTACTGCAACCTCCA  
 CCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCTAAGTAGTTGGGAAATACAGG  
 CGTGTGCCAACACACCCAGCTCATTTGTATTTAGCGGAGATGGGTTGCCAT  
 GTTGGCCAAGCTGGTCTCAAACCTCTGACCTCAGGTGATTGCCGCTCAGCCTCC  
 CAAAGTGCTGGTTACAGGCGTGAGCCACCACACCCAGCCAAGAAGTCTTCTG  
 ATCACCCACTCTCCTCTCCAAATGGCATTAGTTGTCCTCCTTGATTTGAG  
 AGTATGTCTGTAAGCCCCAAATGCAGCTGAATCATCTGCCATCCACCCCTGTG  
 CCCAACAGTAAGCCTCTAGAGTAGATACTATCTCCTGCATCTCAGTGAACCACT  
 GCCCAGCAAAGCAGTCTGCTAAAACAATGACTCTAGAGATCCTAAGCTGTGAG  
 AGCTGGAGGAGAGAATTAGACTGATGGTCTGGGAAGGGATTGAATTAGTCATCTG  
 TACCTTTCTTCTTGACTTAAGTCCAGACCTGTAGCAACCATTCTGCTTAGACATC  
 CAGAACATAAGCCTATGGGTCTGCTGCTGTTGGGTCTTAGTCTGGGTGAAACTTTC  
 TCTACTTCTGTCAGCTCTCAGATGAACCACAGAACAGCAGGAATGTGGGCATCATCAG  
 TGAAATCTCTGCATACAGCAGACAAAGGGCTGGCAGTGGCTGTTATGAGGCAG  
 CGCTAGGAGAGCTGATCCAGACTCTCCCTGCAGTGAAAGGGAGGGAGCCCTCA  
 TGAAGTATTGACTGCTTGAGCAGGAATTGCTTACCAAGCAGCTGAGTGCCTCT  
 CGAGCTCACATCGGTTTCCCTCATGAGGCCACTTGGAGTCTGCTGAGGGACTTGG  
 TTCTATTAGGGAAAGGTGAGTTGGGATGGTGAGCAGGGAGGGCTGGGACATTG  
 TGGCTAATGGGCTTTCTCTGGCTTAGATCCGGCAGAGTTCCTCTATCTC  
 GTCTTGTGCTGATTAAGGTGCCCTGTCCTCCAGTTTCTCCATCTCCTGGG  
 ACGTAGCAGGAAATCAGCATCATGGTGGTCAAGGCCACAGATGTCCCC  
 TACTGCCACTGTGAAGTTCTGGGGCTGGCACAGCTGCCTGCATCGCAGATC  
 TCATCACCTTCTGGATACTGCTAAAGTCCGGTACAGGTGAGGGGATGAA  
 GCCTGGAGTCTGATGGTGTACTCTGTCCTCCCCAAAGACACAGACCCCTCA  
 AGGGCCAGTGGTGGAGCATCGAGATGACTGGAGGTGGGAAGGGCAACATGCTTAT

10

20

30

40

CCCTGTAGCTACCCCTGTCTGGCCTTGCAGATCCAAGGAGAAAGTCAGGGGCCAG  
 TCGCGCTACAGCCAGCGCCCAGTACCGCGGTGTATGGGCACCATTCTGACC  
 ATGGTGCCTACTGAGGGCCCCGAAGCCTCTACAATGGGCTGGTGCCTGCCT  
 GCAGCGCCAATGAGCTTGCCTCTGTCCGCATCGGCCGTATGATTCTGTCAA  
 ACAGTTCTACACCAAGGGCTCTGAGCGTAGTATGGAGCAAGGGTAGGCCCC  
 TGGCCCTTTCTCAGTGATGATTGATCTTAGTCATTAGCCATATACTTTTAG  
 GCCCCACGATCCCTAGGAAGATCAGGGAACAGAGAACTGGAAGGGCCCTGGTCC  
 TCCACATAGTCCTAACACACCACCTGGGAGTAGGTAGTATCATCCCAGTGTATAGAAGA  
 AGAGACTGAGGTGGGAAGGCAGTGGTAGAGTGGGACTTGGCCAGGGCACACA  
 GTAGAGAGCCAGAAAACACAGTAGAGAGCCAGGACACTCGTCTAAGGCCAGC  
 GTTCTCCCTTCACCTCTAGTATGCCATGCCAACCCCTCCATTTCACATGACGA  
 AACAGAGCCCCAGACAAAAGGTTCTTCCCAGATCACATGGCAGGAAGAAGTAA  
 AGCTGACCTGAGATCCAAGTCTTAGGAATCCCAGTCAGAAAGCCACTTCTCTC  
 TGAGCCTGGTTTCACATTGTCAGATGAAATGATTGTGATTCTCAGGGCTGTTG  
 AGCAGGTAATGAAAATGTTATGAAAGAAAGCACCAAGTTCAATTGGTATTTGTTGATGTG  
 CCCTGCTATGTCCCTAGCAAGAAGTAGATATTCA TAGGGATATTGGTATTTGTTGATGTG  
 AGGAGTTCTTACAGCAAGAGCTTGTAGAAGGCCAAAAGCTTCTGGATTCTATTCCA  
 AAAGCAGGAGATGACAGTGACAGGGTGGTTGGTGAAGGAGAGATGAGGTAGAAA  
 ATGAGTGAAGCCGCTGCCACTGACCCATGGCTGCCACAGATGCCAGCATT  
 GGGAGCCGCTCTAGCAGGCAGCACACAGGTGCCCTGGCTGTGGCTGTGGC  
 CCAGCCCACGGATGTGGTAAAGGTCCGATTCCAAGCTCAGGCCGGCTGGAG  
 GTGGTCGGAGATACCAAAGCACCGTCAATGCCCTACAAAGACCATTGCCGAGAG  
 GAAGGGTCCGGGGCTCTGGAAAGGTGTGTACCAAGTTGTTCCCTCCCTT  
 CCTCCTCCCCGATACTCTGGTCTCACCCAGGATCTCCTCCCTACAGGGACCTCT  
 CCCAATGTTGCTCGTAATGCCATTGTCAACTGTGCTGAGCTGGTACCTATGAC  
 CTCATCAAGGATGCCCTCTGAAAGCCAACCTCATGACAGGTGAGTCATGAGGT  
 AGACGGTGTGGTCTCACCTCCCCATGCCAGGAGCAGGTGCGGGGGTAGCT  
 GACACCAGAAGACCACATCTTTCATCCTATTGCCCTTGCAAGGGAGAGTAAGATA  
 TCTCTTACTTGCATATTGAAGCCAATTGGATGAAGCTCCACTTGACATTGAG  
 GAACTGAGGCTAGATTGGAAAATGACTCTTCAGGTCTCAGAAGATGTCTCAGCT  
 GGAGTCCCTGTCTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGAGATAGAG  
 TCTCACTCTGTTACCGTGTAACTCAGCTCACTGCAACCTCTCCTCTGGTTCAA  
 GCGATTCTGTGCCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGGATGACAGGTGTGCACCAGCACA  
 CTGGCTAATTTGTATTTAGTAGAGATGGAGTTCACCATGTTAGCCAGGCTGGT  
 CTCGAACCTCTGGCCTCAAGTGATCTGCCACCTGGCCTCCAAATGTGCTGGGATT  
 ACAGGTGTGAGCCTCTGCAGGCCCATCCTCTGTTGTTGAGACAGGGCTTGCT  
 CGGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGGGTAGATAATGGCTATTGCAAGCCTCGACCT  
 CCCTGACTCAAGCAATCCTCCCACCTCAGCCTCTGAGTAGCTGGGCTGACTACAG  
 GCATGCACACTGTGCCTGGCTAATTTGTATTTGTAGAGACAGGGTTTGCCATG  
 TTACCCAGTCTGGTCTGAACCTCTGGCTCAAGTGATCCACCCACCTCGGCCTCCA  
 AAAGAAGTCCTGGATTACAGGCATGAGACATTGTGCCAGCCTCTGTCTCTTAA  
 AATCATGAAAACCTCGTAGCTACTTAAGTAATTCTCCTGCCTCTGGAATGATGGGTG  
 AAGATCTGACTGCCTGCCTGCTCCTGGCAGATGACCTCCCTGCCACTTC  
 ACTTCTGCCCTGGGGCAGGCTCTGCACCACTGTGATCGCCTCCCTGTAGAC  
 GTGGTCAAGACGAGATACTGAACCTGCCCTGGCAGTAGACAGTAGCGCTGG  
 CCACTGTGCCCTACCATGCTCAGAAGGAGGGCCCCGAGCCTCTACAAAG  
 GGTGAGCCTCTGGCCTCCCCACCCAGTTCAAGGCCTTGGCTATGCATGTCTATTGT

10

20

30

40

GGGTGGGAGAGAACCACTGGAAGTAGCAGCCAAGTGTGACTATTCTGATC  
 CTGGTCCTGGCATTCACCAAGCATTACCTATCCCCTAATTCCCTCCTCCAGAATT  
 GCTACCACATCACTGTTATTAGGTGTTAAATGGAGACTCAAAGGGAATTGATGCTTAT  
 AGCCAAGCAGCTGTGAGCTCAGTCATTGAGTCCTCCCAGCCTCCTTGGGACAGAG  
 CAACTGGGTTGGATTGAATACCAAGGCCAGTGAGGGAAAGTGGGAGGTGGAGGTGCC  
 CCCATGACCTGTGATTTCCTCTAGGTTCATGCCCTCCTTCTCCGCTTGGGT  
 TCCCTGGAACGTGGTGTGATGTTGTCACCTATGAGCAGCTGAAACGAGCCCTCAT  
 GGCTGCCTGCACCTCCCCAGAGGGCTCCCTCTGAGCCTCTCCTGCTGCTGACCT  
 GATCACCTCTGGCTTIGTCTCTAGCCGGGCATGCTTCCTTCTCCTCTCCT  
 CTCTCCCTCCTCCCTCTCCTCTTCCCTTACATTCTCATCTACTCATGTCAGTGC  
 TGGTGGAGTTGACATTGACAGTGTGGGAGGCCTCGTACAGCCAGGATCCA  
 AGCGTCCCGTCCCTGGAAAGTTCAGCCAGAACTTCTGCTGCTGCCCTGGACAG  
 CCCAGCCTAGCCCCACTTGTATCCATAAAGCAAGCTAACCTTGGCGTCTCCTCC  
 CTCTCTTAGCTTACCAAGAGGTCTTGGTCCAATGGCCTTTGGTACCTGGTGGG  
 CAGGGGAGGAACCACCTGACTTGAAGGGATCCACCTCCACCTCCAGC  
 ATCCAATCTGAAGCCCCTGAGGTCTAGGTCATCTGGTCCATTCTCTAGACCCAGGCC  
 GTACTAACATGGGAGTGCAGGAGCCACCTGAGAGACAGCAGTGCCTCCCT  
 TTGCCGGGCCACTTGAGCTTACTCAGAACTCTGGTACTCTAGTGCCTGCCATCCA  
 ACCCCCCACCCAGCCGAGGCCTGTTATCTGCACAACAAGAGTGCCTGTGTC  
 CCTGCATCTCTGCAGTCCAGAGGAACATGAGACTCTAGATGCTGTTGACTTATT  
 TTATTCCATTAAATGGAAGGAAGACCCACCTCCCCAAAGTCCCAGACCTGT  
 GAGAACAAAGTCAGTCAGCCTCCACCTCCACAGCCACAGCCACACCCACAGA  
 GGAAATGTTACTGAACCTGGGTGGAGCAGGCCCTGACTCCACAGAGGGTGGGAG  
 GCTGCAGGGCAAACATCTGGTCTCTGCCTGAGGAACTTCCATTGTGTTTTGTT  
 GTTTGAGACAGAGTCTCACTTGCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTCAATCT  
 TGGCTCACTGCAACCTCTCCAGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCAAAGT  
 AGCTGGGATTACAGGCATACACCATCATACCTGGCTAATTGTGTTTTGGTAGA  
 AACGGGGTTTGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTGACCTCAAGTGAATCC  
 ACCTACCTCAGCCTCCAAAGTGCCTGGGATTACAGGCATGCCACTGTGCCTGGCC  
 AGGATATTTCATTGGAGTCTCACCAACACCCCCCTCACCTGCCCTGCC  
 AGCTAGGCATCCAAGGAGGCCAGAAGGCCAGGGCTGGCTGCACAGGGTCTC  
 CGCTTCTCTGTCCTGTTCTTACACCTGCACTCAGAGGCAGGTGGCAGGGTACT  
 ACAATTCAAGGAGTGGAGACTGTGAGGTCTGGAATCCAAGGCATCTCCTGTAG  
 GGCTGGGCCCTAGAATTATGTCACTCAGACCCAGTTGTAGGTGTGAAGAAACT  
 GAGGCCTGACACAGGTGATGCAGGCAAGAACACCCAGAAAGTCCACTACTGAAC  
 GGACCGGGACCCAGTCCTCCCTGGACTCCCCAGAGACCAGTGCCTGGGG  
 TCCTTGGGAAGCCTGTTGGCAGCTGTGGAGCTAGGCCCTGAGAACACGACC  
 CTCCCTCTCCCTAGCCTCAAGCCGCTGAAGCCACTGCTGCTCGCCGCCCTGTA  
 GCCCAATGGTCAGAGCTGGAGGCTAGACCTTCAGTGCCTGGGTTGAGGGCCAGGG  
 TGTTAGATTGGTTTGAGAAGGAACGAGGGCCCAGGATTCTCAGCTTCTAGTT  
 TTTGACAAATTGAGCTGAGGCCCATAGCCTCGGGAGGGACAGGGTTGAGTGC  
 TAAGTCGGCAAACCAGGGTAAAGGTGACAGGCAGCTCAGCCAGGCTGCAGGGGTG  
 GCATATACAGAGGACCTGCCACTACTTATGTACCTTCTTACACTAATTCTGTGAG  
 GCAGGCTGTTGTTAGCTCTGCTGGACGGGAAGAAGTAGGGCAGTTGGTAGGT  
 GTGTGTCAGCTAAACAGGCTGGGTGGGATGAGCAAGTCAGCTGGTCATTAG  
 CAGCCTTAATAGACACGAGGCTACCCAACTCACTGTGGTCTGGGTGTGGCCTAG  
 GACAATGAGCTGGGAACAGTGGTAGGAACCACTGGAAAACATACCAGTGGGTCTCA  
 TTCATTCTGATCACAGGTAGATCACTCTTGGTCCAAACCCTTAATGCCTATT  
 AAG

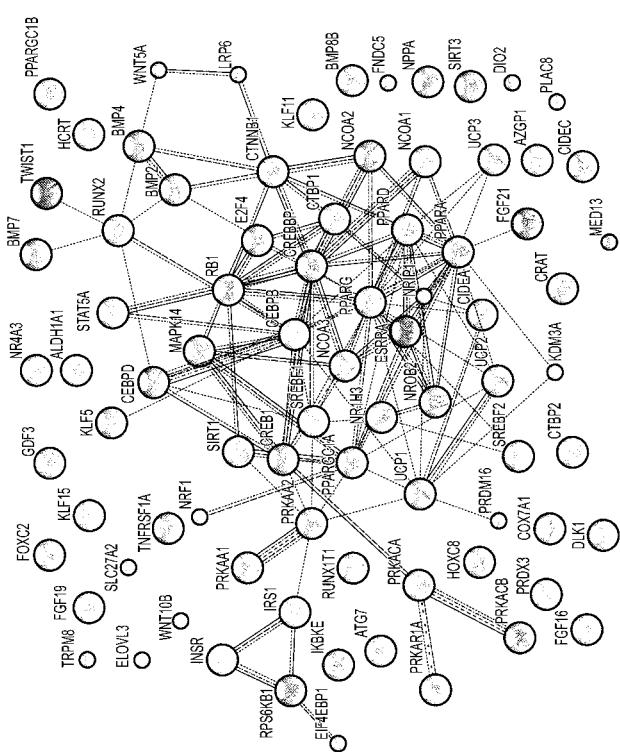
10

20

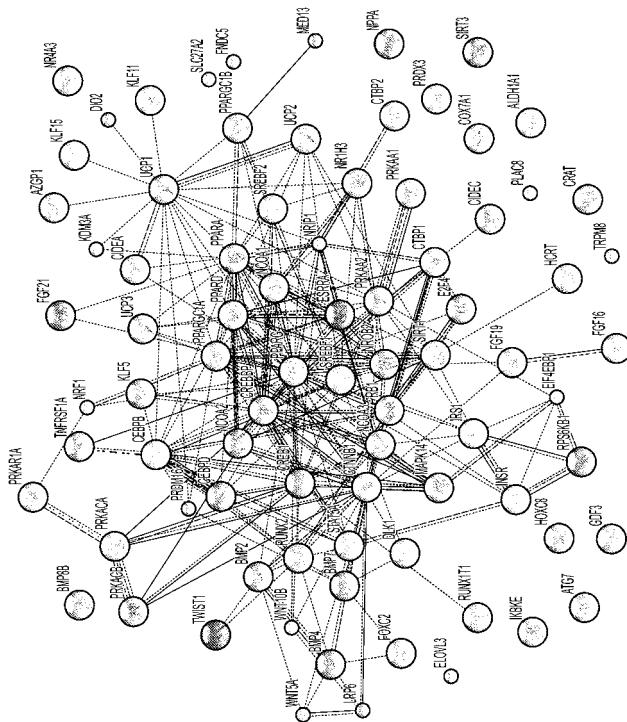
30

40

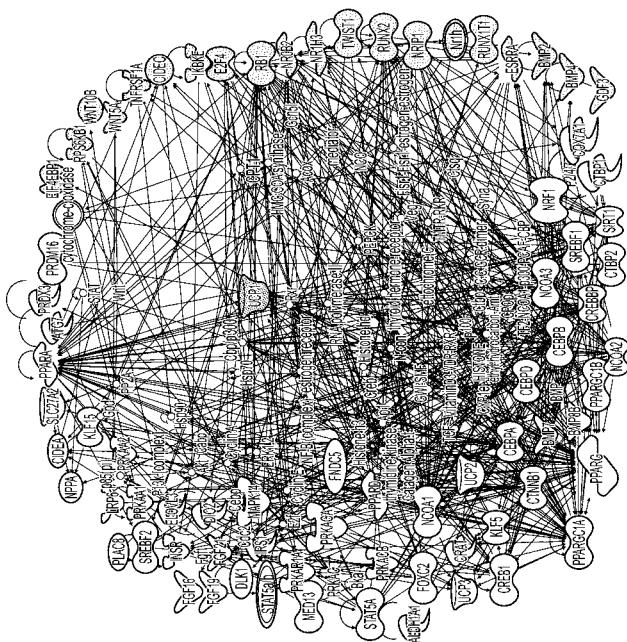
【 図 1 A 】



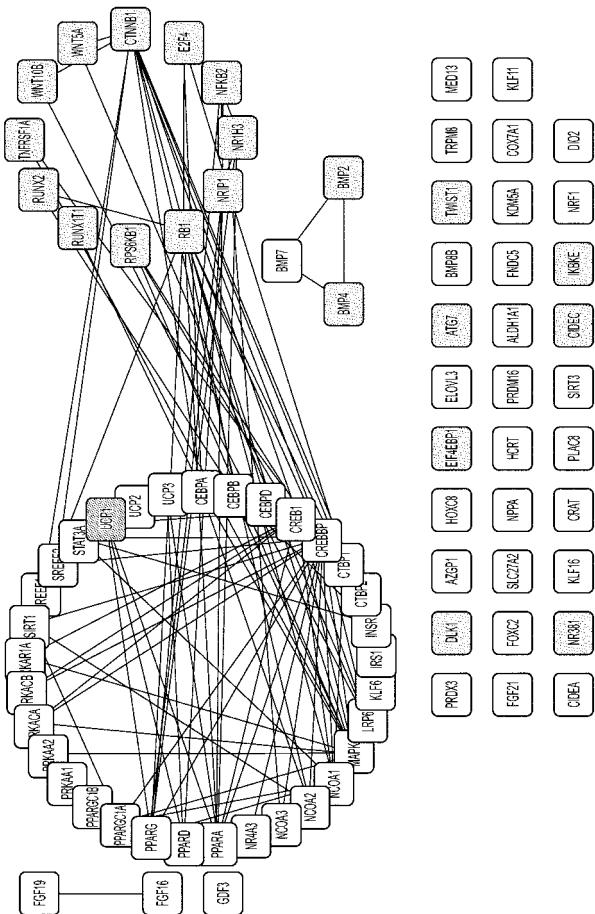
【 図 1 B 】



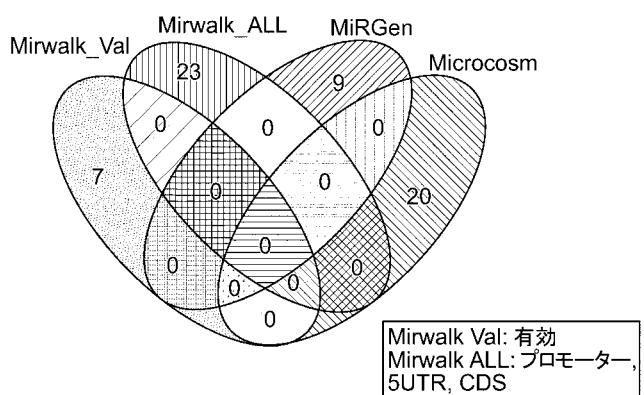
【図2A】



【 図 2 B 】

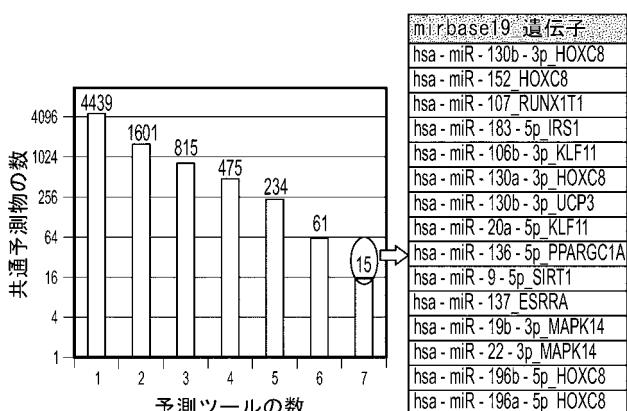


〔 図 3 〕

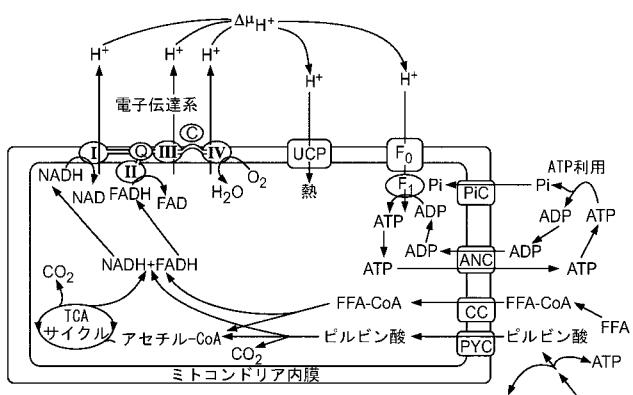


〔 四 4 〕

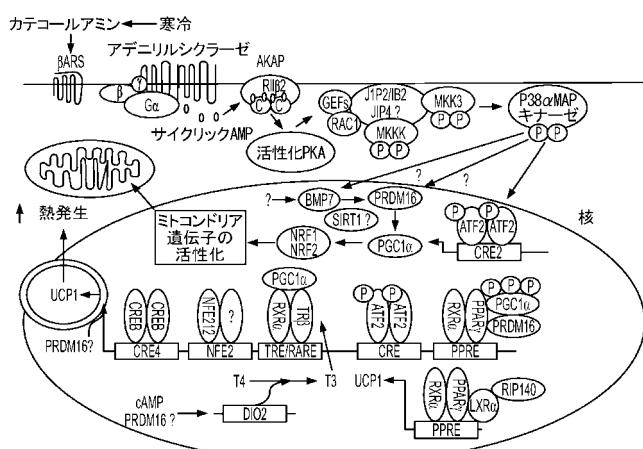
7つの主要な予測ツール (Targetscan、Mirwalk、RNA22、PITA、Pictar、Miranda、Diana) 間の共通miR-遺伝子予測物



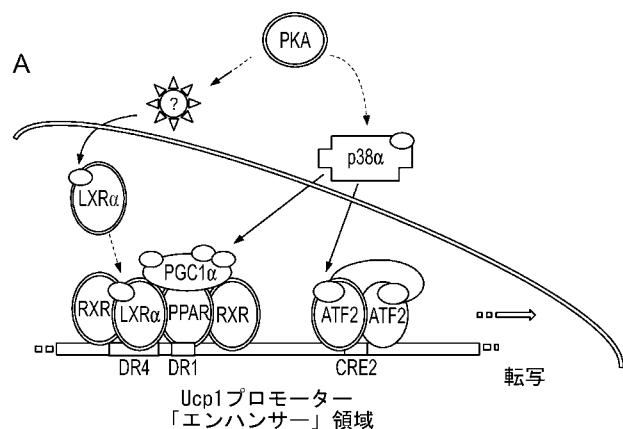
〔 図 5 〕



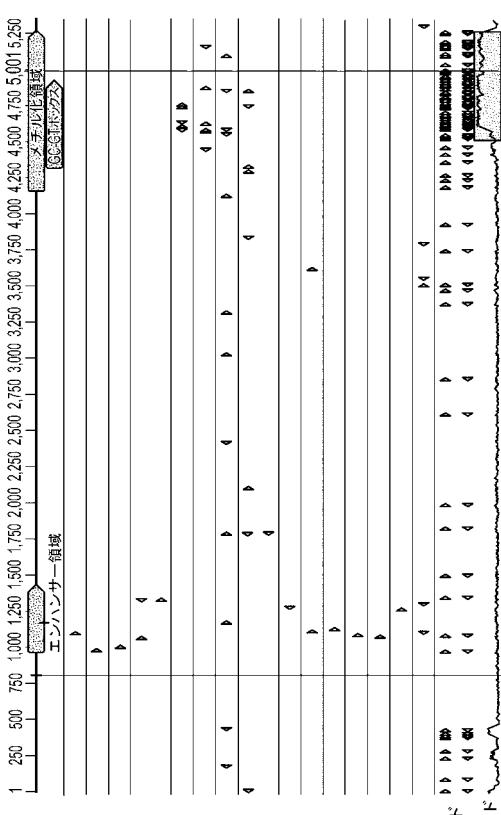
〔 図 6 〕



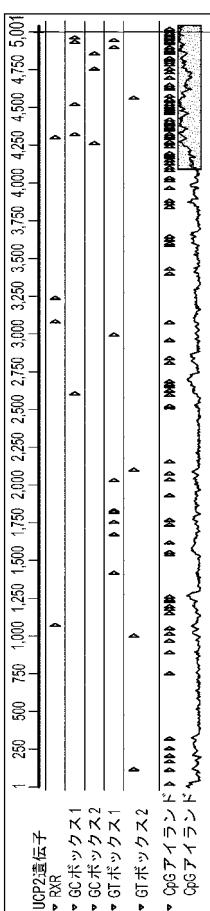
【図7】



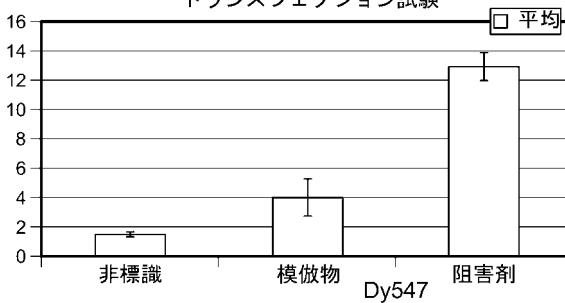
【図8 A】



【図8 B】

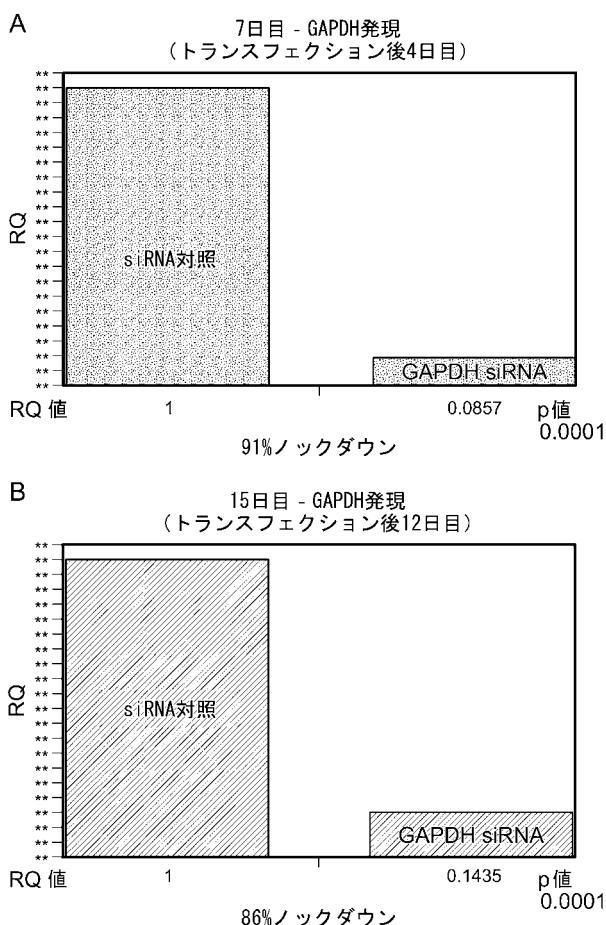


【図9】

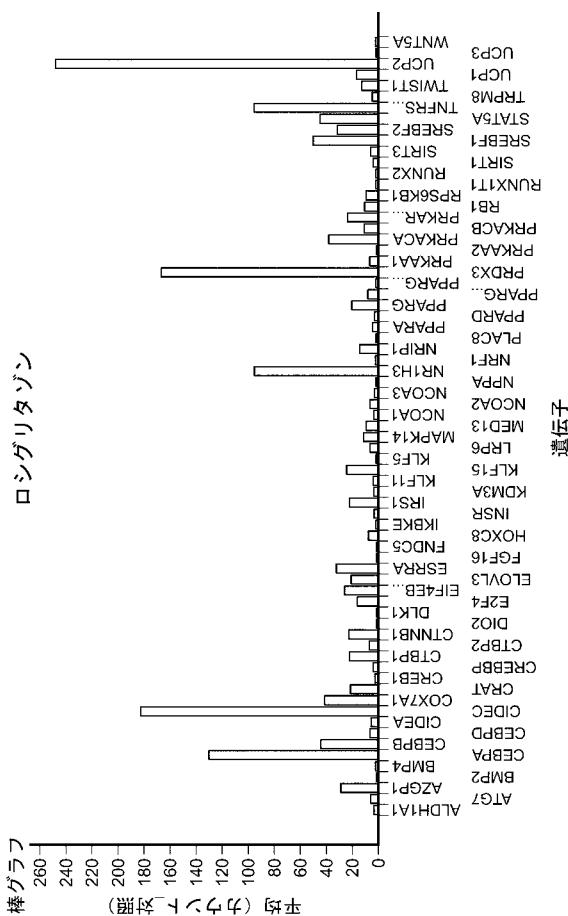
前脂肪細胞トランスフェクション試験：  
トランスフェクション試験

Dy547トランスフェクションは非標識トランスフェクタントよりも有意に高かった  $p < 0.0001$ 。

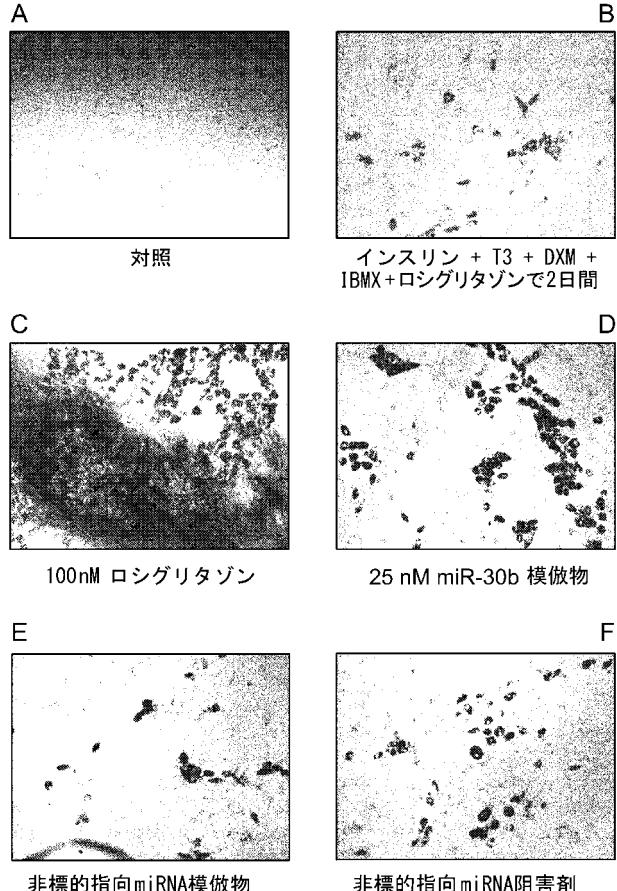
【 図 1 0 】



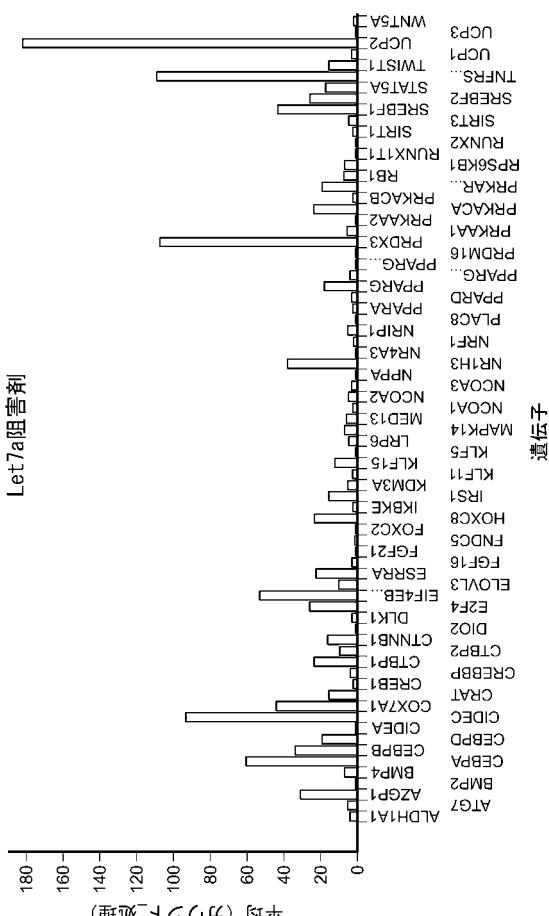
【図12A】



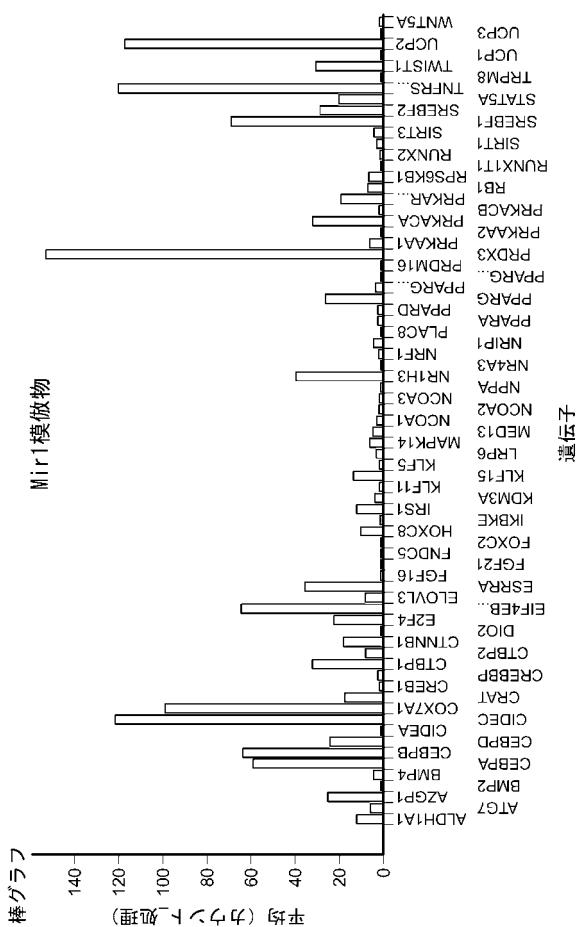
【 図 1 1 】



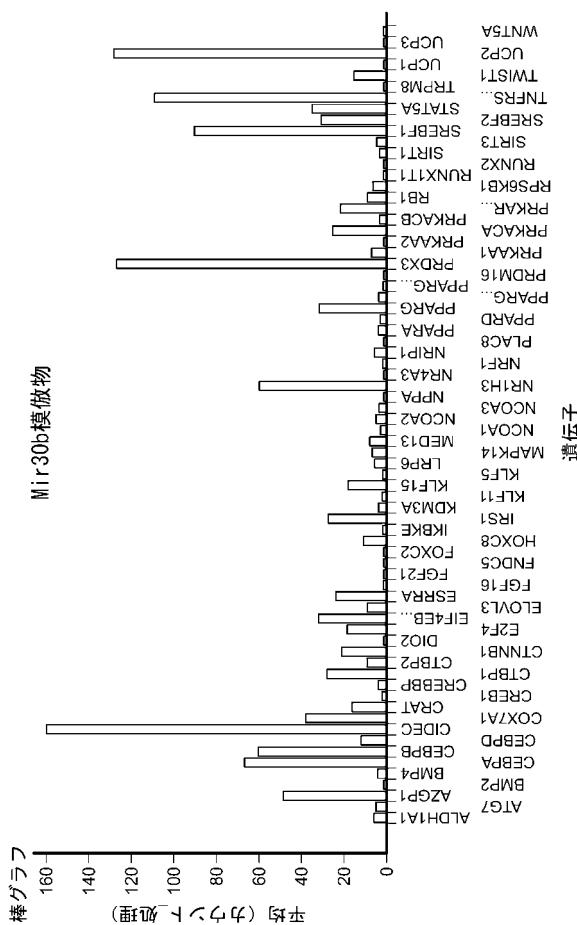
【图 1-2-B】



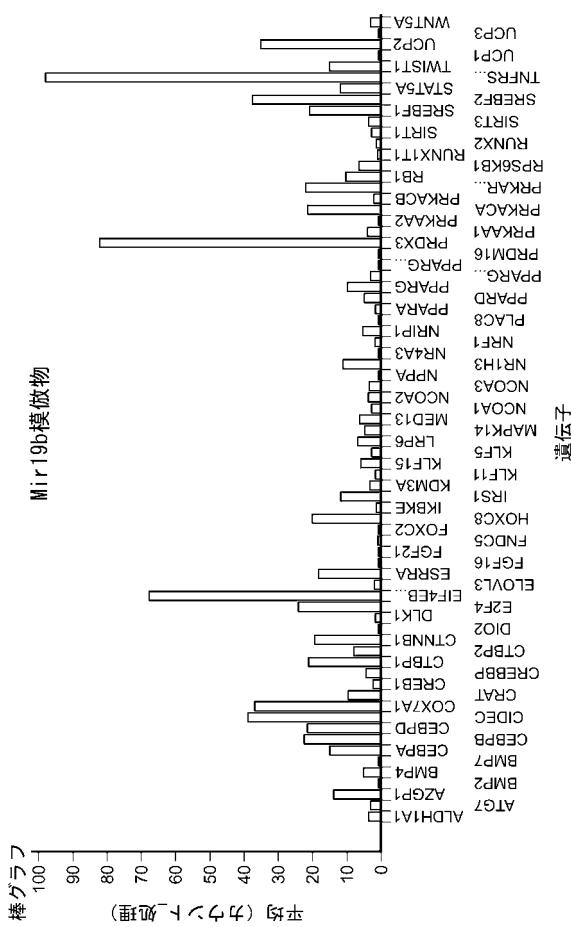
【図12C】



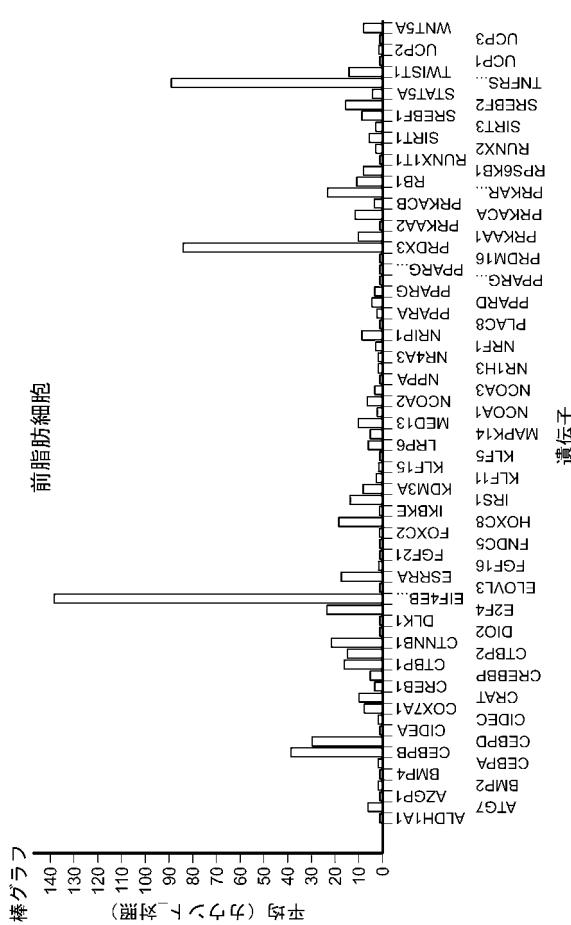
【 図 1 2 E 】



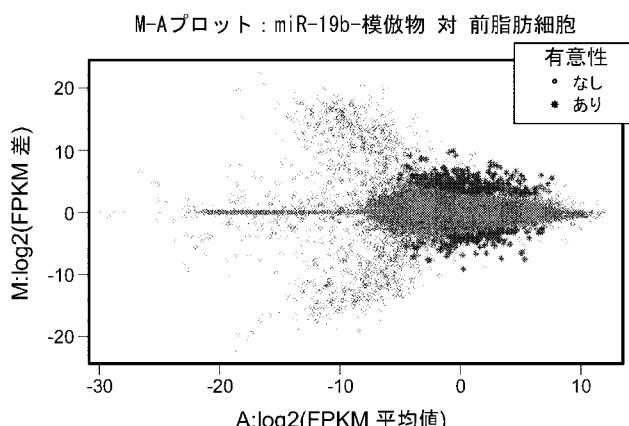
【 図 1 2 D 】



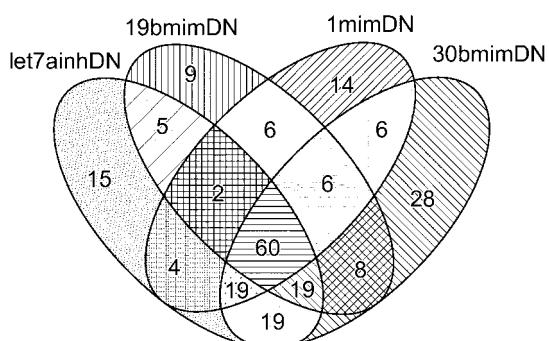
【図12F】



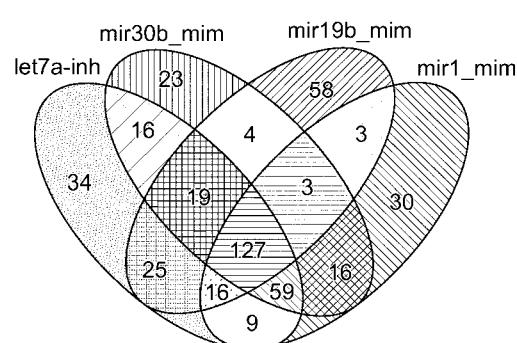
【図 1 3】



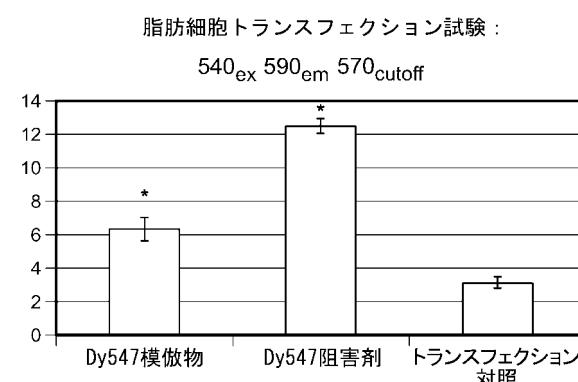
【図 1 5】



【図 1 4】

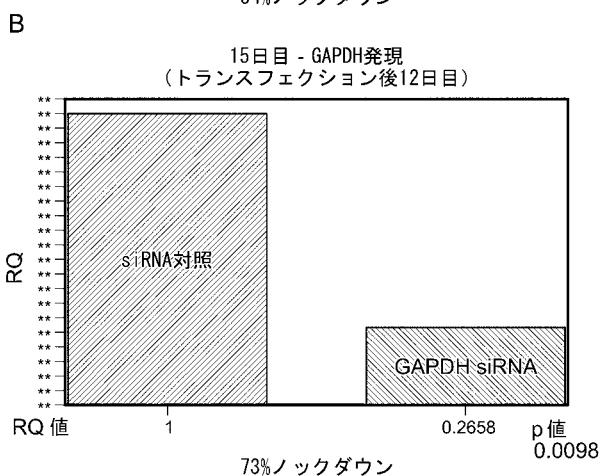
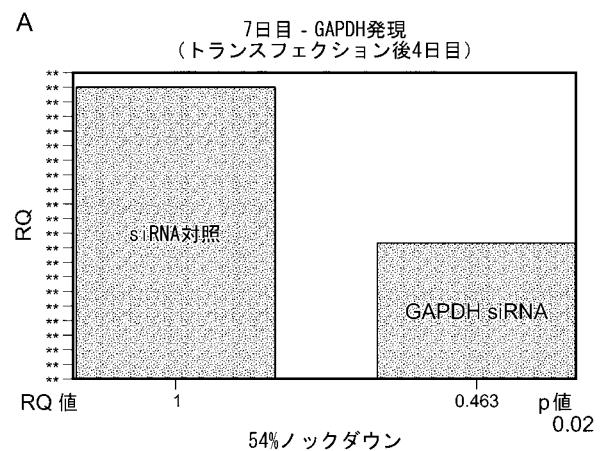


【図 1 6】

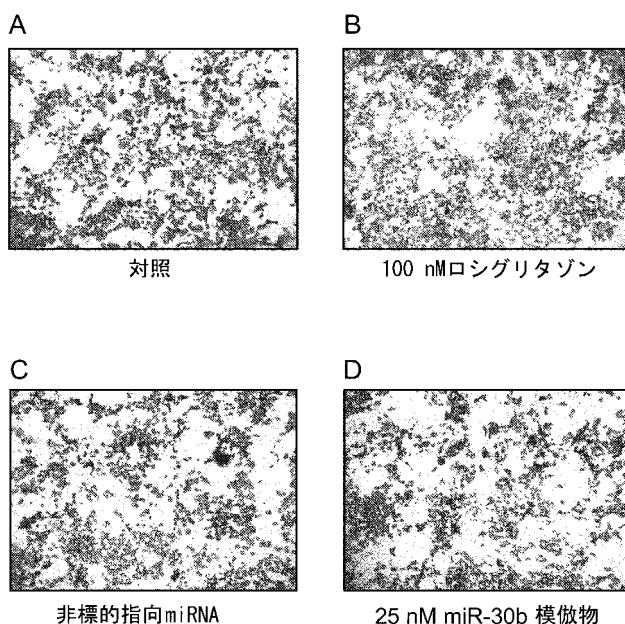


Dy547トランスフェクションは、非標識でトランスフェクトした対照よりも有意に高かった。p値は<0.01である。

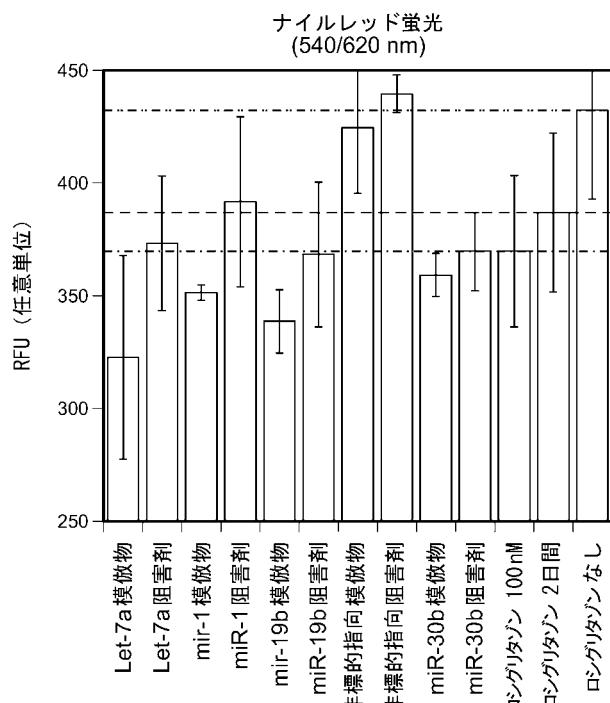
【図 1 7】



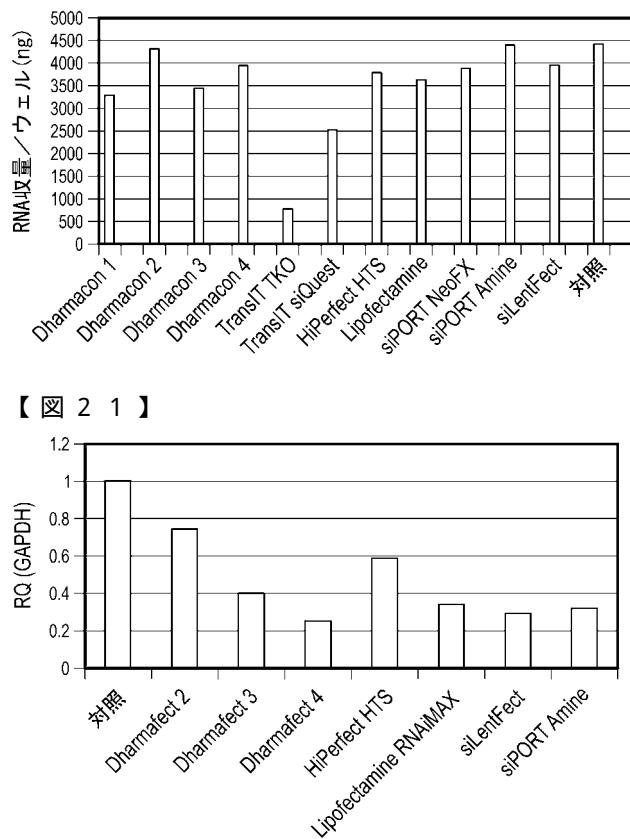
【図 1 8】



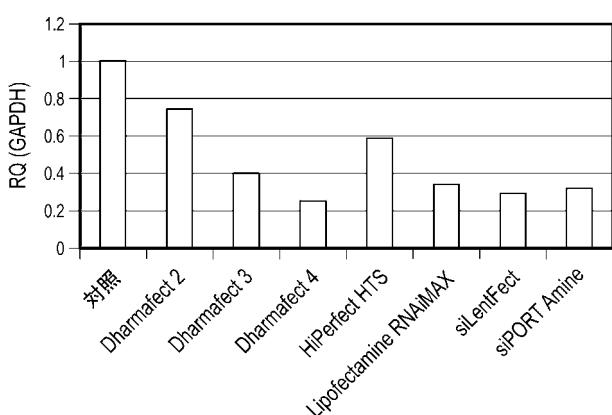
【図19】



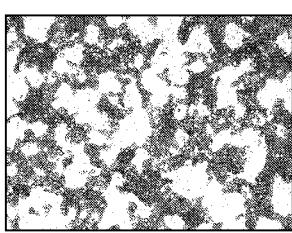
【図20】



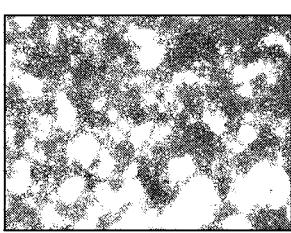
【図21】



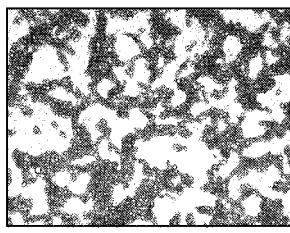
【図22-1】



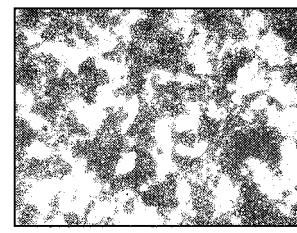
対照



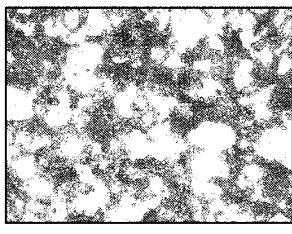
50 nM Let-7a 阻害剤



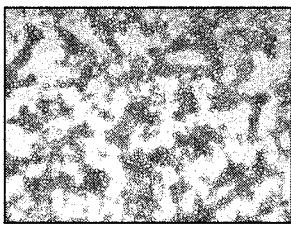
10 nM T3



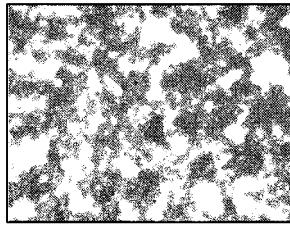
50 nM miR-19b 模倣物



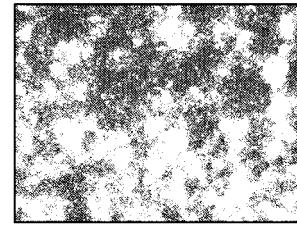
10 μM CL316,243



50 nM miR-1 模倣物

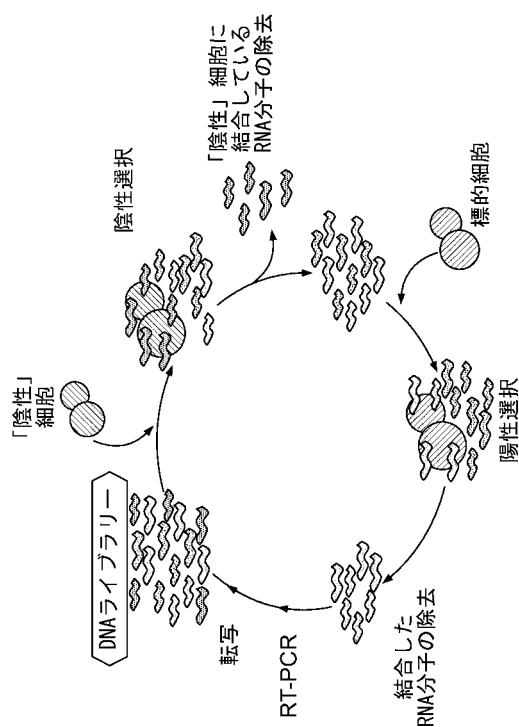


100 nM ロシグリタゾン

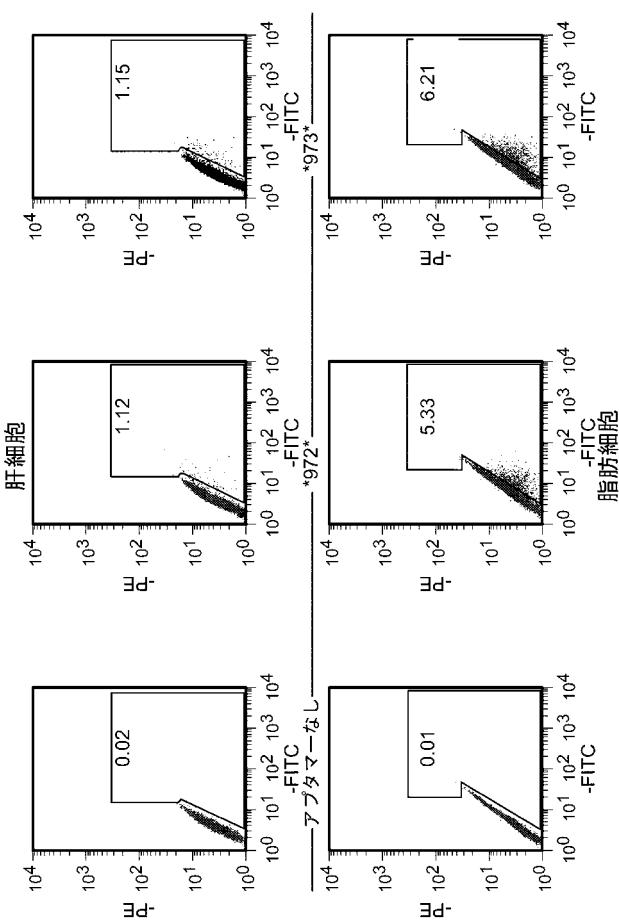


50 nM miR-30b 模倣物

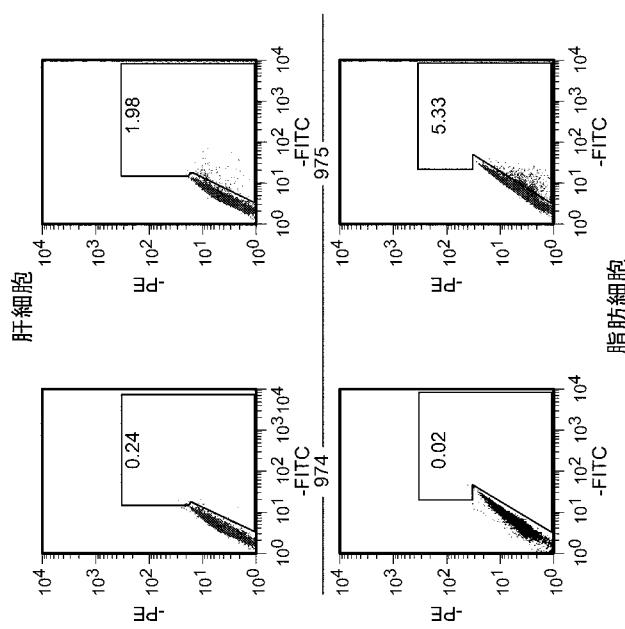
【図 2 3】



【図 2 4 - 1】



【図 2 4 - 2】



**【手続補正書】****【提出日】**平成27年3月2日(2015.3.2)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0 0 5 4**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0 0 5 4】**

本開示はまた、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象において脂肪消失を引き起こす方法を提供する。ある種の態様において、対象は哺乳動物である。他の態様において、哺乳動物はヒトである。

**[本発明1001]**

細胞における呼吸鎖脱共役を調節する方法であって、細胞を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性を調節するmiRNA剤と接触させる段階を含む、方法。

**[本発明1002]**

細胞が、前脂肪細胞、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体である、本発明1001の方法。

**[本発明1003]**

組織における熱発生を調節する方法であって、組織を、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性を調節するmiRNA剤と接触させる段階を含む、方法。

**[本発明1004]**

組織が、褐色脂肪、白色脂肪、皮下脂肪組織、肝臓、または筋肉である、本発明1003の方法。

**[本発明1005]**

組織をエクスピボでmiRNA剤と接触させる、本発明1004の方法。

**[本発明1006]**

その治療を必要とするヒト対象において肥満を治療する方法であって、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤の活性または発現を調節するmiRNA剤の有効量をヒト対象に投与する段階を含む、方法。

**[本発明1007]**

治療のために選択されるヒト対象が、肥満に対する遺伝的素因または後成的素因を有する、本発明1006の方法。

**[本発明1008]**

ミトコンドリア脱共役剤がUCP1またはUCP2である、前記本発明のいずれかの方法。

**[本発明1009]**

miRNA剤が、

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105, hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

からなる群より選択されるmiRNAである、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1010]

miRNA剤が、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAである、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1011]

miRNA剤が、

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105, hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

からなる群より選択されるmiRNAのアゴミア(agomir)またはアンタゴミア(antagomir)である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]

miRNA剤が、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]

miRNA剤が、hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、およびhsa-miR-545からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1014]

miRNA剤が、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、およびhsa-miR-1179からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1015]

miRNA剤が標的指向部分に連結される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1016]

標的指向部分がアプタマーである、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1017]

標的指向部分がmiRNA剤を特定の細胞型または組織に送達する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1018]

miRNA剤が、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1019]

miRNA剤が、少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1020]

miRNA剤が、ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性化因子または抑制因子の活性を調節する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1021]

活性化因子または抑制因子が、表2に記載される活性化因子または抑制因子からなる群より選択される、本発明1018の方法。

[本発明1022]

miRNA剤が、活性化因子または抑制因子のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する、本発明1020または1021の方法。

[本発明1023]

miRNA剤が、活性化因子または抑制因子のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、本発明1020または1021の方法。

[本発明1024]

ミトコンドリア脱共役タンパク質のmRNAまたはタンパク質発現が上方制御される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1025]

ミトコンドリア脱共役タンパク質のミトコンドリア脱共役活性が上方制御される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1026]

以下を含む、熱発生を調節するmiRNA剤をスクリーニングする方法：

a) ヒトゲノムを含む指標細胞を提供する段階；

b) 該指標細胞を試験miRNA剤と接触させる段階；ならびに

c) 該miRNA剤の存在下および非存在下において、該指標細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の細胞活性を決定する段階であって、試験miRNA剤の存在下における熱発生制御因子の活性の変化により、その試験miRNA剤が熱発生を調節するmiRNA剤として同定される、段階。

[本発明1027]

細胞が、脂肪細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、肝細胞、筋細胞、またはそれらの前駆体である、本発明1026の方法。

[本発明1028]

段階(c)において決定される熱発生制御因子の細胞活性が、熱発生制御因子のmRNA発

現レベル、タンパク質発現レベル、またはミトコンドリア脱共役活性である、本発明1026の方法。

[本発明1029]

熱発生制御因子がUCP1である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1030]

細胞における少なくとも1つの熱発生制御因子の活性を調節する、アゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1031]

表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである、本発明1030のアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1032]

以下：

hsa-miR-1-1, hsa-miR-1-2, miR-19a-b, hsa-miR-105,  
hsa-miR-1283, hsa-mir-129, hsa-miR-133a-1, hsa-miR-133a-2, hsa-miR-143, hsa-mir-143-5p, hsa-mir-147, hsa-mir-149, hsa-mir-199a, hsa-mir-199b, hsa-mir-200c, hsa-mir-204, hsa-mir-205, hsa-miR-206, hsa-mir-21, hsa-mir-211, hsa-mir-218, hsa-mir-218-1, hsa-mir-218-2, hsa-mir-219-2, hsa-mir-219-2-3p, hsa-mir-22, hsa-mir-22-3p, hsa-mir-22-5p, hsa-mir-24-2, hsa-miR-30a-e, hsa-miR-3177-5p, hsa-mir-325, hsa-mir-331, hsa-mir-331-5p, hsa-miR-3613-3p, hsa-mir-362, hsa-mir-362-5p, hsa-miR-3658, hsa-mir-367, hsa-mir-371, hsa-mir-371-5p, hsa-mir-377, hsa-mir-378, hsa-mir-378a-5p, hsa-mir-382, hsa-mir-383, hsa-mir-422a, hsa-mir-425, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-491, hsa-mir-508, hsa-mir-508-5p, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-miR-515-3p, hsa-mir-519e, hsa-miR-520a, hsa-mir-543, hsa-mir-545, hsa-mir-549, hsa-mir-556, および hsa-miR-568, hsa-mir-620, hsa-mir-643, hsa-mir-654-3p, hsa-miR-7a-g, hsa-mir-765, hsa-mir-871, hsa-mir-888, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-92b, hsa-mir-93, hsa-mir-96, および hsa-mir-99a

からなる群より選択されるmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアである、本発明1030のアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1033]

hsa-miR-19b-2-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-211、hsa-miR-325、hsa-miR-382-3p/5p、hsa-miR-543、hsa-miR-515-3p、および hsa-miR-545 からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、本発明1030のアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1034]

hsa-miR-331-5p、hsa-miR-552、hsa-miR-620、および hsa-miR-1179 からなる群より選択されるmiRNAのアンタゴミアである、本発明1030のアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1035]

標的指向部分に連結される、本発明1030～1034のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1036]

標的指向部分がアプタマーである、本発明1035のアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1037]

標的指向部分がアゴミアまたはアンタゴミアを特定の細胞型または組織に送達する、本発明1035または1036のアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1038]

少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合す

る、本発明1028～1033のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1039]

少なくとも1つのミトコンドリア脱共役剤のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、本発明1030～1037のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1040]

ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性化因子または抑制因子の活性を調節する、本発明1030～1037のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1041]

活性化因子または抑制因子が、表2に記載される活性化因子または抑制因子からなる群より選択される、本発明1030～1037のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1042]

活性化因子または抑制因子のmRNAまたはプロモーター領域に直接結合する、本発明1030～1037のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1043]

活性化因子または抑制因子のmRNAの5'UTRまたはコード配列に直接結合する、本発明1030～1037のいずれかのアゴミアまたはアンタゴミア。

[本発明1044]

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される2つ以上のmiRNAを含む、薬学的組成物。

[本発明1045]

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、本発明1044の薬学的組成物。

[本発明1046]

2つ以上のmiRNAが組換えベクターから発現される、本発明1044の薬学的組成物。

[本発明1047]

組換えベクターが、DNAプラスミド、ウイルスベクター、およびDNAミニサークルからなる群より選択される、本発明1047の薬学的組成物。

[本発明1048]

hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される2つ以上のmiRNAを含む、本発明1044の薬学的組成物。

[本発明1049]

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、本発明1048の薬学的組成物。

[本発明1050]

2つ以上のmiRNAが組換えベクターから発現される、本発明1048の薬学的組成物。

[本発明1051]

組換えベクターが、DNAプラスミド、ウイルスベクター、およびDNAミニサークルからなる群より選択される、本発明1048の薬学的組成物。

[本発明1052]

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを前脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、前脂肪細胞を誘導して脂肪細胞に分化させる方法。

[本発明1053]

前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる誘導が、前脂肪細胞を100 nMシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した場合の、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化よりも大きい、本発明1052の方法。

[本発明1054]

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19b

アゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、本発明1052の方法。

[本発明1055]

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、hsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを脂肪細胞の集団に投与する段階を含む、脂肪細胞の脂質含量を減少させる方法。

[本発明1056]

脂肪細胞の脂質含量が、100 nMロシグリタゾンに2日間曝露した後に維持培地に曝露した脂肪細胞の脂質含量よりも低い、本発明1055の方法。

[本発明1057]

脂肪細胞の脂質含量が、培養期間中100 nMロシグリタゾンに曝露した脂肪細胞の脂質含量よりも低い、本発明1055の方法。

[本発明1058]

培養期間が8～16日である、本発明1057の方法。

[本発明1059]

培養期間が10～14日である、本発明1058の方法。

[本発明1060]

培養期間が14日である、本発明1059の方法。

[本発明1061]

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、本発明1055の方法。

[本発明1062]

hsa-let-7aアゴミア、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-1アンタゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-19bアンタゴミア、hsa-miR-30bアゴミア、およびhsa-miR-30bアンタゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象においてインスリン感受性を高める方法。

[本発明1063]

対象が哺乳動物である、本発明1062の方法。

[本発明1064]

哺乳動物がヒトである、本発明1063の方法。

[本発明1065]

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、本発明1062の方法。

[本発明1066]

hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを細胞に投与する段階を含む、細胞における1つまたは複数の脱共役タンパク質の発現または活性を増加させる方法。

[本発明1067]

細胞が、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞、皮下脂肪細胞、肝臓細胞、または筋細胞からなる群より選択される、本発明1066の方法。

[本発明1068]

1つまたは複数の脱共役タンパク質がUCP-1またはUCP-2を含む、本発明1066の方法。

[本発明1069]

hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAを対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象において脂肪消失を引き起こす方法。

[本発明1070]

対象が哺乳動物である、本発明1069の方法。

[本発明1071]

哺乳動物がヒトである、本発明1070の方法。

[本発明1072]

肥満を治療するための医薬の製造における、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアの使用。

[本発明1073]

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、本発明1072の使用。

[本発明1074]

アゴミアまたはアンタゴミアが標的指向部分に連結される、本発明1072の使用。

[本発明1075]

標的指向部分がアプタマーである、本発明1074の使用。

[本発明1076]

肥満を治療するための、表1、11、13、および14に記載されるmiRNAからなる群より選択される1つまたは複数のmiRNAのアゴミアまたはアンタゴミアを含む組成物。

[本発明1077]

1つまたは複数のmiRNAが、hsa-let-7aアンタゴミア、hsa-miR-1アゴミア、hsa-miR-19bアゴミア、およびhsa-miR-30bアゴミアからなる群より選択される、本発明1076の組成物。

[本発明1078]

アゴミアまたはアンタゴミアが標的指向部分に連結される、本発明1076の組成物。

[本発明1079]

標的指向部分がアプタマーである、本発明1076の組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 2】

(表8) UCP1遺伝子調節エレメント

	調節エレメントの名称	配列	SEQ ID NO:	数	ヌクレオチド位置
1	<b>BRE1</b> (褐色脂肪応答エレメント1)	CCTCTCTGCTTCTTCT	1	1	1,129～1,144
2	<b>BRE2</b> (褐色脂肪応答エレメント2)	CTCCTTGGAA	2	1	1,269～1,278
3	<b>CRE2</b>	ATTCTTTA	3	4	1,121～1,128; 3,631～3,638; 10,982～10,989; 15,881～15,888
4	<b>CREB</b>	ACGTCA	4	5	1,082～1,087; 1,345～1,350; 1,348～1,343; 11,439～11,434; 13,831～13,836
5	<b>DR1</b>	TTGCCCTTGCTCA	5	1	1,099～1,111
6	<b>DR4</b>	ACGTCAATAAGGGTCA	6	1	1,082～1,097
7	<b>DR4型 RARE</b>	RGKTCANNNNRGKTCA	7	1	1,316～1,301
8	<b>ERE</b>	GCTCATACTGACCT	8	1	1,107～1,120
9	<b>PRE</b>	GTAAATGTGTTCT	9	1	1,009～1,021
10	<b>RARE</b>	TGACCACAGTTGATCA	10	1	983 → 999
11	<b>RXR</b>	AGGTCA	11	12	1,120～1,115; 1,316～1,311; 3,517～3,522; 3,560～3,555; 3,813～3,808; 5,318～5,313; 6,233～6,238;

					6,831～6,836; 8,122～8,127; 9,966～9,971; 11,339～11,334; 11,412～11,407
12	<b>GCボックス1</b>	CGCCC	12	7	4,593～4,589; 4,615～4,619; 4,615～4,619; 4,747～4,751; 4,765～4,769; 5,914～5,910; 13,715～13,711
13	<b>GCボックス2</b>	GCGGG	13	9	4,463～4,459; 4,585～4,589; 4,593～4,597; 4,639～4,643; 4,883～4,887; 5,176～5,172; 5,929～5,933; 5,940～5,944; 14,994～14,990
14	<b>GTボックス1</b>	CACCC	14	25	194～190; 452～448; 1,184～1,188; 1,803～1,807; 2,428～2,424; 3,037～3,041; 3,330～3,334; 4,137～4,141; 4,566～4,562; 4,599～4,595; 4,869～4,865; 5,104～5,108; 5,461～5,457; 6,237～6,241; 6,293～6,289; 8,096～8,092; 8,198～8,194; 9,649～9,645; 9,912～9,908; 12,962～12,958; 13,136～13,132; 13,723～13,719; 14,404～14,400; 14,960～14,964; 15,576～15,572
15	<b>GTボックス2</b>	GTGGG	15	20	25～21; 1,805～1,801; 1,809～1,805;

					2,119～2,123; 3,854～3,850; 4,310～4,314; 4,339～4,343; 4,765～4,761; 4,867～4,871; 6,291～6,295; 7,554～7,558; 8,280～8,284; 8,681～8,685; 9,615～9,619; 9,689～9,693; 9,906～9,910; 10,363～10,359; 13,074～13,070; 13,640～13,644; 13,941～13,945
16	CpGメチル化アイランド	CG	16	366	4,519～5,258; 5,639～6,694

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 6】

(表9) MicroCosm Targets を用いて決定された、UCP1 (NCBI参照配列NG\_012139.1) の3'UTRにおけるmiRNAの結合部位

名称	配列	SEQ ID NO:	起点bp	終点bp	長さ
hsa-miR-21	AATGTAATGCAGATAAGCTA	17	14143	14162	20
hsa-miR-219-2-3p	ACATTTTAATTACAATTTC	18	14217	14236	20
hsa-miR-22	GATTGGCAGCTT	19	14857	14868	12
hsa-miR-222a	GATTTTTAATGTTAGAGTCCAG	20	14500	14522	23
hsa-miR-290-3p	TTTAGAGCTGGAGGGTACTT	21	14621	14640	20
hsa-miR-292-3p	TTTAGAGCTGGAGGGTACTT	22	14621	14640	20
hsa-miR-292-5p	GACAGAGGAACAGTTGAG	23	14648	14666	19
hsa-miR-325	ATTTTGGCAGGATTGCTACTAG	24	14568	14589	22
hsa-miR-331-5p	TTTGAGATCTATACTGG	25	14383	14401	19
hsa-miR-362-5p	ATTTTAAGCTAAATCCAAGGATT	26	14838	14860	23
hsa-miR-367	TGACCATTCTGGAGTGCAATT	27	14170	14191	22
hsa-miR-371-5p	ACAGTTTGAT	28	988	997	10
hsa-miR-371-5p	ACAGTTTGAG	29	14657	14666	10
hsa-miR-377	CTGGAGTGCAATTGTGTGA	30	14179	14197	19
hsa-miR-378	TTTTAATGTTAGAGTCCAG	31	14503	14522	20
hsa-miR-382	TGATGACATCTCTAACAACTTC	32	14526	14547	22
hsa-miR-460	AGAAAATGAGTGAAATGCAG	33	14250	14269	20
hsa-miR-508-5p	TGACCATTCTGGAGTG	34	14170	14186	17
hsa-miR-543	TACTCTGAATGTT	35	14478	14490	13
hsa-miR-549	TTAACACAGTTGTCA	36	14321	14336	16
hsa-miR-643	CAAGTTCACTAGAACATAAG	37	14412	14431	20
hsa-miR-654-3p	AAGGTTACAGGCTGCCAGACAT	38	14880	14901	22
hsa-miR-664	GTGTGAATGAATG	39	14192	14204	13
hsa-miR-871	TAGGCATGAACCTACTCTGAATG	40	14466	14488	23
hsa-miR-883a-3p	AAACTGAGTGAAATGCAGTT	41	14252	14271	20
hsa-miR-883b-3p	AAACTGAGTGAAATGCAGTT	42	14252	14271	20
hsa-miR-888-3p	TTTATTAACCACAGTTGTCAGTT	43	14317	14339	23
hsa-miR-92b	GAGTGCAAT	44	14182	14190	9

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0198

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0198】

(表10) いくつかのプログラムによる、UCP1 (NCBI参照配列、NG\_012139.1) の3'UTRにおけるmiRNAの結合部位

	名称	配列	SEQ ID NO:	起点bp	終点bp	長さ
1	hsa-miR-1179	AAGTATCCTTT	45	15346	15356	11
2	hsa-miR-1302	ATGGGACACA	46	15021	15030	10
3	hsa-miR-130b	TTATTTCCCT	47	15161	15171	11
4	hsa-miR-146a	TGACAACGT	48	14327	14336	10
	hsa-miR-146a	AGGGAACGT	49	15231	15240	10
	hsa-miR-146a	TGTGAACCTGG	50	15679	15688	10
5	hsa-miR-181c	AACCATACT	51	15304	15312	9
6	hsa-miR-19b-2	ACTTTGCCTGG	52	14991	15000	10
7	hsa-miR-203	TTAAATGTT	53	15584	15592	9
8	hsa-miR-204-5p	TTCCTTTATC	54	14006	14015	10
	hsa-miR-204-5p	TTCCTCTGTC	55	14648	14657	10
9	hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCT	56	14153	14162	10
10	hsa-miR-211-5p	TTCCCTATCTC	57	14779	14789	11
11	hsa-miR-214	CAGCAAGCA	58	15052	15060	9
12	hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAA	59	14859	14868	10
	hsa-miR-22-5p	AGTTCTTCACA	60	14203	14213	11
13	hsa-miR-26a-2-3p	CATTTCTTG	61	13918	13927	10
	hsa-miR-26a-2-3p	CCAATCCTTG	62	14853	14862	10
	hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTTCATG	63	15616	15625	10
14	hsa-miR-30b	GTAACCTTCC	64	14878	14887	10
15	hsa-miR-325	CAGAGTAGGT	65	14475	14484	10
	hsa-miR-325	CCTTGTAGGC	66	15378	15387	10
16	hsa-miR-328	CTGTTCCCT	67	14651	14660	10
17	hsa-miR-362-5p	ATCCTTGGAT	68	14850	14859	10
18	hsa-miR-367-3p	AATTGCACTC	69	14182	14191	10
19	hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCTGC	70	15435	15444	10
	hsa-miR-371a-5p	TCTCAAACGT	71	14658	14667	10
20	hsa-miR-378a-3p	ACTGGCCTTG	72	15816	15825	10
21	hsa-miR-382-3p	ATTCATTACAC	73	14194	14203	10
22	hsa-miR-382-5p	GAAGTTGTTAGAGAT	74	14533	14547	15

23	hsa-miR-383	AGATTAGAA	75	14545	14553	9
24	hsa-miR-421	ATTAACTGAC	76	14333	14342	10
	hsa-miR-421	CTCAAAAGAC	77	14380	14389	10
25	hsa-miR-422a	ACTGCCCTT	78	15817	15825	9
26	hsa-miR-431	TGTCTGGCA	79	14892	14900	9
27	hsa-miR-452	TTATCTGC	80	14151	14158	8
	hsa-miR-452	TCTTCTGC	81	14773	14780	8
	hsa-miR-452	ACATCTGC	82	15009	15016	8
28	hsa-miR-455-3p	CAGTCCAT	83	13893	13900	8
	hsa-miR-455-5p	TGTGTGCCTT	84	15641	15650	10
29	hsa-miR-491-5p	AATGGGGAAG	85	14975	14984	10
30	hsa-miR-501-3p	ATGCATCAGG	86	15547	15556	10
31	hsa-miR-504	AGACCTGT	87	15325	15333	9
	hsa-miR-508-5p	TATTCTAGTGAACTTG ACTCTTA	88	14405	14427	23
33	hsa-miR-512-5p	CACTCAG	89	14255	14261	7
34	hsa-miR-514a-3p	TTGACTCTT	90	14406	14414	9
35	hsa-miR-515-3p	GACTGCCCTT	91	15539	15547	9
	hsa-miR-515-3p	GTGTGCCCTT	92	15641	15649	9
36	hsa-miR-517a-3p	ATGGTGCATT	93	15650	15659	10
37	hsa-miR-545	CAGCAAGCACT	94	15050	15060	11
38	hsa-miR-549	TGACAACGT	95	14327	14336	10
39	hsa-miR-552	CACAGGTGA	96	15130	15138	9
40	hsa-miR-616-5p	ACTCTAAC	97	14510	14518	9
41	hsa-miR-620	ATGAATATAG	98	14560	14569	10
42	hsa-miR-643	ACTGGTATGT	99	13933	13942	10
	hsa-miR-643	TCTTGTATTTC	100	14423	14432	10
	hsa-miR-643	CCTTGTAGGC	101	15378	15387	10
	hsa-miR-643	ACATGCATGC	102	15553	15562	10
43	hsa-miR-651	TTAAAATAAG	103	13988	13997	10
	hsa-miR-651	TTAGGTTAAA	104	13993	14002	10
	hsa-miR-651	TCATGATAAG	105	15700	15709	10
44	hsa-miR-654-3p	TATCTCTTCT	106	14775	14784	10
	hsa-miR-654-3p	TATGTATACT	107	15493	15502	10
45	hsa-miR-655	GTAATACAT	108	15593	15601	9
46	hsa-miR-767-3p	CCTGCTCAT	109	14871	14879	9
47	hsa-miR-888-3p	GACTGACTCC	110	15772	15781	10
48	hsa-miR-92b-3p	ATTGCACTCC	111	14181	14190	10
49	hsa-miR-941	CACCCAGGT	112	14396	14404	9
50	hsa-miR-99a-3p	AAGCTGGCTC	113	15117	15126	10

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 0 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 0 1】

(表11)UCP1遺伝子配列(NCBI参照配列:NG\_012139.1)中に予測される結合部位を

## 有するmiRNA

miRNA	配列	SEQ ID NO:	起点bp	終点bp	長さ
hsa-let-7c	TAGAGTTTC	114	5918	5926	9
hsa-let-7e	GGAGGTAGG	115	13283	13291	9
hsa-let-7e	TGAAGTAGG	116	7612	7620	9
hsa-let-7e	AGAGGTAGG	117	3306	3314	9
hsa-let-7i-3p	CTGTGCAAG	118	3588	3596	9
hsa-miR-17	CAAAGTGCT	119	12200	12208	9
hsa-miR-17	CAAAGTGCT	120	9931	9939	9
hsa-miR-17	CAAAGTGCT	121	218	226	9
hsa-miR-19a	TGTGCAAAT	122	3916	3924	9
hsa-miR-19a	TGTGCAAAT	123	834	842	9
hsa-miR-19b-2	ACTTTGCGG	124	14991	15000	10
hsa-miR-19b-2	AGTTTTACAA	125	11998	12007	10
hsa-miR-19b-2	AGTTTTGTAT	126	10023	10032	10
hsa-miR-19b-2	AGTCTTGAAG	127	9399	9408	10
hsa-miR-19b-2	AGGTTTGTAG	128	7758	7767	10
hsa-miR-19b-2	AGTATTGAAG	129	7159	7168	10
hsa-miR-19b-2	AGGCTTGCAG	130	3546	3555	10
hsa-miR-19b-2	AATTGGCAG	131	529	538	10

hsa-miR-19b-2	AGTTTTGGAA	132	312	321	10
hsa-miR-20b	CAAAGTGCT	133	12200	12208	9
hsa-miR-20b	CAAAGTGCT	134	9931	9939	9
hsa-miR-20b	CAAAGTGCT	135	218	226	9
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCT	136	14153	14162	10
hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAA	137	14859	14868	10
hsa-miR-22-3p	AAGCTTCCAG	138	1482	1491	10
hsa-miR-22-5p	AGTTCTTCACA	139	14203	14213	11
hsa-miR-22-5p	AATTCTTCAGG	140	8032	8042	11
hsa-miR-22-5p	GGTTCTTCAGC	141	5389	5399	11
hsa-miR-24-2-5p	TGCCTACTGGCC	142	8651	8662	12
hsa-miR-25-3p	CATTGCAC	143	11565	11572	8
hsa-miR-25-5p	AGGCGGAG	144	5963	5970	8
hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTTCATG	145	15616	15625	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCAATCCTTG	146	14853	14862	10
hsa-miR-26a-2-3p	CATTTTCTTG	147	13918	13927	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCTACTCTTC	148	13505	13514	10
hsa-miR-26a-2-3p	ACGATTCTTG	149	13192	13201	10
hsa-miR-26a-2-3p	TCTATTCTTT	150	12883	12892	10
hsa-miR-26a-2-3p	CATATTTTTG	151	10197	10206	10
hsa-miR-26a-2-3p	GCTAGTCTTG	152	9978	9987	10
hsa-miR-26a-2-3p	CATATTTTTG	153	9890	9899	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTTCTTT	154	6631	6640	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCCATTCTCG	155	4709	4718	10
hsa-miR-26a-2-3p	TTTATTCTTG	156	3893	3902	10
hsa-miR-26a-2-3p	CCTTTACTTG	157	1885	1894	10
hsa-miR-26a-2-3p	GCGATTCTTG	158	376	385	10
hsa-miR-27-5p	AGAGCTTAGG	159	2949	2958	10
hsa-miR-30b	GTAACCTTCC	160	14878	14887	10
hsa-miR-30b	GTAACCATCA	161	12991	13000	10
hsa-miR-30b	GTAATCATAAC	162	12831	12840	10
hsa-miR-30b	GTCAACATCA	163	11401	11410	10
hsa-miR-30b	GTAAACATAA	164	9365	9374	10
hsa-miR-30b	GTACTCATCC	165	9016	9025	10
hsa-miR-30b	CTATACATCC	166	8586	8595	10
hsa-miR-30b	CTAACACATCT	167	7495	7504	10
hsa-miR-31	GGCTATGCC	168	7712	7720	9
hsa-miR-32	ATTGCACA	169	11564	11571	8
hsa-miR-92b	ATTGCACTCC	170	14181	14190	10
hsa-miR-92b	ATTGCACTAG	171	11282	11291	10

hsa-miR-93	CAAAGTGTG	172	12199	12208	10
hsa-miR-93	CAAAGTGTG	173	217	226	10
hsa-miR-93-3p	ACTCCTGGGCT	174	12356	12366	11
hsa-miR-93-3p	ACTGATAAGCT	175	11055	11065	11
hsa-miR-93-3p	ACTCCTGACCT	176	9966	9976	11
hsa-miR-96-3p	AATCATGTGCC	177	8659	8669	11
hsa-miR-99a-3p	AAGCTGGCTC	178	15117	15126	10
hsa-miR-99a-3p	AAACTCTTC	179	13344	13353	10
hsa-miR-99a-3p	AATCTTGTTC	180	11952	11961	10
hsa-miR-99a-3p	AAGCTCCTT	181	11050	11059	10
hsa-miR-99a-3p	AAGCTCCTT	182	8099	8108	10
hsa-miR-99a-3p	AAGCTCTGTC	183	7523	7532	10
hsa-miR-99b-3p	CAACCTCGAG	184	13666	13675	10
hsa-miR-99b-3p	CGAGCTCCTG	185	13660	13669	10
hsa-miR-99b-3p	GAAGCTTGTG	186	6436	6445	10
hsa-miR-99b-3p	CAAACCTCTG	187	257	266	10
hsa-miR-100	TCCAGTAGAT	188	11866	11875	10
hsa-miR-100	ACGCGCAGAT	189	5634	5643	10
hsa-miR-106b-5p	CAAAGTGTG	190	12199	12208	10
hsa-miR-106b-5p	CAAAGTGTG	191	217	226	10
hsa-miR-126-3P	TCATACAGT	192	12828	12836	9
hsa-miR-126-3P	TTGTACTGT	193	11542	11550	9
hsa-miR-126-3P	TGGTCCCCT	194	7922	7930	9
hsa-miR-126-3P	TCATACAGT	195	932	940	9
hsa-miR-130b	TTATTTCCCT	196	15161	15171	11
hsa-miR-130b	CTCTTTTCAGT	197	9670	9680	11
hsa-miR-130b	CTCTCTTCACT	198	8977	8987	11
hsa-miR-130b	CTCTTTTCCC	199	8444	8454	11
hsa-miR-130b	CTTTTCCCCCT	200	6624	6634	11
hsa-miR-130b	CTATTTCCGT	201	5742	5752	11
hsa-miR-130b	TTCCTTTCCCT	202	5007	5017	11
hsa-miR-130b	CTCTTTGCCCC	203	1845	1855	11
hsa-miR-130b	CTCCTTTCCCT	204	1033	1043	11
hsa-miR-133a-1	TTTGGTGCCC	205	7393	7402	10
hsa-miR-140-3p	TACCACAG	206	5893	5900	8
hsa-miR-141	TAACACTG	207	5852	5859	8
hsa-miR-143	GGTGCAGTG	208	4132	4140	9
hsa-miR-143-3p	TGAGATGAGG	209	13727	13736	10
hsa-miR-143-3p	TGAGATGGAG	210	10172	10181	10
hsa-miR-143-3p	TTAGATGAAG	211	9572	9581	10

hsa-miR-144-3p	TACAGTATT	212	12825	12833	9
hsa-miR-144-3p	TACAATATA	213	8859	8867	9
hsa-miR-144-3p	GACAGTATA	214	1491	1499	9
hsa-miR-146a	CCTCTGAAA	215	3499	3507	9
hsa-miR-146a	TGTGAACTGG	216	15679	15688	10
hsa-miR-146a	AGGGAACTGA	217	15231	15240	10
hsa-miR-146a	TGACAACTGT	218	14327	14336	10
hsa-miR-146a	TAAGAACTAA	219	8935	8944	10
hsa-miR-146a	TTAGAACAGA	220	7908	7917	10
hsa-miR-146a	TGAGAAGTGC	221	6926	6935	10
hsa-miR-146a	TGAAAACTTA	222	3883	3892	10
hsa-miR-146a	ACAGAACTGA	223	2259	2268	10
hsa-miR-146a	TGAGACCAGA	224	2235	2244	10
hsa-miR-146a	TGAGAAATAA	225	1614	1623	10
hsa-miR-147	TGTGTGGATAA	226	7223	7233	11
hsa-miR-147	TTTGTGCAAAT	227	3916	3926	11
hsa-miR-154	AATCATACA	228	12830	12838	9
hsa-miR-154	AATCATACA	229	934	942	9
hsa-miR-181c	AACCATAGT	230	15304	15312	9
hsa-miR-181c	AACCAAAGA	231	13244	13252	9
hsa-miR-181c	AACCATCAC	232	12990	12998	9
hsa-miR-181c	ATCCAGCGA	233	11466	11474	9
hsa-miR-181c	AAACATCTA	234	7494	7502	9
hsa-miR-181c	AAAAATCGA	235	6201	6209	9
hsa-miR-181c	AACCCCCGA	236	5540	5548	9
hsa-miR-181c	AACCCTCTA	237	3614	3622	9
hsa-miR-181c	AGCCAGCGA	238	3471	3479	9
hsa-miR-181c	AACCATAGG	239	2801	2809	9
hsa-miR-181c	AACCATCAC	240	194	202	9
hsa-miR-185	TGGAGAGAA	241	2979	2987	9
hsa-miR-192-5p	CTAACATATGAA	242	114	125	12
hsa-miR-194-1	TGTAACAGCA	243	1895	1904	10
hsa-miR-196a	AGGTAGTTT	244	12139	12147	9
hsa-miR-199a-5p	CCCTGTGTTC	245	5753	5762	10
hsa-miR-200a	TAACACTG	246	5852	5859	8
hsa-miR-200b	TAATAATGCC	247	11184	11193	10
hsa-miR-200b	GAATACTGCC	248	10340	10349	10
hsa-miR-200c-3p	TAATACTGT	249	12466	12474	9
hsa-miR-200c-3p	TAATAATGC	250	11185	11193	9
hsa-miR-200c-3p	GAATACTGC	251	10341	10349	9

hsa-miR-200c-3p	TAATACAGC	252	7594	7602	9
hsa-miR-203	TTAAATGTT	253	15584	15592	9
hsa-miR-203	TGAAATTTC	254	9782	9790	9
hsa-miR-203	TGAAAGGTT	255	4495	4503	9
hsa-miR-204-5p	TTCCTCTGTC	256	14648	14657	10
hsa-miR-204-5p	TTCCTTATTC	257	14006	14015	10
hsa-miR-205	TCCTTCATT	258	10659	10667	9
hsa-miR-208b	ATAAGAAGA	259	9493	9501	9
hsa-miR-208b	ATAAGAAGA	260	1770	1778	9
hsa-miR-211-5p	TTCCCTATCTC	261	14779	14789	11
hsa-miR-211-5p	TCCCCTCTGTC	262	5238	5248	11
hsa-miR-211-5p	TTCCCTTGCTC	263	5002	5012	11
hsa-miR-211-5p	TTCCCATTCTC	264	4710	4720	11
hsa-miR-214	CAGCAAGCA	265	15052	15060	9
hsa-miR-214	CAGAAGGCA	266	6918	6926	9
hsa-miR-214	CCGCAGGCA	267	5935	5943	9
hsa-miR-214	CACCAGGCA	268	2087	2095	9
hsa-miR-218	TGTGCTTGA	269	10385	10393	9
hsa-miR-302c	TTAACATG	270	2932	2940	9
hsa-miR-324-5p	CGCGTCCCC	271	4876	4885	10
hsa-miR-325	CCTGTAGGC	272	15378	15387	10
hsa-miR-325	CAGAGTAGGT	273	14475	14484	10
hsa-miR-325	CCAAGTAGCT	274	10066	10075	10
hsa-miR-325	CCAAGTAGCT	275	354	363	10
hsa-miR-328	CTGTTCCCT	276	14651	14660	10
hsa-miR-328	CTGGCTCCCT	277	8215	8224	10
hsa-miR-328	CTGGCCCTTC	278	8062	8071	10
hsa-miR-328	CTGGCACTCA	279	6653	6662	10
hsa-miR-328	CTGGCTTCT	280	6496	6505	10
hsa-miR-328	CTGCCCTCC	281	6048	6057	10
hsa-miR-328	CTGGGCCGCT	282	4804	4813	10
hsa-miR-328	CTGGAGCTCT	283	4477	4486	10
hsa-miR-328	CTGACCCTT	284	1089	1098	10
hsa-miR-330	CAAAGCACAC	285	13845	13854	10
hsa-miR-330	CAAAGCACAC	286	11657	11666	10
hsa-miR-331-5p	CTAGGTGTGG	287	7719	7728	10
hsa-miR-361-3p	CCCCCAGG	288	5112	5119	8
hsa-miR-362-5p	ATCCTTGGAT	289	14850	14859	10
hsa-miR-367-3p	AATTGCACTC	290	14182	14191	10
hsa-miR-367-3p	AAATGCACTT	291	999	1008	10

hsa-miR-369	AATAATACA	292	2266	2274	9
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCTGC	293	15435	15444	10
hsa-miR-371a-3p	AAGAGCCGAC	294	11455	11464	10
hsa-miR-371a-3p	ACGTGCCACC	295	10044	10053	10
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCTCT	296	7047	7056	10
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCACCC	297	5457	5466	10
hsa-miR-371a-5p	TCTCAAAC TG	298	14658	14667	10
hsa-miR-372	AAAGTGCTG	299	12199	12207	9
hsa-miR-372	AAAGTGCTG	300	217	225	9
hsa-miR-374a-3p	TCATCAGATT	301	10606	10615	10
hsa-miR-377-3p	AGCACACAAA	302	13842	13851	10
hsa-miR-378a-3p	ACTGGCCTTG	303	15816	15825	10
hsa-miR-378a-3p	ACTGGTCTTG	304	11837	11846	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTGCCTC	305	12216	12225	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTGCCTC	306	10082	10091	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTGTCTC	307	8207	8216	10
hsa-miR-378a-5p	CTCCTAACTC	308	7650	7659	10
hsa-miR-382-3p	ATTCA TTCAC	309	14194	14203	10
hsa-miR-383	AGATTAGAA	310	14545	14553	9
hsa-miR-383	AGATTAGAA	311	7912	7920	9
hsa-miR-383	AGAACAGAA	312	5801	5809	9
hsa-miR-412	ACTTCACCT	313	737	745	9
hsa-miR-421	CTCAAAAGAC	314	14380	14389	10
hsa-miR-421	ATTA ACTGAC	315	14333	14342	10
hsa-miR-421	AACATCAGAC	316	11398	11407	10
hsa-miR-421	ATCA ACTGAG	317	3427	3436	10
hsa-miR-421	ATCAACAGGT	318	2443	2452	10
hsa-miR-421	ATCAAAAGAT	319	2333	2342	10
hsa-miR-422a	ACTGGCCTT	320	15817	15825	9
hsa-miR-422a	ACTGGTCTT	321	11838	11846	9
hsa-miR-422a	ACTGGACGT	322	5847	5855	9
hsa-miR-425	AGCGGGAAAGGT	323	5167	5177	11
hsa-miR-431	TGTCTGGCA	324	14892	14900	9
hsa-miR-431	TGTCTAGCA	325	9218	9226	9
hsa-miR-432-5p	TCCTGGAGT	326	13624	13632	9
hsa-miR-432-5p	TATTGGAGT	327	10785	10793	9
hsa-miR-432-5p	TCTTAGAGT	328	9263	9271	9
hsa-miR-432-5p	TCTTAGAGT	329	6666	6674	9
hsa-miR-432-5p	TCTTGGAGC	330	2180	2188	9
hsa-miR-452	ACATCTGC	331	15009	15016	8

hsa-miR-452	TCTTCTGC	332	14773	14780	8
hsa-miR-452	TTATCTGC	333	14151	14158	8
hsa-miR-452	TCCTCTGC	334	13488	13495	8
hsa-miR-452	TCATGTGC	335	8660	8667	8
hsa-miR-452	TCATCTGG	336	8221	8228	8
hsa-miR-452	TCATGTGC	337	7945	7952	8
hsa-miR-452	ACATCTGC	338	7508	7515	8
hsa-miR-452	CCATCTGC	339	6787	6794	8
hsa-miR-452	TCATCCGC	340	5912	5919	8
hsa-miR-452	TCATCTGT	341	4053	4060	8
hsa-miR-452	TCATCTCC	342	3667	3674	8
hsa-miR-452	TCCTCTGC	343	3457	3464	8
hsa-miR-452	TCTTCTGC	344	2210	2217	8
hsa-miR-455-3p	CAGTCCAT	345	13893	13900	8
hsa-miR-455-5p	TGTGTGCCTT	346	15641	15650	10
hsa-miR-455-5p	TCTGTGCCTT	347	11203	11212	10
hsa-miR-455-5p	TATGTGCTTT	348	10522	10531	10
hsa-miR-483-3p	CACTCCTC	349	13536	13543	8
hsa-miR-483-3p	CACTCCTC	350	10333	10340	8
hsa-miR-483-3p	CACTCCTC	351	6101	6108	8
hsa-miR-486-5p	TCATGTACT	352	9835	9843	9
hsa-miR-486-5p	TCCTGTCCT	353	6526	6534	9
hsa-miR-487a	AATCATACAG	354	12829	12838	10
hsa-miR-487a	AATCATACAG	355	933	942	10
hsa-miR-491-5p	AATGGGGAAG	356	14975	14984	10
hsa-miR-491-5p	AGAGGGGACC	357	12315	12324	10
hsa-miR-491-5p	AGTTGGGCAC	358	11555	11564	10
hsa-miR-491-5p	AGTAGAGAAC	359	6909	6918	10
hsa-miR-491-5p	GGTGAGGAAC	360	6005	6014	10
hsa-miR-491-5p	AGCGGGGCAC	361	4455	4464	10
hsa-miR-491-5p	AGTGGGAAAT	362	3846	3855	10
hsa-miR-496	TTAGTATTAA	363	10948	10956	9
hsa-miR-496	TGAGTATAA	364	10768	10776	9
hsa-miR-496	TCAGTATTAA	365	9666	9674	9
hsa-miR-501-3p	ATGCATCAGG	366	15547	15556	10
hsa-miR-501-3p	ATCCACCGGG	367	11497	11506	10
hsa-miR-501-3p	AGGCACCAGG	368	2089	2098	10
hsa-miR-504	AGACCTGT	369	15325	15333	9
hsa-miR-504	AGCCCCTGG	370	12898	12906	9
hsa-miR-504	AGTCCCTGG	371	10591	10599	9

hsa-miR-504	AGACCCGGG	372	4767	4775	9
hsa-miR-508-3p	TGATTATAGC	373	13565	13574	10
hsa-miR-508-3p	TGAGTGTAGC	374	3231	3240	10
hsa-miR-512-3p	CAGTGCTGTC	375	13211	13220	10
hsa-miR-512-3p	AAGTGCTCTC	376	7688	7697	10
hsa-miR-512-3p	AAGTGCTCTC	377	3184	3193	10
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	378	14255	14261	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	379	13591	13597	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	380	12291	12297	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	381	6652	6658	7
hsa-miR-512-5p	CACTCAG	382	5067	5073	7
hsa-miR-514a-3p	TTGACTCTT	383	14406	14414	9
hsa-miR-514a-3p	TTGACAGTT	384	13870	13878	9
hsa-miR-514a-3p	TTAACACTT	385	11237	11245	9
hsa-miR-514a-3p	ATGACACTT	386	10617	10625	9
hsa-miR-515-3p	GTGTGCCTT	387	15641	15649	9
hsa-miR-515-3p	GACTGCCTT	388	15539	15547	9
hsa-miR-515-3p	GAGTGACTT	389	1371	1379	9
hsa-miR-516a-3p	TGCTTCCT	390	10301	10308	8
hsa-miR-517a-3p	ATGGTGCATT	391	15650	15659	10
hsa-miR-517a-3p	ATCTTGCTTC	392	10303	10312	10
hsa-miR-519b-3p	AAAGTGCAT	393	13782	13790	9
hsa-miR-519e-3p	AAGTGCCTC	394	7048	7056	9
hsa-miR-520a-5p	CTCCAGATGG	395	6274	6283	10
hsa-miR-545	CAGCAAGCACT	396	15050	15060	11
hsa-miR-545	CAGAACACATT	397	11639	11649	11
hsa-miR-545	CTGCAAACACT	398	3450	3460	11
hsa-miR-549	TGACAACGT	399	14327	14336	10
hsa-miR-551b-3p	GCTACCCAT	400	2411	2419	9
hsa-miR-552	CACAGGTGA	401	15130	15138	9
hsa-miR-552	AACAGGTCA	402	11407	11415	9
hsa-miR-552	AACATGTGA	403	9513	9521	9
hsa-miR-552	AACAGGTTA	404	2441	2449	9
hsa-miR-552	AACAGGTAA	405	1569	1577	9
hsa-miR-583	AAAAGAGGA	406	2921	2929	9
hsa-miR-583	CAAATAGGA	407	2833	2841	9
hsa-miR-583	CAACGAGGA	408	1824	1832	9
hsa-miR-583	CAAAGAAGA	409	1139	1147	9
hsa-miR-593-3p	TGTCTCTGT	410	8204	8212	9
hsa-miR-593-3p	TGGCTCTGC	411	6852	6860	9

hsa-miR-593-3p	TGCCTCTGC	412	231	239	9
hsa-miR-593-5p	AGGCACCAAG	413	2090	2098	9
hsa-miR-593-5p	AGGCACCAAG	414	2083	2091	9
hsa-miR-598	ACGTCATC	415	11432	11439	8
hsa-miR-611	GCGAGGTCTC	416	4779	4788	10
hsa-miR-611	GAGAGGCC	417	2121	2130	10
hsa-miR-611	GAGAGGACCT	418	1546	1555	10
hsa-miR-616-5p	ACTCTAAC	419	14510	14518	9
hsa-miR-619	GACCTGGA	420	5824	5831	8
hsa-miR-620	ATGAATATAG	421	14560	14569	10
hsa-miR-620	ATGGAAATAT	422	12111	12120	10
hsa-miR-620	TTGGATATAG	423	11026	11035	10
hsa-miR-620	GTGGAGATGG	424	10397	10406	10
hsa-miR-620	ATGGAGATCC	425	6268	6277	10
hsa-miR-620	ATGGAGGGAG	426	5626	5635	10
hsa-miR-620	CTGGAGAAAG	427	3827	3836	10
hsa-miR-620	ATCCAGATAG	428	2959	2968	10
hsa-miR-620	ATGGGGCTAG	429	2843	2852	10
hsa-miR-620	AGGGAGAGAG	430	1551	1560	10
hsa-miR-620	CAGGAGATAG	431	1430	1439	10
hsa-miR-620	TTGGAGAGAG	432	1201	1210	10
hsa-miR-623	TCCCCTGC	433	8306	8313	8
hsa-miR-623	TCCCCTGC	434	5004	5011	8
hsa-miR-631	CACCTGGCC	435	9900	9908	9
hsa-miR-631	GACATGGCC	436	8632	8640	9
hsa-miR-634	AACCAGCAC	437	4520	4528	9
hsa-miR-636	TGTGCTTG	438	10386	10393	8
hsa-miR-638	ACGGAGCGCG	439	4905	4914	10
hsa-miR-638	AGGGAGGGCG	440	4615	4624	10
hsa-miR-642a-5p	ATCCCTCTC	441	8983	8991	9
hsa-miR-642a-5p	GTCCCTCCC	442	4722	4730	9
hsa-miR-643	ACATGCATGC	443	15553	15562	10
hsa-miR-643	CCTTGTAGGC	444	15378	15387	10
hsa-miR-643	TCTTGTATTTC	445	14423	14432	10
hsa-miR-643	ACTGGTATGT	446	13933	13942	10
hsa-miR-643	ACTTCTATTTC	447	12886	12895	10
hsa-miR-643	ACTTTCTGC	448	12044	12053	10
hsa-miR-643	GCTTGTAAAGC	449	11698	11707	10
hsa-miR-643	AGTTGTATGT	450	10531	10540	10
hsa-miR-643	ACTTGGAAGC	451	8105	8114	10

hsa-miR-643	ACTTGTGTGG	452	7227	7236	10
hsa-miR-643	ACTTGTTTGA	453	1880	1889	10
hsa-miR-643	ACATGTTTGC	454	1695	1704	10
hsa-miR-650	AGGAGGCCAC	455	9647	9655	9
hsa-miR-650	AGAAGGCAG	456	6917	6925	9
hsa-miR-650	AGGAGGCCAG	457	3474	3482	9
hsa-miR-650	ATGAGGCCAG	458	3052	3060	9
hsa-miR-651	TCATGATAAG	459	15700	15709	10
hsa-miR-651	TTAGGTTAAA	460	13993	14002	10
hsa-miR-651	TTAAAATAAG	461	13988	13997	10
hsa-miR-651	TTAGCATAAC	462	12788	12797	10
hsa-miR-651	TTATGATGAG	463	12617	12626	10
hsa-miR-651	TTTGGATGAG	464	11069	11078	10
hsa-miR-651	TGAGTATAAG	465	10767	10776	10
hsa-miR-651	TTACAATAAG	466	10546	10555	10
hsa-miR-651	TAAGGATAAA	467	8265	8274	10
hsa-miR-651	TGTGGATAAG	468	7222	7231	10
hsa-miR-651	GTAAGGATAGG	469	5553	5562	10
hsa-miR-651	CTAGGAAAAG	470	2823	2832	10
hsa-miR-651	CTATGATAAG	471	1635	1644	10
hsa-miR-651	TAAGGATAGG	472	1562	1571	10
hsa-miR-654-3p	TATGTATACT	473	15493	15502	10
hsa-miR-654-3p	TATCTCTTCT	474	14775	14784	10
hsa-miR-654-3p	TCTATCTGCT	475	8354	8363	10
hsa-miR-654-3p	AATGTCTGGT	476	6720	6729	10
hsa-miR-654-3p	TATGTTTCCT	477	6638	6647	10
hsa-miR-654-3p	TTTTTCTGCT	478	6586	6595	10
hsa-miR-654-3p	TATGTCTTTT	479	6534	6543	10
hsa-miR-654-3p	TATATCTGCA	480	6214	6223	10
hsa-miR-654-3p	TATGTAGGCT	481	97	106	10
hsa-miR-655	GTAATACAT	482	15593	15601	9
hsa-miR-655	ATAGTACAT	483	4200	4208	9
hsa-miR-655	ATAAGACAT	484	3642	3650	9
hsa-miR-655	ATAATACAG	485	2265	2273	9
hsa-miR-655	ACAATACAT	486	1757	1765	9
hsa-miR-656	AATATTATA	487	657	665	9
hsa-miR-664-3p	TATTCATTT	488	9385	9393	9
hsa-miR-765	TGGAGGA	489	5020	5026	7
hsa-miR-766	CTCCAGCCCC	490	12901	12910	10
hsa-miR-766	CTCCAGCCCC	491	5032	5041	10

hsa-miR-767-3p	CCTGCTCAT	492	14871	14879	9
hsa-miR-767-3p	TCTTCTCAT	493	9155	9163	9
hsa-miR-875	CCTGGAAATA	494	5820	5829	10
hsa-miR-875	CCTAGAAACA	495	5294	5303	10
hsa-miR-876	TGGATTCT	496	6366	6374	9
hsa-miR-876	TGGATTCT	497	142	150	9
hsa-miR-888-3p	GACTGACTCC	498	15772	15781	10
hsa-miR-888-3p	GACTGACAGC	499	9119	9128	10
hsa-miR-890	TACTTGGAAAG	500	8106	8115	10
hsa-miR-940	AAGGCAGTG	501	1807	1815	9
hsa-miR-941	CACCCAGGT	502	14396	14404	9
hsa-miR-941	CACCCTGCC	503	13715	13723	9
hsa-miR-941	CACCCCTCT	504	13128	13136	9
hsa-miR-941	CACTCAGCT	505	12289	12297	9
hsa-miR-941	CTCCCGGGT	506	10102	10110	9
hsa-miR-941	CAGCCTGCT	507	10034	10042	9
hsa-miR-941	CACCCACCT	508	9904	9912	9
hsa-miR-941	CACCTGGCC	509	9900	9908	9
hsa-miR-941	CATCTGGCT	510	8219	8227	9
hsa-miR-941	CACTCGACT	511	8148	8156	9
hsa-miR-941	CTCCCCAGCT	512	6840	6848	9
hsa-miR-941	CTCACGGCT	513	6031	6039	9
hsa-miR-941	CAGCCCCGT	514	5928	5936	9
hsa-miR-941	CACCTGACT	515	5510	5518	9
hsa-miR-941	CACGCCGCT	516	5142	5150	9
hsa-miR-941	CTCCCTGCT	517	3983	3991	9
hsa-miR-941	CACCAAGGA	518	2087	2095	9
hsa-miR-941	CTCCCGGGT	519	390	398	9
hsa-miR-941	CACCCAGCC	520	186	194	9
hsa-miR-941-2	ATCCGACTGT	521	9657	9666	10
hsa-miR-941-2	TCCCTGCTGT	522	8726	8735	10
hsa-miR-941-2	TCCCAGCTGT	523	6838	6847	10
hsa-miR-941-2	AGCCCGCTGT	524	5926	5935	10
hsa-miR-941-2	ACCCGGGCGT	525	4764	4773	10
hsa-miR-1179	AAGTATCCTTT	526	15346	15356	11
hsa-miR-1179	ATGCATTCTGT	527	3357	3367	11
hsa-miR-1179	ATGCATTCTCT	528	1854	1864	11
hsa-miR-1207-5p	TGGCAGGG	529	11441	11448	8
hsa-miR-1224-3p	CTCCACCTCC	530	399	408	10
hsa-miR-1228-3p	TCCCACCTG	531	13637	13645	9

hsa-miR-1228-3p	TCACGCCTG	532	4992	5000	9
hsa-miR-1231	GTGTCTGGC	533	12807	12815	9
hsa-miR-1231	GTGTCCGGG	534	4739	4747	9
hsa-miR-1245	AAGTGATCT	535	8341	8349	9
hsa-miR-1245	AAGTGATCT	536	2020	2028	9
hsa-miR-1249	CGCCCTTC	537	5907	5914	8
hsa-miR-1251	ACTCTAGGT	538	12854	12862	9
hsa-miR-1251	ACTCTATCT	539	8357	8365	9
hsa-miR-1251	ACTCCAGCT	540	4044	4052	9
hsa-miR-1251	AGTCTAGCT	541	457	465	9
hsa-miR-1252	AGAGGGAAAT	542	3819	3828	10
hsa-miR-1252	GGAAGGAAAT	543	1625	1634	10
hsa-miR-1268	CGGGCGTGG	544	4762	4770	9
hsa-miR-1270	CTGGAAATA	545	5820	5828	9
hsa-miR-1270	CTGGAGATG	546	5055	5063	9
hsa-miR-1270	CTGGAGAAA	547	3828	3836	9
hsa-miR-1270	CAGGAGATA	548	1431	1439	9
hsa-miR-1272	GATGATGA	549	10622	10629	8
hsa-miR-1275	GTAAGGGAGA	550	1189	1198	10
hsa-miR-1302	ATGGGACACA	551	15021	15030	10
hsa-miR-1302	TTTGGATATA	552	11027	11036	10
hsa-miR-1302	TTAGGGCATA	553	8421	8430	10
hsa-miR-1302	TTGGAACAGA	554	6076	6085	10
hsa-miR-1302	CTGGGACTTA	555	4819	4828	10
hsa-miR-1302	GTGGGAAATA	556	3845	3854	10
hsa-miR-1302	TTGTGAGATA	557	1944	1953	10
hsa-miR-1302	CTGGGAAATA	558	867	876	10
hsa-miR-1324	TCAAGACAGA	559	9426	9435	10
hsa-miR-1827	TGAGGCAGT	560	3051	3059	9
hsa-miR-1911-3p	CACCAGGCC	561	2087	2095	9
hsa-miR-1915	CCCCAGGG	562	5111	5118	8
hsa-miR-2909	TTTAGGGCC	563	3728	3736	9

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 1 0】

(表14) UCP2遺伝子配列の5'UTR中に予測される結合部位を有するmiRNA

マイクロRNA	シード長	起点	配列	SEQ ID NO:	終点	P値
hsa-let-7c	9	3052	UAGAGUUAC	564	3044	0.0374
hsa-let-7i-3p	9	3051	CUGCGCAAG	565	3043	0.0374
hsa-miR-1228-5p	9	3419	UGGGCGGGG	566	3411	0.0374
hsa-miR-1229-3p	9	3419	UCUCACCCAC	567	3411	0.0374
hsa-miR-129-1-3p	10	2784	AGCCCUUACC	568	2775	0.0095
hsa-miR-1302	9	4219	UGGGACAUUA	569	4211	0.0374
hsa-miR-1303	9	2159	UUAGAGACG	570	2151	0.0374
hsa-miR-136	9	4486	CUCCAUUUG	571	4478	0.0374
hsa-miR-155	9	2160	UUAAUGCUA	572	2152	0.0374
hsa-miR-16	10	3603	UAGCAGCACG	573	3594	0.0095
hsa-miR-18a-3p	10	3603	ACUGCCCCUAA	574	3594	0.0095
hsa-miR-190	9	2428	UGAUUAUGUU	575	2420	0.0374
hsa-miR-191	9	3052	CAACGGAAU	576	3044	0.0374
hsa-miR-192	9	4390	CUGACCUAU	577	4382	0.0374
hsa-miR-194	9	1643	UGUAACAGC	578	1635	0.0374
hsa-miR-197	9	5001	UCACCACCU	579	4993	0.0374
hsa-miR-19b-2-5p	10	3052	AGUUUUGCAG	580	3043	0.0095
hsa-miR-203	9	3051	UGAAAUGUU	581	3043	0.0374
hsa-miR-218	10	3603	UUGUGCUUGA	582	3594	0.0095
hsa-miR-218-1-3p	9	5001	UGGUUCCGU	583	4993	0.0374
hsa-miR-219-1-3p	9	3614	AGAGUUGAG	584	3606	0.0374
hsa-miR-26a-2-3p	9	2163	CCUAUUCUU	585	2155	0.0374
hsa-miR-27a-3p	10	3603	UUCACAGUGG	586	3594	0.0095
hsa-miR-27a-5p	11	3336	AGGGCUUAGCU	587	3326	0.0024
hsa-miR-28-5p	10	3603	AAGGAGCUA	588	3594	0.0095
hsa-miR-331-3p	9	4134	GCCCCUGGG	589	4126	0.0374
hsa-miR-337-5p	10	115	GAACGGCUUC	590	106	0.0095
hsa-miR-340-3p	9	1872	CCGUCUCAG	591	1864	0.0374
hsa-miR-34c-3p	11	2162	AAUCACUAACC	592	2152	0.0024
hsa-miR-373-5p	11	530	ACUAAAAUGG	593	520	0.0024

hsa-miR-425	9	1013	AAUGACACG	594	1005	0.0374
hsa-miR-497	9	3661	AGCAGCACCA	595	3653	0.0374
hsa-miR-501-5p	9	4164	AUCCUUUGGU	596	4156	0.0374
hsa-miR-505	9	1015	GUCAACACU	597	1007	0.0374
hsa-miR-508-3p	9	1274	GAUUGUAGC	598	1266	0.0374
hsa-miR-509-3p	12	2554	UGAUUGGUACGU	599	2543	0.0006
hsa-miR-512-5p	10	987	ACUCAGCCUU	600	978	0.0095
hsa-miR-514	9	5001	UUGACACUU	601	4993	0.0374
hsa-miR-515-5p	9	59	UUCUCCAAA	602	51	0.0374
hsa-miR-518a-3p	9	19	GAAAGCGCU	603	11	0.0374
hsa-miR-519e-5p	11	2525	UCUCCAAAAGG	604	2515	0.0024
hsa-miR-548a-3p	10	680	CAAAACUGGC	605	671	0.0095
hsa-miR-550a-3p	9	4312	GUCUUACUC	606	4304	0.0374
hsa-miR-571	9	739	UGAGUUGGC	607	731	0.0374
hsa-miR-578	9	1377	CUUCUUGUG	608	1369	0.0374
hsa-miR-606	9	4420	AACUACUGA	609	4412	0.0374
hsa-miR-615-5p	10	1140	GGGGGUCCCC	610	1131	0.0095
hsa-miR-638	9	2710	GGGAUCGCG	611	2702	0.0374
hsa-miR-657	12	1316	GCAGGUUCUCAC	612	1305	0.0006
hsa-miR-658	9	3673	GGCGGAGGG	613	3665	0.0374
hsa-miR-877-3p	9	4349	UCCUCUUCU	614	4341	0.0374
hsa-miR-93-3p	9	799	ACUGCUGAG	615	791	0.0374
hsa-miR-96-3p	9	799	AAUCAUGUG	616	791	0.0374
hsa-miR-99b-3p	9	2163	CAAGCUCGU	617	2155	0.0374

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 7 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 7 9】

(表25)ヒトUCP1遺伝子の1,462塩基対(bp)転写物ENST00000262999の核酸配列(6つのエキソンは大文字で表示)

番号	エキソン/ イントロン	起点	終点	長さ	配列	SEQ ID NO
	5' 上流配列				.....gtcggttcaaaaaacagaaaatcggtt tgctgccccggcgacaggcgta	618
1	ENSE000010 81761	141,489,959	141,489,758	202	AGAGCAAGGGAAAGGAACTT CCTCCACCTTCGGGGCTGGA GCCCTTTCTCTGCATCTCC AGTCTCTGAGTGAAGATGGG GGGCCTGACAGCCTCGGACG TACACCCGACCCCTGGGGTC CAGCTCTTCTCAGCTGGAAT AGCGGCGTGCTTGGCGGACG TGATCACCTCCCGCTGGAC ACGGCCAAAGTCCGGCTCCA G	619
	イントロン1-2	141,489,757	141,489,132	626	gtagctaggcagagggtaagacaa..... tgttctgcacccttttatttcag	620 621
2	ENSE000010 09006	141,489,131	141,488,933	199	GTCCAAGGTGAATGCCGAC GTCCAGTGTTATTAGGTATA AAGGTGCTGGAACAAATC ACCGCTGTGGTAAAAACAGA AGGGCGGATGAAACTCTACA GCGGGCTGCCTGCGGGGCTT CAGCGGCAAATCAGCTCCGC CTCTCTCAGGATCGGCCTCTA CGACACGGTCCAGGAGTTCC TCACCGCAGGGAAAGAAA	622
	イントロン2-3	141,488,932	141,484,673	4,260	gtaagccgtgagcgttcctggagg..... aataattttttctctctggatag	623 624
3	ENSE000010 81759	141,484,672	141,484,472	201	CAGCACCTAGTTAGGAAGC AAGATTTAGCTGGCTAAC GAATGGAGGAGTGGCAGTAT TCATTGGCAACCCACAGAG GTCGTGAAAGTCAGACTCA AGCACAGAGCCATCTCCACG GAATCAAACCTCGCTACACG GGGACTTATAATGCGTACAG AATAATAGCAACAACCGAAG GCTTGACGGGTCTTGGAAA G	625
	イントロン3-4	141,484,471	141,484,366	106	gtaactaactcaaaatgggtta..... acattttttttttttcccccag	626 627

4	ENSE000010 81762	141,484,365	141,484,264	102	GGACTACTCCCAATCTGATG AGAAGTGTCATCATCAATTG TACAGAGCTAGTAACATATG ATCTAATGAAGGAGGCCTIT GTGAAAAACACATATTAGC AG	628
	イントロン 4-5	141,484,263	141,483,528	736	gtaactccccattcatataacaaa..... gacctgttcatcgatccattttag	629 630
5	ENSE000010 81763	141,483,527	141,483,347	181	ATGACGTCCCCTGCCACTTG GTGTCGGCTCTTATCGCTGGA TTTGCGCAACAGCTATGTCC TCCCCGGTGGATGTAGTAAA AACCAAGATTATTAATTCTCC ACCAGGACAGTACAAAAGTG TGCCCAACTGTGCAATGAAA GTGTTCACTAACGAAGGACC AACGGCTTCTTCAAGGG	631
	イントロン 5-6	141,483,346	141,481,165	2,182	gtaagatatgatcttgttatctgt..... cgaacgatgacatgcactttctag	632 633
6	ENSE000010 81760	141,481,164	141,480,588	577	GTTGGTACCTTCCCTTCTTGC ACTTGGATCCTGGAACGTCA TTATGTTGTGCTTGAAC AACTGAAACGAGAACTGTCA AAGTCAAGGCAGACTATGGA CTGTGCCACATAATCAGCTTC AAGAAAATGATGTAACATAC CAGTGGGAATCTGCTGACT GGATCATAAAAACAACAAA ACTTATTCACTTATTAAACC TAAAAAGATAAAGGAATT GGCAGAGAATTGGACTTT TTTATATAAAAAGAGGAAA ATTAATGCCTATTCATATAA CTTTTTTTCTCAGTGTCT TAAGAAGGGAAAGCAAAA CATTAGCATATACCCTGGC AAATGTAATGCAGATAAGCT ACTGCATTGACCATTCTGG AGTGCAATTGTGTGAATGAA TGTGAAGAACTTAAACATGT TTAATTACAATTCCAACCTGG TGGAAAAGAAACTGAGTGAA ATGCAGTTATATTATAAAT ACTTAAAATGAAGTTATTA AAAATATTAGTTTTATTAAAC CACAGTTGTCAGTTAATATAT TCAATAAAAGTATTGCTAATA CCTTTT	634
	3'下流配列				aaagttgtctttgagatctacccgggttaa gagtcaagttacta.....	635

## 【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 8 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 8 0】

(表26)ヒトUCP1遺伝子(ENSG00000109424)の9,371塩基対(bp)の核酸配列、(エ

キソンは太字で表示) :

> 染色体 : GRCh37:4:141479988:141490559:-1

AGAGAAGGCCGCAAGGTGCCTGCAAGATGTCTGGGGAGTTGGAGGAATGGAAGAG  
TGCCCCGCTTCCTCTGGGAGAGCTCCAGCTAGGCAGAACCTTCACCAAGGCTC  
TGATATCGTGCTGGTTCCGAAAGCCCCAGCCGAAGGTGTGCGAGCAAAGGGTGAC  
AGAAGGTGAGGCACGTGCGGGGGCGCGGGTGTGCTGACCGCCGCGGTGCGCCCTCC  
CCGACGTGCGTGTGCGGGGCGCAGACAACCAGCGGCCGCCAGGGCTTCGGGGA  
GCGAAGCAGGGCTCCCAGGGCACCGAGCGAGAAATGGGAATGGGAGGGACCCGGT  
CTCCCGGACACGCCCGGCAGGTCCCACGCCCGGGTCTTCTGAGACCTCGCGCGGC  
CCAGCCCAGGGAGCGGCCAGCTATATAAGTCCCAGCGGAAGACCGGAACGCAGAG  
GGTCCTGCTGGCGCGAGGGTAGGGACTCGGCCCTCCAC  
CGCGCTCCGTCTGCAGCCGCCCTGACCCCGCTGACCCGCGGTGCGCCCTGGTCAA  
AAACAGAAATCGGGTTGCTGCCCGGACAGGCGTAAGAGCAAGGGAAAGGA  
ACTTCCTCACCTCGGGCTGGAGCCCTTCCTCTGCATCTCCAGTCTGA  
**GTGAAGATGGGGGCCTGACAGCCTCGGACGTACACCCGACCCCTGGGGTCC**  
AGCTCTCTCAGCTGGAATAGCGCGTGCTTGGCGGACGTGATCACCTTCC  
CTGGACACGGCAAAGTCCGGCTCAGGTAGCTAGGCAGAGGGTAAGACAAGG  
GGTCTCAGGACAGAGGGACGCTGTTGCGTGCATTCCATTATTCTGCTTGGTGT  
AACCACCTGTTCTAGGTAGGGTAGGTGACCTTCAAAGCAGTCTGGCCTGTCCCAG  
GGCTGGTCTTCTGGATGGAAACTGGAACTTTCTGGGATTAGCTGAAGAACAC  
CAGGGCCACAGAGAAATGGGTTGACCATGACTACTACCAAATTCTCCAAAATTAG  
GGTCACTTAGTATTAAAGAGCTGAGAATATTGCCCTCTGAGTTACTAGTCA  
GGTCTTTCTTCTGGATTCTGACCTTCTGGGTTCTGTCTATCCTACTGCCCTAGGG  
TTCTGGAGAGCTGGGAGGGGATATTCAAATGTGATTGTAGCCAGCCTCCC  
TCCATCTGCGCGTGAGCGAACACACACACACACACACACACACACACA  
CACACACACACGGTAGAGGGAGGTGGATGGAAGAGGAATGTTGCTGAGAAAAGAA  
ACGGAAAATAGGAACACAGGGGAAATCTTGGCTTAAGAGTGAACCTCAATTGCT  
CCCTCTGTTCTGCACCTTCTTCTGAGGTCCAAGGTGAATGCCGACGTCCA  
**GTGTTATTAGGTATAAAGGTGTCTGGGAACAAATCACCCTGTGGTAAAACA**  
GAAGGGCGGATGAAACTCTACAGCGGGCTGCCTGCGGGCTTCAGCGGCAAAT  
CAGCTCCGCCTCTCAGGATCGGCCTCTACGACACGGTCCAGGAGTTCTCA  
CCGCAGGGAAAGAAAGTAAGCCGTGAGCGTCTGGGAGGGCAGAAAAGCCTG  
GGCTCCGCTCTGTTCTGAGGTGAAACACACAGAGGAGTGGTTTCATAACAAATT  
GGCGAGAAAACATTGAACTCTCCCTCCCCAACATTAGCTATTGTTCAT  
AGAAAAAAAGTATGCAAATCGATTAGATGCAGATATAACTGTAAAGGTAC  
CCAGTCATGGAAGTTGTGCCAGTTGGATCTCCATCTGGAGAATATGGGTGGC  
TACAGAAAATGTTAACTTAAAGTCTCCAAAGAGGGAAAGTATATCAGAAACATC  
TATGGAGCTTGTCAAGAAATCCAAACGAGGACTACCATGGCCTCTGAGTCTGAATCC  
TCAGGCTAGAGACCAGAGTGTCTTCCACAAGCTCCCATCATTGTATGCAA

CAAAGTTCAAAGCCTCTGTTGAAGCAAAGAAAGCCAGACTTGTGAAGAGAGTT  
GAAAGGACAGGAAAAGACATATTCTCTTAAGAGGTCCTCATCAGGTCCAGGAA  
AGACCAGAGCAGAAAAAGTGGACGAATGCTGCAGGGAGTTGTTAGGGAAAAAA  
GAAAAGGAAACATATTCTGAGTGCCAGTGCACCTAAGAATTCTGTCACTTAG  
GTAGCATTATTGAGGGCTTAACATATGAACCAGACATTGTTCTAAGTGCCTCAGAT  
ACATTATAACTGGAAGGGTATTAGTACCATATCCCTGGCAGATGGGAAAAGTCAA  
CACAGAGCAGATTCACTTGCCCAAGGTCACACAGCTGGGAGGGGGCAGAGCCA  
GGGTTCAAACCCAGGCAGTCTGGCCTCGGACTCCAGGCTCTAACCCCTGTTCTAC  
TGCCTCTGCACTTCTCATATGATTCTGCCATCATTCAAACCGCACAACACTGCTGT  
GAGTAAAAGTGTAGCCGAATATCAGGGTAGTTAAGTAACATGCACAAAATCACA  
CAGCTAACATCACAGAGGCACTTCATGTGGAGTAGACAAGCCAGAGAGAAGAT  
GTGCTGATGGCACAATGAATACTAACATTAGTGAATCCACCTGTAGATTCTACATT  
CTGCTGTGAGTAACCTCAACTATAATTATGGATAATTATAATGTTGTTCTA  
TACAAATATATAAGTTACTTATCCACACAAGTACTTCAAAGTGAAGATAAAGTC  
TGGATGTTACTAGATCAAACACTGCATTTTTATTAGTGTAGCAAGAGAGGAA  
ACACAAAGGAGGTAAAGCTGCCGTTCAGGTGGTTCTTCACAGATTGACTGTTCT  
ACCAATTGTTGTGACTTGGCACCAAATTAAATAGGATATATGTTGGCAGTGTCT  
ATGTTATATAGATTCAAGTTATTAGTAGGCTTATTGAACTGCCATGTGCAGTAAC  
TATGTTAGATGTTAGATGGCAGATGTGCTCTAGACAGAGCCTACAGTTGAGAGTA  
TGGGTTGTTGGAGAAGTGAATAGATGACTATATTCCATGATACTGCTGTATTA  
CAATACAGTCCTACTCACTAACGATGGGATACATTCTCAGAAATGAGTTAGGAG  
GCAAATTGGTTGTTGAATGAACATCACAGAGAGCACTACACAAACCTAGATGGCA  
TAGCCACACCTAGGCTATATGGTATAATCTATTGCTCTAGGCTACAAACCTGTGCA  
GCATGTTGGTATTGAATACTACAGGCAATTGTTACATAAAGTTAAGTGTGTTGTC  
CTAAAAATAGAAAAGGTAATGCATTACACTACAGTCTTATGGGCTGGATGTC  
AGGTGATAGGAATTTCAGCTCTGTTCAATCTTACGGGACCACATCATGTATGC  
AGCACATGACTAACTGTAATTACAAGATGGTGGCTATATTAAACAGAACTACTTAAG  
CTAGCCATGGAGGTATGGCCGTGAGATTCTGAAGAATTACGTCTGGATCAAT  
TCTGGAAGGGCCAGCAGGAGTACTCCAGGCAAAGGGTGAGAAAGGAGCTTCAA  
GTAGAGTGAAGGTCATGTGCAAAGACTCACTGAGGAGTCAGTGAACATAGCACAG  
GGAGGACATGTTGGTGGAGGAAGGAGGGGTGAAGCCACAGAGACAGGAGGGAGCCA  
GATGACAGAAGGCCTGCAGGCAGGTGCTAAGGAGTTGGATTTCCTACAGTGG  
TGGGAAGTCATTGAAAAATTAAAGCAAGGGAGTGGCATAAAACAATTACATTTC  
AAAAGATCACTTGGCAGCAGATAGAGTATATGTAAAAGGAGTAAGAAAGAGGT  
AAGTTAGAAAGCAAGAAATGATCAGGTATGCCCTAAACACTGGCAATAGGGAAA  
AAGAGATGTCAATCAGAAAGATTGAGAAAGTATAATTGAATTGACTTGGTGAACAA  
ATAGAAGTAAGGCATAAGGGACAGGTAGAAATATGAGATGACTTCCAAGTTCTGT  
TTAAAGATACCCTTATTGAGAGAGGATGTAGAGCTGTCTAGGGGGAAAGACA  
AGAAATTGGTTAGGCCATGTCAACAGGTAAATGCCAGTAGGCACATGATTCA  
TATTAGTGGCTCTTATTAGGAGAAAATCTGAGGCCAGATTCCAGGAAGTCACAGCA  
GGGACTACCAATAGGGCAAACAGCAGAGAGTGTGGAAAGGACTGAAAAGTGTAC  
ATTGTACATAACAAATAGAAGCTCACTGATTCTAGCAAAACATCTCAGCAGAG  
TAGCGTGGTATAAGCTATTGAGGGACTGAGGAAGAAAATGGCTCTGAGAAGT  
AAAGACAAACAATATGTTGAAATAAATTCTTTAGTTCTTAAAGGAGCT  
CTTTCCAGCTGATTGGGAAGTGAAGAGAGGGATTGAAAGTGGAGATTGGAGG  
ATAGGATGAGTACATCAAGATACTACGTTGAGTCAGTGCATTACAAATGTGA  
GCTAAAAGTGAAGGCATTGTAATCATATGATATTGCTAATTAAAGACAGCTGTCA  
GTCATATGCCAGCTCCTGGTAAAGCATGATGAGAAGAGTACAATCATGGTAGTGA

TTTAAAAATTGCTGCCAGTTGTGGATTTCTTATGCTAGACAGTGTAAAGCTTT  
ATCAATATTATTAACTCACACAACCTCTAACAGAGGTAGATATTATTATCCCTTTGAC  
AAATTAGGAAACAGAATTATAATGACTGAGAAAGTCTCTGCTGAGTAAATGTTACT  
GAACCTAATTATGTTACTTAATGATAGAAATGAATATTGGGCTCAAGACTATT  
TGTACTTAATGAAATCTGTCTTGAGCAACATAAGCTATTTCAAAATTAAAGAC  
AAAAATCACTTCTCTCCTGTCTTATTITGTTCCACTGGGCTCATCTAAGGCC  
AACACTACTGATGGCCCATTGATGGCAGTTGTCCACTGGGCTCATCTAAGGCC  
ACCAAGTCCCATAATTACATGATCATTGAGGGAGAAAGATCAAGCCTATTGGTG  
ATGGGTGCCTCCTCACAGTCGGATAATACTGAAAAGAGAGCTAAATGTGGAAAGA  
ACCAAGTTGAACACAGGAAAGAACAGGCCACTGTGAAAATAAGCATTGTGTTTC  
TTGTTCTTGAAAGTCTCATTTAAAAATTACAGACACCTGAAGTTCTAGCCT  
TACTCTGAGTTGACGCACATTAGTACATGATCAACACATAAACAAAGCATTAGAGAA  
ATAGAAAAGCTGTAAGAACATACAAAAATATGGGCCAGGTGGGTGGCTCATACCTGTA  
ATCCTAGCACTTGGGAGGCCAGGCAGACGGATCACCTGAGGTCAAGGAGTTCAAG  
ACTAGCCTGGCCAATATAGTGAACACCTGCTCTACTAAAAATACAAAACCTAGCAG  
GCTGTGGTGGCACGTGCCTATAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAT  
CTCTGAACCCGGGAGGCCAGATTGCAGTGAGCCAAGATCACACCAACTGCACTCT  
AGCCTAGATAACAGAGCAAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAACACAAATATG  
AACCACTGAAAATTAAAAAGACATGCATGCATTCTAGGTCTTAATTTCCTAA  
TAATTTCCTCTGGATAGCAGCACCTAGTTAGGAAGCAAGATTAGCTG  
GTCTAACGACTGGAGGAGTGGCAGTATTCAATTGGCAACCCACAGAGGTG  
AAAGTCAGACTCAAGCACAGGCCATCTCCACCGAATCAAACCTCGTACAC  
GGGGACTTATAATGCGTACAGAATAATAGCAACAACCGAAGGCTGACGGGT  
TTTGGAAAGGTAACTAACCTAAACATGGTTTATAACCACCAAGCACATACATA  
CAACTAGCAACTATTGTAAGTAGAGTTAATAAACATTTCCTTTTTCCCCA  
GGGACTACTCCCAATCTGATGAGAAGTGTCAATTGTACAGAGCTAGTA  
ACATATGATCTAATGAAGGAGGCCATTGTGAAAAACACATATTAGCAGGTAAC  
TTCCCATTCTATATAACAAACAGGTCGCACCTTAAAGTTCATCTGGAGCTCTGC  
AGCCACCTTACTCAATCTCTTAACCTCAATAGTTCTCTTTAAAAATTAAAGTA  
ATTTCGAACCATATATAACTTGTGAGAAGCAGGAAAAGACCAAAATATTAAAGTTA  
AGAAGTTTGCCACAACAAAATATTGCAACAAAAAACAGGCAATTCTATGTC  
AGCATTATTCTCATTTAAACTAATATAGGACTTTGTTAGAATCTTATTCTTAT  
ACAGCAGAATTCAAGGAGGTAAGTCCATCCTGCATACTATATCCAAAAGATCTAGTTA  
TAAAAGGAGCTTATCAGTGGTCTCATCCAAAAGTAATACCATAAGATAGGTTCTTA  
AAAATAATTCTAACAACTCTAGAGACATTGAAATTCCCTTATTCAATAAAA  
AGTATTAGATGCTCATATTAGGCATTATTACAGGCCTAAAGGCACAGAGGAAAC  
TAACAGTTACTTCCTAAAGTGTAAACATCTATTAGCCATTACTCTTACCTTC  
TTTTCTAGTGCAATACCTTCTTATTATTATTATAAGACATCTTCATTG  
ACCTACTGTTATCAATAGGTTATAAGATATGACAGATAACTAAATTGCAAGCCCC  
CAAAAGTCTGATGTTGACCTGTTCATCGATCCATTAGATGACGTCCCCGCCA  
CTTGGTGTGGCTCTTATCGCTGGATTGCGCAACAGCTATGTCCTCCCCGGT  
GGATGTAGTAAAACCAAGATTATTAAATTCTCCACCAGGACAGTACAAAAGTGT  
GCCCAACTGTGCAATGAAAGTGTCACTAACGAAGGACCAACGGCTTCTTCAA  
GGGGTAAGATATGATCTTGTGATCTGTAATGTTCTGGCTGTGTGCTTGG  
GACACTCTCATGTCAAGCAACCGACATTAGCTTACAAGCCTTAGTATATTCTATATA  
CTTAGTATTGACTTTCTGCCACAGATTCTCAAATCCACCAATTCAACTGTGCCA  
GAAAGTAAAAGCCATGATATTCAAATTCTCAACTTGATCAAAGGCTATTCAA  
GACCAGTGCCTTCCACTGGTCCAACTACTGGAAATGCAGACAGTATTGCCTT

CTCTGGGCAAGAAAGTTATAAGTAGAGGGAAATCATAATAGAGAGCTATGAGAGA  
ACAAGATTGATTGATTAAATTGATGGACTCAAGTTAACATTGTAAAAGT  
GATAAGACATCACCACCAATCTAGAAAAGTGTGCAGAAAAAGTATTGATTGGGT  
AATTATTACACTCACCTAGAAACAAGTGTGTGAATAGATTACATATTCCATAAT  
GCAATGTTGTATCAGAAACTACCTCCTAAGAAAATATAGTATGGGCTCGCGTGGT  
GGCTCGCACCTGTAATCCCAGCAGTGGAGATGGAGGAGGAGTCAGTGAG  
CCCAGACTGGGCAACAAAGCGAGACCCTGTCTCAACAAAAAATTAAAATTAGCT  
GAGTGTGGTGGCACGCAGTGATGGTCCCCTACTTGGGAAGCTGAGGCAAGAGGA  
TCTCCTGAGGCCAGGAGTTCAAGGTTCAGCGAGCTATGATTGTGCCACTGCACTCC  
AGCCTGGGAGACAGAGCAAGTCCCTGTCTAAAAAAGAAGAAGGAGAAGGAGGAG  
AAAATACAGTATTAAGTAATCTGTCAATATATTCCACAAGGATTACACTAGTGGTT  
AATAATAAAATTATACCTTTAAATTGTAAGGCCATTCTCAAGCTTATAAAT  
TAAGCATGAATGCATCATACACATTAAATAATTATTATTCAAAATTAAAAACCTT  
CTTATGATACATTAATAACAAATGAAGTTCATTATAAAATTAACTTAAATGGATATA  
CCAGTTATTAACCATTAACCATTAAATAATTATTATTCAAAATTAAAAACCTT  
TTGGGGAGAAATACTACAACATGGATGAACCTGAAAACGTTATGCTAAGTGAAA  
TAAGCCAGACACAAAAGGACAAATACTGTATGATTACACTTAAATGAGGTACCTAG  
AGTAGTCAAATTACATAGAGACAGAAAGAATAGAAGTTACAGGGCTGGAGGTAGG  
AAAAAAATGGAGAGCTGTTAATGGGTAGAGAGTTCTTTGGGGTACAAAAAGG  
TTCTAGAGATGGATAGTGGTGTGGTTACACACAATGTGTGTACTTAATGCTACT  
GAAATGTAATTGATTTTTTGCAGCAAAATACCCACATTGGAAAGTGA  
AGAGAAACATGTTAAGAGACTTGAAGGAAAAAAATTGGGGCAGAGGGTGT  
ATAGGTTAAACAATAAAAGCCATTAAACAGTAACAATTCTCTAAGGACAAGAAT  
CGTCAAGATTGAGACAGCACTGATTCTGACTCTACTCAATACTCTTGGTTCTC  
TTCTCCTCCCCCTCTAATAGTTCTACCTCCCATTCAAGAAAGCAAAGCAAACA  
AGCAAAATTCCCCCTCCCTCAAAAAGGAAAGAGTTTGAAAAGTCATGTCA  
GTGAAGAAAAGACATGTTGGGAGTGAAGGATATTGTTGATTGTATAGATGTGA  
TCATCAGGGCTGTGTTGAAGTAATATAGGACATCTAGAGGAAAATTATT  
CAGCAGAGGAGGGAAAGATGAAGAGTAGGTACTTTAAGCATCTTCACTGAGGAG  
TGGCAAAATGAGAACATGCTATAACCTGCTATAATCATTAAAGAATTCAAGGCTGAGTGT  
GGTGGTGCAGTCTAGTCCAGTTACTCCAGGAGGCTCAGGTGGAGGATCACTTA  
AGCCCAGGAGCTCGAGGTGAGCTATGATTACACTACTGCATTCCAGCCTGG  
GCGGCAGGGTGAAGCCTCATCTCAAAAATTAAAAAAAAAAATCAAACAAATTA  
ATCGAACGATGACATGCACTTTCTAGGTTGGTACCTCCTCTGCGACTGGAT  
CCTGGAACGTCATTATGTTGTGTGCTTGAACAAACTGAAACGAGAACTGTCAA  
AGTCAAGGCAGACTATGGACTGTGCCACATAATCAGCTCAAGAAAATGATGT  
AACATACCAGTGGGAATCTGCTGACTGGATCATAAAACAAACAAACTTATT  
CACTTATTAAACCTAAAAGATAAAGGAATTGGCAGAGAATTGGACTTT  
TTTATATAAAAAGAGGAAAATTAAATGCCTATTCTATATAACTTTTTTCT  
CAGTGTCTAAGAAGGGAAAGCAAACATTCACTGATATAACCTGGCAAATGT  
AATGCAGATAAGCTACTGCATTGACCATTCTGGAGTGCAATTGTGTGAATGA  
ATGTGAAGAACTTAACATGTTAATTACAATTCCAACGGTGGAAAAGAAC  
TGAGTGAATGCAGTTATTTATAAAACTTAAAATGAAGTTATTAAAAT  
ATTAGTTTTATTAAACCACAGTTGTCAAGTTAATATATTCAATAAGTATTGCTAA  
TACCTTTAAAGTTGTCTTGTGAGATCTATACCTGGGTGAAGAGTCAAGTCACT  
AGAATACAAGACTGCCAATAGCAAATGCAGGTCTTAGAATCATAGGCATGAACC  
TACTCTGAATGTTATTAGTATAGATTAAATGTTAGAGTCCAGATTGATGACATC  
TCTAACAACTCTAACAGACACTATATTCAATTGGCAGGATTGCTACTAGAGTC

TTGGTATCTGTGCTAGCATCACATAATTTAGAGCTGGAGGGTACTTCTGGGAAGAC  
 AGAGGAACAGTTGAGATTCTACTGAGATGAAAACGAATCTTCATGGAATCTTCA  
 GCAAAGCCAAATTCAAATTCAATTGACATTAGCACCTGTAGTAACCTTTCAATGCCTACA  
 AACTGCATGCAGAAGAGATAGGGAAACAGTAAAACAGATATTAAAAGAAGTTTTA  
 AGACAAAGCCCAGCCTGATTTAAGCTAAATCCAAGGATTGGCAGCTGGATGAGC  
 AGGAAGGTTACAGGCTGCCAGACATCATTCTAGTTCTGTTAATCAACTCCATGTT  
 ACATTTACTATCAGGGATTCTCACCTC ACCCTCATGCAT (SEQ ID NO: 636)

## 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0281

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0281】

(表27)ヒトUCP1遺伝子 (NCBI参照配列 : NG \_012139.1、第4染色体上のRefSeqGene ) の15,910塩基対 (bp) の核酸配列: (SEQ ID NO: 637)

CTGTACAGCT	CTCCGACAAT	CCCACATCTA	GATGCCAAGC	TGAGGTTGGC	ATTCTCACTA	61
ATTTGCTGTT	ATAAAATATTA	AGCTATCATA	AGCGTTAGCC	TACATATGAC	TCTTTCATAT	121
GTTAGTTAAT	TATTTTAGGG	TAGAAATCCA	AAAGTGGAGT	TACCAGAAGT	GGATATAGAC	181
ATTCTGGCTG	GGTGTGATGG	TTCATGCCTG	TAATCCCAGC	ACTTTGGGAG	GCAGAGGCAG	241
GCGGATCACT	TGAGGCCAGG	AGTTTGAGAT	CAGCCTGGC	CAACACAGCG	AAACCCCCATC	301
TCTACTAAAA	ATTCCAAAAC	TAGCCAGGCA	TAGTGGCACA	TGCCTGTACT	CCCAGCTACT	361
TGGGAGGCTA	AGACACAAGA	ATCGCTTGAA	CCCGGGAGGG	AGGTGGAGGT	TGCGGTGAGC	421
TGAGATTGTG	CCACCGTACT	CCAGCCTGGG	TGACACAGCT	AGACTCTGTT	TCAAAAAAAA	481
AAAGAAAAAG	AAAAGAAAAA	AATAGACTTT	CTCTTGGCTC	AGTGTATACT	GCCAAATTGT	541
TTTCCAAAAA	AATTGTGTCA	ATGTATAACA	CCATCACTAA	TATAGTATTG	ATATTATGGT	601
TATTACATTT	TAAAATTCTAT	AATTGTAAT	TATAACATTC	ATAATTATT	ACTATTATA	661
ATATAATGT	AAATGTATAT	TATATATAAA	TGTTATAGTA	ATTATAACTT	TGGTAGTGAC	721
AAAGTATTAA	TTTATTAGGT	GAAGTATATG	CTTTTTTATT	AGTGATAATA	AATATATCCT	781
CTCTCCCAATT	ATAAAAGTTT	GTATTTCTTC	TTTTAGAAAT	TGATTCTTCT	GTCATTGCA	841
CATTATCTG	TATAATTATA	ACAGGGTATT	TCCCAGTGGT	GGCTAATGAG	AGAATTATGG	901
GAAAGTATAG	AACACTATTC	AAATGCAAAG	CACTGTATGA	TTTTTATTTA	ATAGGAAGAC	961
ATTTTGTGCA	GCGATTTCTG	ATTGACCACA	GTTTGATCAA	GTGCATTTGT	TAATGTGTT	1021
TACATTTTCA	AAAAGGAAAG	GAGAATTGT	TACATTCA	ACTGCTGCC	ACTCCTTGC	1081
TACGTCAAA	AGGGTCAGTT	GCCCTTGCTC	ATACTGACCT	ATTCTTACC	TCTCTGCTTC	1141
TTCTTGTGC	CAGAAGAGTA	GAAATCTGAC	CCTTTGGGGA	TACCACCCCTC	TCCCCCTACTG	1201
CTCTCTCCAA	CCTGAGGCAA	ACTTTCTCCT	ACTTCCOAGA	GCCTGTCAGA	AGTGGTGAAG	1261
CCAGCCTGCT	CCTTGGAACATC	CAGAACTACT	TTCAGAACCT	TGAACCTCTG	TGACCTCTCA	1321
GGGCCCCCTT	GTGTGAAGTT	TTTGACGTCA	GCTTCTCTG	TGACCCCTTAG	AAGTCACTCT	1381
TGTGTCTAGC	ACATCCCAGG	TGCTCAGTCA	CCATTGAAC	ACAGTCATAC	TATCTCCTGG	1441
CAAAGGCTCT	TAACTGTCCA	TGTTAGCCTG	ATATTAATAT	CCTGGAAGCT	TATACTGTG	1501
TTCTCCCTC	CAGGTTTAAA	TAAGGCAGCC	CCTTTATCCT	GTCACAGGTC	CTCTCTCCCT	1561
ACCTATCCTT	ACCTGTTTG	GATAACAACC	TTTCTTATTT	CTAATAGATT	TATTTATTTC	1621
TCACATTTC	TTCCCTTATC	ATAGTTTCC	TCTCACTTC	TCCTCTAGTT	TGTCATAC	1681
TGGCTTTAAA	ACATGCAAAC	ATGTGCCCTA	TGGGGAAAAA	AAGACAATT	TAATTACCT	1741
TGCTCTTCT	TTACAAATGT	ATTGTGGCTT	CTTCTTATAG	TCCAAATCTA	AAACTCTT	1801
CCCACCCACT	GCCTGAACT	CCTCCCTCGT	TGTGAAAGTA	GGATGGGGCA	AAGAGAGAAT	1861
GCATGCCCT	CCCAACTGCT	CAAACAAGTA	AAGGTGCTGT	TACAGTTATC	TTTGCTACC	1921
TTAACACAAT	AATTATTTTA	TTATATCTCA	CAATTCTATG	GATCAGGAAT	TTAGACTGGG	1981
CTCAGCTAGG	CGATTCTCT	GCTTACTGA	CATCATAGGA	GATCACTTGG	TGGTATTCAA	2041
CTGTCAGGTA	GGCTTATCTG	GAGGGTCCAA	GATAGCTGTA	CTCTGGTGCC	TGGTGCTTG	2101
GTAAAGAGGG	ATGATGATGT	GGGGCCTCTC	CAGCATGAAC	AGCCTCAGAG	AAGTTGCTT	2161
TCTTACATGC	TGGCCCAGGG	CTCCAAGAGC	AAATGTTGCA	GTGAGTAAAG	CAGAAGATAC	2221
AAGGACTTTT	ATAATCTGGT	CTCAGAAGCC	ACATGGCCTC	AGTCTGTAT	TATTCTATTG	2281
GTCAAAACAT	TCATAAGCCT	GCCAGATGCA	AGGGGAAGGC	ATATGTACCC	TCATCTTTG	2341
ATGGGAGGAA	TGTGATGGAT	TTGCAATTAT	GTTTTAAAC	TACTACAGAC	AGAACCACTG	2401
AGAAAGATTG	ATGGGTAGCT	TTGGGGTGA	GACTGGGAAT	TAACCTGTTG	ATAGCAGAGG	2461
TTCACTAGAG	TCAACAAAGGA	ATAAGGTCTC	CTCTTGAC	CTTGTACAT	ACTATACCAA	2521
CATTCTTAAC	CACTGCTTAG	CCATCAGCCT	CACAACTAA	CAACTCCATC	ATAGTTGTAC	2581

TCCCTAACAGAT	CACCAACAAT	GTTAGAGTCA	AATCCGGTAG	GTTTTCTTT	GTTTTGTCC	2641
TCCTGACATT	TTTCTAAAC	TTGACACTGG	TCAGACCCAA	TCTTCCTTTA	ATCATATTCT	2701
TAAATACCAG	TTCTATCACT	GGATATGTTA	CTGTTCTTG	TTCTCACTCT	ACCTTGTACA	2761
AAGCCATTCT	TTCCAGACTA	TAACCTCTGGG	TCTGGTCCC	CCTATGGTTT	GGCCCTTGAA	2821
TTCTTTCTCCT	AGTCCTATT	GACTAGCCCC	ATTTTCCCGT	GAAAAGCATG	CCCCTTCAT	2881
TGCATCCATA	TCATGACTAC	CAAATACCTC	CTCTATTCT	TCCTCTTTA	GCATGTTAAA	2941
TGCAGCTTCC	TAAGCTCTCT	ATCTGGATAT	CAACAGTATT	CTCTCCAAAT	AATTCTAAGA	3001
CTTTAAAAAT	TGGTTTAATC	TTCTTACCCC	AAAATCACC	CCCCTTACCA	ACTGCCTCAT	3061
GACAATCATT	GGTACTGTCA	CTGAGCTTGC	AAACCATGTT	CTTAAACATA	GAGTAATCTT	3121
TGACTCCACA	TCTAATCATT	CATAAAGCTG	TATTGTCTAT	CAAATTAAT	CTGACATTAA	3181
TGTGAGAGCA	CTTCATAGTC	TGTAAAGCAC	TACACAGGTG	ATAACATGAA	GCTACACTCA	3241
TAATGGATT	GCAGGCTCTG	CTTCTCATTT	GGCTTCTACA	GCCTCATCCC	TCACCAACTT	3301
CTTGCCTTAC	CTCTCTCTT	CTTCCCCATC	ACCCAATTTC	CCAGTCAGTC	AGGCCAACAG	3361
AATGCAATTCT	ATATAACCGA	CTTGCTTCC	CCAACATCTT	TGCCTGTATG	CATGCCACTT	3421
ATTTGCCTCA	GTTGATCTTT	ATTCAACAA	GTGTTGCAG	AGGAGAAACC	TCGCTGGCTC	3481
CTTCTCCTTT	CTATTTTTT	TCAGAGGCTA	CCCGTCAGGT	CAACATTGCC	TTTTTCAGGG	3541
AAGCTCTGCA	AGCCTGACCT	CCCTTGAAG	TGCCTTAGGA	CTGGCTTCTT	GCACAGTACA	3601
CAACCTTAC	TTATAGAGGG	TTGGAGATT	ATTCTTATT	CATGTCTTAT	TTCTCCTGCT	3661
CCTGGAGGAG	ATGACTCTGA	CTTCCACTGA	CTCTTTGGG	GGGCTTAAGT	CAGGGTTGAG	3721
TACCAAGGGC	CCTAAATAGC	TGGACGTGGA	TTCTGGTAAT	ATCAAATCCA	TCTTTGGCTT	3781
AACTGAGAGG	TTCTGAAAGC	TGGGACCTGA	CCTTGTCCAT	TTCCCTCTT	CTCCAGTTTC	3841
CTATTATTTC	CCACTGTTT	TTTAAAAGT	TTTTTGTTTT	CTTAAGTTT	CACAAGAATA	3901
AACATTGAAA	ATAAAATTG	CACAAAGATC	GAACTAGGAA	AGGCCACACA	ACCAACACAT	3961
ATTACATCAT	TATAGGTAAG	TTAGCAGGG	GATTCAGAC	CTGGGCTAGC	TCTGGAACCA	4021
CATTACAC	TGTTGAAAAT	AAAAGCTGGA	GTACAGATGA	CTTCCCAGG	TTCACAGAGT	4081
TGGTAAGCTG	GAGAGCTGCA	CCTGGAGCCA	AGCAACCTGC	CCTGCTCTT	CCACTGCCCC	4141
CTCTAAGAAA	TCTAATTAGA	AGGAACAGGT	GGTATCTCAT	TTTGTACGGT	GCTTTAGCAA	4201
TGTACTATT	GCTTCTAGT	GTGTCTATTG	TCTCGTTGA	CATCTTCTCT	CAAAAAGTGA	4261
TGAAACGAAA	CGCTCTTTT	GACAAGTTCA	GAGTGCTCTT	GGTCCCTGTG	TGGGATTCTT	4321
CCAAGTCTGA	ATTGGTAGT	GGGAAGAGAA	GGAAATCCGGA	GGAAAGGAGGA	TGAGAAGTTT	4381
AAAGGAGAGG	AAAGGGAAGC	AGAGAAGGCC	GCAAGGTGCC	TGCAAGATGT	CTGGGGAGTT	4441
GGAGGAATGG	AAGAGTGCC	CGCTCTTCC	TCTGGGAGAG	CTCCAGCTAG	GCAGAACCTT	4501
TCACCAAGGC	TCTGATATCG	TGCTGGTTTC	CGAAAGCCCC	AGCGAAGGT	GTGCAGCCAA	4561
AGGGTGACAG	AAGGTGAGGC	ACGTGCGGGG	GCGCAGGTG	TGACCGCCGC	GGTGCAGCCCT	4621
CCCTCCGACG	TGCGGTGTGC	GGGGCGCAGA	CAACCAGCGG	CCGGCCCCAGG	GCTTCGGGG	4681
AGCGAACGAG	GGCTCCCGAG	GCACCGAGCG	AGAATGGGAA	TGGGAGGGAC	CCGGTGCCTCC	4741
CGGACACGCC	CCCGCAGGT	CCACGCCCG	GGTCTCTGA	GACCTCGCGC	GGCCCAGCCC	4801
GGGAGCGGCC	CAGCTATATA	AGTCCCAGCG	GAAGACCGGA	ACCGAGAGGG	TCCTGCTGGC	4861
GCGAGGGTGG	GTAGGAGGG	ACGCGGGGAC	TCGGCCCCCA	ACACCGCGCT	CCGTCTGCAG	4921
CCGCCGCCTC	TGCACCGCCG	CTGCCCGGGC	GTCGGTTCAA	AAAACAGAAA	TCGGGTTTGC	4981
TGCCCGGCCG	ACAGGCGTGA	AGAGCAAGGG	AAAGGAACCTT	CCTCCACCTT	CGGGGCTGG	5041
GCCCTTTTCC	TCTGCATCTC	CAGTCTCTGA	GTGAAGATGG	GGGGCCTGAC	AGCCTCGGAC	5101
GTACACCCGA	CCCTGGGGGT	CCAGCTCTC	TCAGCTGGAA	TAGCGCGGTG	CTTGGCGGAC	5161
GTGATCACCT	TCCCCGCTGG	CACGGCCAAA	GTCCGGCTCC	AGGTAGCTAG	GCAGAGGGT	5221
AAGACAAGGG	GTCTCAGGAC	AGAGGGGACG	CTGTTGCGTG	CATTCCATT	ATTCTCTGCT	5281
TTGGTGTAAAC	CACTGTTCT	AGGTAGGGT	GGTGACCTTC	CAAAGCAGTC	TGGCCTTGTC	5341
CCAGGGCTGG	TGCTTTAGGA	TGGGAAACTG	GAACCTTTTC	TGGGATTAGC	TGAAGAACCA	5401
CCAGGGCCAC	AGAGAATGGG	TTGACCATGA	CTACTACCAA	ATTCTCCAA	AATTTAGGGT	5461
GCACTTAGTA	TTTTAAGAGC	TGAGAATATT	GGCCTCTCCT	GAGTTACTA	GTCAGGTGCT	5521
TTTCCTTTC	TTTGATTCTT	CGGGGGTTCT	GTCCTATCCT	ACTGCCCTAG	GGGTTCTGG	5581
GAGTTCTTGG	GGAGGGGGAT	ATTCAAAATG	TGCATTGTTAG	CCAGCCTCCC	TCCATCTGC	5641
CGTGAGCGAA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACGGT	5701
AGAGGGAGGT	GGATGGAAGA	GGAAATGTTGC	TGAGAAAAGA	AACGGAAAAT	AGGAACACAG	5761
GGGGAAATCT	TGGCTTAAGA	GTGAACCTAA	TTTCGCTCCC	TTCTGTTCTG	CACCTTCTTT	5821
ATTTCAGGT	CCAAGGTGAA	TGCCGACGT	CCAGTGTAT	TAGGTATAAA	GGTGTCTGG	5881
GAACAATCAC	CGCTGTGTTA	AAAACAGAAG	GGCGGATGAA	ACTCTACAGO	GGGCTGCCTG	5941
CGGGCTTCA	CGGGCAAATC	AGCTCCGCT	CTCTCAGGAT	CGGCCTCTAC	GACACGGTCC	6001
AGGAGTTCC	CACCGCAGGG	AAAGAAAGTA	AGCCGTGAGC	GTTCTGGGA	GGGGCAGAAA	6061

AGCCTTGGGC	TCCGCTCTGT	TCCAAAAAGT	GTAACACACA	GAGGAGTGGT	TTTCATAAACA	6121
AATTGGCGAG	AAAACATTC	TATTGAACT	CTCCCTTCCC	CAAACATTAG	CTCATTGTT	6181
ATAGAAAAAA	GTATGAAAAA	TCGATTTTT	AGATGCAGAT	ATATACTTGT	AAAGGTCACC	6241
CAGTCATGGA	AGTTTTGTGC	CCAGTTGGA	TCTCCATCTG	GAGAATATGG	GTGGGCTACA	6301
GAAAATGTT	TAACTAAAG	TTCTCCAAAG	AGGGAAGTAT	ATCAGAAACA	TCTATGGAGC	6361
TTGTCAGAAA	TCCAAACGAG	GACTACCAGT	GTCCTCTGAG	TCTGAATCCT	CAGGCTAGAG	6421
ACCAGAGTGT	CTTTCACAA	GCTTCCCTCA	TCATTTGTGT	ATGCAACAAA	GTTCAAAGCC	6481
TTCTGTTGA	AGCAAAGAAA	GCCAGACTT	GTGAAGAGAG	TTGAAAGGAC	AGGAAAAGAC	6541
ATATTCCTC	TTAAGAGGTT	CCTCATCAGG	TCCAGGAAAG	ACCAGAGCAG	AAAAAGTGGA	6601
CGAATGCTGC	AGGGAGTTG	TTTAGGGAA	AAAGAAAAGG	AAACATATT	CCTGAGTGCC	6661
AGTGCACCT	AAGAATTCT	GTCACCTT	GTAGCATTA	TTTGAGGGCT	TAACTATGAA	6721
CCAGACATTG	TTCTAAGTGC	TTCAGATACA	TTATAACTGG	AAGGGTATTA	GTACCATTAT	6781
CCCTTGGCAG	ATGGGAAAC	TGAACACAGA	GCAGATTCA	CACTTGCCCCA	AGGTACACACA	6841
GCTGGGAGGG	GGCAGAGCCA	GGGTTCAAAC	CCAGGCAGTC	TGGCCTCGGA	CTCCAGGCTC	6901
CTAACCCCTGT	TCTCTACTGC	CTTCTGCACT	TCTCATATGA	TTCTGCCCAT	CATTCAAACC	6961
GCACAAACACT	GCTGTGAGTA	AAAAGTGT	GCCGAATATC	AGGGTAGTTA	AGTAACATGC	7021
ACAAAATCAC	ACAGCTAATC	AACATCAGAG	GCACTTCA	GTGGAGTADA	CAAGCCAGAG	7081
AGAAGATGTG	CTGATGGCAC	AATGAATACA	TTAAGTGA	TCCACCTTGT	AGATTTCATC	7141
ATTCTGCTG	TGAGTAACCT	TCAATACTAT	AATTATG	GATAATTAT	AAATGTTGTC	7201
TATACAAATA	TATAAGTAT	ACTTATCCAC	ACAAGTACTT	TCAAAGTGA	GATAAAAGTCT	7261
GGATGTTACT	AGATCAAAAC	TGCATTTTT	TATTATAGA	TGTAGCAAGA	GAGGAAACAC	7321
AAAGGAGGTA	AAGCTGCCG	TTCAGGTGGT	TTTCTTCACA	GATTGACTGT	TCTACCAATT	7381
GTTGTGGACT	TTGGGCACCA	AATTAAATAGG	ATATATGTT	GCAGTGTCT	ATGTTATATA	7441
GATTCACTTT	ATTTAGTAGG	CTTATTGAA	CTGCCATGTG	CCAGTAACTA	TGTTAGATGT	7501
TTAGATGGCA	GATGTGTCTC	TAGACAGAGC	TTACAGTTGA	GAGTATGGGT	TGTGTGGGA	7561
GAAGTGAATA	GATGACTATA	TTCCATGATA	CATGCTGTAT	TACAATACAG	TCCTACTTCA	7621
CTTAACGATG	GGGATACATT	CTCAGAAATG	AGTTAGGAGG	CAAATTGGTT	GTTGAATGAA	7681
CATCACAGAG	AGCACTTACA	CAAACCTAGA	TGGCATAGCC	ACACCTAGGC	TATATGGTAT	7741
AATCTATTGC	TCCTAGGCTA	CAAACCTGTG	CAGCATGTTG	GTATTGAATA	CTACAGGCAA	7801
TTGTTACATA	AAGTTAAGT	TTTGTGTACC	AAAAAATAGA	AAAGGTAATG	CATTACACTA	7861
CAGCTTATG	GGGCTGGGAT	GTCACTAGGT	GATAGGAATT	TTTCAGCTCT	GTTCTAATCT	7921
TACGGGACCA	CCATCATGTA	TGCAGCACAT	GACTAATGT	AATTACAAGA	TGGTGGCTAT	7981
ATTAACACAGA	ACTACTTAA	CTAGCCATGG	AGGTATGGTC	CGTGAGATTT	TCCTGAAGAA	8041
TTAACGTCTG	GATCAATTCT	GGAAGGGCCA	GCAGGAGTAC	TCCAGGCCAA	GGGGTGAGAA	8101
AGGAGCTTCC	AAGTAGAGTG	AAGGTATGT	GCAAAGACTC	AGTGAGGAGT	CGAGTGAACAA	8161
TAGCACAGGG	AGGACATGTT	GGTGAGGAAG	GAGGGGTGAA	GCCACAGAGA	CAGGAGGGAG	8221
CCAGATGACA	GAAGGCCCTG	CAGGCGGTGC	TAAGGAGTT	GGATTTTATC	CTTACAGTGG	8281
TGGGAAGTCA	TTGTAAAAAT	ATTAAGCAAG	GGAGTGGCAT	AAACAATT	CATTTCAAA	8341
AGATCACTT	GGCAGCAGAT	AGAGTATATA	TGTAAAAGGA	GTAAGAAAGA	GGTAAGTTAG	8401
AAAGCAAGAA	ATGATCAGGG	TATGCCCTAA	AAACACTGGCA	ATAGGGAAA	AGAGATGTCA	8461
ATCAGAAAGA	TTGAGAAAGT	ATAATTGAAT	TGACTTGGT	AACAAATAGA	AGTAAGGCAT	8521
AAGGGACAGG	TAGAAATATG	AGATGACTTC	CAAGTTCTG	TTTAAAGATA	CCCTTTATTG	8581
AGAGAGGATG	TATAGAAGCT	GTCTTAGGGG	GAAGACAAGA	AATTGGTTT	AGGCCATGTC	8641
AACAGGTAAT	GGCCAGTAGG	CACATGATT	AGTTTATT	GTGGGCTCCT	TTTAGGAGAA	8701
AATCTGAGCC	AGATTCCAGG	AAGTCACAGC	AGGGACTACC	AATAGGGTCA	AACAGCAGAG	8761
AGTGTGGAAA	GGACTGAAAAA	GTGATCATTG	TACATAACAA	ATAGAAGCTC	ACTGATTTC	8821
TAGCAAAAC	ATCTTCAGCA	GAGTAGCGTG	GTATAAGCTA	TATTGTAGGG	GACTGAGGAA	8881
GAAATGGGCT	CTGAGAAGTA	AAGACAAACA	ATATGTTT	TAATAAAATT	TCTTTAGTT	8941
CTTAAAAAA	AAGCCTCTT	TCCAGCTGA	TTGGGAAGT	AAGAGAGGGA	TTTGAAAGTT	9001
GGAGATTGGA	GGATAGGATG	AGTACATCAA	GATACACTAC	GTTGTAGTGC	AGTGCATTAC	9061
AAATGTGAGC	TAAAAGTGAA	GGCATTGTA	ATCATATGAT	ATTGCTAATT	AAAAGACAGC	9121
TGTCACTCAT	ATGCCCACT	CCTGGTAAAG	CATGATGAGA	AGAGTACAAT	CATGGTAGTG	9181
ATTAAAAAT	TGCTGCCAGT	TTTGTGGATT	TTCTTATGC	TAGACAGTGT	AAGCTCTTA	9241
TCAATATTAT	TTAACTCACA	CAACTCTAAG	AGGTAGATAT	TATTATCCCT	TTTGACAAA	9301
TTAGGAAACA	GAATTATAAT	GACTGAGAA	GTCTCTGCTG	AGTAAATGTT	ACTGAACCTT	9361
AATTATGTT	TTACTTAATG	ATAGAAATGA	ATATTGGGCT	TCAAGACTAT	TTGTACTTAA	9421
TGAAATCTGT	CTTGAGCAAC	ATAAGCTATT	TTTTCAAAA	TTTTAAGACA	AAAATCACTT	9481
TCTTCTCTCC	TGTCTTCTTA	TTTTGTTCC	CTTCACATGT	TGTAGCCTAA	CACTACTTGA	9541

TGGCCCATT	TGGTGCAGTT	TGTCCACTGG	GCTTCATCTA	AGGCCACCAA	GTCCCATAAT	9601
TAACATGATC	ATTCGTGGGA	GAAAGATCAA	GCCTCATTGG	TGATGGGTGC	CTCCTCACAG	9661
TCGGATAATA	CTGAAAAGAG	AGCTAAATGT	GGGAAAGAAC	CAAGTTGAAC	ACAGGAAAGA	9721
ATCAGGCCAC	TGTAAAATA	AGCATTGTGT	TTTCTTGTTC	CTTGAAAGTC	TTCATTNTTA	9781
AAAAATTCA	GACACCTGAA	GTTCCTAGC	CTTACTCTGA	GTGACGCAC	ATTAGTACA	9841
TGATCAACAC	ATAAACAAAGC	ATTAGAGAAA	TAGAAAAGCT	GTAAGAATAC	AAAAATATGG	9901
GCCAGGTGGG	TGGCTCATAC	CTGTAATCCT	AGCACTTTGG	GAGGCCGAGG	CAGACGGATC	9961
ACCTGAGGTC	AGGAGTCAA	GACTAGCCTG	GCCAATATAG	TGAAACCCCTG	TCTCTACTAA	10021
AAATACAAAA	CTTAGCAGGC	TGTGGTGGCA	CGTGCCTATA	ATCCCAGCTA	CTTGGGAGGC	10081
TGAGGCAGGA	GAATCTCTG	AACCCGGGAG	GCGGAGATTG	CAGTGAGCCA	AGATCACACC	10141
ACTGCACTCT	AGCCTAGATA	ACAGAGCAAG	ACTCCATCTC	AAAAAAA	AAAATACAAA	10201
AATATGAACC	ACTGAAAATT	AAAAGACAT	GCATGCATTC	TAGGTCTTTA	ATTTTTTTTC	10261
TTAATAATT	TTTTCTCTC	TGGATAGCAG	CACCTAGTTT	AGGAAGCAAG	ATTTTAGCTG	10321
GTCTAACGAC	TGGAGGAGTG	GCAGTATTCA	TTGGGCAACC	CACAGAGGTC	GTGAAAGTCA	10381
GACTTCAAGC	ACAGAGCCAT	CTCCACGGAA	TCAAACCTCG	CTACACGGGG	ACTTATAATG	10441
CGTACAGAAT	AATAGCAACA	ACCGAAGGCT	TGACGGGTCT	TTGGAAAGGT	AACTAACTTC	10501
AAAATGGTT	TTATAACCAC	CAAAGCACAT	ACATACAAC	AGCAACTTAT	TGTAAAGTAG	10561
AGTTAATAAA	CATTTCTTT	TTTTTTTCC	CCAGGGACTA	CTCCCAATCT	GATGAGAAGT	10621
GTCATCATCA	ATTGTACAGA	GCTAGTAACA	TATGATCTAA	TGAAGGAGGC	CTTTGTGAAA	10681
AAACAACATAT	TAGCAGGTAA	CTTCCCATTT	CATATAACAA	ACAGGTCTGC	ACCTTTAGAA	10741
GTTCATCTG	GAGCTCTGC	AGCCACCTTA	TACTCAATCT	CTTAACTCCA	ATAGTTTCT	10801
CTTTTAAAAA	ATTAAGTAAT	TTTGAACCAT	ATATAACTTT	GTGAGAAGCA	GGAAAAGACC	10861
AAAATATTAA	GTTTAAGAAG	TTTGCCACA	ACAAAAATAT	TTGCAACAA	AAATAACAGG	10921
CAATTTCATG	TCAGCATTAT	TCTCATTTAA	TACTAATATA	TGGGACTTTT	GTTAGAATCT	10981
TATTCTTTAT	ACAGCAGAAT	TCAGGAGGTA	AGTCCATCCT	GCATACTATA	TCCAAAAGAT	11041
CTAGTTATAA	AAGGAGCTTA	TCAGTGGTCT	CATCCAAAAA	GTAATACCAT	AAGATAGGTT	11101
CTTAAAATA	ATATTCTAAC	AACTCTAGA	GACATTGAAA	TTTCCCTAT	TTCAATAAAA	11161
AAGTATTAGA	TGCTCATATA	TTAGGCATTA	TTACAGGCCT	TAAAGGCACA	GAGGAAACTA	11221
ACAGTTTACT	TTCCTAAAGT	GTTAACAAATC	TATTAAGCCA	TTTACTCTTT	ACCTTCTTTT	11281
TCTAGTGCAA	TACCTTCTT	ATTTTATTTT	ATTTATTTAT	AAGACATCTT	CATTGACCTA	11341
CTGTTATCAA	TAGGTTTATA	AAGATATGAC	AGATAACTAA	ATTGCAAGCC	CCCAAAAGTC	11401
TGATGTTGAC	CTGTTTCATC	GATCCATTTC	AGATGACGTC	CCCTGCCACT	TGGTGTCCGC	11461
TCTTATCGCT	GGATTTGCG	CAACAGCTAT	GTCCTCCCCG	GTGGATGTAG	AAAAACCAG	11521
ATTTATTAAT	TCTCCACCAAG	GACAGTACAA	AAGTGTGCC	AACTGTGCAA	TGAAAGTGT	11581
CACTAACGAA	GGACCAACGG	CTTCTTCAA	GGGGTAAGAT	ATGATCTTGT	GTATCTGAA	11641
TGTGTTCTGG	CTGTCTGTGT	GCTTGGGAC	ACTCTCATGT	CAAGCAACCG	ACATTAGCT	11701
TACAAGCCTT	AGTATATTCA	TATACTTAGT	ATTGACTTTT	CCTGCCACA	GATTCTCCA	11761
ATCCACCAAT	TCCACTGTGC	CAGAAAGTAA	AAAGCCATGA	TATTCAAATT	TTCTCAACTT	11821
TGATCAAAGG	CTCATTCAAG	ACCAGTGCCT	TTTCCACTGG	TCCAATCTA	CTGGAAATGC	11881
AGACAGTATT	TTGCCTTCTC	TGGCAAGAA	AGTTATAAAG	TAGAGGGAAA	TCATAATAGA	11941
GAGCTATGAG	AGAACAAAGAT	TTGATTTGAT	TTAATTGAT	GGACTCAAGT	TTAACACATTG	12001
TAAAACCTAGA	GATAAGACAT	CACCAACAA	CTAGAAAAGT	GATGCAGAAA	AGTATTGTAT	12061
TTGGGTAATT	ATTACACTCA	CCTAGAAACA	AGTGTGTGT	AATAGATTAC	ATATTCCTAT	12121
AATGCAATGT	TGTATCAGAA	ACTACCTTCC	TAAGAAAATA	TAGTATGGGC	TCGGCGTGGT	12181
GGCTCGCACC	TGTAATCCA	GCACCTTGGG	AGATGGAGGC	AGGAGGATCA	CTTGAGCCCA	12241
GACTGGGCAA	CAAAGCGAGA	CCCTGTCTCA	ACAAAAAATT	TAAAATTAG	CTGAGTGTGG	12301
TGGCACGCAC	TGATGGTCCC	CTCTACTTGG	GAAGCTGAGG	CAAGAGGATC	TCCTGAGCCC	12361
AGGAGTCAA	GGTTTCAGCG	AGCTATGATT	GTGCCACTGC	ACTCCAGCCT	GGGAGACAGA	12421
GCAAGTCCCT	GTCTCAAAAAA	AGAAGAAGGA	GAAGGAGGAG	AAAATACAGT	ATTAAGTAAT	12481
CTGTCATAT	ATTCCACAAAG	GATTACACTA	GTGGTTAAT	AATAAAATT	TATTACCTT	12541
TTAAATTGTA	AGGCCATTCC	TCAAGCTTTA	TAATTAAGC	ATGAATGCAT	CATACACATT	12601
TTATAAAAAG	TTCCAACCTCA	TCATAATCTG	TACTTATGAT	ACATTAATAC	AAATGAAGTT	12661
CATTATAAAA	TTAACTTAAA	ATGGATATAC	CAGTTATTAA	ACCATTAACC	ATTAAATAAT	12721
TTTATTTTTT	TCAAATTAA	AAACCTTTG	GGGAAGAAAT	ACTACAACAT	GGATGAACCT	12781
TGAAAACGTT	ATGCTAAGTG	AAATAAGCCA	GACACAAAAG	GACAAATACT	GTATGATTAC	12841
ACTAAATGA	GGTACCTAGA	GTAGTCAAAT	TCATAGAGAC	AGAAAGAATA	GAAGTTACCA	12901
GGGGCTGGAG	GTAGGAAAAAA	ATGGAGAGCT	GTTTAATGGG	TAGAGAGTTT	CTTTTGGGG	12961
TGACAAAAAG	GTTCTAGAGA	TGGATAGTGG	TGATGGTTAC	ACACAATGTG	TGTGTACTTA	13021

ATGCTACTGA	AATGTAATT	TATGATTTT	TTTTTTGCA	GCAAAATACC	CCACATTGGG	13081
AAGTGAAGAG	AAACATGTTA	AGAGACTTGA	AGGAAAAAAA	TTGGGGCAGA	GGGGTGT	13141
TTATAGGTTA	AACAATAAAA	GCCATTAA	CAGTAACAAT	TTCTCTAAGG	ACAAGAATCG	13201
TCAAGATTGA	GACAGCACTG	ATTCTTGAC	TCTACTCAAT	ACTTCTTGG	TTTCTCTTCT	13261
TCCTTCCCCC	TTCTAATAGT	TTCTTACCTC	CCATTCAAGAA	AGCAAAGCAA	AACAAGCAA	13321
AATTCCCCCT	TCCCCTCAAAA	AAGGAAAGAG	TTTTGAAAAA	AGTTCATGTC	AGTGAAGAAA	13381
AGACATGTTT	TGGGAGTGAA	GGATATTGT	GGATTTGTAT	AGATGTGATC	ATCAGGGCTG	13441
TGTTGTTTG	AAGTAATATA	GGACATCTAG	AGGAAAATT	ATTTTCAGCA	GAGGAGGGAA	13501
AGATGAAGAG	TAGGTACTTT	TAAGCATCTT	CACTTGAGGA	GTGGCAAAAT	GAGAACATA	13561
ACCTGCTATA	ATCACTTAA	GAATTTCAGG	CTGAGTGTGG	TGGTGCAGTC	TCTAGTCCC	13621
GTTACTCCAG	GAGGCTCAGG	TGGGAGGATC	ACTTAAGCCC	AGGAGCTCGA	GGTTGCAGTG	13681
AGCTATGATT	ACACTACTGC	ATTCAGCCT	GGGCAGCAGG	GTGAAGCCTC	ATCTCAAAA	13741
TTAAAAAAA	AAAAAATCAA	ACAAATTAAT	CGAACGATGA	CATGCAC	TCTAGGTTGG	13801
TACCTTCCTT	CTTGCAGCTT	GGATCCTGGA	ACGTCAATT	GTGTTGTGTG	TTTGAACAAAC	13861
TGAAACGAGA	ACTGTCAAAG	TCAAGGCAGA	CTATGGACTG	TGCCACATAA	TCAGCTCAA	13921
GAAAATGATG	TAACATACCA	GTGGAATCT	TGCTGACTGG	ATCATAAAA	CAAACAAAAC	13981
TTATTCACTT	ATTTAACCT	AAAAAGATAA	AGGAATT	GCAGAGAATT	TTGGACTTT	14041
TTATATAAAA	AAGAGGAAA	TTAATGCCTA	TTTCATATAA	CTTTTTTTT	TTCTCAGTGT	14101
CTTAAGAAGG	GGAAAGCAAA	ACATTCA	TATACCTG	CAAATGTAAT	GCAGATAAGC	14161
TACTGCATT	GACCATTCT	GGAGTGCAAT	TGTGTGAATG	AATGTGAAGA	ACTTTAACAT	14221
GTTTAATTA	CAATTCAAC	TGGTGGAAA	GAAACTGAGT	GAAATGCAGT	TTATATT	14281
AAATACTTAA	AAATGAAGTT	ATTAATAA	TTAGTTTTA	TTAACACAG	TTGTCAGTTA	14341
ATATATTCAA	TAAAGTATTG	CTAATACCTT	TTAAAGTTG	TCTTTGAGA	TCTATACCTG	14401
GGTGTAAAGAG	TCAAGTCAC	TAGAACAA	GACTGCCAA	TAGCAAATGC	AGGTCTTAG	14461
AATCATAGGC	ATGAACCTAC	TCTGAATGTT	ATTAGTATAG	ATTTTAATG	TTTAGAGTCC	14521
AGATTGATG	ACATCTCAA	CAACTCTAA	TCTAACACAC	TATATTCA	TTGGCAGGAT	14581
TGCTACTAGA	GTCTTGGTAT	CTGTGCTAGC	ATCACATAA	TTTAGAGCTG	GAGGGTACTT	14641
CTGGGAAGAC	AGAGGAACAG	TTTGAGATT	CTACTGAGAT	GAAACGAAT	CTTCATGGAA	14701
TCTTCAGCA	AAGCCAATT	CAAATTCA	ATTAGCACCT	GTAGTAACCT	TTTCAATGCC	14761
TACAAACTGC	ATGCAGAAGA	GATAAGGAAA	CAGTAAACAA	GATATTAAA	GAAGTTTTA	14821
AGACAAAGCC	CAGCCTGATT	TTAAGCTAA	TCCAAGGATT	GGCAGCTTG	ATGAGCAGGA	14881
AGGTTACAGG	CTGCCAGACA	TCATTCTAGT	TCTGTTTAA	TCAACTCCAT	GTTACATT	14941
CTATCAGGG	TTCTCACCTC	ACCCCTCATGC	ATGCTCTCCC	CATTCAATTAC	CCGCAAAAGT	15001
GTCTGTAGC	AGATGTCTTC	TGTGTCCC	ACATACCATT	TTGCTCTT	GTGCTTGCTG	15061
GCCTGACTTC	CTATTGTCA	GTCAGCATCT	GCCCTTTT	GGGTCTCTGG	CCACCAGAGC	15121
CAGCTTACT	CACCTGTGCA	TGGCATTCTA	GAAGAGCAGC	AGGGAAAATA	ACACAGCCCC	15181
AGTGCAGCCC	TTAACCCACCA	ATAACTGGT	GTAGTTGGT	TACAAATATC	TCAGTTCC	15241
CAACTGTCAG	GTGGAATACC	GCTGAGGGAT	CAAACCTCTAG	TAACACACAG	TAGTGT	15301
CTTACTATGG	TTAACTAAAA	AATCACAGGG	TCTTCATGCA	TTTGGAAAGG	ATACTTTATT	15361
TCTTACAAAG	GGTTACAGCC	TACAAGGTGG	TCATTCTGCA	GGCTAGAAAG	CGTAACCTCC	15421
AGCAAAGACC	GGAGGCAGGC	ACTCTAGGG	AAGGAAGAGT	AAGACAGAAA	TTTAAATTGA	15481
ATGGGTTGGC	CAAGTATACA	TATTCAACAG	GCTACAGGTG	GATTCA	TATTCA	15541
GGCAGTCCTG	ATGCATGCAT	GTTACACCTT	GGGGTGGAGG	CTTAACATTT	AAATGTATTA	15601
CAGTTAGGCC	CTATACATGA	AAAGGTGAAG	CAGTAACACG	AAGGCACACA	ATGCAC	15661
TCTGTAAACA	GGCCAGAGCC	AGTTCACAGT	GGTTGGTCTC	TTATCATGAG	AAAGCTACTA	15721
AAATCCTCTT	GTCCAGTTAA	AACTGTAGTT	ATGGCTGGT	GAAAATGGGC	TGGAGTCAGT	15781
CAACACTTGG	TGAAGCTGCA	GTTGCTTCAG	ACACTCAAGG	CCAGTGT	TTTAGCTGCT	15841
CGAGAAAAAG	AAAAATCTTG	TGGCAGTTAG	AACATAGTT	ATTCTTAAG	TGTAGGAGTG	15901
TGTGACTTAA	//					

## 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0282

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0282】

(表28)ヒトUCP2遺伝子の2,113塩基対(bp) 転写物ENST00000310473の核酸配列(8つのエキソンは大文字で表示)

番号	エキソン/ インtron	起点	終点	長さ	配列	SEQ ID NO
	5' 上流配列				.....aatcgacagcgaggccggtcgcag gccccagtcggccctgcaggagcc	638
1	ENSE0000228 7650	73,694,352	73,693,766	587	AGCCCGCGCGCTCGCTCGCAG GAGGGTGGGTAGTTGCCA GCGTAGGGGGCTGGGCCA TAAAAGAGGAAGTCACCTA AGACACGGCCCCGCTGGACG CTGTTAGAACCGTCCTGGC TGGGAAGGCAAGAGGTGTGT GACTGGACAAGACTTGTTC TGGCGGTCACTTGCATCC TCACAGAGGTGGCGGGCCG AGAGAGTGTGAGGCAGAGGC GGGGAGTGGCAAGGGAGTG ACCATCTGGGAAACGAAGG AGTAACACGCGGTGATGGGAC GCACGGAAACGGGAGTGGA GAAAGTCATGGAGAGAACCC TAGGCAGGGCGGTCCCCGCG GAAAGGCGGCTGCTCCAGGG T CTCCGCACCCAAGTAGGAGC TGGCAGGCCGGCCCCGCC CGCAGGCCACCCGGGCC CCGCCCCGAGGCTTAAGCC GCGCCGCCGCTGCGGGAG CCCCACTGCGAAGCCCAGCT GCGCGCCTGGGATTGAC TGTCCACGCTCGCCGGCTC GTCCGACGCGCCCTCCGCCA GCCGACAGACACAGCCGCAC GCACTGCCGTGTTCTCCCTGC GGCTCG	639
	インtron 1-2	73,693,765	73,692,678	1,088	gtgagccctggccccagccctgegcc..... actctctgccttgcacccacag	640 641
2	ENSE0000118 4362	73,692,677	73,692,521	157	GACACATAGTATGACCATTA GGTGTTCGTCCTCCACCCAT TTTCTATGGAAAACCAAGGG GATCGGGCCATGATAGCCAC TGGCAGCTTGAAGAACGGG ACACCTTAGAGAGAGCTTGA TCTGGAGGCCTCACCGTGA GACCTTACAAAGCCGG	642
	インtron 2-3	73,692,520	73,689,523	2,998	gtaagagtccagttcaaggaagg..... tggggctttctctttggcttag	643 644
3	ENSE0000118 4370	73,689,522	73,689,298	225	ATTCCGGCAGAGTTCCTCTAT CTCGTCTTGTGCTGATTAAA GGTGCCCTGTCTCCAGTTT TCTCCATCTCCTGGGACGTAG CAGGAAATCAGCATCATGGT TGGGTTCAAGGCCACAGATG	645

					TGCCCCCTACTGCCACTGTGA AGTTCTTGGGGCTGGCACA GCTGCCTGCATCGCAGATCT CATCACCTTCCTCTGGATAC TGCTAAAGTCCGGITACAG	
	イントロン 3-4	73,689,297	73,689,142	156	gtgagggatgaagccctggagtc..... tagctaccctgtctggccctgcag	646 647
4	ENSE0000125 2503	73,689,141	73,688,931	211	ATCCAAGGAGAAAAGTCAGGG GCCAGTGCAGCCTACAGCCA GCGCCCAGTACCGCGGTGTG ATGGGCACCATTCTGACCAT GGTGCCTACTGAGGGCCCC GAAGCCTCTACAATGGGCTG GTTGCCGGCCTGCAGCGCCA AATGAGCTTGCCTCTGTCCG CATCGGCCTGTATGATTCTGT CAAACAGTCTACACCAAGG GCTCTGAGC	648
	イントロン 4-5	73,688,930	73,688,063	868	gtgagtgatggaggcaagggtgttagc..... caactgacccatggctcgccccacag	649 650
5	ENSE0000118 4355	73,688,062	73,687,868	195	ATGCCAGCATTGGGAGCCGC CTCCTAGCAGGCAGCACAC AGGTGCCCTGGCTGTGGCTG TGGCCCAGCCCACGGATGTG GTAAAGGTCCGATTCCAAGC TCAGGCCCGGGCTGGAGGTG GTCGGAGATACCAAAGCACC GTCAATGCCTACAAGACCAT TGCCCGAGAGGAAGGGTTCC GGGGCCTCTGGAAAG	651
	イントロン 5-6	73,687,867	73,687,788	80	gtgttaccatgtttcccttcc..... accaggatcttctctctcacag	652 653
6	ENSE0000336 1285	73,687,787	73,687,686	102	GGACCTCTCCCAATGTTGCTC GTAATGCCATTGTCAACTGT GCTGAGCTGGTGACCTATGA CCTCATCAAGGATGCCCTCCT GAAAGCCAACCTCATGACAG	654
	イントロン 6-7	73,687,685	73,686,717	969	gtgagtcatgaggtagacggtgctg..... tgcctgcctgctcccttggcag	655 656
7	ENSE0000118 4349	73,686,716	73,686,536	181	ATGACCTCCCTTGCCACTTCA CTTCTGCCTTGGGGCAGGCT TCTGCACCACTGTCATCGCCT CCCCTGTAGACGTGGTCAAG ACGAGATAACATGAACCTCTGC CCTGGGCCAGTACAGTAGCG CTGGCCACTGTGCCCTTACCA TGCTCCAGAAGGGAGGGCCC CGAGCCITCTACAAAGG	657
	イントロン 7-8	73,686,535	73,686,167	369	gtgagctctggtcctcccccaccca..... atgacctgtgattttctctcttag	658 659
8	ENSE0000118 4368	73,686,166	73,685,712	455	GTTCATGCCCTCCTTCTCCG CTTGGGTTCCCTGGAACGTGG	660

					TGATGTTCGTCACCTATGAGC AGCTGAAACGAGGCCCTCATG GCTGCCTGCACTCCCGAGA GGCTCCCTCTGAGCCTCTCC TGCTGCTGACCTGATCACCTC TGGCTTGTCTCTAGCCGGC CATGCTTCCCTTCTTCCTTC TTCTCTTCCCTCTTCCTTC TCTCCTCCCTCTTCCTTC CTCTCCTCCGCTCCTTAC CTACCACCTCCCTCTTCTA CATTCTCATCTACTCATTGTC TCAGTGCTGGTGGAGTTGAC ATTTGACAGTGTGGGAGGCC TCGTACCAGCCAGGATCCA AGCGTCCCCTCCCTGGAAA GTTCAGCCAGAATCTCGTCC TGCCCCCGACAGCCCAGCCT AGCCA CTTGTACATCCATAAAGCAAG CTCAACCTGGCGTC	
	3' 下流配列				tccctcccttcgttagcttaccagaggcttg gtccaatggcccttt.....	661

## 【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0283

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0283】

(表29) 5,000 bp 5'UTRおよび2,000 bp 3'UTRを含むヒトUCP2遺伝子 (ENSG00000175567) の15,174塩基対 (bp) の核酸配列、(8箇所のエキソンは強調表示)

TCCAGCCTGGCAACAAGAGTGAACACTCGGTCTAAAAAAAAAAAAAGAGAAGA  
AGAAGAAAGAAAACTAGGTGGAGTGTGGTGGCTTGCACCTATAATCCCAGCACTTT  
GGGAGGCCGAGGTGGGTGGATCTATTGAGGCTAGGAGTTCAAGATCAACCTGCCAA  
CATGACGAAACCCACCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCACGGCGTGGTGTGT  
GTGCCTGTAATCCTAGCTACTTGGAAAGGCTGAGGCAGGAATCGCTTGAACCTGGGG  
GGCAGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCTTGCACACTGCACCTCCAGGCTGGCGACACA  
GCACAACCTATCTAAAAAGAAAAACAAAAGAAAACAAATATCAA  
AATAATTCTAGTTAGTGGATTCACTCACTTATTCAATGACTTATTGAATTAT  
CATATATTACTAGTGTCTTTAATACATACCTCTACAATTTCACACTGAAATTAC  
TTCATTGATCAGGGCTTTAAACTGATCTCCATTGCATTGTTACTAACTATAGT  
TATTATTATGTATTAGCACTCTGAGCCTACTGTAATGATGTGTACCTTAATAAAGA  
ACTGAATATTGTAATGGCTGGCAGTGAATTAGTAGTTCTGAATTAGAGCTCAA  
AATATGGGAGTAATTGCTGCTTATTCTTGGAGAGGTAATAGAGGAAAAACAGA  
ATCTAATAACAATCACAGATTTGGAAAGCACTGTAAAACCATATGATCAATTCT  
AGCTTCTTATGTAACATGGAAAGATTGCCAGCTGAACACACTGTCTGATGCTCTAAGAA  
GTTGGGGAGAATTGCATTAGAACTGTGAGCAGGAAATGAGAACGACTGCTATGTT  
CATGCTTGTGAATTAGCTTATTCACTTACACAATTGATGGAAAAATGCATCT  
TTAACCTGGTGTGTTCAATTCAACTTTAAAATACAGGAGTGGGCCAGACCCGGT  
GGCTCACACCTGTAATCTCATCACTTGGGAGGCCAGGTGGACCACAAGGT

CAAGAGATAGACACCATCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCATCTCCACTAAAAATA  
CAAAAATTAGCTGGCATGTTGGCACGTACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGACTG  
AGGCAGGAGAATCGCTGAACCTGGGAGATGGAGGTTACAGTAAGCCGAGATCGCG  
CCACTGCACTCCAGCCTGGCGACAGAGCAAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAACCAAGGATGTGTTACCAAGGAAAATTCATTTA  
CAATGGTTAATTATGTGACAAACATGTCAAGTAATTCCATCTGGCTTGTGTCACCA  
TTTCCCCACCCCTTTTCAGAAACCAAGAAGAAGAACAAACATCAAAATG  
GACATGGAAATTAACAAATATGATTCAATTAACTCTCTAAGAGGTTTTAAAAA  
TTATTTATTTGAGACGGAGTCTGCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGG  
ATCTCAGCTCACTGCAACCTCCATCTCCAGGTTCAAGCGATTCTCCTGCTCAGCCT  
CCCAAGTAGCTGGAACACAGGCAAGCACCACACCCAGCTAATGTTGTATTT  
TGGTAGAGATGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGATGGTCTCGATCTTGTACCTCAT  
GATCCACCCGCCTGGCCTCCAAAGTGCCTGGGATTACAGGTATTTTATTTTT  
GAGACAGGGTCACCCGTCAACCCAGGCTGGAGTGTAGTGGCACAATCATGGCTCAC  
TGCAGCCTCAACCTCCCAGGCTCAGGTGATCCTCATGTCAGCCTCCAAAGTAGCTG  
GAACATAGCGTGCAACACCATGCCAGCTAATTTGTATTTTGTAGAGACAG  
GGATTGCCATGTTGCCAGGCTGGTCTCAACTCCTGGCCTCAAGTGATCCACCCG  
TCTCAACCTCCAAACTGCTAGGATTACAGGTGTGAGCCACCGTGCCCCATCTCATC  
TGCTAAGTGGGTTAAAGAAATTCAAGTTCATGTCAATTAAATGTATGGTTATC  
AAATTGACTTCTTTAAATGCAATCAGATAACTGTATGCTTGTGAGGG  
GAGGAAAGTTAATATAGCCAATCTACTCAATATTAGCAGAAATTATCAGAGACT  
AAGGAAATGTTAAGTTTCTCATGTTGGTTAAATTACCTAATGTTTCAGTTCT  
CTTCATTCTGTCTTTTCATTTCAGTGTCAAATACAGTTGTATTTAAAG  
ATTAGAAGTCCAAAACTGTAAGCACAGTGGATTGTTCTGGATGATGTTAAA  
TTATACAACAAATATGAAACATTGTCAATTGGTTATTGGCACATACAAATAT  
TTACAAATAAACGTGTGTGTGCGTGTACACACAATTCAATGAAATAGATGTGA  
AACAAAGTTCTTTTTTGAGACAGAGCTTGCTCTGCTCTGCCCCAGGCTGGA  
GTCAATGTCGAGTCTCAGCTACTGCAACCTCTGCCCTCCGGGTTCAAGCGATT  
TCCTGCCCTAGCCTCCGAGTAGCTGGACTACAGGCACCTACCACACTCCCAGCT  
AATTTTGTTAGTAGAGACAGGGTTACCATGTTAGCCAGGCTAGTCTCCAA  
CTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCGCTCAGCCTCCAAAGTGCTGGATTGCAGGC  
GTGAGCCACCTCACCTGGCTACAAGTTCAAATACATTATCTGTACCCATACATT  
CTCCAGTTGTCCACAGGACATCTTATGACTTGAGCAAGCTGCTAAAATCCAAGGG  
TGCAGCGTTGTATGTCTAGGATTGCTCAGATCTGCCCCACCCCTGAAAGAATT  
AAGAGAATTCTTGAGGCCAGGCACAGTGGCTCACACCTGTAATTCCAGTACTGTGA  
GAGTCGAGGTAGAGGACTGCTTGAGGCCAGGAGTTCAAGAGCAGCCTGGACAAC  
ATAGGGAGACCTGTCACTACAAAGAATAAAATTAGCCAGGCTAGTGGCTCAT  
CCCTGTGGTCCCAGCTACTAGGGAGGCAGAAGTAGGACTGCTTGTCCCAGGAGGTC  
AAGACTGCAGTGAGCTGAGACCCAGCCACCTGCATTCCAGCCTGGCAACAAAAG  
AGACCCGTCTAAAAATAAGTTAAATAAAATAATAAAATAGTTAAACCC  
TAAACACATCTCTTTCAAAGAGGACTCTTAAGGACTTCATGCTGCGCCTGTG  
ATCTCCACTCCCTTTCAAGCGTCCACACTTTAACAGTCTCTTTGCCAAGGATAA  
TAAGTATATAGTTCTGGAATCCAGATTCTCCCTGTTGGACAGCCAGGGGACAA  
TTTTGGTCTGCAGGCCCTTGCATCTGTTCTGCTGTTGCTCAGCAATCTCACAGCAA  
TTGCCAGCCTCCGGAAATGCACAGCCAGACAGAGCTCAGCGAAAAGCTAGAG  
AACCTGGCGGAGGGAGACTCACAGTGCCACAAAAAACTTATCTTCTTTTT  
TTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCT  
TTCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCT

ATCTGCCTGACTTCTGTTCCACGCTGCTCTGCCAGGACCATGCGCTGGCGTGT  
TTCTTCGCTATAATTATCCAGGCCATCCCAGCTGGTCCCCCAGCTGTTCCC  
TGGCAGTCCCTCTGCTGGTAAAACACATATGGCGCCGCCCTGACCAGGGTGTAAAG  
TGTGTGAATATCAGGAAGATGACTGAACGTCTTGGACTCCGTTCTCATTGTAA  
AATGGAGGTTAACCAACAGCCTCTACTCCCCAAACGCACGTGTTGTCCCCGGCC  
AGAGGGCCAATTGGCTGTCACCGTCAGTTACCCCCACAGGACGGTCAGCC  
AATTAAAGCGAACCAACAGGCCGGCATCTCCTGACGCCTTCTCATCCCAGGGCT  
GGACAGGCAGCTGGCCTGGGCCGGCTTGCGCTGACGTGCGGGGCCGGCG  
TTGCTTGTCTGTGTAGGAGCGTAGGAGGTACGCTGGGTGCTCCGCCGGCG  
GCCTTAGTGTCTGGTCCCTAAACGCCAGGCCGCTCCACGGGGAGAAGGCG  
AACCCAGCCAGGCCAACGGCTGTTGCGGTTGCCGGGACCTGTTGCTGAGTT  
CTGATTGGTCCCTCCCCGACAACCGCGGCTGTAACCAATGACAGCGAGGCCG  
GTCGCAGGCCAGTCCGCCCTGCAGGAGCCAGCCGCGCTCGCTCGAGGAG  
GGTGGTAGTTGCCAGCGTAGGGGGCTGGGCCATAAAAGAGGAAGTGCAC  
AAGACACGGCCCCGCTGGACGCTTAGAAACCGCTGGCTGGGAAGGCAAGAGG  
TGTGTACTGGACAAGACTGTTCTGGCGGTAGTCTGCCATCCTCACAGAGGT  
GGCGGCCGAGAGAGTGTGAGGCAGAGGCCAGTGGCAAGGGAGTGACCATCT  
CGGGGAACGAAGGAGTAAACCGCGTGATGGGACGCACGAAACGGAGTGGAGAA  
AGTCATGGAGAGAACCCCTAGGCAGGGCGGTCCCCCGGAAAGGCGGCTGCTCCAGG  
GTCTCCGCACCCAAAGTAGGAGCTGGCAGGCCGGCCCGCCCTGCGCGAGGCC  
CGGGCCCCGCCCGAGGCTTAAGCCGCCGCGCCCTGCGCGAGGCCACTGCG  
AAGCCCAGCTGCCCGCCAGCCAGACACAGCCGACGCAGTCCGTGTTCTC  
CGACGCCCTCCGCCAGCCAGACACAGCCGACGCAGTCCGTGTTCTC  
CCTGCCGCTCGGTGAGCCTGGCCCAGCCCTGCCCTTGCGCCCCCACGCTTG  
TTCTGCCTGCGCTGCCGCTTCCATTACCTCTCCACCCAGTTGACTCT  
TTCTTCTCGGTTTATTGTTGTTGTTGTTGAGACAGGCTTCGCT  
GTCTCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCATCTCGCTCACTGCAGCCTCACCTCCC  
AGGTTCAAGCGATCCGCCTGCCAGTAGCTGGGATTACAGGCCGCCACACGC  
CTGGCTAATTTGTTGAGAGATGGGGTTGCCATGTTGCCAGGCTGGCCT  
CGAACTGCTGAGCTCAAGCAATCCGCCCTCGGCCTCACAAAGTCTAGAATT  
AGGCATGAGCCTCCGGTCCGGCTGTGCTAATCCTTCTGCTTGGTCTTATT  
CTCTCTCTCTTTCTTAGCCCTTGTGCTTCCCTCTCCGTTCACTGAGCCTG  
TTGAGCCTCACCTTCACTCCCTTCCACACGATGCCAGGCCCTGCC  
ATGGGGACCATCAGCGATGACCACAATGACCTCTCCCTACAGGAGCTCCAGGC  
AGTGTCCCTGCACCGCCTTCCCAGGGCTGGGGCTTTCTAGTGGGCTTGAGCT  
GCTCAATCTGGCCTCTGCAGGGCCGGCTCCAGCCCTCAACCTCTCACAGCCC  
ACCTGGGACCTAGCCAATTCCGGAGAGTCTCTGTCCCCTCGTACCCCTCACAAAC  
TCTCCACTCACAAAGTCTGATGACTGTCTAGGGGTGCTTATAGAGTACTGA  
GTGTTACAAAGCAGAAGTCTGGATGAGAACCAATTGATATTAGCAGGTGG  
GTGGGGTGGGGAGTGTACCTAGGTCATTCCGCCCTGCTTCCCTTCCAGTG  
TGTGCACTAACCAAGTCCCTGGGCCCTGTTCCCCATCCCCCTCAAGGCATGGATTG  
GGTGGGCTTGTGCTTGGGCCAGGTGGCCCTTCTAAACTCTGCTTGTAC  
CCACAGGACACATAGTATGACCAATTAGGTGTTCGTCTCCACCCATTCTAT  
GGAAAACCAAGGGATCGGGCCATGATAGCCACTGGCAGCTTGAAGAACGGG  
ACACCTTAGAGAACGCTGATCTGGAGGCCTCACCGTGAGACCTAACAGC  
CGGGTAAGAGTCCAGTCCAAGGAAGAGGTCTCTGCTGCTCCTAACCCCTGTGGT  
AGGGGCAGGAGTCAGCAGGGCATTAACAAAAATAATTACCATCCCCACCCCGACA  
GTGAAGTGGCTTTCCAGTTCACAGAGCACTCACACCTCCCCGCTCTATTCTGG

CCCTTCAGCTGACTCGGACAAGCCAAGGATCTTGGTCCCCATTATAAAGGAGAAA  
ACTGAGGCCACGTGAACAGTGATTGGCCCCAAGTCATCCCAGGAGCCAGCAGAA  
GAGCTAGGACAGGAACCTATTGTTCAACTCATATTGATGCTAGCTTGACTATCC  
CTGAAACCGAGATTGTAATCAGCCGGCTCTGAAACTGGTTATTGCTGGGACTG  
TAAAATAGGATTAACATTCTAGCCTGCATTAAATTGCTGTTAGTAGGGCCATCT  
TACCCACCCTCTGAAGGACCTGACTTGGCAAGCCAAGGCAACATTCAAATATGG  
CAGCTGAACCTCTGTGCACTTGTCTTGGCAGCAGCTGGCTTATTCTCTGGC  
CTTCACAACATCCTGCAACCCAGCTCAAGGTCAAGGAAATGTGACAGACTCATGTCATC  
ATATCTCTGATGCCAGAGAAGGGATACCATTGCCTGAGCCTCAGTACTGTT  
AACAGCCTGTGAGAACTTCCTGTGAAAGGCCCTGTCTGCGCTGGGCTGATAA  
AACAGCAAGAACGAACTGAGGAGCTGGCAGCAGTGCAGCAAAGCAAATACTACCAGC  
TTTGGTGCCGTGAAAGTGTGGCTCTACTCATCTCACATGAAATAAGGCAGCCACC  
TTGCAGGGCTGCTCTGAGGATTGAGCTAACAGTGCCTGGCGTTGGGTTGGGG  
AAAGTTGTGGAGCACCTCTGGGGAAAGGGGTGTCAGAGCAGGAAATCTGGGAG  
TCCGAGGGCACCTCATCAACCCAACTGTCAATTGAGCACCAGTCTCACTGAGCC  
TCGTGGCAAGCTGGAGGGAAACAGGAATAAGGTCAAGGCCCTGTTCTAGGTCCC  
AGTGTAGTTGCTATGGTGAGTATCTCATTCCCTGCTTGCCTGGGAGCTGGAGTG  
AGAAGCCCAAGAGGAAGCTGGTGAGCTGTTGTTCCATGGGCTCTGTGTTACA  
GCTGACTCCCTCACAGCCAGCCCTTCACCTGAGCCCCAGCAACAAAGGCAGTC  
GGCGGGCTCAAAGCAGCTGCTCAAATGAAGTCAAAGAAATAAGCTCAGGGAAAG  
AAGCAGGTCAACCTCCCCACTAGGGTCTGGCTCACTCCCTCTGGGAGTGG  
GGAGGGTGTGGTCCAACTCAGAACAAAATGGGCTTTGGTTACTTATCACTCT  
TCACAGCTCTGACCTGGACCCCTCATCCCTGCCTGTTGTTGTAAGTGCAG  
CCCCTAAGTGGAGGAAAGGAAACTGGCCAAACAAAAAGGAGAGCAGTTCT  
GCATCACATGGTAGGCCAGGAGGAGTCTAACAGTCCCTAGGTTTGGGTTGAAAC  
AAATCACCTAGCTAAATGTTACCTTATCTAACAGTCCCTAGGTTTGGGTTGAA  
TTTTTTTTTTGAGACAAGGTCTCACTCTCACCCAGACTGGAGCACAGTGGC  
AATCACAGCTCACTGCAGCCTCAACCTCTGGCTCAAGCAATCGTCCAAGTAGCT  
GGGACTATAGGCCTGCACCACCATGTCCAGCTAACATTATTTATTTAG  
ACAGGGTCTCATTATGTTGCCCTGGCTGGCTTGAACCTCTGGGTTCAAGCAG  
CCACCTCTGCCTCCAAAGTGCTAGGTTTTGTTGTTGTTGTTGAA  
AGAGTCTGCTCTGCGCTAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCAGTCTCAGCTACTG  
CCTCCACCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCTAACAGT  
ACAGGCAGTGTGCCAACACACCCAGCTCATTGTTGTTAGCGGAGATGGGTT  
TGCCATGTTGCCAACAGCTGGTCTCAAACCTCTGACCTCAGGTGATTGCC  
GCCTCCAAAGTGCTGGGTTACAGGCGTGAGCCACCACACCCAGGCCAAAG  
TTTCTGATCACCCACTCTCCTCTCCAAATGGCATTAGTGTCCCTCCTTGCA  
TTTGAGAGTATGTCCTGTAAGCCCCAAATGCAGCTGAATCATGCCC  
CCCTGTGCCAACAGTAAGCCTCTAGAGTAGATACTATCTCCTGCATCTCAGT  
AACCACTGCCAGCAAAGCAGTCTGCTAAACAAATGACTCTAGAGATCCTAAG  
GTGTGAGAGCTGGAGGAGAGAATTAGACTGATGGTCTGGGAAGGGATTGA  
CATCTTGACTTCTGACTTAAGTCCAGACCTGTAGCAACCATTCTGCTT  
AGACATCCAGAACATAAGCCTATGGGTCTGCGCTGGTCTTAGTCTGGT  
ACTTTCTACTTCTGTCAGCTCCAGATGAACCACAGAACAGCAGGA  
TCATCAGTGAAATCTCTGCATACAGCAGACAAAGGGCTGGCCAGTGG  
AGGCAGCGCTAGGAGAGCTGATCCAGACTCTCCCTGCAGTGAAAGGGAG  
CCTCATGAAGTATTGACTGCTTGAGCAGGAATTGCTTACCA  
GCCTCTCGAGCTCACATGGTTTCCCTCATGAGGCCACTGGAGTCTGAGGG

ACTTGGTTCTATTAGGGAAGGTGAGTTGGGATGGTGAGCAGGGAGGGCCTGGGG  
ACATTGTGGCTAATGGGGCTTTCTCCTCTGGCTAGATTCCGGCAGAGTCCTCT  
ATCTCGTCTTGTGCTGATTAAAGGTGCCCTGTCTCCAGTTTCTCCATCTC  
CTGGGACGTAGCAGGAAATCAGCATGGTGGGTTCAAGGCCACAGATGTG  
CCCCCTACTGCCACTGTGAAGTTCTGGCACAGCTGCCTGCATCGC  
AGATCTCATCACCTTCTGGATACTGCTAAAGTCCGGTACAGGTGAGGGG  
ATGAAGCCTGGGAGTCTTGATGGTGTCTACTCTGTTCCCTCCCCAAAGACACAGACC  
CCTCAAGGGCCAGTGTGGAGCATCGAGATGACTGGAGGTGGGAAGGGCAACATG  
CTTATCCCTGTAGCTACCCCTGTCTGGCCTGAGATCCAAGGAGAAAGTCAGGGG  
CCAGTGC CGC CTACAGCCAGCGCCAGTACCGCGGTGTGATGGGCACCATTCT  
GACCATGGTGC GTACTGAGGGCCCCGAAGCCTCTACAATGGGCTGGTCCG  
GCCTGCAGCGCCAAATGAGCTTGCCTGTCCGCATGGCCTGTATGATTCTG  
TCAAACAGTTCTACACCAAGGGCTCTGAGCGTGAGTATGGAGCAAGGGTAGG  
CCCCTGGCCCTTTTCTCAGTGATGATTGATCTTAGTCATTGCCATATAGTTT  
TTAGGCCACGATCCCTAGGAAGATCAGGGAACAGAGAACTGGAAGGGGCCCTG  
GTCCTCCACATAGTCTTAAGCACCTGGCTATACCAGGCTCTGAGCAGGGCGTCAT  
CCCACATCACAGTCTTCAACACACCCTGGAGTAGGTAGTATCATCCCAGTGTATAG  
AAGAAGAGACTGAGGTGGAACGGCAGTGGTAGAGTAGGGACTTGGCCAGGGCA  
CACAGTAGAGAGGCCAGAAAACACACAGTAGAGAGGCCAGGACACTCGTCTAAGGC  
CAGCGTTCTCCCTTCACCTCCTAGTATGCCATGCCAACCCCTCATTACACATG  
ACGAAACAGAGCCCCAGACAAAAGGTTGCTTCCCAGATCACATGGCAGGAAGAA  
GTAAAGCTGACCTGAGATCCCAAGTCTTAGGAATCCCAGTCCTCAGAAAGCCACTTC  
TCTCTGAGCCTTGGTTTACATTGTCAGATGGAAATGATTGTGATTCTCAGGGCT  
GTTGAGCAGGTAATGAAAATGTTTATGAAAGAAAGCACCAAGTTCATTTGGTC  
TTAGCCCTTGCTATGTCCTAGCAAGAAGTAGATATTCAAGGGATATTGTTGAT  
GTGAGGAGTTCTACAGCAAGAGCTGTAGAAGGCCAAAGCTCTGGATTCTATT  
CCAAAAGCAGGAGATGACAGTGACAGGGTTGGTGGAGAGATGAGGTAG  
AAAATGAGTGCAAGCCGCTGCCACTGACCCCAGGCTGCCACAGATGCCAGC  
ATTGGGAGCCGCCTCCTAGCAGGCAGCACACAGGTGCCCTGGCTGTGGCTGT  
GCCAGCCCACGGATGTGGTAAAGGTCCGATTCCAAGCTCAGGCCGGGCTG  
GAGGTGGTCGGAGATACCAAAGCACCGTCAATGCCATACAAGACCATTGCCGA  
GAGGAAGGGTTCCGGGCTCTGGAAAGGTGTGACAGTTGTTCCCTCCTACAGGGACC  
TCTCCAATGTTGCTCGTAATGCCATTGTCAACTGTGCTGAGCTGGTGACCTAT  
GACCTCATCAAGGATGCCCTCCTGAAAGCCAACCTCATGACAGGTGAGTCATGA  
GGTAGACGGTGCTGGTCTCACCCCTCCCCATGCCAGGAGCAGGTGCGGGGTCT  
AGCTGACACCAGAACGACCACATCTTCTATTGCCCTTGAGGGAGAGTAA  
GATATCTTACTTGCCATATTGAAGCCAATTGGGATGAAGCTCCACTTGCACATT  
GAGGAAGTGAGGCTAGATGGCAAAATGACTCTTCAGGTCTCAGAAGATGTCTCA  
GCTGGAGTCCCTGTCTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGAGATA  
GAGTCTCACTCTGTTACCGTGTAAATCTCAGCTACTGCAACCTCTCCTGGGTT  
CAAGCGATTCTGTGCCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGGATGACAGGTGTGCACCAGC  
ACACTGGCTAATTTGTATTTAGAGAGATGGAGTTCACCATGTTAGCCAGGCT  
GGTCTCGAACTCCTGGCCTCAAGTGTACTGCCACCTGGCCTCCAATGTGCTGGG  
ATTACAGGTGTGAGCCTCTGCGCCCCATCCTCTTGTGTTGTTGAGACAGGGTCTT  
GCTGGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGGATTAATGGCTATTGCAGCCTCGA  
CCTCCCTGACTCAAGCAATCCTCCACCTCAGCCTCTGAGTAGCTGGGCTGACTA  
CAGGCATGCACACTGTGCCTGGCTAATTTGTATTTGTAGAGACAGGGTTTGCC

ATGTTACCCAGTCTGGTCTGAACTCCTGGGCTCAAGTGATCCACCCACCTCGGCCT  
CCAAAAGAAGTCCTGGATTACAGGCATGAGACATTGTGCCAGCCTCTGTCTCTT  
TAAAATCATGAAAACCTCGTAGCTACTTAAGTAATTCTCCTGCCCTCTGGAATGATGG  
GTGAAGATCTTGACTGCCCTGCCCTGCCCTGGCAGATGACCTCCCTGCCAC  
**TTCACCTCTGCCCTTGGGGCAGGCTTCTGCACCACTGT**CATGCCCTCCCCCTGTA  
GACGTGGTCAAGACGAGATACTGAACCTGCCCTGGGCCAGTACAGTAGCGC  
**TGCCACTGTGCCCTTACCATGCTCCAGAAGGAGGGCCCCGAGCCTCTACA**  
AAGGGTGAGCCTGGTCTGCCCTCCCCACCCAGTCAGGCCTTGGCTATGCATGTCTA  
TTGTGGGTGGAGAGAACCACTGGAAGTGAGTAGCAGCCAAGTGTGACTATTCT  
GATCCTGGCCTGGCATTCAACCAGCATTCACCTATCCCCTTAATTCCCTCCCAG  
AATTGCTACCATCACTGTTATTAGGTGTTAAATGGAGACTCAAAGGAATTATGC  
TTATAGCCAAGCAGCTGTGAGCTCAGTCATTGAGTCCTCCAGCCTCTGGGAC  
AGAGCAACTGGGTGGATTGAATACCAGGCCAGTGAGGGAAAGTGGAGGTGGAG  
GTGCCCTGACCTGTGATTTCCTCTAGGTT**CATGCCCTCCTTCTCCGCTT**  
**GGGTTCCCTGGAACGTGGTGTGATGTTCTCACCTATGAGCAGCTGAAACGAGCCC**  
**TCATGGCTGCCTGCACTCCCGAGAGGCCCTCTGAGCCTCTGCTGCTGCTG**  
ACCTGATCACCTCTGGCTTGTCTAGCCGGCCATGCTTCCCTTCTCCT  
TCTTCTCTCCCTCTCCCTCTCCCTCTCCCTCTTCCCCACCTCTCCTTC  
CGCTCCTTACCTACCACTTCCCTTTCTACATTCTCATCTACTCATTGTCTC  
AGTGCTGGTGGAGTTGACATTGACAGTGTGGGAGGCCCTCGTACCAAGCAGGA  
TCCCAAGCGTCCCGTCCCTGGAAAGTCAGCCAGAACTTCAGCCAGAATCTCGTCTGCCCG  
ACAGCCCAGCCTAGCCCACTTGT**CATCCATAAAGCAAGCTCAACCTGGCGTCT**  
CCTCCCTCTTGTAGCTCTTACCAAGAGGTCTGGTCCAATGGCCTTTGGTACCTG  
GTGGCAGGGAGGAACCACCTGACTTTGAAAATGGGTGTGATCCACCTCCACCTC  
CAGCATCCAATCTGAAGCCCCTGTAGGT**CATCTGGTCCATTCTCTAGACCCAGG**  
CCCTGTACTAACATGGGAGTGCAGGAGCCACCTGAGAGACAGCAGTGCCTCCCT  
TCCCTGCCCCACTTGAGCTTACTCAGAACATGGTACTCTAGTGCCTGCCATC  
CCAACCCCCCAGCCAGCCAGGCCCTGTTATCTGCACAACAAGAGTGCTCTGTG  
TGCCCTGCATCTCCTGCAGTCCAGAGGAACATGAGACTCTAGATGCTGTTGACTT  
TATTTATTCCATTAAATGGAAGGAAGAACCCACCTCCCCAAAGTCCCAGACC  
TTGTGAGAACAAAGTCAGTCAGCCTCTCCACCCCTCACAGCCACAGCCACACCCAC  
AGAGGAAATGTTACTGAACACTGGTGGAGCAGGCCCTGACTCCACAGAGGGTGGTG  
GAGGCTGCAGGGCAAACATCTGGTCTCTGCCAGGATACTTCCATTGTGTTTTT  
GTTGTTTGAGACAGAGTCTCACTGCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCAA  
TCTTGGCTCACTGCAACCTCTCCAGGTTCAGGCAGTCTGCCCTCAGCCTCCAA  
GTAGCTGGATTACAGGCATACACCACATACCTGGCTAATTGGTTGTTGGTAG  
AAACGGGTTTGCATGTTGGCAGGCTGGTCTCAAACCTCTGACCTCAAGTGATC  
CACCTACCTCAGCCTCCAAAGTGTGGATTACAGGCATGCCACTGTGCCCTGGC  
CAGGATATTCCATTGGAGTCTCACCAACACCAACCCCCCTCCACCTGCCCTGCC  
CAGCTAGGCATCCAAGGAGGCCAGAAGAACCCAGGCCCTGGCTGCACAGGGTCT  
CCGCTCTCTGTCCCTGTTCTATCACCTGCACTCAGAGGCAGGTGGCAGGGTAC  
TACAATTCAAGGAGTGGAGACTGTGAGGTCTGGAATCCAAGGCATCTCCTGTAG  
GGCTGGGCCCTAGAATTATGTCACTCAGACCCAGTTGTAGGTGTCTGAAGAAACT  
GAGGCCTGACACAGGTGATGCAGGCAAGAACACCCAGAAAGTCCACTACTGAACGT  
GGACCGGGACCCAGTCCTCCCTGGACTCCCCCAGAGAACCCAGTGCTGGGG  
TCCTGGGAAGCCTGTTGGCAGCTGTGGAGCTAGGCCCTGAGAACACGACCACC  
CTCCCTCTCCCTCAGCCTCAAGCCACTGCTGCTCGCCGCCTCGTAA  
GCCCAATGGTCAGAGCTGGAGGCTAGACCCCTCAGTGCTGGTTGAGGCCAGGG

TGTTAGATTGGTTTGAGAAGGAACGAGGGCCCAGGATTCTCAGCTTCTTAGTT  
TTGACAAATTGAGCTGAGGCCCATAGTCCTCGGGAGGGACAGGGTGAGTGCCA  
TAAGTCGGCAAACCAGGGTAAAGGTGACAGGCAGCTCAGCCAGGCTGCAGGGGTG  
GCATATACAGAGGACCTGGCCACTACTTATGTACCTTACACTAATTCTGTGAG  
GCAGGCTGTTGTTAGCTCTGCTCTGGACGGGAAGAAGTAGGGCAGTTGGTAGGT  
GTGTCAAAGCTAACAGGCTGGGTGGGCATGAGCAAGTCAGCTGGTCATTCA  
CAGCCTTAATAGACACGAGGCTACCCAACTTCACTGTGGTCTGGGTGTGGCCTAG  
GACAATGAGCTGGAACAGTAGGAAACCACTGGAAAACATACCAAGTGGTCTCA  
TTCATTCTGATCACAGGTAGATCACTCTCTTGGTCCAACCCCTTAATGCCTATT  
AAG (SEQ ID NO: 662)

【手続補正1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2015518485000001.app

## 【国際調査報告】

PATENT Date of receipt: 17 March 2015 (17.03.2015) PCT/US2013/037579 3

61500210011



## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference. 381070002WO1	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US13/37579	International filing date (day/month/year) 22 April 2013 (22.04.2013)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 20 April 2012 (20.04.2012)
Applicant APTAMIR THERAPEUTICS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:
- the international application in the language in which it was filed.
- a translation of the international application into \_\_\_\_\_ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- b.  This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).
- c.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3.  Unity of invention is lacking (see Box No. III).

## 4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.
- the text has been established by this Authority to read as follows:

## 5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

## 6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 22
- as suggested by the applicant.
- as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
- as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b.  none of the figures is to be published with the abstract.

31. 3. 2015

INTERNATIONAL SEARCH Date of receipt: 17 March 2015 (17.03.2015) PCT/US2013/037579 3  
International application No.

PCT/US13/37579

2

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

## a. (means)

- on paper  
 in electronic form

## b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT** Date of receipt: 17 March 2015 (17.03.2015) PCT/US2013/037579 3

PCT/US13/37579

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claims Nos.: 9-25, 37-43 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

\*\*\*Please See Supplemental Page\*\*\*

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Group I: Claims 1-8, 30-36 and 44-79

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH Date of receipt: 17 March 2015 (17.03.2015) PCT/US2013/037579 3

PCT/US13/37579 4

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>            IPC(8) - C12N 15/113; A61K 48/00; C07H 21/02 (2013.01)            USPC - 514/44A; 536/24.1, 24.5            According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																							
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)            IPC(8): C12N 15/113, 11, 00, 5/00, 02; A61K 48/00; C07H 21/02; A61P 3/00, 21/00 (2013.01)            USPC: 514/44A, 44R, 43, 42, 23, 1; 435/375, 325; 536/23.1, 22.1, 18.7, 1.11</p>																							
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>																							
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)            MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; PubMed; 'UCP1,' 'UCP2,' 'UCP3,' uncoupled, protein, mitochondria*, thermogenin, 'miRNA,' 'microRNA,' micro, 'RNA,' mir, hsa*mir*, thermogenesis, egomir, antagonir, anti*mir, blockmir, adipocyte, adipogenesis, pre*adipocyte, rosiglitazone</p>																							
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2011/079263 A2 (COLLARD J et al.), June 30, 2011; abstract; paragraphs [0030], [0060], [0072], [00105], [00119], [00120], [00178]-[00180]</td> <td>1-7, 8/1-8/7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CHEN, X et al. RNA-Mediated Regulation And Noncoding RNAs: In Vitro Evidence Suggests That miR-133a-mediated Regulation Of Uncoupling Protein 2 (UCP2) Is An Indispensable Step In Myogenic Differentiation. The Journal of Biological Chemistry. 2009, Vol. 284, pp 5362-5369; page 5362, column 2, paragraph 2 to page 5363, column 1, paragraph 1; page 5364, column 1, paragraph 3.</td> <td>30-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ALEXANDER, R et al. MicroRNAs In Adipogenesis And As Therapeutic Targets For Obesity. Expert Opinion in Therapeutic Targets. May 2011, Vol. 15, No. 5, pp 623-636 (Author Manuscript, October 7, 2011, pp 1-21); page 4, section 2.1, paragraph 1; page 9, section 3.2, paragraph 3 to page 10, section 3.2, paragraph 2.</td> <td>30, 33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2010/108126 A2 (MENDLEIN, JD et al.), September 23, 2010; page 133, line 3 to page 135, line 36; page 143, lines 20-27; page 145 line 14 to page 147, line 20; page 264, lines 24-31; page 267, line 20 to page 268, line 5; page 276, lines 10-15; page 321, line 30 to page 322, line 2.</td> <td>35/30-35/33, 36/35/33, 62-65, 69-79</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>34, 35/34, 36/35/34</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>35/30-35/33, 36/35/33/33, 52-54, 61-79</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2011/079263 A2 (COLLARD J et al.), June 30, 2011; abstract; paragraphs [0030], [0060], [0072], [00105], [00119], [00120], [00178]-[00180]	1-7, 8/1-8/7	X	CHEN, X et al. RNA-Mediated Regulation And Noncoding RNAs: In Vitro Evidence Suggests That miR-133a-mediated Regulation Of Uncoupling Protein 2 (UCP2) Is An Indispensable Step In Myogenic Differentiation. The Journal of Biological Chemistry. 2009, Vol. 284, pp 5362-5369; page 5362, column 2, paragraph 2 to page 5363, column 1, paragraph 1; page 5364, column 1, paragraph 3.	30-32	Y	ALEXANDER, R et al. MicroRNAs In Adipogenesis And As Therapeutic Targets For Obesity. Expert Opinion in Therapeutic Targets. May 2011, Vol. 15, No. 5, pp 623-636 (Author Manuscript, October 7, 2011, pp 1-21); page 4, section 2.1, paragraph 1; page 9, section 3.2, paragraph 3 to page 10, section 3.2, paragraph 2.	30, 33	Y	WO 2010/108126 A2 (MENDLEIN, JD et al.), September 23, 2010; page 133, line 3 to page 135, line 36; page 143, lines 20-27; page 145 line 14 to page 147, line 20; page 264, lines 24-31; page 267, line 20 to page 268, line 5; page 276, lines 10-15; page 321, line 30 to page 322, line 2.	35/30-35/33, 36/35/33, 62-65, 69-79	A		34, 35/34, 36/35/34			35/30-35/33, 36/35/33/33, 52-54, 61-79
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	WO 2011/079263 A2 (COLLARD J et al.), June 30, 2011; abstract; paragraphs [0030], [0060], [0072], [00105], [00119], [00120], [00178]-[00180]	1-7, 8/1-8/7																					
X	CHEN, X et al. RNA-Mediated Regulation And Noncoding RNAs: In Vitro Evidence Suggests That miR-133a-mediated Regulation Of Uncoupling Protein 2 (UCP2) Is An Indispensable Step In Myogenic Differentiation. The Journal of Biological Chemistry. 2009, Vol. 284, pp 5362-5369; page 5362, column 2, paragraph 2 to page 5363, column 1, paragraph 1; page 5364, column 1, paragraph 3.	30-32																					
Y	ALEXANDER, R et al. MicroRNAs In Adipogenesis And As Therapeutic Targets For Obesity. Expert Opinion in Therapeutic Targets. May 2011, Vol. 15, No. 5, pp 623-636 (Author Manuscript, October 7, 2011, pp 1-21); page 4, section 2.1, paragraph 1; page 9, section 3.2, paragraph 3 to page 10, section 3.2, paragraph 2.	30, 33																					
Y	WO 2010/108126 A2 (MENDLEIN, JD et al.), September 23, 2010; page 133, line 3 to page 135, line 36; page 143, lines 20-27; page 145 line 14 to page 147, line 20; page 264, lines 24-31; page 267, line 20 to page 268, line 5; page 276, lines 10-15; page 321, line 30 to page 322, line 2.	35/30-35/33, 36/35/33, 62-65, 69-79																					
A		34, 35/34, 36/35/34																					
		35/30-35/33, 36/35/33/33, 52-54, 61-79																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/></p> <p>* Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family</p>																							
Date of the actual completion of the international search 18 October 2013 (18.10.2013)	Date of mailing of the international search report 25 OCT 2013																						
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																						

INTERNATIONAL SEARCH Date of receipt: 17 March 2015 (17.03.2015) PCT/US2013/037579 3

International application no.

PCT/US13/37579

5

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN, T et al. MicroRNA let-7 Regulates 3T3-L1 Adipogenesis. Molecular Endocrinology, 2009, Vol. 23, pp 925 to 931; page 928, column 1, paragraph 1; 929, column 2, paragraph 1; page 930, column 2, paragraph 9 to page 931, column 1, paragraph 1.	55
Y	WO 2011/138457 A1 (SCHEIDEKER, M et al.), November 10, 2011; abstract; page 14, line 32 to page 15, line 21; page 16, lines 20-33; page 46, lines 1-10	56-61
Y	WO 2012/007725 A2 (CHOO, Y et al.), January 19, 2012; page 17, lines 23-33; page 19, lines 1-6; page 23, lines 13-20; page 27, lines 25-28; page 47, lines 1-14; page 47, lines 22-27	53, 56-60
X	US 2011/0224286 A1 (YU, X et al.), September 15, 2011; paragraphs [0081], [0082], [0084], [0104], [0105], [0192]	44-51
Y	ZARAGOSI, LE et al. Small RNA Sequencing Reveals miR-642-3p As A Novel Adipocyte-Specific microRNA And miR-30 As A Key Regulator Of Human Adipogenesis. Genome Biology. 2011, Vol. 12, pp 1-13; page 2, column 2, paragraph 4; figure 2, Table 1.	52-54
A	RANTALAINEN, M et al. MicroRNA Expression In Abdominal And Gluteal Adipose Tissue Is Associated With mRNA Expression Levels And Partly Genetically Driven: PLoS ONE. 2011, Vol. 6, No. 11, pp 1-12; e27338. doi:10.1371/journal.pone.0027338; page 2, column 2, paragraph 3; page 8, column 1, paragraph 6-column 2, paragraph 1.	34, 35/34, 36/35/34

INTERNATIONAL SEARCH Date of receipt: 17 March 2015 (17.03.2015) PCT/US2013/037579 3  
International application no.

PCT/US13/37579

6j

-Continued from Box No. III: Observations Where Unity Of Invention Is Lacking

Group I: Claims 1-8, 30-36, 44-79

Group II: Claims 26-29

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-8, 30-36 and 44-79 are directed toward a method of modulating respiratory chain uncoupling in a cell, the method comprising contacting the cell with a miRNA agent that modulates activity of at least one mitochondrial uncoupler; a method of modulating thermogenesis in a tissue, the method comprising contacting the tissue with a miRNA agent that modulates activity of at least one mitochondrial uncoupler; a method of treating obesity in a human subject in need of treatment thereof, the method comprising administering to the human subject an effective amount of a miRNA agent that modulates activity or expression of at least one mitochondrial uncoupler; an agomir or antagonmir that modulates the activity of at least one thermogenic regulator in a cell; a pharmaceutical composition comprising two or more miRNAs selected from the group consisting of hsa-let-7a agomir, hsa-let-7a antagonmir, hsa-miR-1 agomir, hsa-miR-1 antagonmir, hsa-miR-19b agomir, hsa-miR-19b antagonmir, hsa-miR-30b agomir, and hsa-miR-30b antagonmir; a method of inducing pre-adipocytes to differentiate into adipocytes comprising administering to a population of pre-adipocytes one or more miRNAs selected from the group consisting of hsa-let-7a agomir, hsa-let-7a antagonmir, hsa-miR-a agomir, hsa-miR-1 agomir, hsa-miR-19b agomir, hsa-miR-19b antagonmir, hsa-miR-30b agomir, and hsa-miR-30b antagonmir; a method of decreasing the lipid content of adipocytes comprising administering to a population of adipocytes one or more miRNAs selected from the group consisting of hsa-let-7a agomir, hsa-let-7a antagonmir, hsa-miR-1 agomir, hsa-miR-19b agomir, hsa-miR-19b antagonmir, hsa-miR-30b agomir, and hsa-miR-30b antagonmir; a method of increasing insulin sensitivity in a subject in need thereof comprising administering to the subject one or more miRNAs selected from the group consisting of hsa-let-7a agomir, hsa-let-7a antagonmir, hsa-miR-1 agomir, hsa-miR-19b agomir, hsa-miR-19b antagonmir, hsa-miR-30b agomir, and hsa-miR-30b antagonmir; a method of increasing expression or activity of one or more uncoupling proteins in a cell comprising administering to the cell one or more miRNAs selected from the group consisting of hsa-let-7a antagonmir, hsa-miR-1 agomir, hsa-miR-19b agomir and hsa-miR-30b agomir; a method of causing fat loss in a subject in need thereof comprising administering to the subject one or more miRNAs selected from the group consisting of hsa-let-7a antagonmir, hsa-miR-1 agomir, hsa-miR-19b agomir and hsa-miR-30b agomir; use of an agomir or antagonmir of one or more miRNAs selected from the group consisting of the miRNA set forth in Tables 1, 11, 13 and 14 in the manufacture of a medicament for the treatment of obesity; and a composition comprising an agomir or antagonmir of one or more miRNAs selected from the group consisting of the miRNA set forth in Tables 1, 11, 13 and 14 for the treatment of obesity.

Group II: Claims 26-29 are directed toward a method of screening for a miRNA agent that modulates thermogenesis, the method comprising: a) providing an indicator cell comprising a human genome; b) contacting the indicator cell with a test miRNA agent; and c) determining the cellular activity of at least one thermogenic regulator in the indicator cell in the presence and absence of the miRNA agent, wherein a change in the activity of the thermogenic regulator in the presence of the test miRNA agent identifies the test miRNA agent as a miRNA agent that modulates thermogenesis.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a method of modulating respiratory chain uncoupling in a cell, the method comprising contacting the cell with a miRNA agent that modulates activity of at least one mitochondrial uncoupler, which is not present in Group II; Group II having special technical features including a method of screening for a miRNA agent that modulates thermogenesis, the method comprising: a) providing an indicator cell comprising a human genome; b) contacting the indicator cell with a test miRNA agent; and c) determining the cellular activity of at least one thermogenic regulator in the indicator cell in the presence and absence of the miRNA agent, wherein a change in the activity of the thermogenic regulator in the presence of the test miRNA agent identifies the test miRNA agent as a miRNA agent that modulates thermogenesis.

Groups I-II share the technical features including a method comprising a miRNA agent that modulates thermogenesis, the method comprising: a miRNA agent that modulates thermogenesis.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2011/079263 A2 to Collard, et al. (hereinafter 'Collard'). Collard discloses a method (Claim 1) comprising a miRNA agent (paragraphs [00105], [00107]) that modulates thermogenesis (paragraph [0060]), the method (Claim 1) comprising: a miRNA agent (paragraphs [00105], [00107]) that modulates thermogenesis (paragraph [0060]).

Since none of the special technical features of the Groups I-II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Collard reference, unity of invention is lacking.

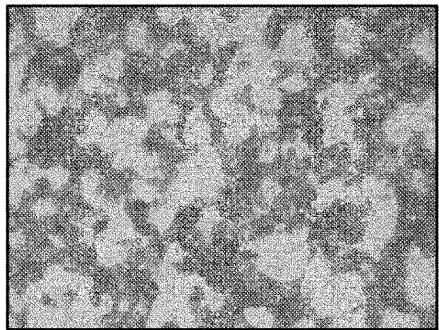
## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

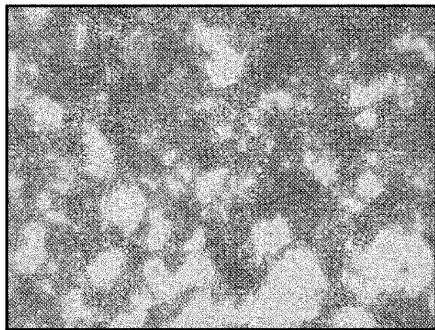
(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,H,U,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
 (74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
 (74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
 (74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
 (74) 代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一  
 (74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
 (74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘  
 (74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
 (72) 発明者 シボニエ マーク  
アメリカ合衆国 フロリダ州 ネイブルズ テラシーナ ウェイ 484  
 F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 DA02 EA02 EA04 FA02 GA11 HA17  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 CA44  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA70 ZB21

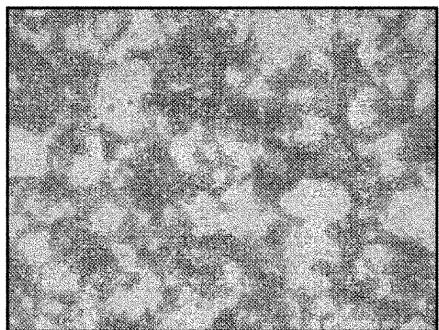
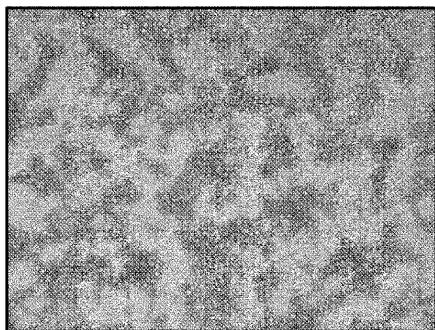
【要約の続き】



对照



50 nM Let-7a 阻害剤

10  $\mu$ M CL316,243

50 nM miR-1 模倣物