

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2017年5月4日(04.05.2017)(10) 国際公開番号  
WO 2017/073600 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/09* (2006.01)      *C12N 5/071* (2010.01)  
*C12N 1/00* (2006.01)      *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号:                    PCT/JP2016/081692
- (22) 国際出願日:                    2016年10月26日(26.10.2016)
- (25) 国際出願の言語:                    日本語
- (26) 国際公開の言語:                    日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2015-212176 2015年10月28日(28.10.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 遠藤 慧(ENDO, Kei); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目13番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## 添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: mRNA DESIGN METHOD

(54) 発明の名称: mRNA の設計方法

(57) Abstract: The present invention is a method for designing mRNA which can be identified with a high degree of accuracy while the cell is still alive. The method is for designing mRNA comprising at least two miRNA response elements, wherein the mRNA comprises at least two miRNA response elements and marker gene elements functionally bonded to the at least two miRNA response elements. The method comprises the following steps: (1) a step in which the translation inhibiting effects of mRNA comprising one miRNA response element are measured in at least two target cells; (2) a step in which, on the basis of the measurement results from step (1), the translation inhibiting effects of mRNA comprising at least two miRNA response elements are calculated in each target cell; and (3) a step in which, on the basis of the values calculated in step (2), the mRNA comprising at least two miRNA response elements and exhibiting the largest difference, in terms of translation inhibiting effects, between the at least two target cells is selected.

(57) 要約: 生細胞を生きたまま、高精度で判別することができる mRNA を設計する方法。以下の工程を含む、miRNA 応答配列を 2 以上含有する mRNA を設計する方法であって、当該 miRNA 応答配列を 2 以上含有する mRNA が、2 以上の miRNA 応答配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む mRNA である、方法; (1) 1つの miRNA 応答配列を有する mRNA の翻訳抑制効果を 2 以上の対象細胞で測定する工程、(2) 前記工程(1)の測定結果に基づき、各対象細胞での miRNA 応答配列を 2 以上含有する mRNA の翻訳抑制効果を算出する工程、(3) 前記工程(2)で算出された値に基づき、前記 2 以上の対象細胞間における翻訳抑制効果の差が最大になる、miRNA 応答配列を 2 以上含有する mRNA を選択する工程。

## 明 細 書

### 発明の名称： mRNAの設計方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、mRNAの設計方法に関する。
- [0002] 多細胞生物の組織や器官は、多種類の細胞で構成されている。ヒトは、60兆 ( $6 \times 10^{13}$ ) 個もの細胞から構成され、その種類は、成熟細胞だけでも約400種程度にも及ぶ。これらの細胞については、個々の細胞の機能を解析するだけでなく、医療応用のための細胞調製において、細胞種を判別したり、同定したりする技術が重要になってきている。
- [0003] 細胞を同定するためには、特異的に発現した細胞表面のマーカー因子を、抗体で検出する手法が一般的に知られている。しかし、抗体で細胞内の情報を検出するためには、対象細胞を固定・膜透過させる必要があり、生細胞の分取には応用することができないという問題があった。また、細胞表面に必ずしも細胞の特定が可能なレセプターが存在するものではない。また、抗体による細胞のマーカー因子検出のような、一因子を、positive/negative（陰性または陽性）の2つに分類する手法は、細胞を定性的に分類する手法となり、精密な分類が難しいという問題がある。
- [0004] 細胞をより精密に分類する方法、すなわち細胞を定量的に分類する方法としては、例えば、マイクロアレイや次世代シーケンシングなどを用いた多変量の測定に基づく細胞のプロファイリングが知られている。これらの方法では、タンパク質やRNAなどの細胞内分子について、多種類の分子を同時に定量測定し、また多変量解析などの統計解析を用いるなどして、定量的に細胞を分類することが可能である。しかし、測定をなされた細胞は破壊されてしまうため、細胞を生存させた状態では測定できないという問題がある。
- [0005] そこで、所望の細胞に特異的に発現するマイクロRNA（以下、miRNAと指称する）を利用して、マーカーの遺伝子発現を抑制するという点に着目し、当該システムを利用した細胞分離方法が、提案されている（特許文献1）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開W02015/105172

#### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1の方法では、着目する所望の細胞によっては、細胞を分類するための適切なmiRNAが選択できないこともあり、当該システムの改良が望まれている。

#### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、2以上のmiRNA応答配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNAについて、1つのmRNAが複数のmiRNAを可算的に検出できること、各miRNAへの検出感度をmRNA上のmiRNA標的配列の位置で調節できることを発見した。すなわち、多因子の情報を先に要約してから、その結果合成されたパラメータを検出することで、同時に検出可能な、限られたシグナル数でも、多数の生細胞内因子の定量情報に由来し、そのエッセンスを抽出した合成パラメータを直接検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] したがって、本発明の課題は以下の手段により解決することができる。

[1] 以下の工程を含む、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを設計する方法であって、当該miRNA応答配列を2以上含有するmRNAが、2以上のmiRNA応答配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNAである、方法；

(1) 1つのmiRNA応答配列を有するmRNAの翻訳抑制効果を2以上の対象細胞で測定する工程、

(2) 前記工程(1)の測定結果に基づき、各対象細胞でのmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAの翻訳抑制効果を算出する工程、

(3) 前記工程(2)で算出された値に基づき、前記2以上の対象細胞間に

おける翻訳抑制効果の差が最大になる、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを選択する工程。

[2] 前記工程(1)と工程(2)の間に、前記工程(1)の測定結果に基づき、前記工程(2)の算出に使用するmiRNA応答配列の種類を、多変量解析を用いて限定する工程をさらに含む、[1]に記載の方法。

[3] 前記工程(2)の翻訳抑制効果が、前記2以上のmiRNA応答配列のそれぞれの翻訳抑制効果- $\log(\rho)$ を、miRNAの数だけ合算して得られるものであり、前記それぞれの翻訳抑制効果- $\log(\rho)$ が、下記式

[数1]

$$-\log(\rho) = -d^{\xi} \cdot \log(\rho^0)$$

(式中、 $\rho$ は、miRNAによる翻訳抑制効果を表し、

$d$  [nt]は、開始コドンからmiRNA標的配列までの距離を表し、

$\xi$ は、-0.576を表し、

$\rho^0$ はそれぞれのmiRNAについて距離0 [nt] の時の仮想的な翻訳抑制効果を表す)

に基づいて算出される、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記工程(3)が、各対象細胞におけるマーカー遺伝子の翻訳量の分散を最大にする、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを選択する工程を含む、[1]～[3]のいずれか1項に記載の方法。

[5] [1]～[4]のいずれか1項に記載の方法でmRNAを設計する工程と、

前記設計されたmRNAを、遺伝子工学的手法により合成する工程とを含む、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAの製造方法。

[6] [1]～[4]のいずれか1項に記載の方法で設計されたmRNAを用いて、マーカー遺伝子の翻訳量を指標として2以上の対象細胞を分離する方法。

[7] 前記mRNAが、[1]～[4]のいずれか1項に記載の方法で設計された、マーカー遺伝子配列及び5'UTRの配列がそれぞれ異なる4種のmRNAである、[6]に記載の方法。

## 発明の効果

[0010] 本発明によれば、所望の細胞をより高精度で分離することが可能な、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを設計する方法が提供される。当該mRNAは、1分子で多数のmiRNAに応答し、かつ個々のmiRNAへの応答の程度（検出感度）を任意に調節可能なプローブとして機能する。すなわち、本発明により、細胞内の多因子情報を線形モデルで抽出することに成功した。従来技術では、非侵襲的に（細胞を殺さずに）同時に検出可能なシグナルの数は限られており、1対1に対応した検出プローブでは対応できなかったが、本発明の設計方法により、同時に検出可能な、限られたシグナル数でも、多数の生細胞内因子の定量情報に由来し、そのエッセンスを抽出した合成パラメータを直接検出することができるようになった。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、生細胞内で多変量計算を実行するスキームを示す。図1aは、旧来の方法（左）では、個々の細胞内情報（今回の場合はmiRNA情報）を個別に検出し、その後で多変量解析により情報を抽出していることを示し、本発明（右）ではあらかじめ細胞内で多変量の計算を行い、その結果を直接検出することを示す。図1bは、多数のmiRNAに応答するmRNAを用いた線形多変量計算を示す。mRNAが複数のmiRNA活性に対して独立に応答し、かつ個々のmiRNAへの応答性能を調節できればよい。2つのmRNAを用いて、その比率を算出すれば、多数のmiRNAに任意の比重をつけた線形計算を実現できる。

[図2]図2は、合成mRNAは複数miRNAへ独立で、調節可能な応答を実現できることを示す。図2aは、5つのスロットを持つmRNAの5'UTRのデザインを示す。各スロットはmiRNAに相補的な配列を挿入する。AUGはマーカータンパク質(hmAG1)の開始コドン。下部は4種類のmiRNAに応答するmRNAシリーズ。灰、miR-34a-5p；青、miR-17-5p；緑、miR-21-5p；赤、miR-92a-3pへの応答配列を

示す。図2 bは、miR-17-5pとmiR-92a-3pに応答するmRNAの例を示す。上部に5' UTRの設計を示す。Relative expressionは双方の存在下のマーカーの平均発現量に対する比率で示す。一方のみのmiRNA阻害剤存在下でのRelative expressionの積をEstimated expressionとした。図2 cは、実験的に測定されたRelative expression値(Observed relative expression)とEstimated Expressionの比較を示す。ランダムに設計した12種類について、独立した3回の実験結果をプロットした。図2 dは、同じmiRNAへの応答配列を複数含むmRNAシリーズを示す。各mRNAは1~5箇所に miRNA応答配列を含む。mRNAの発現量は各スロットにおける抑制効果( $\rho$ , rho)の積算値となると予測される。図2 eは、実験的に測定されたRelative expression値(Observed relative expression)と推測値の比較を示す。4種類のmiRNAについてそれぞれ比較した。図2 fは、各スロットにおける抑制効果とスロットの開始コドンからの距離のプロットを示す。各スロットにおける抑制効果は、miRNAごとにeのデータから最小二乗法によるフィッティングで算出した。エラーバーは3回の解析結果の平均土標準偏差を示す。

[図3]図3は、複数miRNA活性の線形計算に基づく生細胞の分類を示す。図3 aは、スクリーニングのスキームを示す。異なるmiRNA(a, b, c)に応答して異なる蛍光タンパク質(hmAG1, tagBFP, hdKRed)を発現する3種類のmRNA(1-slot mRNA)と、miRNAに応答しないhmK02の1-slotコントロールmRNAを同時に導入した。270種類のmiRNAはコントロールを含めて96種類のトランسفェクションになる。フローサイトメトリーで解析し、様々な細胞におけるmiRNA活性のプロファイルを得た。図3 bは、ヒトiPS細胞(hiPS)を用いた、独立した2回のスクリーニング結果の比較を示す。緑、hmAG1; 青、tagBFP; 紫、hdKRedをマーカータンパク質として用いたmRNAの発現量を示す。図3 cは、標準化したデータセットの細胞間比較を示す。正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)とhiPSCの比較を例として示す。図3 dは、主成分分析による細胞の分類。8種類の細胞と条件についてスクリーニングした結果を標準化して主成分分析を実施した結果を示す。第一成分(Component 1)と第二成分(Component

2) によるプロットを示した。図3 e は、細胞間の分散を最大化するmRNAセットを示す。標準化後のデータセットとともに、hmAG1 とhmK02 の比率とtag BFP と hdKRed の比率をパラメータとして、細胞間の分散を最大化するmRNAセットを計算して設計した。図3 f は、図3 e のmRNAセットによる5種類の細胞の計算上の分類を示す。図3 g は、mRNAセットによる生きた細胞の分類を示す。フローサイトメトリーの結果を、蛍光比率の2次元の密度プロットとして示した。赤字で示された細胞は赤の、その他の4種類の細胞を黒の密度として示した。

[図4]図4 は、複数miRNA活性の線形計算に基づくhiPS細胞の変化の追跡を示す。図4 a は、二次スクリーニングのスキームを示す。図3 のスクリーニングの結果から、hiPSC と hiPSC (14d) の差が大きかった54 miRNAを選び、24 トランスフェクションの二次スクリーニングとした。図4 b は、経時変化の追跡スキームを示す。hiPSCをbFGFの非存在下で多能性を失わせて自然に（ランダムに）分化させた。示された日数培養後、mRNAセットをトランスフェクションし、24時間後にフローサイトメトリーで解析した。図4 c は、miRNA活性の経時的変化の比較を示す。測定した蛍光比率について、day 1 と day 3 の比較を例として示す。図4 d は、スクリーニング結果の主成分分析の結果を示す。第一成分(Component 1)と第二成分(Component 2) によるプロットを示した。また、bFGF 存在下で 1-3 日培養した細胞を青で示した。図4 e は、hiPSCをbFGFの非存在下で多能性を失わせて分化させた際の、細胞間の分散を最大化するmRNAセットを示す。細胞間の分散を最大化するmRNAセットを計算して設計した。図4 f は、図4 e のmRNAセットによる細胞の計算上の分類を示す。図4 g は、mRNAセットによる生きた細胞の分類。フローサイトメトリーの結果を、蛍光比率の2次元の密度プロットとして示した。赤字で示された細胞は赤の、その他の4種類の細胞を黒の密度として示した。

[図5]図5 は、miRNA 阻害剤によるmiRNA活性測定への影響を示す。図5 a は、本実施例で使用したmiRNA阻害剤の独立性を確認した結果を示す。miRNAに応答するmRNAそれぞれについて、5種類のmiRNA阻害剤を細胞に導入した。各

条件における発現量は、mRNAの応答するmiRNA阻害剤存在下での発現量を基準にした比率で示す。エラーバーは3回の実験の平均土標準偏差を示す。各miRNA阻害剤はクロストークしないことが確認された。図5 bは、miRNA阻害剤の合計導入量の影響を確認した結果を示す。図5 aと同様の実験をmiR-1阻害剤を2 pmolまたは4 pmol加えて行った。“w/o”の条件は図5 aの“miR-1 (n. c.)”に相当する。当該条件では、無関係のmiRNA阻害剤の有無によって検出されるmiRNAの活性は変動しない。

[図6]図6は、標的配列の位置によるmiRNA検出力の違いを示す。図6 aは、5-slot mRNAと1-slot mRNAの5'UTRの構造を示す。図6 bは、各スロットにおける抑制効果を示す。miRNAごとに図3 eのデータから最小二乗法によるフィッティングで算出した。エラーバーは3回の解析結果の平均土標準偏差を示す。右のパネルは1-slot mRNAの結果。1-slot mRNAはslot-5に近い挙動を示す。

[図7]図7は、スクリーニング結果の標準化を示す。上図は、HeLa細胞と正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)の結果を示し、下図は、HeLa細胞とヒトiPS細胞(hiPSC)の比較結果を示す。緑色プロットはhmAG1、青色プロットはtagBFP、および紫色プロットはhdKRedをマーカータンパク質として用いた際のmRNAの発現量を示す。図7 aは、観察されたexpression値の比較を示す。細胞ごとのバイアスが見られる。図7 bは、細胞間のバイアスの標準化を示す。蛍光タンパク質ごとの細胞間の発現蛍光の違いを、HeLa細胞の結果を基準にして標準化した。しかし、蛍光タンパク質ごとに分布する位置が異なっている。図7 cは、蛍光タンパク質間のバイアスの標準化を示す。蛍光タンパク質ごとに分布を標準化した。

[図8]図8は、異なるmRNAセットによる細胞の分類結果を示す。図3 gと同様の実験を異なるmRNAセットで行った。フローサイトメトリーの結果を、蛍光比率の2次元の密度プロットとして示した。赤字で示された細胞は赤の、その他の4種類の細胞を黒の密度として示した。図8 aは、miRNAに応答しないコントロールmRNAのセットを用いた結果を示す。図8 bは、活性のばらつきが

大きかったmiRNAに応答する1-slot mRNAのセットを用いた結果を示す。図8 cは、hiPSCの変化を追跡した時のmRNAセット（図4 e）を用いた結果を示す。

[図9]図9は、異なるmRNAセットによる hiPSC の追跡結果を示す。図4 gと同様の実験を行い、フローサイトメトリーの結果を蛍光比率の2次元の密度プロットとして示した。赤字で示された細胞は赤の、その他の8種類の細胞を黒の密度として示した。図9 aは、その他の培養条件の結果を示す。図4 e～4 g のmRNAセットを用いて、異なる培養条件の細胞を分離した。図9 bは、他のmRNAセットを用いた実験の結果を示す。細胞種を分類した時のmRNAセット（図3 e）を使用した。

### 発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。以下の実施形態は本発明を限定するものではない。

[0013] 本発明は、第1実施形態によれば、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを設計する方法であって、当該miRNA応答配列を2以上含有するmRNAが、2以上のmiRNA応答配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNAである、方法に関する。本実施形態による方法は、以下の工程を含む。

(1) 1つのmiRNA応答配列を有するmRNAの抑制効果を2以上の対象細胞で測定する工程、

(2) 前記工程(1)の測定結果から、各細胞でのmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAの翻訳抑制効果を算出する工程、

(3) 前記工程(2)で算出された値より、2以上の対象細胞間における翻訳抑制効果の差が最大になるmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAを選択する工程。

[0014] 本発明は、2以上のmiRNAの応答配列（以下、miRNA応答配列、あるいはmiRNA標的配列ともいう）とこれに機能的に連結したマーカー遺伝子を含むメッセージンジャーRNA(mRNA)が、各miRNA応答配列個別の翻訳抑制効果の積算値に翻訳抑制効果を備え、かつ、各miRNA応答配列個別の翻訳抑制効果は、各mi

RNA応答配列の開始コドンからの距離に反比例するという発見に基づく。

[0015] 本発明において、2以上のmiRNAの応答配列とマーカー遺伝子が機能的に連結するとは、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む。）の5'UTR内に、2以上のmiRNA応答配列を備えることを意味する。このようなmRNAは、細胞内での対応するmiRNAの発現を指標として、細胞種を分離することができる。さらに詳細には、細胞内に対応するmiRNAが発現していると、その発現量に応じて、マーカー遺伝子の翻訳が抑制される。ここでいう、「miRNAの発現」とは、成熟miRNAが、所定の複数の蛋白質と相互作用して、RNA-induced silencing complex (RISC) を形成した状態にあるmiRNAが存在していることをいうものとする。「成熟miRNA」は、一本鎖RNA（20～25塩基）であり、核外でDicerによる切断によってpre-miRNAから生じ、「pre-miRNA」は、Droshaと呼ばれる核内酵素による部分切断によって、DNAから転写された一本鎖RNAであるpri-mRNAから生じる。本発明におけるmiRNAとは、少なくとも10,000種類以上のmiRNAから選択することができる。詳細には、データベースの情報（例えば、<http://www.mirbase.org/>又は<http://www.microrna.org/>）に登録されたmiRNA、及び／または当該データベースに記載されている文献情報に記載されたmiRNAより選択することができ、市販のライブラリのmiRNAより選択することもできる。すなわち、本発明においては、指標となるmiRNAは特定のmiRNAに限定されるものではない。

[0016] 本実施形態による設計方法に用いる、上記のようなmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAを本明細書中で、miRNA応答性mRNA、n-slot mRNA（nは2以上の整数）、あるいはレポーターmRNAとも指称する。このようなmiRNA応答性mRNAの基本的な構造について説明する。

[0017] 本実施形態において設計するmRNAの模式的な構造を、図2aの上図に例示する。図2aに示すmRNAは、5'末端から、5'から3'の向きに、Cap構造（7メチルグアノシン5'リン酸）、miRNAの応答配列を挿入可能な5つのスロット、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、並び

に、ポリAテイルを備える。

[0018] ここで、「スロット」とは、miRNA標的配列を挿入可能な部分を概念的に示すものであって、各スロットは、miRNA標的配列、またはmiRNAの標的ではない配列（空スロットともいう）から構成される。ただし、5つのスロットのうち、2以上には、同一もしくは異なるmiRNA標的配列が挿入される。各スロットに挿入されるmiRNA標的配列、またはmiRNAの標的ではない配列の塩基数は、同一であってもよく異なっていてもよいが、概ね20～25塩基である。スロット間には、任意の数の塩基が存在してもよく、存在しなくてもよい。また、3以上のスロットを含むmRNAにおいては、各スロット間の塩基数及び配列が同じであっても異なっていてもよい。

[0019] miRNA標的配列は、指標となるmiRNAに特異的に結合可能な配列をいう。miRNA標的配列は、例えば、指標となるmiRNAに完全に相補的な配列であることが好ましい。あるいは、当該miRNA標的配列は、miRNAにおいて認識され得る限り、完全に相補的な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。当該miRNAに完全に相補的な配列からの不一致は、所望の細胞において、通常にmiRNAが認識し得る不一致であれば良く、生体内における細胞内の本来の機能では、40～50%程度の不一致があっても良いとされている。このような不一致は、特に限定されないが、1塩基、2塩基、3塩基、4塩基、5塩基、6塩基、7塩基、8塩基、9塩基、若しくは10塩基又は全認識配列の1%、5%、10%、20%、30%、若しくは40%の不一致が例示される。また、特には、細胞が備えている mRNA 上の miRNA 標的配列のように、特に、シード領域以外の部分に、すなわち miRNA の 3' 側 16 塩基程度に対応する、標的配列内の 5' 側の領域に、多数の不一致を含んでもよく、シード領域の部分は、不一致を含まないか、1塩基、2塩基、若しくは3塩基の不一致を含んでもよい。また、開始コドンとなりうるAUG配列が含まれることのないように、miRNA標的配列を選択することが好ましい。

[0020] スロットに挿入され得るmiRNAの標的ではない配列（以下、非標的配列ともいう）は、特に限定されるものではないが、miRNA標的配列との類似性が低く

、かつ、AUGを配列として含まないものであることが好ましい。類似性が低いとは、例えば、60%以上、70%以上、あるいは80%以上が不一致の配列であってもよいが、これらには限定されない。同一のmiRNA応答性mRNA上に、2以上の空スロットが存在する場合には、それぞれの空スロット挿入される非標的配列は、同一でも異なっていてもよい。また、特定の対象細胞の分離を指標に設計された複数種のmiRNA応答性mRNAのセットにおいて、異なるmiRNA応答性mRNAの空スロット挿入される非標的配列も、同一でも異なっていてもよい。

[0021] miRNA応答性mRNAにおいて、Cap構造と最も5'側に位置するスロット（図2においては、slot-1）と間の塩基数及び塩基の種類は、開始コドンとなるAUGを含まず、かつステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、Cap構造とmiRNA標的配列と間の塩基数には、特に限定はなく、目的及び用途に合わせた塩基数となるように設計することができるが、例えば、1000塩基以下、好ましくは500塩基以下、さらに好ましくは250塩基以下の範囲で設計することができる。また、最も開始コドンに近接するスロット（図2においてはslot-5）と開始コドンと間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。したがって、最も開始コドンに近接するスロットと開始コドンと間の塩基数にも特に上限はなく、例えば、1000塩基以下、好ましくは500塩基以下、さらに好ましくは250塩基以下の範囲で、例えば、2～20塩基、好ましくは3～20塩基となるように設計することができる。

[0022] マーカー遺伝子は、細胞内で翻訳されて、マーカーとして機能し、細胞種の判別を可能にする任意の蛋白質をコードする遺伝子である。細胞内で翻訳されてマーカーとして機能しうる蛋白質としては、一例としては、蛍光、発光、呈色、若しくは蛍光、発光又は呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができる蛋白質であってよい。蛍光蛋白質としては、Sirius、EBFPなどの青色蛍光蛋白質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光蛋白質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azam

i-Green (例えば、hmAG1)、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、などの緑色蛍光蛋白質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光蛋白質；KusabiraOrange (例えば、hmK02)、mOrangeなどの橙色蛍光蛋白質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRF P、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、などの赤色蛍光蛋白質；TurboFP6 02、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed (例えば、hdKeima Red)、mRasberry、mPlumなどの近赤外蛍光蛋白質が挙げられるが、これらには限定されない。

[0023] 発光蛋白質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光又は呈色を補助する蛋白質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、βラクタマーゼなどの蛍光、発光又は呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらには限定されない。ここで本発明において、蛍光、発光又は呈色を補助する蛋白質をマーカー遺伝子として使用する場合、所望の細胞の判別において、対応する前駆物質と細胞を接触させること、又は細胞内に対応する前駆物質を導入することによって行われ得る。

[0024] また、細胞内でマーカーとして機能しうる蛋白質の別の例としては、細胞の機能に直接影響を与える蛋白質類が挙げられる。細胞増殖蛋白質、細胞死滅蛋白質、細胞シグナル因子、薬剤耐性遺伝子、転写制御因子、翻訳制御因子、分化制御因子、リプログラミング誘導因子、RNA結合タンパク質因子、クロマチン制御因子、膜タンパク質を例示することができるが、これらには限定されない。例えば、細胞増殖蛋白質は、それを発現した細胞のみを増殖させ、増殖した細胞を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅蛋白質は、それを発現した細胞の細胞死を引き起こすことで、特定のmiRNAを含有、もしくは含有しない細胞自体を死滅させ、細胞の生死を示すマーカーとして機能する。細胞シグナル因子は、それを発現した細胞が、特定の生物学的信号を発し、この信号を特定することでマーカーとして機能する。

[0025] 本発明において、マーカー遺伝子は、局在化シグナルをコードする遺伝子

を備えていてもよい。局在化シグナルとしては、核局在化シグナル、細胞膜局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、タンパク質分泌シグナル等を挙げることができ、具体的には、古典的核移行配列（NLS）、M9配列、ミトコンドリア標的配列（MTS）、小胞体移行配列を挙げができるが、これらには限定されない。このような局在化シグナルは、後述するイメージングサイトメトリー等で、本発明の方法における判別工程を、画像上で行うときに特に有利である。

[0026] miRNA応答性mRNAは、通常のウリジン、シチジンに替えて、シュードウリジン、5-メチルシチジンなどの修飾塩基を含んでいることが好ましい。細胞毒性を低減させるためである。修飾塩基の位置は、ウリジン、シチジンいずれの場合も、独立に、全てあるいは一部とすることができます、一部である場合には、任意の割合でランダムな位置とすることができます。

[0027] 図示する概念図においては、スロットの総数が5であるが、スロットの総数は2以上であればよく、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、あるいはそれ以上であってもよい。本実施形態においては、説明の簡略化のために、スロットの総数が5のmiRNA応答性mRNAを例示して説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0028] 図2a上図に示す基本的構造を備えるmRNAは、以下の特性（a）、（b）を備える。

（a）miRNA応答配列を2以上含有するmRNAによる翻訳抑制効果は、各スロットのmiRNA標的配列単独による翻訳抑制効果の積算値となる。

[数2]

$$\rho^{\text{slot-1}} \times \rho^{\text{slot-2}} \times \rho^{\text{slot-3}} \times \rho^{\text{slot-4}} \times \rho^{\text{slot-5}} = \text{Estimated expression}$$

（b）各スロットのmiRNA標的配列単独による翻訳抑制効果は、miRNAの種類に関わらず一般に、開始コドンからmiRNA標的配列までの距離の定数乗、具体的には-0.576乗に比例する。

## [数3]

翻訳抑制効果 (local repression,  $-\log(\rho)$ )

$$-\log(\rho) = k(d) \cdot \{-\log(\rho^0)\} = -d^\xi \cdot \log(\rho^0)$$

$d$ , distance from AUG[nt];  $\rho^0$ , repression at 0 [nt]

$$\rho(d) = \{\rho^0\}^{k(d)} = \rho^0 \cdot d^\xi$$

tuning factor;  $k = d^{-0.576}$

[0029] (a) の式において、各スロットに挿入されるmiRNA応答配列を、slot-1から順に、それぞれ、miRNA(1)、miRNA(2)、miRNA(3)、miRNA(4)、miRNA(5)とした場合について考える。slot-1に挿入されたmiRNA(1)単独による翻訳抑制効果 ( $\rho^{\text{slot-1}}$ ) は、miRNA(1)を含めた全ての応答配列に対する阻害剤を添加した系での実測の翻訳抑制効果を1とした場合の、miRNA(1)以外の全ての応答配列に対する阻害剤を添加した系での実測の翻訳抑制効果で表される。slot-2に挿入したmiRNA(2)についての翻訳抑制効果 ( $\rho^{\text{slot-2}}$ )、slot-3に挿入したmiRNA(3)についての翻訳抑制効果 ( $\rho^{\text{slot-3}}$ ) についても同様にして得ることができ、それらの積算値が、複数のスロットを備えるmRNAの予測翻訳抑制効果となる。なお、上記数式のように、 $\rho$ の対数で考える場合には、合算値が予測翻訳抑制効果の対数となる。

[0030] (b) の式において、各スロットの開始コドン (AUG) からの距離  $d$  とは、開始コドンAUGのAから5'側に、各スロットを構成するmiRNA応答配列の3'末端の塩基までの塩基数 (nt) をいうものとする。また、 $\rho^0$ は、距離  $d$  が0の場合の仮想的な翻訳抑制効果の値をいうものとする。(a) 及び(b) 式の導出及び実験によるサポートは、実施例に示す。

[0031] 本実施形態に係る設計方法は、上記特性を備えるmiRNA応答性mRNAの基本構造に対して、各スロットに挿入するmiRNA応答配列の種類及び数（ただし、2以上）を選択する方法に関する。上記工程（1）に先立って、任意選択的な前工程として、スロットに挿入しうる候補miRNA標的配列をスクリーニングする工程を実施することができる。候補となり得るmiRNA応答配列は、上述の通

り、あらゆるmiRNAに対する応答配列であってよい。したがって、本出願時ににおいて特定されているmiRNAには限定されず、今後、その存在及び機能が特定されるあらゆるmiRNAを含むものとする。この中から、複数の候補miRNA標的配列間で、類似の配列がなく、また、開始コドンに相当しうるAUGを含まないmiRNA応答配列とすることが好ましい。ここで、類似の配列とは、例えば、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上の配列相同性を有する配列をいうものとする。候補miRNA標的配列をスクリーニングする工程は、一例としては、後述する分離方法を用いて分離する細胞種の特性に応じて指標となるmiRNAを適宜選択することができる。また、特には、分離すべき複数の細胞中で、ある細胞では高発現（高活性）であり、別の細胞では低発現（低活性）であるような、miRNAの組み合わせを選択することができる。分離の精度をより高くするためである。

[0032] 工程（1）は、1つのmiRNA応答配列を有するmRNAの抑制効果を、2以上の対象細胞で測定する工程である。工程（1）で用いる1つのmiRNA応答配列を有するmRNAを、1-slot mRNAとも指称する。この工程では、任意選択的に前工程で選択した、複数種類の候補miRNA標的配列にそれぞれ対応する、1-slot mRNAを合成する。何種類の1-slot mRNAの翻訳抑制効果を測定するかは、当業者が目的と用途に応じて適宜決定することができ、理論上の上限及び下限は存在しない。例えば、20種以上、50種以上、70種以上、100種以上の1-slot mRNAの翻訳抑制効果を測定することができる。

[0033] 各1-slot mRNAは、5'末端から、5'から3'の向きに、Cap構造（7メチルグアノシン5'リン酸）、1つのmiRNAの応答配列、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、並びに、ポリAテイルを備える。すなわち、図2aに示すmiRNA応答性mRNAのスロットを1つだけにしたものといえ、1-slot mRNAの翻訳抑制効果を測定可能であれば、5'UTRにおける、スロットの5'側や3'側の塩基数や塩基の種類は、任意であってよい。1-slot mRNAは、実験的に上記（b）式における、 $\rho^0$ を導出するために用いられるためである。

- [0034] 対象細胞とは、本実施形態において、miRNA応答性mRNAを設計するための指標となる細胞であって、2種以上、例えば、3種、4種、5種、6種、7種、または8種以上であってもよく、理論上、対象細胞の種類は限定されるものではない。
- [0035] 対象細胞は、後述する細胞の分離方法において、想定される使用状況において分離対象とする複数の細胞種をいうことができるが、これらには限定されない。分離の対象とする細胞の一例としては、同一の多能性幹細胞から分化した細胞であって、分化の程度が異なる複数種の細胞であってもよい。あるいは、別の例としては、生物個体、臓器、および組織から分取された細胞、あるいはその培養細胞であって、複数種類の細胞が含まれる細胞群、あるいは所望ではない細胞の混入が疑われる細胞群に含まれる細胞が挙げられる。しかしながら、対象細胞は、その細胞内の特徴（miRNA活性）を反映してmiRNA応答性mRNAを設計する指標になるものであればよく、使用状況において実際に分離する細胞と同一種の細胞には限定されない。また、いずれの場合であっても、異なる細胞の種類をおおまかに分類したいのか、類似した細胞の種類の中で細かく分類したいのかなど、分離の目的等によってどのような指標が有効になるのかは異なり、当業者が適宜決定することができる。
- [0036] 分離対象とする細胞は、多細胞生物種から採取した細胞群に含まれる細胞であってもよく、単離された細胞を培養することによって得られる細胞群に含まれる細胞であってもよい。当該細胞は、特に、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）採取した細胞、若しくは哺乳動物より単離された細胞又は哺乳動物細胞株を培養することによって得られる細胞であってよい。体細胞としては、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髓質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ纖毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、

収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。また、好ましい細胞は、前期体細胞を採取後に人為的な操作を加えた細胞群であり、所望しない細胞を含む可能性があり、及び／または不均質な可能性がある細胞群である。例えば、前記体細胞から調製したiPS細胞を含んでなる細胞群であり、あるいはES細胞やiPS細胞などによって例示される多能性幹細胞を分化させた後に得られる細胞群であって、所望する細胞以外に分化された細胞を含み得る細胞群である。本実施形態において、判別対象の細胞群は、生存状態にあることが好ましい。本発明において、細胞が生存状態にあるとは、代謝能を維持した状態の細胞を意味する。本発明は、細胞を本発明の方法に供し、分離方法の終了後においても、その生来の特性を失うことなく、生存状態のまま、特に分裂能を維持したまま、続く用途に用いることができる点で有利である。

- [0037] 対象細胞における翻訳抑制効果の測定は、1-slot mRNAを細胞に導入する工程と、マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、1-slot mRNAの翻訳抑制効果を得る工程とにより実施することができる。
- [0038] 本発明において、1-slot mRNAを細胞に導入する工程（以下、導入工程と指称する）は、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェク

ション法、遺伝子銃法などを用いて、1種以上の1-slot mRNAを直接、細胞群に含まれる細胞に導入する。場合により50以上、100以上、200以上の異なるmiRNA応答配列について、1-slot mRNAの抑制効果を測定する場合には、miRNA応答配列及びマーカー遺伝子が異なる2種、3種あるいは4種以上のmiRNA応答性mRNAと、コントロールmRNAを、対象細胞に共導入することができる。コントロールmRNAとは、miRNA標的部位を有さず、1-slot mRNAがコードするマーカー遺伝子とは異なるマーカー遺伝子をコードするmRNAをいう。共導入した2以上のmRNAから発現するマーカー蛋白質の活性比は、細胞集団内において一定である。また、この時の導入量は、導入される細胞群、導入するmRNA、導入方法および導入試薬の種類により異なり、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。コントロールmRNAの導入量もまた、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。

- [0039] miRNA応答性mRNAが細胞に導入されると、細胞内では、細胞に所定のmiRNAがRISCとして存在する場合、miRNA応答性mRNAがコードするマーカー遺伝子の翻訳量が制御、例えば翻訳量が抑制される。そして、翻訳量の制御は、miRNA活性に応じて定量的になされる。一方、細胞に所定のmiRNAが存在しない場合、もしくは所定のmiRNAがRISCとして存在しない場合、miRNA応答性mRNAがコードするマーカー遺伝子の翻訳量が抑制されることはない。したがって、所定のmiRNAがRISCとして存在する細胞と、存在しない細胞との間で、マーカー遺伝子の翻訳量が異なる。なお、本明細書において、所定のmiRNAがRISCとして存在する場合を、「miRNA活性が存在する場合」とも指称する。一方、コントロールmRNAは、miRNA活性に関係なくマーカー蛋白質を発現する。導入されても、miRNA標的配列が存在しないため、miRNA発現量に応じて翻訳制御されることはないと認められる。
- [0040] 本実施形態においては2以上の対象細胞の全てにおいて、1-slot mRNAの翻訳抑制効果を測定する。
- [0041] マーカー遺伝子の翻訳量は、所定の検出装置を用いて、マーカー蛋白質か

らの信号を検出することにより得ることができる。検出装置としては、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、CCDカメラ等が挙げられるが、これらには限定されない。このような検出装置は、マーカー蛋白質及び判別の態様により、当業者が適したものを用いることができる。例えば、マーカー蛋白質が、蛍光蛋白質又は発光蛋白質の場合には、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、CCDカメラといった検出装置を用いてマーカー蛋白質の定量が可能であり、マーカー蛋白質が、蛍光、発光又は呈色を補助する蛋白質の場合には、発光顕微鏡、CCDカメラ、ルミノメーターといった検出装置を用いたマーカー蛋白質の定量方法が可能であり、マーカー蛋白質が、膜局在蛋白質の場合には、抗体などの細胞表面蛋白質特異的な検出試薬と、上記の検出装置を用いたマーカー蛋白質の定量方法が可能である。マーカー蛋白質が蛍光蛋白質の場合は、フローサイトメトリーを用いて、個々の細胞において翻訳されたマーカー蛋白質である、蛍光蛋白質、発光酵素が発する光の強度を定量的に得ることができると好ましい。

[0042] なお、1-slot mRNAの翻訳抑制効果の測定方法は、上記した特定の方法のみには限定されず、他の任意の方法で実施することができる。例えば、マイクロアレイを使用する方法や、次世代シーケンシングによる方法を用いて、miRNAと相互作用しているmRNAを定量することによる、1-slot mRNAの翻訳抑制効果の測定が可能であり、これらの方法を用いて測定した場合も本発明を構成するものとする。

工程（1）は、前述の式（b）の原理、すなわち、各スロットのmiRNA標的配列単独による翻訳抑制効果は、miRNAの種類に関わらず一般に、開始コドンからmiRNA標的配列までの距離の定数乗、具体的には-0.576乗に比例する、という発見に基づき、1-slot mRNAの翻訳感度を調節する方法に関する発明ということもできる。すなわち、1つのmiRNA応答配列を有するmRNAにおいて、miRNA応答配列の開始コドンからの距離を変化させることにより、同じmiRNA応答配列を持つmRNAであっても、翻訳抑制効率を変化させる、すなわちチュ

ーニングすることができる。このようなmRNAを用いることにより、多様な細胞の分離が可能になるといえる。

- [0043] 工程（2）は、前記工程（1）の測定結果に基づき、各対象細胞でのmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAの翻訳抑制効果を算出する工程である。この工程では、前述の特性（a）、（b）に基づき、各細胞でのmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAの翻訳抑制効果を、計算により得る。より具体的には、前記工程（1）の測定値から得られる、dが0の際の仮想的な翻訳抑制率を、 $d^{-0.576}$ 乗したもの（dは、マーカー遺伝子の開始コドンからのmiRNA応答配列の距離）を、miRNA応答配列の数だけ積算することによって算出する。
- [0044] 前記工程（1）の測定結果から、それぞれの1-slot mRNAについて、AUGからの距離d（nt）における翻訳抑制効果 $\rho^{(d)}$ の実測値を得ることができる。そして、式（b）に基づき、 $\rho^{(d)}$ の実測値、並びに位置dにおけるtuning factor k値から、特定のmiRNAの仮想の翻訳抑制効果である $\rho^{(0)}$ を得ることができる。なお、dは、工程（1）で設計したそれぞれの1-slot mRNAの間で、同一であってもよく、異なっていても、同じように $\rho^{(0)}$ の値を導出することが可能である。本発明においては、式（a）及び（b）の示す原理に基づいて所望の翻訳抑制効果を測定することができればよく、例えば工程（1）の試験条件（1-slot mRNAの設計条件等）によっては、 $\rho^{(0)}$ の値を直接的に算出する必要が無い場合もある。
- [0045] そうすると、AUGから異なる距離dにある、あるmiRNA応答配列の単独で翻訳抑制効果は、 $\rho^{(0)} \cdot d^{-0.576}$ で表される。そして、式（a）に基づいて、miRNA応答配列の数だけこの値を積算することで、mRNAの翻訳抑制効果予測値（計算値）が得られる。なお、式（a）において、空スロットの翻訳抑制効果は1である（翻訳抑制しない）。この方法によれば、5のスロットを備えるmiRNA応答性mRNAの翻訳抑制効果を、例えば選択したすべてのmiRNA応答配列について、網羅的に計算することができる。
- [0046] ただし、miRNA応答配列には20塩基程度の長さがあるため、miRNA標的配列が重なるような位置にスロットを設計することはできない。また、式（a）

、（b）による計算上は、1以下のmiRNA標的配列を含むmRNAを原理的には排除しない。

[0047] 上記の工程（1）の後であって、（2）の前には、前記工程（1）の測定結果に基づき、前記工程（2）の算出に使用するmiRNA応答配列の種類を、多変量解析、例えば、主成分分析やクラスター分析を用いて限定する工程をさらに含んでもよい。この工程を本明細書で、「限定工程」とも指称する。前記工程（1）では、例えば測定する1-slot mRNAを、100種以上、200種以上とする場合があり、工程（1）で探索した全てのmiRNAについて、あらゆる組み合わせのmRNAを設計して探索すると、その組み合わせが膨大になることがある。したがって、工程（1）で得られた細胞ごとのmiRNA活性のプロファイルを、主成分分析およびクラスター分析などの多変量解析を実施し、細胞の分離に有効なmiRNAを限定することができる。主成分分析においては、寄与率の高い主成分に対して、それぞれ主成分負荷量の絶対値が高いmiRNAを、細胞の分離に有用なmiRNAとして選択できる。またクラスター分析においては、同一クラスターに分類されるmiRNA群から代表的なmiRNAを選択することによって、細胞分離への有用性が低いと期待されるその他のmiRNAを排除することができる。本発明の実施例では、270種のmiRNA応答配列から、この段階で26miRNA応答配列にまで絞ってから、工程（2）を実施している。これらの多変量解析によって、工程（2）において算出するmRNAの構成を1、あるいはそれ以上の数に限定することができる。

[0048] また、この段階で、miRNA応答配列の種類のみならず、スロットの数や位置などを、ある程度固定したmRNAの構成を設計することができる。図2a及び後述する実施例では、5-slotのmRNA、slot間距離2nt、最も開始コドンに近いslotと開始コドンの距離2nt、という構成に固定して工程（2）を実施している。このようなslotの位置及び数構成は、当業者が適宜決定することができる。そして、このような設計において、細胞の分離のために2種以上のmiRNA応答性mRNAを設計しようとするとき、2種以上のmiRNA応答性mRNAのセットでは、スロットの位置や数が互いに同じであっても異なっていてもよく、m

iRNA応答性mRNAの5'UTRの全長も、互いに同じであっても異なっていてもよい。いずれもこの段階で適宜設計することができる。

[0049] この限定工程は、工程（2）で網羅的な計算をすることが可能な場合は、原理的には必須ではなく、任意選択的に行ってよい工程である。

[0050] 工程（3）は、前記工程（2）で算出された値より、2以上の対象細胞間における翻訳抑制効果の差が最大になるmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAを選択する工程である。この工程では、翻訳抑制効果の差が最大になるように、各スロットに挿入されるmiRNA応答配列及び非miRNA応答配列を選択する。

[0051] 工程（2）において、それぞれAUGから任意の塩基数離れた場所にある、任意の数のスロットをもつmRNAを設計することができ、設計されたmRNAを目的の細胞に導入したときの、各細胞における発現量は計算して得ることができる。すなわち、任意に設計したmRNAを細胞に導入した結果は推測することができる。工程（2）において多種類のmRNAを設計し、細胞に導入したときの各細胞における推測値を計算すれば、そのなかから、任意の条件を設定して目的に応じた効果を持つmRNAを得ることができる。例えば、対象とする複数種類の細胞に導入した場合に細胞を分離する能力の高いmRNAを得たい場合、設計したmRNAごとの各細胞における発現量の分散を指標として、最も分散が大きいmRNAを、細胞分離能が最も高いと期待されるmRNAとして選択することができる。2種類以上の設計mRNAを同時に細胞に導入した場合であっても、それぞれのmRNAの各細胞における発現量が計算で得られるため、任意の条件を設定して目的に応じた効果を持つmRNAの組み合わせを得ることができる。例えば、4種類のmRNAを細胞に導入して、2種類のmRNAずつの発現量の比率を指標にして細胞を分類しようとする場合、4種類のmRNAごとの各細胞における発現量が工程（2）で得られているため、それらの比率を計算し、4種類のmRNAひとセットごとに各細胞における2つの蛍光比率をパラメータとして得ることができる。任意のmRNAを4種類選んだ任意のmRNAセットについて、得られた2パラメータのばらつき、任意の2つの細胞間の差、あるいはその差の積算値

が最大となるmRNAセットを計算結果から探索することができる。

[0052] 工程（3）において探索の対象となるmRNAの数は、限定工程でどの程度まで、スロットに挿入するmiRNA候補数や、スロット数を絞るかにより異なる。例えば、限定工程で、計算により単一のmRNA、あるいは4種類のmRNAひとセットにまで絞った場合には、実質的に工程（3）は、工程（2）で翻訳抑制効果を計算した単一のmRNA、あるいは4種類のmRNAひとセットを、そのまま選択するだけとなる場合もある。

[0053] また、工程（3）においては、分散、複数パラメータのはらつき、任意の2つの細胞間の差、あるいはその差の積算値の計算結果のみに基づいて、最終的な単一のmRNA、あるいは2～4種類のmRNAひとセットを選択することもできるし、さらに実験的手法で翻訳抑制効果を測定し、分散、複数パラメータのはらつき、任意の2つの細胞間の差、あるいはその差の積算値の計算結果と合せて、最終的な単一のmRNA、あるいは2～4種類のmRNAひとセットを選択することもできる。すなわち、工程（2）で翻訳抑制効果を計算した全てのmRNAについて、あるいは工程（2）で翻訳抑制効果を計算したmRNAのうち、工程（3）で分散、複数パラメータのはらつき、任意の2つの細胞間の差、あるいはその差の積算値の計算結果からある程度絞り込んだmRNAについて、実際に遺伝子工学的手法により、これらのmRNAを調製し、対象細胞に導入して分離方法を試験する。その結果、実際に対象細胞の分散、複数パラメータのはらつき、任意の2つの細胞間の差、あるいはその差の積算値が最大となるmRNAを選択して、本発明の設計を完了することもできる。

[0054] 次に、工程（1）～（3）を例に基づき説明する。

### 工程（1）

1-slot mRNAを用いて、各細胞におけるmiRNA活性を具体的に測定する。ここではmiRNA応答mRNAの発現量として考えるため、発現量が小さいものほど活性は高くなる。また、以後の計算のため対数で考える。そのため、全く活性がない場合が0、発現量を1/10まで抑制する場合が-1、1/100まで抑制する場合が-2と負の数字が小さいほど抑制力が高い。細胞 A, B, C, D を対象に解

析して、以下のような結果を得たとする。

[0055] [表1]

	miRNA の活性 (各細胞における miRNA 応答 mRNA の発現量の対数)			
	細胞 A	細胞 B	細胞 C	細胞 D
miR-1	0 (発現量 = 1)	-0.5	-1	-2
miR-2	-1 (発現量 = 0.1)	-0.1	-0.8	-0.2
miR-3	-2 (発現量 = 0.01)	-2	-0.4	-1.2
miR-4	0.5	0	-2	0.1

[0056] 工程 (2)

上記工程で、それぞれの細胞ごとにmiRNAの活性がわかれば、複数のmiRNA標的配列を含むあるmRNAを作つて細胞に導入した時に、各細胞における発現量を予想することができる。このとき、予想値は  $k \times$  上記対数の和で与えられる。 $k$ の値はスロットのAUGからの距離 ( $d[nt]$ ) で決まり、 $k=d^{-0.576}$ で求まる。ただし、以下の例では簡単のため直接  $k$  を与える（そういうdのところにスロットがあるmRNAだとする）。

[0057] [表2]

スロット					各細胞における発現量の対数			
$k=0.05$	$k=0.1$	$k=0.2$	$k=0.4$	$k=0.8$	細胞 A	細胞 B	細胞 C	細胞 D
空	miR-1	空	miR-2	空	a	b	c	d
miR-3	miR-4	miR-4	空	miR-3	e	f	g	h

$a = 0.1 \times 0 + 0.4 \times -1 = -0.4$  (このmRNAの発現量は  $10^{-0.4} = 0.398$  と計算される。)

$$b = 0.1 \times -0.5 + 0.4 \times -0.1 = -0.09$$

$$c = 0.1 \times -1 + 0.4 \times -0.8 = -0.42$$

$$d = 0.1 \times -2 + 0.4 \times -0.2 = -0.28$$

[0058] 例えば、miRNA 100 個を解析対象としていて、あらかじめAUGからの距離が

固定されている5つのスロットを含むmRNA（たとえば5つのスロットの距離を105 nt, 80 nt, 65 nt, 40 nt, 15ntとする）は、各スロットにはmiRNA標的配列100種類または空配列の101種類が入ることができる。作成可能な5-slot mRNAは  $101 \times 101 \times 101 \times 101 \times 101 = 10,510,100,501$  種類の mRNA（ただし、このうち1種類は全て空）を作ることができ、そのmRNAを各細胞に導入した場合の発現量が計算できる。このmRNAとはスロットの距離が違う値に固定されたmRNAも同様の計算で10,510,100,501種類設計できる。たとえば5つのスロットの距離が106 nt, 80 nt, 65 nt, 40 nt, 15ntのものも10,510, 100,501 種類できるし、104 nt, 80 nt, 65 nt, 40 nt, 15nt のものも、106 nt, 83 nt, 62 nt, 41 nt, 13nt のものも10,510,100,501 種類できる。スロット数を5以外にした場合も同様で、それぞれAUGから任意の塩基数離れた場所にある、任意の数のスロットをもつmRNAを設計でき、そのmRNAをこれらの細胞に導入した場合の、各細胞における発現量を計算によって得ることができます。

#### [0059] 工程（3）

あるmRNAを使用した時の細胞の分離具合を、そのmRNAを使用した時のそのmRNAの発現量の対数の分散を指標として計算する。

スロットの構成が、5'側から順に「空/miR-1/空/miR-2/空」のmRNAの場合、発現量の対数值は (A, B, C, D) = (-0.4, -0.09, -0.42, -0.28) ので、このmRNA（を用いた場合の対象細胞）の標本分散は 0.0172と計算できる。例えば、「空/miR-1/空/miR-2/空」と「miR-3/ miR-4/miR-4/空/miR-3」のmRNAを使った場合、「miR-3/ miR-4/miR-4/空/miR-3」の発現量は以下の通り。

$$e = (0.05+0.8) \times -2 + (0.1+0.2) \times -0.5 = -1.85$$

$$f = (0.05+0.8) \times -2 + (0.1+0.2) \times -0 = -1.7$$

$$g = (0.05+0.8) \times -0.4 + (0.1+0.2) \times -2 = -0.94$$

$$h = (0.05+0.8) \times -1.2 + (0.1+0.2) \times -0.1 = -1.05$$

このmRNAの標本分散は 0.156と計算できる。また、これら2つの値で細胞を

分類しようとする場合、 $\{A, B, C, D\} = \{(-0.4, -1.85), (-0.09, -1.7), (-0.42, -0.94), (-0.28, -1.05)\}$  となる。そこで 2 変数の相関係数を計算すると  $-0.320$  となる。例えば、標本分散および相関係数を 2 パラメータのばらつきの指標として用いることができる。

- [0060] miRNA応答性mRNAは、上記工程（1）～（3）に従って設計され、その配列が決定されれば、遺伝子工学的に既知の任意の方法により当業者が合成することができる。特には、プロモーター配列を含むテンプレートDNAを鑄型として用いた*in vitro*転写合成法により、得ることができる。
- [0061] したがって、本発明は、上記工程（1）～（3）を含む設計の工程と、合成工程とを含む、mRNAの製造方法とも捉えることができる。製造したmRNAは、第2実施形態において詳述する分離方法において、好適に用いることができる。
- [0062] 本発明は、第2実施形態によれば、2以上の対象細胞を分離する方法に関する。当該方法は、第1実施形態の方法で設計され、合成されたmiRNA応答性mRNAを用いて、マーカー遺伝子の翻訳量を指標として2以上の対象細胞を分離する。miRNA応答性mRNAで測定するのは、第1実施形態の方法において用いた対象細胞内の特徴を反映したなにかしらの指標といえるので、設計したmRNAあるいはmRNAのセットをどのような細胞、細胞の混合物に導入することもできる。ただし、mRNAを設計したときに根拠となった対象細胞の組み合わせとなるべくよく分類しようとするような指標となっている。
- [0063] 本実施形態による分離方法では、第1実施形態により設計され、合成されたmRNAを用いる。したがって、第1実施形態により設計され、合成された1種類のmiRNA応答性mRNAを用いることもでき、2種類、3種類、4種類以上のmiRNA応答性mRNAを用いることもできる。2種類以上のmiRNA応答性mRNAを用いる場合には、第1実施形態により、細胞の分離を最大にするように設計された5'UTRの配列及びマーカー遺伝子がそれぞれ異なる2種類以上のmiRNA応答性mRNAのセットを用いる。特には、5'UTRの配列及びマーカー遺伝子がそれぞれ異なる4種類のmiRNA応答性mRNAから構成されるセットを用いること

がより好ましい。

[0064] 具体的な方法としては、4種類のmiRNA応答性mRNAを、対象細胞を含む細胞群に共導入し、マーカー遺伝子の翻訳量を指標として対象細胞を分離することができ、詳細な実験手順及び測定法は、第1実施形態の工程（1）と概ね同様である。したがって、測定は種々の方法で可能であるが、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合であって、フローサイトメトリーで測定する場合を例として説明する。4種類のmiRNA応答性mRNAから測定される蛍光強度をそれぞれ、FL1、FL2、FL3、FL4とした場合に、FL1/FL2、FL3/FL4の蛍光強度比をそれぞれX軸、Y軸とした場合のドットプロットで、細胞を分離することができる。あるいは、6種類のmiRNA応答性mRNAから測定される蛍光強度を、同様にして、2種類ずつの蛍光強度比とし、それぞれX軸、Y軸、Z軸とした場合のドットプロットで、細胞を分離することもでき、理論上の上限はない。

[0065] このような分離はまた、イメージアナライザーを用いたイメージングサイトメトリーでも実施することができる。イメージアナライザーは、細胞内のマーカー遺伝子の翻訳量の経時変化の情報を得ることができ、また、画像化、視覚化の点で優れており、単位時間あたりの解析量を向上できるほか、細胞の形態情報や位置情報を包含した解析、培養容器に接着した状態の細胞や、平面的あるいは立体的に組織化された細胞群を対象にした細胞の同定といった応用が可能となる点で有利である。

## 実施例

[0066] 以下に、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は本発明を限定するものではない。

### [0067] mRNAの配列

本実施例で使用した5-slot mRNAの5' UTR配列は、表3の配列番号2～115に、1-slot mRNA の5' UTR配列は、表5の配列番号122～391に示す。

### [0068]

[表3-1]

<b>Figure</b>	<b>slot-1</b>	<b>slot-2</b>	<b>slot-3</b>	<b>slot-4</b>	<b>slot-5</b>	<b>5' UTR sequence (Sequence ID No)</b>	<b>Protein</b>
control	-	-	-	-	-	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGCACGCUGACAAUU CAAGCACUCUGAUUUGACAUUACAAGCACUG AUUUGACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 )	hmA G1
Fig.2 a	-	miR-17-5 p	-	miR-92a-3p	-	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACCUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCGAACGGCACGCUGACAAUU ACAGGCCGGACAAGUGCAAAAGCACUCUGAU UUGACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 )	hmA G1
Fig.2 a	miR-21-5 p	-	-	-	miR-92a-3p	GGUCAACAUCAUCAGUCUGAUAGCUACCGCUUGAAG UCUUAAAACGAACGGCACGCUGACAAUU AGCACUCUGAUUUGACAUUACAGGCCGGACA AGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 )	hmA G1
Fig.2 a	-	-	-	miR-21-5 p	miR-17-5 p	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGCACGCUGACAAUU UCAACAUCAUCAGUCUGAUAGCUACUACCUGCACUG UAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 4 )	hmA G1
Fig.2 a	-	miR-21-5 p	-	miR-17-5 p	-	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACAUACAUCAG UCUGAUAGCUACGAACGGCACGCUGACAAUC CUACCUUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCUGA UUUGACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 5 )	hmA G1
Fig.2 a	-	miR-92a-3p	-	-	miR-34a-5p	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACAGGCCGG ACAAGUGCAAUACGAACGGCACGCUGACAAUA AGCACUCUGAUUUGACAUUACAACCAGCUAG ACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 )	hmA G1
Fig.2 a	miR-34a-5p	-	miR-34a-5p	miR-34a-5p	miR-92a-3p	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUAAAACCAACCAGCUAAGACACUGCA GACAACCAGCUAAGACACUGCCAACAGGCCGG CAAGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 )	hmA G1
Fig.2 a	-	-	miR-17-5 p	-	miR-34a-5p	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACCGCUUGAAG UCUUAAAACUACCUACUGCACUGUAAGCACUU GGAAGCACUCUGAUUUGACAUUACAACCAGCU AAGACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 )	hmA G1
Fig.2 a	-	miR-17-5 p	miR-34a-5p	-	miR-34a-5p	GGCCGUUGAAGCUUUAAAACCUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGACAACCAGCUAAGACACUGCC AGAACGACUCUGAUUUGACAUUACAACCAGCU AAGACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 )	hmA G1
Fig.2 a	miR-34a-5p	-	miR-92a-3p	-	miR-17-5 p	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUAAAAGACAGGCCGGACAAGUGCAAU AAAGCACUCUGAUUUGACAUUACUACCUGCACU GUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 10 )	hmA G1
Fig.2 a	miR-34a-5p	miR-92a-3p	-	miR-34a-5p	miR-17-5 p	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCAACAGGCCGG ACAAGUGCAAUACGAACGGCACGCUGACAAUA CAACCAGCUAAGACACUGCCACUACCUGCACUGU AAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 11 )	hmA G1

[表3-2]

Fig.2 a	miR- 17-5 p	miR- 21-5 p	-	-	miR- 34a- 5p	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGUCAACAU GUCUGAUAGCUACGAACGGGCACGCUGACAAU AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUA GACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 2 )	hmA G1
Fig.2 a	miR- 21-5 p	-	miR- 92a- 3p	miR- 17-5 p	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUAAAAGACAGGCCGGGACAAGUGCAAU ACUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCUG AUUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 3 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	-	miR- 34a- 5p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUA GACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 4 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 34a- 5p	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU ACAACCAGCUAAGACACUGCCAAAGCACUCUGAU UUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 5 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 34a- 5p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCGCUUGAA UCUUUAAAACCAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 6 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	-	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAUC AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 7 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	-	-	-	GGACACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAA UCUUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 8 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU ACAACCAGCUAAGACACUGCCACACCGAGCUAAG ACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 9 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCGCUUGAA UCUUUAAAACCAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUA AGACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 0 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	-	-	miR- 34a- 5p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAU AGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUAAG ACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 1 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	-	-	miR- 34a- 5p	GGACACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAA UCUUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU AGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUAAG ACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 2 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAACCAACCAGCU GCUUAAAACCAACCAGCUAAGACACUGCCA GACAACCAGCUAAGACACUGCCAAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 3 )	hmA G1

[表3-3]

Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	-	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAACCAGCUAAGACACUGCCAAAGCACUCUGAUU UGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	-	miR- 34a- 5p	-	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUUAAAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	-	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACAACCAGCU AAGACACUGCCAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	-	-	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUUAAAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	-	-	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCAACAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAUUC AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 8 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAACCAGCUAAGACACUGCCAACAACCAGCUAAGA CACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 9 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUUAAAACAACCAGCUAAGACACUGCCA CAACCAGCUAAGACACUGCCAACAACCAGCUAAGA CACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 0 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACAACCAGCU AAGACACUGCCAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUA AGACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 1 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUUAAAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUA AGACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 2 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	-	miR- 34a- 5p	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCAACAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAUUA AGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAACCAGCUAAG ACACUGCCACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 3 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACAACCAGCU AAGACACUGCCAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GACAACCAGCUAAGACACUGCCAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 4 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCACCGCUUGAAG UCUUUAAAACAACCAGCUAAGACACUGCCA GACAACCAGCUAAGACACUGCCAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 5 )	hmA G1

[表3-4]

Fig.2 d	miR- 34a- 5p	miR- 34a- 5p	-	miR- 34a- 5p	-	GGACAACCAGCUAAGACACUGCCAACAACCAGCU AAGACACUGCCACGAACGGGCACGCUGACAAUU CAACCAGCUAAGACACUGCCAAAGCACUCUGAUU UGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 6 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	-	miR- 17-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCCGUUGAA GUCUUUAUUAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCACU GUAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 3 7 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 17-5 p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCCGUUGAA GUCUUUAUUAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 8 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 17-5 p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCCGUUGAA GUCUUUAUUAAACUACCUGCACUGUAAGCACUU UGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 3 9 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	-	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCGAACGGGCACGCUGACAAUU CAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 4 0 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	-	-	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAUUAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 4 1 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 17-5 p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCGCUUGAAG UCUUUAUUAAACUACCUGCACUGUAAGCACUU GGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 4 2 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCCGUUGAA GUCUUUAUUAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCUACCUGCAC GUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 4 3 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCGCUUGAAG UCUUUAUUAAACUACCUGCACUGUAAGCACUU GGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 4 4 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	-	-	miR- 17-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCGAACGGGCACGCUGACAAUU CAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCAC GUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 4 5 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	-	-	miR- 17-5 p	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAUUAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCAC GUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 4 6 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAAACCGCUUGAAG UCUUUAUUAAACUACCUGCACUGUAAGCACUU GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACU GAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 4 7 )	hmA G1

[表3-5]

Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	-	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCGAACGGGCACGCUGACAAUU CCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 4 8 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	-	miR- 17-5 p	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCUG AUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 4 9 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	-	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCUACCUGCACUGUAAGCACUU UGGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAAGCACUCU GAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 5 0 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	-	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCUACCUGCACUGUAAGCACUU UGGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAAGCACUCU GAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 5 1 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	-	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCUACCUGCA CUGUAAGCACUUUGCGAACGGGCACGCUGACAAUU UCAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACAAGCACUCU GAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 5 2 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCGAACGGGCACGCUGACAAUU CUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCUACCUGCACU GUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 5 3 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAUU CUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCUACCUGCACU GUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 5 4 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	GGCCGCUUGAAGUCUUUAUAAAACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCUACCUGCACUGUAAGCACUU UGGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCA CUGUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 5 5 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAUAAAACUACCUGCACUGUAAGCACUU UGGAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCA CUGUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 5 6 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	-	miR- 17-5 p	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCUACCUGCA CUGUAAGCACUUUGCGAACGGGCACGCUGACAAU UCAAGCACUCUGAUUUGACAAUUACUACCUGCAC UGUAAGCACUUUGCACCGGUCGCCACCAUG ( 5 7 )	hmA G1

[表3-6]

Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAAAUAACUACCUGCACUGUAAGCACUU UGGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUC UGAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 5 8 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCCGUUGAA GUCUUUAAAUAACUACCUGCACUGUAAGCACUU UGGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUC UGAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 5 9 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 17-5 p	miR- 17-5 p	-	miR- 17-5 p	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGCUACCUGCA CUGUAAGCACUUUGCACGGGACCGCUGACAAU UCCUACCUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCU GAUUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 0 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	-	miR- 21-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCCGUUGAA GUCUUUAAAACGAACGGGACCGCUGACAAUU AAGCACUCUGAAUUGACAAUUUAACACAGUC UGAUAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 1 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 21-5 p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCCGUUGAA GUCUUUAAAACGAACGGGACCGCUGACAAUU UCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAAGCACUCUGAU UUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 2 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 21-5 p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCCGUUGAA UCUUUAAAACGAACGGGACCGCUGACAAUU GAAGCACUCUGAAUUGACAAUUACAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 3 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	-	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCAACAUCA UCUGAUAGCUACGAACGGGACCGCUGACAAUU AAGCACUCUGAAUUGACAAUUACAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 4 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	-	-	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUAAAACGAACGGGACCGCUGACAAUU AAGCACUCUGAAUUGACAAUUACAAGCACUCUGA UUUGACAAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 5 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCCGUUGAA GUCUUUAAAACGAACGGGACCGCUGACAAUU UCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAUCAACAUCA UGAUAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 6 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCCGUUGAA UCUUUAAAACGAACGGGACCGCUGACAAUU GAAGCACUCUGAAUUGACAAUUUAACACAGUC CUGAUAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 7 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	-	-	miR- 21-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCCGUUGAA UCUGAUAGCUACGAACGGGACCGCUGACAAUU AGCACUCUGAAUUGACAAUUUAACACAGUC GAUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 8 )	hmA G1

[表3-7]

Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	-	-	miR- 21-5 p	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUUAAUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAUUA AGCACUCUGAUUUGACAUUUAUCAACAUCAUCAGUCU GAUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 6 9 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAACCGCUUGAAG UCUUUUAAUAAAUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUA GUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 0 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAUCAACAUCAUCAG UCUGAUAAAGCUACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAAGCACUCUGAUU UGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 1 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	-	miR- 21-5 p	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUUAAUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAAGCACUCUGAUU UGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 2 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAUCAACAUCAUCAG UCUGAUAAAGCUACAUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUA GAAGCACUCUGAUUUGACAUUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 3 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	-	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUUAAUAAAUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUA GAAGCACUCUGAUUUGACAUUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 4 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	-	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACAUCAACAUCA UCUGAUAAAGCUACGAACGGGCACGCUGACAAUUC AAGCACUCUGAUUUGACAUUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 5 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAUCAACAUCAUCAG UCUGAUAAAGCUACAUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUA CAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACAUCAACAUCAUCAGU GAUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 6 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUUAAUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACAUCAACAUCAUCAGU GAUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 7 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	GGCCGUUGAAGUCUUUAAAUCAACAUCAUCAG UCUGAUAAAGCUACAUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUA GAAGCACUCUGAUUUGACAUUUAUCAACAUCAUCAGU CUGUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 8 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGCUUGAAG UCUUUUAAUAAAUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUA GAAGCACUCUGAUUUGACAUUUAUCAACAUCAUCAGU CUGUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 7 9 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	-	miR- 21-5 p	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACAUCAACAUCA UCUGAUAAAGCUACGAACGGGCACGCUGACAAUUA AGCACUCUGAUUUGACAUUUAUCAACAUCAUCAGU GAUAAGCUACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 0 )	hmA G1

[表3-8]

Fig.2 d	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACAUCAUCAG UCUGAUAGCUAUCAACAUCAGUCUGUAAGCUA GUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAAGCACU GUAUUGACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 1 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUACCGC UUGAAGUCUACAGUCUGUAAGCUAAAGCACU GUAUUGACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 2 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 21-5 p	miR- 21-5 p	-	miR- 21-5 p	-	GGUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAUCA ACAGUCUGUAAGCUAAAGCACUCUGAU UGACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 3 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	-	miR- 92a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGGCC GAGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 4 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 92a- 3p	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAAU ACAGGCCGGAACAAGUGCAAUUAAGCACU GUAUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 5 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 92a- 3p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA GUCUUAAAACAGGCCGGAAGUGCAA AAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACU GUAUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 6 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	-	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACAGGCC ACAAGUGCAAUACGAACGGGCACGCUGAC AAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACU GUAUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 7 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	-	-	-	GGACAGGCCGGAACAAGUGCAA UCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAA AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACU GUAUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 8 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 92a- 3p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAA AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACU GUAUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 8 9 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAA AAGGCCGGAACAAGUGCAA AAGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 0 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA GUCUUAAAACGAACGGGCACGCUGACAA AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGGCC CAAGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 1 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	-	-	miR- 92a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUAAAUAACCCGCUUGAA ACAAGUGCAA AGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGGCC AGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 2 )	hmA G1

[表3-9]

Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	-	-	miR- 92a- 3p	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUACCGCUUGAAG UCUUUAAUUAACGAACGGGCACGCUGACAAUUA AGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGGCCGGGACA AGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 3 )	hmA G1
Fig.2 d	-	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAACCGCUUGAAG UCUUUAAUUAAGACAGGCCGGACAAGUGCAAU AACAGGCCGGACAAGUGCAAUAAGCACUCUGAUU UGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 4 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAACAGGCCGGG ACAAGUGCAAUACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAGGCCGGACAAGUGCAAUAAGCACUCUGAUU UGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 5 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	-	miR- 92a- 3p	-	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUACCGCUUGAAG UCUUUAAUUAACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAGGCCGGACAAGUGCAAUAAGCACUCUGAUU UGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 6 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAACAGGCCGGG ACAAGUGCAAUAGACAGGCCGGACAAGUGCAAU AAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 7 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	-	-	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUACCGCUUGAAG UCUUUAAUUAAGACAGGCCGGACAAGUGCAAU AAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 8 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	-	-	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUAACAGGCCGGG ACAAGUGCAAUACGAACGGGCACGCUGACAAUUC AAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGCACUCUGA UUUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 9 9 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAACAGGCCGGG ACAAGUGCAAUACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAGGCCGGACAAGUGCAAUAACAGGCCGGACA AGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 0 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUACCGCUUGAAG UCUUUAAUUAACGAACGGGCACGCUGACAAUUA CAGGCCGGACAAGUGCAAUAACAGGCCGGACA AGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 1 )	hmA G1
Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUUAACAGGCCGGG ACAAGUGCAAUAGACAGGCCGGACAAGUGCAAU AAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGGCCGGGA CAAGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 2 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUACCGCUUGAAG UCUUUAAUUAAGACAGGCCGGACAAGUGCAAU AAAGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGGCCGGGA CAAGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 3 )	hmA G1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	-	miR- 92a- 3p	GGACAGGCCGGGACAAGUGCAAUAACAGGCCGGG ACAAGUGCAAUACGAACGGGCACGCUGACAAUUA AGCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGGCCGGACA AGUGCAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 4 )	hmA G1

[表3-10]

Fig.2 d	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	GGCCGUUGAAGUCUUUAUAAAACAGGCCGGGA CAAGUGCAAUAGACAGGCCGGACAAGUGCAAUA CAGGCCGGACAAGUGCAAUAAGCACUCUGAUUU GACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 5 )	hm AG 1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	GGACAGGCCGGACAAGUGCAAUACGCCUUGAAGU CUUUAAUAAAAGACAGGCCGGACAAGUGCAAUA CAGGCCGGACAAGUGCAAUAAGCACUCUGAUUU GACAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 6 )	hm AG 1
Fig.2 d	miR- 92a- 3p	miR- 92a- 3p	-	miR- 92a- 3p	-	GGACAGGCCGGACAAGUGCAAUAACAGGCCGGGA CAAGUGCAAUACGAACGGGCACGCUGACAAUACA GGCCGGACAAGUGCAAUAAGCACUCUGAUUUGA CAAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 7 )	hm AG 1
Fig.3 e	miR- 4510	miR- 199a- -5p	-	-	let-7i- -5p	GGAACCAUACAUCCUACUCCCUCAGAACAGGUAGU CUGAACACUGGGCGAACGGGCACGCUGACAAUUA GCACUCUGAUUUGACAAUUAACAGCACAAACUAC UACCUCACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 8 )	hm AG 1
Fig.3 e	miR- 135a- -5p	miR- 135a- -5p	miR- 302a- -5p	miR- 135a- -5p	miR- 135a- -5p	GGUCACAUAGGAAUAAAAGCCAUAUCACAUAGGA AUAAAAAGCCAUAAGCAAGUACAUCCACGUUUUAG UGUCACAUAGGAAUAAAAGCCAUAUCACAUAGGA AUAAAAAGCCAUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 0 9 )	hm KO 2
Fig.3 e	miR- 302a- -5p	miR- 199a- -5p	miR- 199a- -5p	miR- 302a- -5p	miR- 199a- -5p	GGAGCAAGUACAUCCACGUUUUAGUGAACAGGUAG UCUGAACACUGGGAACAGGUAGCUGAACACUGG GACAGCAAGUACAUCCACGUUUUAGUGAACAGGUA GUCUGAACACUGGGCACCGGUCGCCACCAUG ( 1 1 0 )	tag BFP
Fig.3 e	miR- 200b- -3p	miR- 200b- -3p	miR- 200b- -3p	miR- 200b- -3p	miR- 200b- -3p	GGUCAUCAUACCAGGCAGUAUUUAUCAUCAUUACC AGGCAGUAUUUAUCAUCAUCAUCAUCAUCAUCAU UCAUCAUCAUCAUCAUCAUCAUCAUCAUCAU GCAGUAUUACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 1 1 )	hdK Red
Fig.4 e	-	miR- 367- 3p	-	-	miR- 302a- -5p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUAAAACACCAUUGC AAAGUGCAAUCGAACGGGCACGCUGACAAUUAAG CACUCUGAUUUGACAAUUAAGCAAGUACAUCCACG UUUAAGUCACCGGUCGCCACCAUG ( 1 1 2 )	hm AG 1
Fig.4 e	-	miR- 27a- 3p	-	miR- 27a- 3p	miR- 27a- 3p	GGCCGUUGAAGUCUUUAUAAAAGCGGAACUUAG CCACUGUGAACGAACGGGCACGCUGACAAUUGCG GAACUUAGCCACUGUGAAAGCGGAACUUAGCCACU GUGAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 1 3 )	hm KO 2
Fig.4 e	miR- 20a- 5p	miR- 367- 3p	miR- 373- 3p	miR- 27a- 3p	miR- 143- 3p	GGCUACCUGCACUUAAGCACUUUAUCAU UAAAGUGCAAUUAACACCCAAAUCGAAGCACUUC GCGGAACUUAGCCACUGUGAAGAGCUACAGUGCUU CAUCUCACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 1 4 )	tag BFP
Fig.4 e	miR- 17-5 p	-	miR- 93-5 p	miR- 17-5 p	-	GGCUACCUGCACUGUAAGCACUUUUGCCGUUGAAG UCUUUAUUAACUACUGCACGAACAGCACUUUG CUACCUUGCACUGUAAGCACUUUGAAGCACUCUGAU UUGACAAUUAACACCGGUCGCCACCAUG ( 1 1 5 )	hdK Red

[0069] [表4-1]

name	sequence (5' to 3')	Seq ID N o.
1slot contr ol 5'UTR	GGGCGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAUUAAGACACCGGUCGC CACCAUG	1 1 6
hmAG1 OR F	AUGGUGAGCGUGAUCAAGCCGAGAUGAAGAUCAAGCUGUGCAUGAGGGCAC CGUGAACGGCCACAACUUCGUGAUCGAGGGCGAGGGCAAGGGCAACCCCUACG AGGGCACCCAGAUCCUGGACCUGAACGUGACCGAGGGCGCCCCCUUGCCCUUC GCCUACGACAUCCUGACCACCGUGUUCCAGUACGGCAACAGGGCCUUCACCAA GUACCCC CGGCGACAUCAGGACUACUUCAAGCAGACCUUCCCGAGGGCUACCA CUGGGAGAGGAUGACCUACGAGGACAGGGCAUCUGCACCGCCACCAGCA ACAUCAGCAUGAGGGCGACUGCUUCUUCUACGACAUCAUGGUUCGACGGCACC AACUUCCCCC CAACGGCCCCGUGAUGCAGAAGAAGACCCUGAAGUGGGAGCCC AGCACCAGAGAAGAUGUAUCGUGGAGGACGGCGUGCUGAAGGGCGACGUGAACAU GAGGCUGCUGCUGGAGGGCGGCCACUACAGGUGCGACUUAAGACCACCU ACAAGGCCAAGAAGGAGGUGAGGCUGCCGACGCCACAAGAUCGACCAAGGG AUCGAGAUCUGAAGCACGACAAGGACUACAACAAGGUGAAGCUGUACGAGAA CGCCGUGGCCAGGUACUCCAUGCUGCCAGCCAGGCCAGUGAAGUGA	1 1 7
hmKO2 OR F	AUGGUGAGUGUAAUAAAACCAGAGAUGAAGAUGAGGUACUACAUGGACGGCUC CGUCAUGGGCAUGAGUUCACAAUUGAAGGGUGAAGGGCACAGGCAGACCUUACG AGGGACAUCAAGAGAUGACACUACGCGUCACAAUGGGCGAGGGCGGGCCAUG CCUUUCGCUUUGACUUAUGUGUCACACGUGUUCUGUACGGCCACAGAGUAAU UACUAAAUAUCCAGAAGAGAUACCAGACUAAUUCAAACAAGCAUUIUCCUGAAGG CCUGUCAUGGGAAAGGUGCUUGGAGUCCAGAAGAUGGGUGGUCCUUCAGUC AGUGCGCAUUAAGCCUUAAGAGGAACACCUUCUACCAAAUCCAAUUUACU GGGUUAACUUCUGCCGAUGGUCCUAUCAUGCAAACCAAGUGUUGAUUG GGAGCCAUCACCGAGAAAAAUACUGCCAGCGACGGAGUUCUGAAGGGUGAUG UUACGAUGUACCUMAACUUGAAGGAGGCGCAUCACAAAUGCCAAUUGAAG ACUACUJUACAAGGGCGAAAGAGAUUCUUGAAUUGCCAGGAGACCAUUAUACU CGGCCAUCGCCUUCGUCAGGAAACCGAAGGCAACAUACUGAGCAGGUAGAAG AUGCAGUAGCUCAUUCUGA	1 1 8
TagBFP OR F	AUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAACAUAGCACAUGAAGCUGUACAUUGGA GGGCACCGUGGACAACCAUCACUUCAGUGACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGC CCUACGAGGGCACCCAGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUUCGAGGGCGGGCCUCUC CCUUCGCUUUCGACAUCUCCUGGUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUU CAUCAACCACCCCAGGGCAUCCCCGACUUCUCAAGCAGUCCUUCUCCUGAGGG CUUCACAUGGGAGAGAGUCACCAUACGAAGACGGGGCGUGCUGACCGC CCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUACUACACGUCAAGAUCAGAG GGGUGAACUUCACAUCCAACGGCCCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGG GAGGCCUUCACCGAGACGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAA CGACAUUGGCCUGAAGCUCUGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGA CCACAUUAAGAUCCAAGAAACCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGUCUACU AUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCAACACGAGACCUACGUC GAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGCGACCUCCUAGCAAACUGGG GCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGUGA	1 1 9

[表4-2]

hdKRed OR F	AUGGUGAGCGUGAUCGCCAACAGAGACCUACAAGGUGUACAUGUCCGGCAC CGUGAACGGCCACUACUUCGAGGGUGGAGGGCGACGGCAAGGGCAAGGCCUACG AGGGCGAGCAGACCGUGAAGCUGACCGUGACCAAGGGCGGCCCCUGCCCUUC GCCUGGGGACAUCCUGUCCCCCUGUCCAGUACGGCAGCAUCCCCUUCACCAA GUACCCGAGGACAUCCCCAGACUACGUGAAGCAGACGUUCCCCGAGGGCUACA CCUGGGAGAGGACCAUGAACUUCGAGGACGGCGCCUGUGCACCUGAGACAA GACUCCAGCAUCCAGGGCACUGCUUCAUCUACAACGUGAAGAUCAGCGGCAC CAACUUCCCCCACAACGGCCCGUGAUGCAGAAGAAGACCCAGGGCUGGGAGC CCAGCACCGAGAGGCUGUUCGCCAGGGACGGAAUGCUGAUCGGCAACGACUAC AUGGCCUGAAGCUGGAGGGCGGCCACUACCUGUGCGAGUUAAGUCCAC CUACAAGGCCAAGAACGCCCUGAGGAUGGCCGGUACCACUACUACUGACAGGAA GCUGGACGUGACCAGCCACACAGGGACUACACCUCCUGGGAGCAGUGCGAGA UCGCCAUCCGCCAGGCACAGCCUGCUGGGCUGA	1 2 0
3'UTR	UCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCCUUG CACCUUGUACCUUCUUGGUCUUUGAAUAAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAAAAAAA AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1 2 1

[0070]

[表5-1]

Transfection	miRNA	miRBases ID	5' UTR sequence (Sequence ID No)	Protein
7	hsa-miR-2 14-3p	MIMAT0 000271	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUGCCUGUCUGUGCCUGCU GUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 2)	hmAG1
8	hsa-miR-1 27-3p	MIMAT0 000446	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCCAAGCUCAGACGGAU CAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 3)	hmAG1
9	hsa-miR-9 2a-3p	MIMAT0 000092	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGGCCGGACAAGUGCAA UAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 4)	hmAG1
10	hsa-miR-3 39-5p	MIMAT0 000764	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUGAGCUCCUGGAGGACAG GGAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 2 5)	hmAG1
11	hsa-miR-1 33a	MIMAT0 000427	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGCUGGUUGAAGGGGACCA AAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 6)	hmAG1
12	hsa-miR-1 7-3p	MIMAT0 000071	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACAAGUGCCUUCACUGCA GUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 7)	hmAG1
13	hsa-miR-1	MIMAT0 000416	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAUACAUACUUUACAUUC CAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 8)	hmAG1
14	hsa-miR-2 06	MIMAT0 000462	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCACACACAUUCUACAUUC AAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 2 9)	hmAG1
15	hsa-miR-1 97-3p	MIMAT0 000227	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCUUGGGUGGAGAAGGUGGUG AAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 0)	hmAG1
16	hsa-miR-2 24-5p	MIMAT0 000281	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACCGAACUAGUGACUU GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 1)	hmAG1
17	hsa-miR-3 65a-3p	MIMAT0 000710	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAUAGGAAAAUUAGGGGCAU UAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 2)	hmAG1
18	hsa-miR-1 83-5p	MIMAT0 000261	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGUGAAUUCUACCAAGUGCCA UAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 3)	hmAG1
19	hsa-miR-3 31-3p	MIMAT0 000760	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUUCUAGGAUAGGCCAGGGG CAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 4)	hmAG1
20	hsa-miR-2 03a	MIMAT0 000264	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUAGUGGUCCUAAACAUUC ACAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 5)	hmAG1
21	hsa-miR-3 67-3p	MIMAT0 000719	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACCAUUGCUALAGUGCAA UUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 6)	hmAG1
22	hsa-miR-3 73-5p	MIMAT0 000725	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAAAGCGCCCCCAUUUUGA GUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 7)	hmAG1
23	hsa-miR-4 84	MIMAT0 002174	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAUCGGGAGGGGACUGAGCCU GAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 3 8)	hmAG1
24	hsa-miR-1 99a-5p	MIMAT0 000231	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAACAGGUAGUCUGAACACU GGGAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 3 9)	hmAG1
25	hsa-miR-3 70	MIMAT0 000722	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCAGGUUCCACCCAGCAG GCAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 0)	hmAG1
26	hsa-miR-3 82-5p	MIMAT0 000737	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGGAAGGGAGAGAGGGCC CAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 1)	hmAG1
27	hsa-miR-3 28	MIMAT0 000752	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACGGAGGGAGAGAGGGCC AGAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 2)	hmAG1

[表5-2]

28	hsa-miR-3 61-5p	MIMAT0 000703	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGUACCCCUUCCAGAUUCUGAU AAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 3)	hmAG1
29	hsa-miR-4 86-5p	MIMAT0 002177	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUUCCAGGUACAG AAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 4)	hmAG1
30	hsa-miR-4 50a-5p	MIMAT0 001545	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAUUUAGGAACACAUCGCAA AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 5)	hmAG1
31	hsa-miR-7 -5p	MIMAT0 000252	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAACAAAUCACUAGUCUUC CAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 4 6)	hmAG1
32	hsa-miR-1 87-3p	MIMAT0 000262	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCGGCUGCAACACAAGACACG AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 7)	hmAG1
33	hsa-miR-5 05-3p	MIMAT0 002876	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGGAAACCAGCAAGUGUUGA CGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 4 8)	hmAG1
34	hsa-miR-1 82-5p	MIMAT0 000259	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGUGAGUUCUACAUUGC CAAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 4 9)	hmAG1
35	hsa-miR-9 9a-5p	MIMAT0 000097	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCACAAGAUCGGAUCUACGGG UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 0)	hmAG1
36	hsa-miR-1 00-5p	MIMAT0 000098	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCACAAGUUCGGAUCUACGGG UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 1)	hmAG1
37	hsa-let-7a -5p	MIMAT0 000062	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACUAUACAACCUACUACCUC AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 2)	hmAG1
38	hsa-miR-1 91-5p	MIMAT0 000440	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAGCUGCUUUUUGGAUUCG UUGAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 5 3)	hmAG1
39	hsa-miR-1 9a-3p	MIMAT0 000073	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAGUUUUGCAUAGAUUUGC ACAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 5 4)	hmAG1
40	hsa-miR-9 9b-5p	MIMAT0 000689	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAGCAGGGACUUUGAGGCCAG UGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 5)	hmAG1
41	hsa-miR-1 93b-3p	MIMAT0 002819	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCAGGGACUUUGAGGCCAG UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 6)	hmAG1
42	hsa-miR-3 42-3p	MIMAT0 000753	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGGGUGCGAUUUCUGUGUG AGAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 5 7)	hmAG1
43	hsa-miR-3 20a	MIMAT0 000510	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCGCCCCUCAACCCAGCUU UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 8)	hmAG1
44	hsa-miR-3 4a-5p	MIMAT0 000255	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAACACCAGCUAAGACACUGCC AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 5 9)	hmAG1
45	hsa-miR-2 2-3p	MIMAT0 000077	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGUUUCUCAACUGGCAGC UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 6 0)	hmAG1
46	hsa-miR-1 0a-5p	MIMAT0 000253	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAAAUUCGGAUCUACAGG GUAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 6 1)	hmAG1
47	hsa-miR-4 23-3p	MIMAT0 001340	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUAGAGGGCCUCAGACCGA GCUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 6 2)	hmAG1
48	hsa-miR-3 0a-3p	MIMAT0 000088	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCUGCAAACAUCCGACUGAAA GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 6 3)	hmAG1
49	hsa-miR-1 51a-3p	MIMAT0 000757	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUCAAGGAGCUUCAGCUA GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (1 6 4)	hmAG1
50	hsa-miR-1 49-5p	MIMAT0 000450	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGAGUGAAGACACGGAGCC AGAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (1 6 5)	hmAG1

[表5-3]

51	hsa-miR-2 96-5p	MIMATO 000690	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGGAUUGAGGGGGGCC UAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (166)	hmAG1
52	hsa-miR-3 24-3p	MIMATO 000762	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAGCAGCACCUUGGGGCAGU AGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (167)	hmAG1
53	hsa-miR-1 06b-5p	MIMATO 000680	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAUCUGCACUGUCAGCACUU AAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (168)	hmAG1
54	hsa-miR-1 29-5p	MIMATO 000242	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCAAGCCCAGACCGAAAAAG AGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (169)	hmAG1
55	hsa-let-7g -5p	MIMATO 000414	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACUGUACAAACUACUACCUC AAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (170)	hmAG1
56	hsa-miR-2 12-3p	MIMATO 000269	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGGUGACUGGAGACUGUU AAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (171)	hmAG1
57	hsa-miR-2 8-5p	MIMATO 000085	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUAAUAGACUGUGAGCUCC UAGAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (172)	hmAG1
58	hsa-miR-1 86-5p	MIMATO 000456	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCCAAAAGGAGAAUUCUU UGAGAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (173)	hmAG1
59	hsa-miR-1 55-5p	MIMATO 000646	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCCUAUCACGAUUAGCAUU AAAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (174)	hmAG1
60	hsa-miR-4 85-5p	MIMATO 002175	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAUUCAUCACGGCCAGCCU CUAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (175)	hmAG1
61	hsa-miR-3 30-3p	MIMATO 000751	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCUCUGCAGGGCUGUGCUU UGCAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (176)	hmAG1
62	hsa-miR-3 45-5p	MIMATO 000772	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAGCCCUGGACUAGGAGUCA GCAGAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (177)	hmAG1
63	hsa-miR-5 00a-3p	MIMATO 002871	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGAAUCCUUGGCCAGGUGC AUAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (178)	hmAG1
64	hsa-miR-1 92-5p	MIMATO 000222	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGCUGUCAAUUCAUAGGUCA GAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (179)	hmAG1
65	hsa-miR-3 35-5p	MIMATO 000765	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAUUUUCGUUAUUGCUCU UGAAGAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (180)	hmAG1
66	hsa-miR-1 40-5p	MIMATO 000431	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACCAUAGGGUAAAACCACU GAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (181)	hmAG1
67	hsa-miR-1 8a-3p	MIMATO 002891	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAGAACAGGAGCACUUAGGGC AGUAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (182)	hmAG1
68	hsa-miR-1 48a-3p	MIMATO 000243	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAAAGUUCUGUAGUGCACU GAAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (183)	hmAG1
69	hsa-miR-1 24-3p	MIMATO 000422	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAUUCACCGCGUGGCCUUUA AGAUCAAAACACCGGUUCGCCACCAUG (184)	hmAG1
70	hsa-miR-9 -5p	MIMATO 000441	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACAGCUAGAUAAACCAA GAAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (185)	hmAG1
71	hsa-miR-1 26-3p	MIMATO 000445	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCAUUUUAUCACGGUAC GAAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (186)	hmAG1
72	hsa-miR-1 01-3p	MIMATO 000099	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUUCAGUUAUCACAGUACUGU AAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (187)	hmAG1
73	hsa-miR-1 35a-5p	MIMATO 000428	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACAUAGGAUAAAAGCCA UAAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (188)	hmAG1

[表5-4]

74	hsa-miR-1 41-3p	MIMATO 000432	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCAUUUACCAGACAGUGU UAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (189)	hmAG1
75	hsa-miR-1 54-5p	MIMATO 000452	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCGAAGGCAACACGGAUACCU AAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (190)	hmAG1
76	hsa-miR-1 95-5p	MIMATO 000461	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAUAAUUCUGUGCUGCU AAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (191)	hmAG1
77	hsa-miR-2 00b-3p	MIMATO 000318	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAUCAUUACCAGGCAGUAU UAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (192)	hmAG1
78	hsa-miR-2 00c-3p	MIMATO 000617	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAUCAUUACCCGGCAGUA UUAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (193)	hmAG1
79	hsa-miR-2 10	MIMATO 000267	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAUCAGCCGUGUCACACGCACA GAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (194)	hmAG1
80	hsa-miR-3 02a-5p	MIMATO 000683	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCAAGUACAUCCACGUUUA AGUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (195)	hmAG1
81	hsa-miR-3 75	MIMATO 000728	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCACCGGAGGCCAACCAA AAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (196)	hmAG1
82	hsa-miR-3 78a-3p	MIMATO 000732	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUCUGACUCCAAGUCCAG UAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (197)	hmAG1
83	hsa-miR-5 12-5p	MIMATO 002822	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAAAGUGGCCUCAAGGCUGA GUGAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (198)	hmAG1
84	hsa-miR-5 18b	MIMATO 002844	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCUAAAGGGGAGCGCUU UGAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (199)	hmAG1
85	hsa-miR-5 18c-3p	MIMATO 002848	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACACUCUAAAGAGAACGCU UUGAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (200)	hmAG1
86	hsa-miR-5 19d	MIMATO 002853	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUCUAAAGGGAGGCACUU UGAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (201)	hmAG1
87	hsa-miR-5 20g	MIMATO 002858	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACACUCUAAAGGGAAAGCACU UUGUJAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (202)	hmAG1
88	hsa-miR-5 23-3p	MIMATO 002840	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCUUAAGGGAGCGCG UUCAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (203)	hmAG1
89	hsa-miR-5 25-5p	MIMATO 002838	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGAAAGUGCAUCCCUCUGGA GAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (204)	hmAG1
90	hsa-miR-5 26a	MIMATO 002845	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGAAAGUGCUUCCCUCUAG AGAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (205)	hmAG1
91	hsa-miR-3 62-3p	MIMATO 004683	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGAAUCCUUGAAUAGGUGUG UUAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (206)	hmAG1
92	hsa-miR-5 89-5p	MIMATO 004799	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAGAGCAGACGUGGUUCU CAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (207)	hmAG1
93	hsa-miR-6 71-5p	MIMATO 003880	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAGCCCCUCCAGGGCUU CCUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (208)	hmAG1
94	hsa-miR-5 06-3p	MIMATO 002878	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCUACUCAGAAGGGUGCCUU AAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (209)	hmAG1
95	hsa-miR-1 25b-1-3p	MIMATO 004592	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCUCCAAGAGCCUAACCCG UAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (210)	hmAG1
96	hsa-miR-3 0b-3p	MIMATO 004589	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAAGUAAAACAUCCACCUCCA GAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (211)	hmAG1

[表5-5]

7	hsa-miR-2 6a-5p	MIMAT0 000082	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCCUAUCCUGGAUUACUUG AAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 2 )	tagBFP
8	hsa-miR-2 4-3p	MIMAT0 000080	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUGUUCUGCUGAACUGAGC CAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 3 )	tagBFP
9	hsa-miR-2 7a-3p	MIMAT0 000084	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCGGAACUUAGCCACUGUGA AAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 4 )	tagBFP
10	hsa-miR-2 1-5p	MIMAT0 000076	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACAACAUCAUCAGUCUGUAAGC UAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 5 )	tagBFP
11	hsa-miR-1 43-3p	MIMAT0 000435	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAGCUACAGUGCUUCAUCUC AAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 6 )	tagBFP
12	hsa-let-7i- 5p	MIMAT0 000415	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACAGCACAAACAUACUACCUC AAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 7 )	tagBFP
13	hsa-miR-4 09-3p	MIMAT0 001639	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGGGGUUCACCGAGCAACAU UCAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 8 )	tagBFP
14	hsa-miR-1 96b-5p	MIMAT0 001080	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCAACAACAGGAAACUACCU AAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 1 9 )	tagBFP
15	hsa-miR-5 01-5p	MIMAT0 002872	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCACCCAGGGACAAAGGA UUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 0 )	tagBFP
16	hsa-miR-3 62-5p	MIMAT0 000705	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUCACACCUGGUUCCAG GAUJAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 1 )	tagBFP
17	hsa-miR-1 93a-3p	MIMAT0 000459	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUGGGACUUUGUAGGCCAG UUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 2 )	tagBFP
18	hsa-miR-1 34	MIMAT0 000447	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCCUCUGGUCAACCAGUCAC AAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 3 )	tagBFP
19	hsa-miR-2 99-3p	MIMAT0 000687	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAGCGGUUUACCAUCCCACA UAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 4 )	tagBFP
20	hsa-miR-4 83-3p	MIMAT0 002173	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAGACGGGAGGGAGGAGUG AAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 5 )	tagBFP
21	hsa-miR-1 50-5p	MIMAT0 000451	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCACUGGUACAAGGGUUGGGA GAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 6 )	tagBFP
22	hsa-miR-2 00a-3p	MIMAT0 000682	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAUCGUUACCAGACAGUGU UAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 7 )	tagBFP
23	hsa-miR-1 33b	MIMAT0 000770	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUAGCUGGUUGAAGGGGACCA AAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 8 )	tagBFP
24	hsa-miR-5 20c-3p	MIMAT0 002846	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCCUCUAAAAGGAAGCACUU UAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 2 9 )	tagBFP
25	hsa-miR-3 78a-5p	MIMAT0 000731	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACACAGGACCUGGAGUCAGG AGAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 3 0 )	tagBFP
26	hsa-miR-3 73-3p	MIMAT0 000726	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACACCCAAAAUCGAAGCACU UCAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 3 1 )	tagBFP
27	hsa-miR-4 92	MIMAT0 002812	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAGAAUCUUGUCCCGCAGGU CCUAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 3 2 )	tagBFP
28	hsa-miR-5 09-3p	MIMAT0 002881	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACCCACAGACGUACCAAUC AAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 3 3 )	tagBFP
29	hsa-miR-5 16b-5p	MIMAT0 002859	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCAAAGUGCUUCUUACCUCCAG AUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG ( 2 3 4 )	tagBFP

[表5-6]

30	hsa-miR-5 18c-5p	MIMATO 002847	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAGAAAGUGCUUCCUCCAG AGAAGAUCACCGGUCCGCCACCAUG ( 2 3 5 )	tagBFP
31	hsa-miR-5 20f	MIMATO 002830	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACCCUCUAAAAGGAAGCACU UAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 3 6 )	tagBFP
32	hsa-miR-9 8-5p	MIMATO 000096	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACAAUACAACUUACUACCUC AAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 3 7 )	tagBFP
33	hsa-miR-3 20b	MIMATO 005792	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUUGCCCUCUCAACCCAGCUU UUAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 3 8 )	tagBFP
34	hsa-miR-4 23-5p	MIMATO 004748	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAGUCUCGCUCUCUGCCCC UCAAGAUCACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 3 9 )	tagBFP
35	hsa-miR-1 40-3p	MIMATO 004597	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCGUGGUUCUACCCUGUGGU AAGAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 0 )	tagBFP
36	hsa-miR-3 78c	MIMATO 016847	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCACUCUUCUGACUCCAAGU CCAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 1 )	tagBFP
37	hsa-miR-1 85-5p	MIMATO 000455	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAGGAACUGCCUUUCUC CAAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 2 )	tagBFP
38	hsa-miR-3 78b	MIMATO 014999	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUUCUGCCUCCAAGUCCAGUA GAUCCAAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 3 )	tagBFP
39	hsa-miR-1 28	MIMATO 000424	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAGAGACCGGUUCACUGUG AAGAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 4 )	tagBFP
40	hsa-miR-5 09-5p	MIMATO 004779	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGAUUGCACUGUCUGCAGU AAGAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 5 )	tagBFP
41	hsa-miR-3 40-5p	MIMATO 004692	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAUCAGUCUCAUUGCUUUAU AAAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 6 )	tagBFP
42	hsa-miR-2 5-5p	MIMATO 004498	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAAUUGCACAGUCUCCGCC UAGAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 7 )	tagBFP
43	hsa-miR-9 2b-3p	MIMATO 003218	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGAGGCCGGACGAGUGCAA UAAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 8 )	tagBFP
44	hsa-miR-3 20c	MIMATO 005793	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCCUCUCAACCCAGCUUUUA GAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 4 9 )	tagBFP
45	hsa-miR-5 08-3p	MIMATO 002880	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCUACUCAAAGGUACAAU CAAGAUCCACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 0 )	tagBFP
46	hsa-miR-7 44-5p	MIMATO 004945	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGCUUAGCCCUAGCCCCG CAAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 1 )	tagBFP
47	hsa-miR-3 180-3p	MIMATO 015058	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGCUCCGGAAAGCUCCGCC CAAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 2 )	tagBFP
48	hsa-miR-3 0d-3p	MIMATO 004551	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCAGCAAACAUUCUGACUGAA GAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 3 )	tagBFP
49	hsa-miR-2 15	MIMATO 000272	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGCUUAGCUAUAGGUCA UAGAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 4 )	tagBFP
50	hsa-miR-4 510	MIMATO 019047	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAACCAUACUCCUACUCCCUC AAGAUACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 5 )	tagBFP
51	hsa-miR-1 260a	MIMATO 005911	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGGUCCGGCAGAGGUGGGAUAG AUCACCGGUCCGCCACCAUG ( 2 5 6 )	tagBFP
52	hsa-miR-1 51a-5p	MIMATO 004697	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUAGACUGUGAGCUCCUCG AAGAUCAACACCCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 7 )	tagBFP

[表5-7]

53	hsa-miR-5 84-5p	MIMATO 003249	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCUCAGUCCCAGGCAAACCAUA AAGAUACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 8 )	tagBFP
54	hsa-miR-5 03-5p	MIMATO 002874	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCUCAGAACUGUUCCCCUG CUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG ( 2 5 9 )	tagBFP
55	hsa-miR-3 4c-5p	MIMATO 000686	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGCAAUCAGCUACUACACUGC CUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 0 )	tagBFP
56	hsa-miR-3 180	MIMATO 018178	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCUCCGGAAGCUCCGCCCCAA GAUCCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 1 )	tagBFP
57	hsa-miR-5 14a-3p	MIMATO 002883	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUCUACUCACAGAACAGUGUCAA UAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 2 )	tagBFP
58	hsa-miR-3 74b-5p	MIMATO 004955	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACUUAGCAGGUUGUUAU AUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 3 )	tagBFP
59	hsa-miR-2 8-3p	MIMATO 004502	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUCCAGGAGCUCACAAUCUAG UGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 4 )	tagBFP
60	hsa-miR-1 307-5p	MIMATO 022727	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGCCGUGCGAGGUCCGGUCG AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 5 )	tagBFP
61	hsa-miR-2 1-3p	MIMATO 004494	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACAGCCCAUCGACUGGUGUU GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 6 )	tagBFP
62	hsa-miR-1 93a-5p	MIMATO 004614	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUCAUCUCGCCGCAAAGACCC AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 7 )	tagBFP
63	hsa-miR-1 269a	MIMATO 005923	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCAGUAGCACGGCUCAGUCC AGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 8 )	tagBFP
64	hsa-miR-3 65b-3p	MIMATO 022834	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAUAGGAUUUUUAGGGGCAU UAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 6 9 )	tagBFP
65	hsa-miR-4 286	MIMATO 016916	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGUACCAGGAGUGGGGUAGA UCCACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 0 )	tagBFP
66	hsa-miR-4 454	MIMATO 018976	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGGUGGCCGUGACUCGGAUCC AGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 1 )	tagBFP
67	hsa-miR-1 38-5p	MIMATO 000430	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGCCUAGAACACACCAAG CUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 2 )	tagBFP
68	hsa-miR-1 307-3p	MIMATO 005951	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACGACCGACGCCACGCCGAG UAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 3 )	tagBFP
69	hsa-miR-6 52-3p	MIMATO 003322	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACAACCCUAGUGGCGCCAU UAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 4 )	tagBFP
70	hsa-miR-5 02-3p	MIMATO 004775	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGAAUCCUUGCCCAGGUGCA UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 5 )	tagBFP
71	hsa-miR-9 2b-5p	MIMATO 004792	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACUGCACCGCGUCCCGUCCC UAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 6 )	tagBFP
72	hsa-miR-5 01-3p	MIMATO 004774	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGAACCUUGGCCGGUGCA UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 7 )	tagBFP
73	hsa-miR-1 285-3p	MIMATO 005876	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGGUCUCACUUUGUUGCCCA GAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 8 )	tagBFP
74	hsa-miR-2 96-3p	MIMATO 004679	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGGAGAGCCUCCACCCACCU CAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 7 9 )	tagBFP
75	hsa-miR-5 06-5p	MIMATO 022701	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUUAAGUAACACCUUCCUGAA UAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG ( 2 8 0 )	tagBFP

[表5-8]

76	hsa-miR-3 61-3p	MIMAT0 004682	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAUCAGAAUCACACCUGGG GGAAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (281)	tagBFP
77	hsa-miR-5 82-3p	MIMAT0 004797	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGUUCAGUUGUCAACCAGU UAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (282)	tagBFP
78	hsa-miR-4 22a	MIMAT0 001339	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGUUCAGACCCUAAGUCCA GUAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (283)	tagBFP
79	hsa-miR-9 8-3p	MIMAT0 022842	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGAAAGUAGUAAGUUGUAU AGAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (284)	tagBFP
80	hsa-miR-4 99a-5p	MIMAT0 002870	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAACAUCACUGCAAGUCUUA AGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (285)	tagBFP
81	hsa-miR-2 4-2-5p	MIMAT0 004497	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGUUCUGCCACCAUG CAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (286)	tagBFP
82	hsa-miR-1 05-5p	MIMAT0 000102	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACACAGGAGUCUGAGCAUU UGAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (287)	tagBFP
83	hsa-miR-3 81-3p	MIMAT0 000736	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGAGAGCUUGCCUUGUA UAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (288)	tagBFP
84	hsa-miR-1 81b-3p	MIMAT0 022692	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUUGCAUCAUUGUUCAGUGA GAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (289)	tagBFP
85	hsa-miR-1 22-5p	MIMAT0 000421	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCAAACACCAUUGUCACACUCC AAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (290)	tagBFP
86	hsa-miR-2 7a-5p	MIMAT0 004501	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUGCUACAAGCAGCUAGCCC UAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (291)	tagBFP
87	hsa-miR-5 05-5p	MIMAT0 004776	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAUCAAUACUUCUCCUGGCUC CCAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (292)	tagBFP
88	hsa-miR-4 54-3p	MIMAT0 003885	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACCUUAAGCAAAUUGCAC UAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (293)	tagBFP
89	hsa-miR-3 01a-3p	MIMAT0 000688	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGUUUUGACAAUACUAUUGCA CUGAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (294)	tagBFP
90	hsa-miR-5 10	MIMAT0 002882	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGUGAUUGCCACUCUCCUGAG UAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (295)	tagBFP
91	hsa-miR-4 11-5p	MIMAT0 003329	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGUACGCUAUACGGGUACU AAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (296)	tagBFP
92	hsa-miR-2 9c-5p	MIMAT0 004673	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAACACCAGGAGAAAUCGGU CAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (297)	tagBFP
93	hsa-miR-1 48b-5p	MIMAT0 004699	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCCUGAGUGUAUAACAGAAC UUAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (298)	tagBFP
94	hsa-miR-2 04-3p	MIMAT0 022693	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACGUCCUUUGCCUUCCAG CAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (299)	tagBFP
95	hsa-miR-4 86-3p	MIMAT0 004762	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACUGAGCUGCCCC GAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (300)	tagBFP
96	hsa-miR-1 25b-2-3p	MIMAT0 004603	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGUCCAAGAGCCUGACUUGU GAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (301)	tagBFP
7	hsa-miR-1 6-5p	MIMAT0 000069	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCCAAUAAAUCGUGCUGC UAAGAUCACACCGGUUCGCCACCAUG (302)	hdKRed
8	hsa-miR-1 7-5p	MIMAT0 000070	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUACCUACUGCACUGUAAGCAC UUGAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (303)	hdKRed

[表5-9]

9	hsa-miR-1 25b-5p	MIMATO 000423	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCACAAGUUAGGGUCAGG GAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (304)	hdKRed
10	hsa-miR-9 3-5p	MIMATO 000093	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCACCUGCACGAACAGCACUU UGAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (305)	hdKRed
11	hsa-miR-2 0a-5p	MIMATO 000075	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCACCUGCACUAUAAGCACU UUAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (306)	hdKRed
12	hsa-miR-1 06a-5p	MIMATO 000103	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCACCUGCACUGUAAGCACU UUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (307)	hdKRed
13	hsa-miR-1 45-5p	MIMATO 000437	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGGGAUCCUGGGAAAACUG GACAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (308)	hdKRed
14	hsa-miR-4 531	MIMATO 019070	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAGAACGCCUUCUCCAUAGA UCCACCGGUCGCCACCAUG (309)	hdKRed
15	hsa-miR-1 93b-5p	MIMATO 004767	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAUUCUCGCCAAACCCCC GAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (310)	hdKRed
16	hsa-miR-1 81a-2-3p	MIMATO 004558	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGUACAGUCAACGGUCAGUG GUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (311)	hdKRed
17	hsa-miR-1 301	MIMATO 005797	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAAGUCACUCCCAGGCAGCU GCAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (312)	hdKRed
18	hsa-miR-8 77-5p	MIMATO 004949	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCCCUGCGCCAUCUCCUCUACA GAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG (313)	hdKRed
19	hsa-miR-4 443	MIMATO 018961	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAAACCCACGCCUCCAAAGAU CCACCGGUCGCCACCAUG (314)	hdKRed
20	hsa-miR-4 25-5p	MIMATO 003393	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAACGGGAGUGAUCGUGUC AUUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (315)	hdKRed
21	hsa-miR-3 20d	MIMATO 006764	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCUCUCAACCCAGCUUUUA GAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG (316)	hdKRed
22	hsa-let-7a -3p	MIMATO 004481	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGAAAGACAGUAGAUUGUAUA GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (317)	hdKRed
23	hsa-miR-9 2a-1-5p	MIMATO 004507	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAGCAUUGCAACCGAUCCCAAC CUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (318)	hdKRed
24	hsa-miR-3 65b-5p	MIMATO 022833	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACAGCUGCCCCUGAAAGUCCC UAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (319)	hdKRed
25	hsa-miR-1 42-3p	MIMATO 000434	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCUCAAAGUAGGAAACACUA CAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (320)	hdKRed
26	hsa-miR-3 20e	MIMATO 015072	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCCUUCUCAACCCAGCUUUAG AUACCGGUCGCCACCAUG (321)	hdKRed
27	hsa-miR-1 06b-3p	MIMATO 004672	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGCAGCAAGUACCCACAGUGC GGAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (322)	hdKRed
28	hsa-miR-5 48i	MIMATO 005935	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCGGAAAAUCCGCAUUACUU UUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (323)	hdKRed
29	hsa-miR-1 261	MIMATO 005913	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAAGCCAAGCCUUACCAUAG AUCCAAACACCGGUCGCCACCAUG (324)	hdKRed
30	hsa-miR-9 -3p	MIMATO 000442	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCACUUUCGGUUAUCUAGCUUU AUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (325)	hdKRed
31	hsa-miR-1 29-1-3p	MIMATO 004548	GGUUCCCGGAUCGCGGAUCCAUACUUUUUGGGUAAGGGC UUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (326)	hdKRed

[表5-10]

32	hsa-miR-4 24-3p	MIMAT0 004749	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAUCAGCAGCGCCUCACGUUU GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 2 7)	hdKRed
33	hsa-miR-7 60	MIMAT0 004957	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUCCCCACAGACCCAGAGCCGA GAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG (3 2 8)	hdKRed
34	hsa-miR-3 65a-5p	MIMAT0 009199	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCACAUCUGCCCCAAAGUCC CUAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (3 2 9)	hdKRed
35	hsa-miR-3 74a-5p	MIMAT0 000727	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCACUUUAUCAGGUUGUAUUA AAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 0)	hdKRed
36	hsa-miR-8 73-5p	MIMAT0 004953	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGGAGACUCACAAGUUCUG CAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 1)	hdKRed
37	hsa-miR-3 0c-2-3p	MIMAT0 004550	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGAGUAAACAGCCUUCUCCA GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 2)	hdKRed
38	hsa-miR-9 9b-3p	MIMAT0 004678	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCGGACCCACAGACACGAGCU UGAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 3)	hdKRed
39	hsa-miR-4 532	MIMAT0 019071	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCGCCGGCUCCCCGGGGAGA UCCACCGGUCGCCACCAUG (3 3 4)	hdKRed
40	hsa-miR-2 0b-3p	MIMAT0 004752	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGGAAGUGCCAUACUACA GUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 5)	hdKRed
41	hsa-miR-4 448	MIMAT0 018967	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUACCCUAGACCAAGGAGCA GAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 6)	hdKRed
42	hsa-miR-3 63-5p	MIMAT0 003385	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAAAUGCAUCGUGAUCACC CGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 7)	hdKRed
43	hsa-miR-1 45-3p	MIMAT0 004601	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGAACAGUAUUUCCAGGAU CCAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 8)	hdKRed
44	hsa-miR-5 74-5p	MIMAT0 004795	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACACACUCACACACACU CAAGAUCCACACCGGUCGCCACCAUG (3 3 9)	hdKRed
45	hsa-miR-2 23-3p	MIMAT0 000280	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGGGUAUUUGACAAACUGA CAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 0)	hdKRed
46	hsa-miR-4 521	MIMAT0 019058	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGAGCACAGGACUUCUUA GCAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 1)	hdKRed
47	hsa-miR-2 2-5p	MIMAT0 004495	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUAAAGCUUGCACUGAAGAA CUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 2)	hdKRed
48	hsa-miR-3 39-3p	MIMAT0 004702	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGGCUCUGUCGUGAGCGC UCAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (3 4 3)	hdKRed
49	hsa-miR-1 6-2-3p	MIMAT0 004518	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUAAAGCAGCACAGUAUU GGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 4)	hdKRed
50	hsa-miR-3 74a-3p	MIMAT0 004688	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAAUACAAUCUGAUAA GAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 5)	hdKRed
51	hsa-miR-5 42-3p	MIMAT0 003389	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUUUCAGUUAUCAAUCUGUCA CAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 6)	hdKRed
52	hsa-miR-4 52-5p	MIMAT0 001635	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUCAGUUUCCUCUGCAAACAG UUAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 7)	hdKRed
53	hsa-miR-5 13a-3p	MIMAT0 004777	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCUUCUCAGAAAGGUGAAAU UUAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 8)	hdKRed
54	hsa-miR-5 32-3p	MIMAT0 004780	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGCAAGCCUUGGGUGUGGG GGAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 4 9)	hdKRed

[表5-11]

55	hsa-miR-5 48a-3p	MIMATO 003251	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCGCAAAAGUAAUUGCAGUU UGAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 0)	hdKRed
56	hsa-miR-2 7b-5p	MIMATO 004588	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCGUUCACCAUCAGCUAGCU CUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 1)	hdKRed
57	hsa-miR-3 180-5p	MIMATO 015057	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCGACGUGGGCGGAGCGUCU GGAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 2)	hdKRed
58	hsa-miR-4 324	MIMATO 016876	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCUUAAGGUUAGGGUCUCAGGG AGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 3)	hdKRed
59	hsa-let-7d -3p	MIMATO 004484	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGAAAGGCAGCAGGUCGUAU AGAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 4)	hdKRed
60	hsa-miR-1 84	MIMATO 000454	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCACCCUUAUCAGUUCUCCGUC CAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 5)	hdKRed
61	hsa-miR-9 5	MIMATO 000094	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCUGCUAAUAAAACCCGUUG AAAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 6)	hdKRed
62	hsa-miR-6 64a-5p	MIMATO 005948	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAUCAAUCAUUUCCCUAGCC AGUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 7)	hdKRed
63	hsa-miR-1 234-5p	MIMATO 022944	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCGGCCCCCCCCCCCCCCCC AGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 8)	hdKRed
64	hsa-miR-1 85-3p	MIMATO 004611	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCGACCAGAGGAAAGCCAGCCC UAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 5 9)	hdKRed
65	hsa-miR-3 01a-5p	MIMATO 022696	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGUAGUGCAUAAGUCAGA GCAGAUACACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 0)	hdKRed
66	hsa-miR-4 25-3p	MIMATO 001343	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCGGGACACGACAUUCCCG AUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 1)	hdKRed
67	hsa-miR-4 97-5p	MIMATO 002820	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCACAAACCACAGUGUGCUGCU GAGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 2)	hdKRed
68	hsa-miR-1 0b-3p	MIMATO 004556	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAUUCCCCUAGAAUCGAAUCU GUAGAUACACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 3)	hdKRed
69	hsa-miR-3 29	MIMATO 001629	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAAAGAGGUUACCAGGUGUG UUAGAUACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 4)	hdKRed
70	hsa-miR-1 44-3p	MIMATO 000436	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGUACAUCAUCUAUCUGUA AGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 5)	hdKRed
71	hsa-miR-2 11-3p	MIMATO 022694	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCCGCACCCUUUGCUGUCCUG CAGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 6)	hdKRed
72	hsa-miR-3 79-5p	MIMATO 000733	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCCUACGUUCCAUAGCUACC AGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 7)	hdKRed
73	hsa-miR-6 29-5p	MIMATO 004810	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGUUCUCCAACGUAAACCA AGAUCAAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 8)	hdKRed
74	hsa-miR-2 12-5p	MIMATO 022695	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGUAGCAGCUAGAGCCAA GGUAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (3 6 9)	hdKRed
75	hsa-miR-5 82-5p	MIMATO 003247	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGUACUGGUUGAACACUG UAAAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (3 7 0)	hdKRed
76	hsa-miR-1 97-5p	MIMATO 022691	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCCUCCACUGCCCUCUACC CGAGAUCCACCGGUUCGCCACCAUG (3 7 1)	hdKRed
77	hsa-miR-2 22-5p	MIMATO 004569	GGUUCCGCGAUCGCCGAUCCAGGAUCUACACUGGUACUG AGAGAUCAACACCGGUUCGCCACCAUG (3 7 2)	hdKRed

[表5-12]

78	hsa-miR-9 3-3p	MIMATO 004509	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCGGAAAGUGCUAGCUCAGCA GUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 3)	hdKRed
79	hsa-miR-4 83-5p	MIMATO 004761	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCUCCUUCUUUCCUCCGUC UUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 4)	hdKRed
80	hsa-miR-5 76-5p	MIMATO 003241	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAAGACGUGGAGAAUUAGA AUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 5)	hdKRed
81	hsa-miR-1 46a-3p	MIMATO 004608	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGAAGAACUGAAUUCAGA GGAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 6)	hdKRed
82	hsa-miR-5 84-3p	MIMATO 022708	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGCCUGGUUGGCCUGGAACU GAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 7)	hdKRed
83	hsa-miR-3 4a-3p	MIMATO 004557	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGGGCAGUAUACUUGCUGAU UGAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 8)	hdKRed
84	hsa-miR-1 90a	MIMATO 000458	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACCUAAUUAUCAAACAUAAUC AAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 7 9)	hdKRed
85	hsa-miR-3 83	MIMATO 000738	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGCCACAAUCACCUUCUGAUC UAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 0)	hdKRed
86	hsa-miR-3 26	MIMATO 000756	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGGAGGAAGGGCCCAGAGG AGAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 1)	hdKRed
87	hsa-miR-5 76-3p	MIMATO 004796	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGAUUCCAAUUUUUUCCACAUC UUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 2)	hdKRed
88	hsa-miR-2 19-5p	MIMATO 000276	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGAAUUGCGUUUUGGACAAUC AAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 3)	hdKRed
89	hsa-miR-3 42-5p	MIMATO 004694	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUAAUCACAGAUAGCACCCU AGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 4)	hdKRed
90	hsa-miR-5 90-3p	MIMATO 004801	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACAUAGCUUAUACAUAAAUA AGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 5)	hdKRed
91	hsa-miR-1 37	MIMATO 000429	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUACGCGUAUUCUUAAGCAA UAAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (3 8 6)	hdKRed
92	hsa-miR-2 98	MIMATO 004901	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGGGAGAACCUCCUGCUUC UGCUAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 7)	hdKRed
93	hsa-miR-3 25	MIMATO 000771	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACACUUACUGGACACCUACUA GGAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (3 8 8)	hdKRed
94	hsa-miR-4 49a	MIMATO 001541	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACCCAGCUAACAAUACACUGCC AAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 8 9)	hdKRed
95	hsa-miR-4 98	MIMATO 002824	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGAAAAACGCCUCCUGGUUG AAAAGAUCCACCGGUCGCCACCAUG (3 9 0)	hdKRed
96	hsa-miR-6 61	MIMATO 003324	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACGCGCAGGCCAGAGACCCA GGCAAGAUACACCGGUCGCCACCAUG (3 9 1)	hdKRed

## [0071] 蛍光蛋白質コード領域及び3' UTR断片の構築

蛍光蛋白質 hmAG1, hmK02, hdKRed および tagBFP の蛋白質コード領域は、プラスミドDNA: pFucci-S/G2/M Green (Amargaam)、pFucci-G1 Orange (Amargaam)、pAM-tagBFP (参考文献 [Miki, K., et al, Cell Stem Cell, 2015])、およびpNP-hdKeima-Red (Amargaam)からそれぞれ表6に示す適当なプライ

マーセット (Fwd/Rev hmAG1 (配列番号392/393)、 Fwd/Rev hmK02 (配列番号394/395)、 Fwd/Rev tagBFP (配列番号396/397)、 Fwd/Rev hdKeimaRed (配列番号398/399)) を用いて PCR 増幅した。PCR 産物中のプラスミドDNAを制限酵素Dpn I (Toyobo)を用いて、37 ° Cで30分消化し、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製した。3' UTR配列はオリゴヌクレオチドtemp3UTR(配列番号 405)を鋳型にしてFwd3UTR(配列番号 403)及びRev3UTR(配列番号 404)をプライマーに用いてPCR増幅した。コントロールmRNAの5' UTR配列は、オリゴヌクレオチドtemp5UTR(配列番号 402)を鋳型にしてT7Fwd5UTR(配列番号 400)及びRev5UTR(配列番号 401)をプライマーに用いてPCR増幅した。これらのPCR 産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製した。

#### [0072] [表6]

name	sequence (5' to 3')	Seq ID No.
FwdhmAG1	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGTGATCAAGCCCG	392
RevhmAG1	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCACTTGGCCTGGCTGGC	393
FwdhmKO2	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGTGTGATTAACCAAGAGATG	394
RevhmKO2	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCAAGGAATGAGCTACTGCATCTTACCTG	395
FwdtagBFP	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCAGCGAG	396
RevtagBFP	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACTCGAGATGCATATGAGATC	397
FwdhdKeimaRed	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGTGATCGCCAAG	398
RevhdKeimaRed	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCAAGCCCAGCAGGCTGTGC	399
T7Fwd5UTR	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG	400
Rev5UTR	CATGGTGGCGACCGGTGTCTTATATTCTTACTC	401
temp5UTR	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAAGAGAGAAAAGAAGA GTAAGAAGAAATAAGACACCGGTGCCACCATG	402
Fwd3UTR	TCTAGACCTCTGCAGGGC	403
Rev3UTR	TTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTATTCAAAGACCAAG	404
temp3UTR	TCTAGACCTCTGCAGGGCTTGCCTCTGGCCATGCCCTTCTCTCCCTT GCACCTGTACCTTGGCTTTGAATAAGCCTGAGTAGG	405

#### [0073] mRNA合成鋳型DNAの構築

mRNA合成鋳型を生成するために、マーカー蛋白質コード領域のPCR増幅断片

(最終濃度 0.2 ng/μL)、3' UTRのPCR増幅断片（最終濃度 10 nM）および5' UTR配列を含むオリゴヌクレオチド（最終濃度 10 nM）を混合し、表7に示したT7Fwd及びRev120Aのプライマーセットを用いてPCR増幅して、連結した。1-slot mRNAの合成錆型には1本の、5-slot mRNAの合成錆型には2本のオリゴヌクレオチドを用いた。ただしコントロールmRNAを作成する場合には、5' UTR配列はオリゴヌクレオチドの代わりに、精製したPCR断片を最終濃度10 nMで用いた。PCR産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製した。最終的に合成される5-slot mRNAの5' UTR配列は表3に、1-slot mRNAの5' UTR配列は表5に、蛍光タンパク質のORF配列（配列番号117, 118, 119, 120、及び3' UTR配列（配列番号121、すべてのmRNAに共通）は表4に示した。5-slot コントロールmRNAの5' UTR配列（配列番号1）は表3に、1-slot コントロールmRNAの5' UTR配列（配列番号116）は表4に示した。

[0074] [表7]

name	sequence (5' to 3')	Seq ID No.
T7Fwd	GCTAATACGACTCACTATAGTTCTTAATCGCGGATCC	4 0 6
Rev120A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTATTCA	4 0 7

## [0075] mRNAの合成及び精製

miRNA応答性mRNAは、修正されたプロトコル（下記の参考文献 [Miki, K., et al, Cell Stem Cell, 2015] を参照）において、MegaScript T7 kit (Ambion)を用いて調製した。この反応において、ウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に替えて、シードウリジン-5' -三リン酸及び5-メチルシチジン-5' -三リン酸(TriLink BioTechnologies)をそれぞれ用いた。IVT (mRNA合成) 反応の前に、グアノシン-5' -三リン酸は、Anti Reverse Cap Analog (New England Biolabs)で5倍希釈した。反応混合液を37度で4時間インキュベートして、TURBO DNase (Ambion)を添加した後、37度でさらに30分インキュ

ベートした。得られたmRNAは、FavorPrep Blood / Cultured Cells total RNA extraction column (Favorgen Biotech)で精製し、Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)を用いて、37度で30分インキュベートした。その後、RNeasy MiniElute Cleanup Kit (QIAGEN)により、さらに精製した。

#### [0076] mRNAトランスフェクション

表8に記載の条件に従って、StemFect (Stemgent)を用いて、製造者の指示に従って24-wellフォーマットの培養プレートにて、リバーストランスクエクションを行った。ただし、ヒトiPS細胞の経時変化を追跡する場合には、フォワードトランスクエクションを行った。

#### [0077] [表8]

Experiment	Item	Cell	Transfected RNA
5-slot mRNAs to two different miRNAs	Fig. 2a-c	HeLa	hmAG1 (5-slot reporter, 80 ng) tagBFP (control, 100 ng) miRNA inhibitor (total 4 pmol, 2 pmol x2)
5-slot mRNAs to three different miRNAs	Fig. 2a-c	HeLa	hmAG1 (5-slot reporter, 80 ng) tagBFP (control, 100 ng) miRNA inhibitor (total 6 pmol, 2 pmol x3)
5-slot mRNAs with multiple target sites to one miRNA	Fig. 2d-e, Fig. S2b	HeLa,	hmAG1 (5-slot/1-slot reporter, 80 ng) tagBFP (control, 100 ng) miRNA inhibitor (2 pmol)
Screening	Fig. 3a-c, 4a-c	All cells used in this study	hmAG1 (1-slot reporter, 40 ng) tagBFP (1-slot reporter, 90 ng) hdKRed (1-slot reporter, 400 ng) hmKO2 (control, 20 ng)
2-D density plot	Fig. 3g, 4g, S4, S5	All cells used in this study	hmAG1 (40 ng) tagBFP (90 ng) hdKRed (400 ng) hmKO2 (20 ng)

#### [0078] フローサイトメトリー

トランスクエクションの24時間後に細胞を培養皿から分離し、メッシュを通して、FACSAria II (BD Biosciences) 用いたフローサイトメトリーによ

り分析した。hmAG1、hmK02、tagBFP及びhdKRedは、青色レーザー（488 nm）とFITCフィルター（530/30 nm）、緑色レーザー（561 nm）とPE フィルター（585/42 nm）、紫色レーザー（405 nm）とPacific Blue フィルター（450nm/40 nm）、及び紫色レーザー（405 nm）とQdot 605 フィルター（610/20 nm）によりそれぞれ検出した。死細胞及びデブリは、前方及び側方光散乱の値に基づいて除外した。

[0079] フローサイトメトリーで検出した蛍光値の補正解析

hmAG1、hmK02、tagBFP及びhdKRedの4種類の蛍光蛋白質を同時に検出した場合には、同時に、hmAG1、hmK02、tagBFPまたはhdKRedのmRNAのみをトランسفエクションした細胞を解析して、実際とは異なる蛍光蛋白質として検出される蛍光値を補正した（参考文献：[Endo, K. and Saito, H. Methods in Molecular Biology, 2014]）。

[0080] Relative expressionの算出

フローサイトメトリーの解析により、レポーター mRNA から発現するhmAG1 の蛍光強度を、共導入したコントロールmRNAから発現する tagBFP の蛍光強度で割り、その解析した細胞集団における相乗平均値をレポーターmRNAの蛍光比率（Fluorescence ratio）とした。各mRNA配列について、レポーターmRNAが応答するmiRNAの阻害剤存在下における蛍光比率を基準として、miR-1 の阻害剤存在下（目的のmiRNA活性状態）の蛍光比率の相対値を“Relative expression”として定義した。2種類のmiRNA応答配列を含む mRNA の場合は、一方のmiRNA阻害剤存在下で、それぞれ“Relative expression” 値を測定し、測定した2値を積算したものを“Estimated expression”とした。3種類のmiRNA応答配列を含む mRNA の場合は、3種類中2種類のmiRNA阻害剤存在下で、それぞれ“Relative expression” 値を測定し、測定した3値を積算したものを“Estimated expression”とした。

[0081] 結果

1分子で多数のmiRNAに応答し、かつ個々のmiRNAへの応答の程度（検出感度）を任意に調節プローブ（= mRNA）の設計方法を開発し、細胞内の多因子情

報を線形モデルで抽出することに成功した。RNA Synthetic Device はmRNAと転写後・翻訳段階の制御を基本としているため、mRNAに作用するmiRNAが細胞内部のマーカー分子として用いられている。マイクロアレイや次世代シーケンシングなどの high-throughput analysisの場合は、まず、(1) miRNAを網羅的に定量検出し、その後で、(2) 多変量解析などにより膨大な数の変数から取り扱いが容易な数の合成変数を抽出し、それに基づいて細胞の状態を区別している(図1 a左図)。一方で、非侵襲的に(細胞を殺さずに)同時に検出可能なシグナルの数は限られており、1対1に対応した検出プローブでは対応できない。そこで、生細胞内の多因子の情報を検出するために、多因子の情報を先に要約してから、その結果合成されたパラメータを検出する戦略をとる(図1 a右図)。すると、同時に検出可能な、限られたシグナル数でも、多数の生細胞内因子の定量情報に由来し、そのエッセンスを抽出した合成パラメータを直接検出できる。我々は、1つのmRNAが複数のmiRNAを可算的に検出できること、各miRNAへの検出感度をmRNA上のmiRNA標的配列の位置で調節できることを発見した。

#### [0082] 複数のmiRNA応答は積算される

複数種類のmiRNAに応答するmRNAを作成するため、これまで1カ所のみmiRNA標的配列を含んでいたmRNA(1-slot mRNA, 図6 a, Miki, K. et al, Cell Stem Cell, 2015, 国際公開W02015/105172)を拡張し、5' UTRに連続に5カ所のmiRNA標的配列挿入部位(スロット)を設計した(5-slot mRNA, 図2a)。細胞内因子の例としては、HeLa 細胞内で弱い活性を示すmiRNAの例としてmiR-34a-5p、強い活性の例としてmiR-17-5pとmiR-92a-3p、さらに非常に強い活性の例としてmiR-21-5pの4種類を選んだ。5カ所のスロットに2または3種類の異なるmiRNA標的配列が挿入され、マーカー蛋白質としてhmAG1をコードするmRNAをランダムに12種類設計し、mRNAを合成した(図2 a, 表3)。合成した5-slot mRNAを、それぞれ、mRNA導入のコントロールとして蛍光蛋白質tagBFPをコードしたmRNAおよび5-slot mRNAが応答するmiRNAに対する阻害剤(miRVana miRNA inhibitor, Invitrogen)とともにHeLa細胞にトラ

ンスフェクションした。トランスフェクション24時間後に、フローサイトメーターを用いてマーカータンパク質の蛍光強度を定量し、Relative expression 値を解析した。

[0083] 例えば、miR-17-5p の標的配列を slot-2 に、miR-92a-3p の標的配列を slot-4 に持つmRNAの場合（図2 b）、両方のmiRNAに対する阻害剤を導入した時の 5-slot mRNA の発現量は、どちらのmiRNAの活性にも影響されていない場合の発現量を示すと考えられ、これを5-slot mRNAごとの発現量の基準値（=1）とした。どちらか一方のmiRNA阻害剤（miR-17-5p または miR-92a-3p）を導入した時の発現量は、それぞれ、もう一方のmiRNA活性（miR-92a-3p または miR-17-5p）のみを反映していると考えられる。また、miRNA阻害剤の非存在下（実際には、mock として用いたmiRNA-1 に対する inhibitor の存在下）の発現量は、両方のmiRNAの活性を反映していると考えられる。この両方のmiRNA活性を反映した Relative expression 値は、個々のmiRNA活性への応答した Relative expression 値の積算値（これを予測発現量、estimated expressionとする）に近い値を示した。

[0084] そこで、ランダムに作成した12種類の 5-slot mRNA それぞれについて、miRNA阻害剤非存在下の Relative expression 値（observed relative expression）と、応答する複数のmiRNAのうち1種類のみのmiRNA活性に応答したRelative expression 値の積算値（estimated expression）を比較すると、非常に高い相関を示した（図2 c）。このことは複数のmiRNA標的配列を持つ合成mRNAを用いることによって、複数のmiRNA活性を積算的に検出できることを示す。

[0085] miR34a-5p, miR-92a-3p, miR17-5p または miR-21-5p に応答する1-slot mRNAを合成し、mRNA導入のコントロールとなる tagBFP mRNA および 4種類のmiRNA阻害剤とともにHeLa 細胞に導入して Relative expression を求めたところ、mRNAが応答するmiRNA 以外のmiRNA阻害剤を導入しても Relative expression の値は影響を受けなかった。よって今回の実験条件においては、これらのmiRNA阻害剤は目的としない他の3種類のmiRNA活性を阻害しないことが確

認された（図5a）。一方、複数のmiRNA阻害剤を挿入する場合には、細胞に導入するmiRNA阻害剤の総量が変動してしまう。ネガティブコントロールとして使用したmiR-1に対するmiRNA阻害剤の量を増加させても、測定されるRelative expression の値は影響を受けなかったことから、今回の実験条件においては、miRNA inhibitor の導入総量の影響は無視できることが確認された。

[0086] スロットの位置により応答感度を調節できる

5カ所のスロットのうち、1、2または3カ所が同一のmiRNA標的配列で占められている一連の5-slot mRNAを、miR34a-5p, miR-92a-3p, miR17-5p または miR-21-5p の4種類のmiRNAについて、それぞれ設計し、mRNAを合成した（Fig. 2d, 表3）。合成した5-slot mRNAを、それぞれ、mRNA導入のコントロールとして蛍光蛋白質 tagBFPをコードした mRNAおよび 5-slot mRNAが応答するmiRNAに対する阻害剤とともにHeLa細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後に、フローサイトメーターを用いてマーカータンパク質の蛍光強度を定量し、Relative expression 値を解析した。ただし、miR-21-5p の解析においては、マーカー遺伝子の発現が強く抑制され、細胞の自家蛍光の影響が高くなるため、tagBFPの蛍光値が 10,000 以下の細胞を除去してmRNA導入量の高い細胞群で評価した。

[0087] このとき、各 5-slot mRNAの発現量（Relative expression）は、各スロットにおけるmiRNA応答性（ $\rho$ ）の積算値だと考えられる（Fig. 2d, bottom）。そこで、実験的に測定した Relative expression 値（observed relative expression）のデータセットから、最小二乗法に基づいたフィッティングにより、各スロットにおけるmiRNA応答性（ $\rho$ ）を4種類のmiRNAそれぞれについて算出した。この解析で求められた各スロットにおけるmiRNA応答性の積算値を、5-slot mRNA それぞれの予測発現量（estimated expression）とした。

[0088] 4種類全てのmiRNAについて、予測発現量は、実験的に測定されたRelative expression 値（observed relative expression）とよく一致した（Fig. 2e）。このことは、5-slot mRNAの挙動が各スロットにおけるmiRNA応答性（Local relative expression,  $\rho$ ）で説明できていることを示唆する。4種類のmiRN

Aのうちいずれにおいても、スロット番号の小さい5' 側のslot ほど応答感度が低く、3' 側のslot ほど応答感度が高かった（図2 f および図6）。

- [0089] 一方、miR34a-5p, miR-92a-3p, miR17-5p または miR-21-5p に応答する1-slot mRNA についても Relative expression 値を解析すると、どのmiRNAにおいても 1-slot mRNA はslot-5 に近い値を示した（図6 b）。1-slot mRNA の miRNA標的配列は、mRNAの5' 末端から~20 nt, AUG から23 nt に位置している（図6 a）ことから、この結果は、miRNA標的配列が、5' 末端ではなく開始コドンにより近いほど、mRNAの応答感度が高くなること、開始コドンからの距離に依存して応答感度が低くなることを示唆する。
- [0090] 解析した4種類のmiRNAに固有のパラメータではなく、これらのmiRNAに共通するパラメータとして、miRNA標的配列の位置とmiRNA応答性の関係を求めるため、活性の異なる 4種類のmiRNAの解析で得られた各スロットの応答感度を、下記の指數関数モデルに同時にフィッティングした（図2 f）。フィッティングは対数値に対して最小二乗法を用いて実施した。
- [0091] [数4]

$$-\log(\rho) = k(d) \cdot \{-\log(\rho^0)\} = -d^\xi \cdot \log(\rho^0)$$

このとき、d は開始コドンからの距離 ([nt]) を、 $\rho^0$  はそれぞれのmiRNAについて距離 0 [nt] の時の仮想的な応答感度を示す。 $\xi$  はmiRNAの種類に関わらず共通する変数を示す。（つまり  $\rho(d) = \{\rho^0\}^{k(d)} = \rho^0 \cdot d^\xi$  となる。）

- [0092] フィッティング解析の結果、miRNAによる翻訳抑制効果（local repression,  $-\log(\rho)$ ）は、開始コドンからmiRNA標的配列までの距離 (d [nt]) と miRNAの種類に関わらない変数 $\xi$ を用いてよく説明できた。今回の解析では、共通変数 $\xi$ の値として -0.576 を得た。すなわち、5' UTR にmiRNA標的配列を含むmRNAを設計する場合、miRNAによる翻訳抑制効果は、miRNAの種類に関わらず一般に、開始コドンからmiRNA標的配列までの距離の -0.576 乗に比例すると考えられる。

[0093] 多種類の細胞の分類

このモデルを実証するため、複数種類のヒト正常細胞を生きたまま、miRNA活性プロファイルに従って分類、分離することを試みた(図3)。

[0094] まず細胞種ごとのmiRNA活性を探索的に定量した。5' UTRで標的配列がAUGになるのを防ぐため、CAUを含まないmiRNAを270抽出した(図3a、表4)。このとき、過去の文献から様々な細胞で比較的発現量の高いものを選別し(参考文献 [Neveu, P., et al, Cell Stem Cell, 2010])、かつ配列に類似性の高いmiRNAは除いた。選別した270のmiRNAのうち90はhmAG1を、別の90はtagBFPを、残る90はhdKRedをマーカーの蛍光蛋白質としてコードする1-slot mRNAを合成した。作成したmRNAの5' UTR配列を表5に示す。異なるmiRNA標的配列が挿入されたhmAG1、tagBFP、およびhdKRedをコードする1-slot mRNAを各1種類と、mRNA導入のコントロールとして用いたhmK02 mRNAの計4種類のmRNAを混合し、解析対象の細胞にトランスフェクションした。すなわち、計90種類の組み合わせで1-slot mRNAをトランスフェクションした。また、解析上のコントロールとして、mRNAを含まない水、miRNAに応答しないコントロールのhmAG1、tagBFP、hdKRedおよびhmK02の4種類のmRNAの混合、またはこれら4種類のmRNAのうちそれぞれ1種類のみ、の6種類のトランスフェクションを行った。すなわち、各細胞について96種類のトランスフェクションを実施して1セットの探索解析とした。解析対象の細胞としては、HeLa細胞のほか、ヒト正常皮膚線維芽細胞(NHDF)、ヒト正常肺線維芽細胞(NHLF)、ヒト正常表皮ケラチノサイト(NHEK)、人腎臓上皮細胞(HRE)の初代培養細胞4種類、マウス線維芽細胞(MEF)、ヒト上皮線維芽細胞由来のiPS細胞(hiPSC)、およびhiPSCをbFGF非存在下で部分的に分化させた細胞(hiPSC 14d)を用いた。

[0095] フローサイトメトリー後、補正された蛍光強度を用いて、解析した細胞ごとにhmAG1、tagBFPおよびhdKRedの蛍光強度をhmK02の蛍光強度で割り、蛍光比率を求め、解析した細胞における相乗平均をもとめて各1-slot mRNAの蛍光比率(Fluorescence ratio)とした。探索解析を同じ細胞に対して2度実施し

、得られた蛍光比率の比較を図3 bに示す。これらの解析結果は高い相関を示したことから、この解析系は安定していることが示唆される。

[0096] 一般に、定量検出されるmiRNAのうち約1/3程度しか翻訳抑制活性を持たないことが知られている（参考文献[Mullokandov, G. et al, Nature Methods, 2013]）。本解析で用いた270のmiRNAについても約2/3程度はmiRNA活性に左右されないと考えられるため、1-slot mRNAの蛍光比率は全体として対角線上に分布すると考えられる。しかし、細胞間の探索解析結果を比較すると、HeLa細胞とNHLFの比較では、観察された蛍光比率は対角線からずれてプロットされている（図7 a）。これは細胞ごとに、蛍光蛋白質の合成効率や安定性などに違いがあるため、結果として発現量の分布にバイアスがかかっていると考えられる。そこで細胞間の蛍光蛋白質発現量を、HeLa細胞を基準に用いて標準化した。具体的には、各細胞の蛍光比率とHeLa細胞の蛍光比率の散布図を作成し、蛍光蛋白質ごとに直線回帰を行って、傾きが1となるようそれぞれに線形補正を実施した（図7 b）。これにより細胞間にあるバイアスは補正され、散布図を作成すると各1-slot mRNAは対角線上に分布したが、hmAG1、tagBFPおよびhdKRedの蛍光比率の分布は一致していない。これはマーカーとして用いた蛍光蛋白質の違いによるバイアスがあることを示す。そこでさらに、各蛍光比率の分布を平均0.5、標準偏差0.15に標準化した（図7 c）。標準化した蛍光比率についてNHDFとhiPSCの比較を図3 cに示す。これらの細胞間には大きなmiRNA活性の差があると期待されるが、実際に、miRNA活性を示す図中の各点は対角線に対して直行する方向に広がって分布しており、かつこの分布は用いた蛍光蛋白質によらず均等に分布している。この補正值を細胞ごとのmiRNA活性プロファイルとし、線形モデルの例として主成分分析により解析した。主成分分析には統計パッケージRのprcomp関数を用いた。第一主成分を横軸、第二主成分を縦軸にとると、8種類の細胞条件は分類された（図3 d）。このことは1-slot mRNAを用いた探索解析によって得られたmiRNA活性プロファイルに従って、これらの細胞を統計解析上は分類できることを示している。

[0097] 主成分分析で得られた成分は270のmiRNA活性の線形結合として表現される。一方、細胞内の複数のmiRNA活性は、複数の標的配列を持つ1つのmRNAにより、定量的に積算して測定でき、かつmiRNA活性の検出感度は標的配列と開始コドン間の距離によって調節できた。従ってマーカータンパク質の発現量の対数をとると、複数のmiRNA活性を線形モデルで集約されることになる（図1b）。ただし、miRNA活性にかかる係数 ( $k = d^{-0.576}$ ) は常に正になる。そこで、異なる蛍光タンパク質を発現する2種類のmiRNA応答mRNAを用いて、2種類の蛍光値の比をとることによって、各miRNAに対して正負任意の重み付けを実現できる（図1b）。すなわち、細胞内の多種類のmiRNA活性プロファイルは、2種類のmiRNA応答mRNAを設計することによって、多変量を1つの蛍光値の比として集約できることになる。そこで、主成分分析と同様に、対象細胞で測定される値の分散が最大化されるようなmRNAを用いれば、対象の細胞を生きたまま分類することができると考えられる。

[0098] ここでは簡単のため4種類の5-slot mRNAを用いることとした。異なる細胞の種類を分類するため、270のmiRNA活性プロファイルから、細胞の分離能の高いと考えられるmiRNAを選別した。スクリーニング解析で得たmiRNA活性プロファイルに対して主成分分析とクラスター分析（ウォード法）を行い 270 のmiRNAを49クラスターに分離し、各クラスターで第一成分または第二成分への寄与が最も高いmiRNAを選んだ。クラスター分析には統計パッケージRのdist関数及びhclust関数を用いた。選ばれた49 miRNAのみで再び主成分分析を行い、第一成分または第二成分への寄与が高い26のmiRNAを選別した。26 miRNA の標的配列を含む 5-slot mRNAの8種類の細胞における発現量の予測値を計算し、いずれかの細胞で発現量が極めて小さくなるmRNA(Estimated expression < 0.05) を除外した。残りのmRNAについて8細胞における予測発現量の分散を計算し、分散が最大化するmRNAを5-slot mRNA #1 (hmAG1) とした。次に、5-slot mRNA #1と予測発現量の比率を計算し、その値が8細胞の分散を最大化するmRNAを5-slot mRNA #2 (hmK02) とした。さらに、5-slot mRNA #1 と 5-slot mRNA #2 の比率と、新たなmRNAの予測発現量の相関係数が 0.3 以下と

なり、かつこれらの2次元のデータにおいて8細胞の分散を最大化するmRNAを求め、5-slot mRNA #3 (tagBFP)とした。最後に5-slot mRNA #1と#2の比率、5-slot mRNA #3と#4の比率の2次元データにおいて8細胞の分散を最大化する5-slot mRNA #4 (hdKRed)を求めた。一連の計算上の探索により得られた1セットの5-slot mRNAを図3eに示す。また、このmRNAセットをトランسفエクションした場合の、8細胞の分布の推測結果を図3fに示す。

[0099] 設計された4本の5-slot mRNAを混合し、HeLa細胞、NHEK、NHDF、hiPSC及びhiPSC 14dにトランسفエクションし、24時間後にフローサイトメトリーを行った。蛍光補正後、解析された細胞ごとにhmAG1/hmK02及びtagBFP/hdKRedの2つの蛍光比率を求め、細胞の分布を密度プロットで示した(図3g)。これらの5種類の細胞は、同一の5-slot mRNAセットを用いてそれぞれ異なる場所に分布した。この結果から、6種類のmiRNA活性から線形モデルで抽出した2つのパラメータを、4本の5-slot mRNAを用いて直接測定し、これに基づいて5種類の細胞を生きたまま分離することが可能となった。また、miRNAに応答しないmRNAのセットや、1-slot のmiRNA-responsive mRNAのセットでも同様の実験を実施したが、これらの細胞種は分離できなかった(図8)。

[0100] 同一細胞(種)の時間変化の追跡

さらに、ヒトiPS細胞が分化能を失う過程を経時的に追跡して、工程(1)で探索する細胞の違いにより、得られるmRNAセットの分離能の違いを検証した(図4)。まず、270のmiRNA活性を探索的に定量した結果(図3c)からhiPSCとbFGF非存在下で部分的に分化させたhiPSC(iPSC 14d)の間で差の大きかった54のmiRNAを選択した(図4a)。これらのmiRNAを対象として、hiPSCがbFGF非存在下で部分的に分化する過程におけるmiRNA活性の経時変化を追跡するため、二次的な探索解析を実施した(図4b)。hiPSCをbFGF非存在下で培養し、培養開始当日(day 0)および1(day 1)、3(day 3)、6(day 6)、9(day 9)、または14日後(day 14)に、異なるmiRNA標的配列が挿入されたhmAG1、tagBFP、およびhdKRedをコードする1-slot mRNAを各1種類と、mRNA導入のコントロールとして用いたhmK02 mRNAの計4種類のmRNAを混合し、ト

ンスフェクションした。このとき一次的な探索解析（図3a）で用いた6種類のコントロールと同一のトランスフェクションを実施した。すなわち、各培養条件において24種類のトランスフェクションを実施した（図4a）。

各培養条件の細胞はトランスフェクションから24時間にフローサイトメトリーで解析した。一時的な探索解析の結果（図7a）と異なり、これらの培養条件間では、蛍光比率に大きなバイアスは見られなかった（図4c）ことから、蛍光比率の値をそのまま以後の解析に用いた。miRNA活性のプロファイルを主成分分析し、第一主成分を横軸、第二主成分を縦軸にとって、これらの培養条件にある細胞を分類した（図4d）。

測定された蛍光比率に対して主成分分析とクラスター分析（ウォード法）を行い54のmiRNAを23クラスターに分離し、各クラスターで第一成分または第二成分への寄与が最も高いmiRNAを選んだ。クラスター分析にはこれまでと同様に統計パッケージRのdist関数及びhclust関数を用いた。選ばれた23 miRNAのみで再び主成分分析を行い、第一成分または第二成分への寄与が高い11のmiRNAを選別した。これらの11 miRNAを用いて、一次的な探索解析（図3e, f）と同様の計算を実施して得られた5-slot mRNAのセットを図4eに、このmRNAセットをトランスフェクションした場合の、各培養条件の細胞の分布の推測結果を図4fに示す。また、実際にこの4本の5-slot mRNAsを各培養条件の細胞にトランスフェクションし、フローサイトメトリーを実施した結果を図4gに示す。電子ティープロット上で細胞集団は時間変化にしたがって移動しており、8種類のmiRNA活性から線形モデルで抽出した2つのパラメータを用いて、ヒトiPS細胞内部情報の経時的な変化を生きたまま追跡することができた。多種類の細胞を分類したプローブセット（図3e）と比べて、hiPSCの変化をより広い範囲に分離することができた（図9）。このことは細胞を分類している2つの合成パラメータを、mRNAのデザインにより任意に変更できることを示している。

[0101] (参考文献)

MicroRNA profiling reveals two distinct p53-related human pluripotent

stemcell states.

Neveu P., Kye MJ., Qi S., Buchholz DE., Clegg DO., Sahin M., Park IH., Kim KS.,

Daley GQ., Kornblum HI., Shraiman BI., Kosik KS.

Cell Stem Cell, 7(6):671-81, 2010

Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches.

Miki K., Endo K., Takahashi S., Funakoshi S., Takei I., Katayama S., Toyoda T., Kotaka M., Takaki T., Umeda M., Okubo C., Nishikawa M., Oishi A., Narita M., Miyashita I., Asano K., Hayashi K., Osafune K., Yamana S., Saito H., Yoshida Y.

Cell Stem Cell, 16(6):699-711, 2015

Engineering protein-responsive mRNA switch in Mammalian cells.

Endo K., Saito H.

Methods Mol Biol, 1111:183-96, 2014

High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries.

Mullokandov G., Baccarini A., Ruzo A., Jayaprakash AD., Tung N., Israelow B., Evans MJ., Sachidanandam R., Brown BD.

Nat Methods, 9(8):840-6, 2012

## 請求の範囲

[請求項1] 以下の工程を含む、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを設計する方法であって、当該miRNA応答配列を2以上含有するmRNAが、2以上のmiRNA応答配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNAである、方法；

- (1) 1つのmiRNA応答配列を有するmRNAの翻訳抑制効果を2以上の対象細胞で測定する工程、
- (2) 前記工程(1)の測定結果に基づき、各対象細胞でのmiRNA応答配列を2以上含有するmRNAの翻訳抑制効果を算出する工程、
- (3) 前記工程(2)で算出された値に基づき、前記2以上の対象細胞間における翻訳抑制効果の差が最大になる、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを選択する工程。

[請求項2] 前記工程(1)と工程(2)の間に、前記工程(1)の測定結果に基づき、前記工程(2)の算出に使用するmiRNA応答配列の種類を、多変量解析を用いて限定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 前記工程(2)の翻訳抑制効果が、前記2以上のmiRNA応答配列のそれぞれの翻訳抑制効果- $\log(\rho)$ を、miRNAの数だけ合算して得られるものであり、前記それぞれの翻訳抑制効果- $\log(\rho)$ が、下記式

[数1]

$$-\log(\rho) = -d^\xi \cdot \log(\rho^0)$$

(式中、 $\rho$ は、miRNAによる翻訳抑制効果を表し、  
 $d$  [nt]は、開始コドンからmiRNA標的配列までの距離を表し、  
 $\xi$ は、-0.576を表し、  
 $\rho^0$ はそれぞれのmiRNAについて距離0 [nt] の時の仮想的な翻訳抑制効果を表す)に基づいて算出される、請求項1または2に記載の方

法。

[請求項4] 前記工程（3）が、各対象細胞におけるマーカー遺伝子の翻訳量の分散を最大にする、

miRNA応答配列を2以上含有するmRNAを選択する工程を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

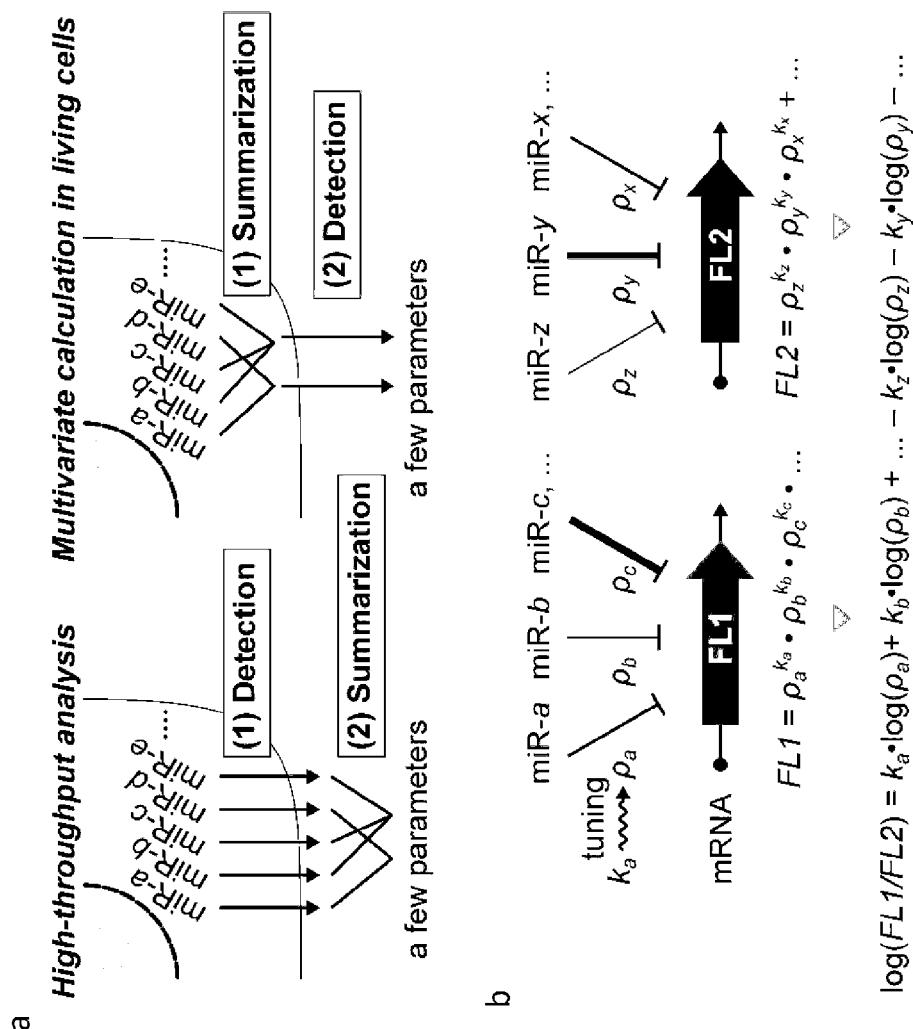
[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法でmRNAを設計する工程と、

前記設計されたmRNAを、遺伝子工学的手法により合成する工程とを含む、miRNA応答配列を2以上含有するmRNAの製造方法。

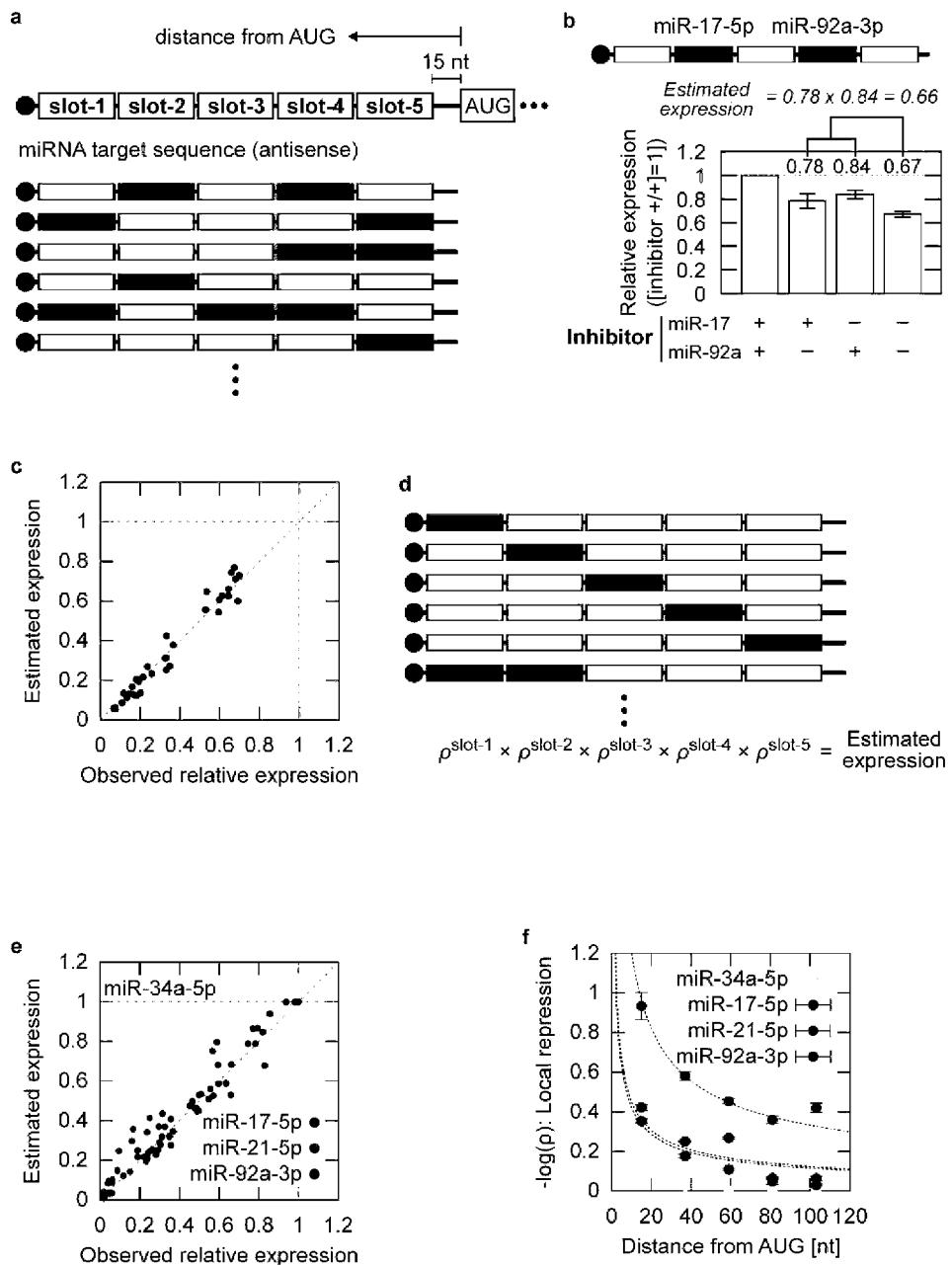
[請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法で設計されたmRNAを用いて、マーカー遺伝子の翻訳量を指標として2以上の対象細胞を分離する方法。

[請求項7] 前記mRNAが、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法で設計された、マーカー遺伝子配列及び5'UTRの配列がそれぞれ異なる4種のmRNAである、請求項6に記載の方法。

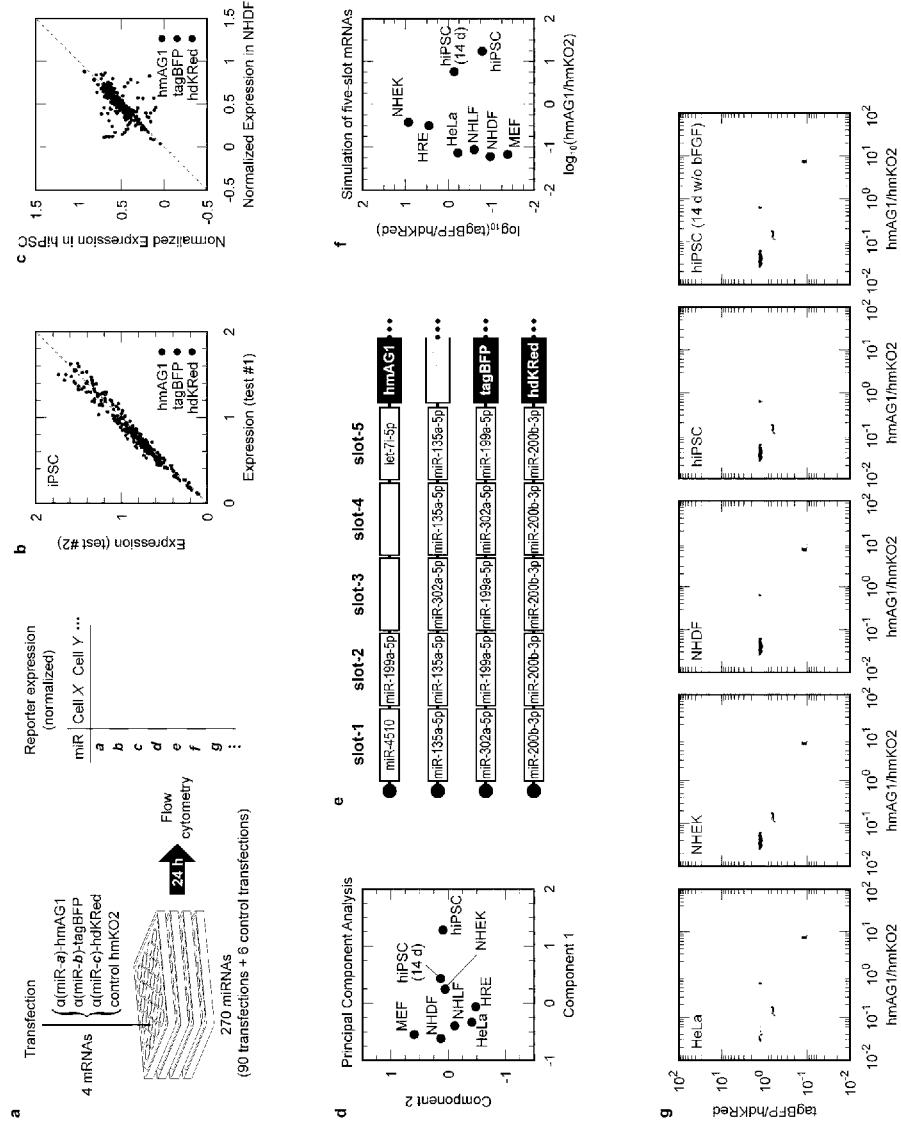
[図1]



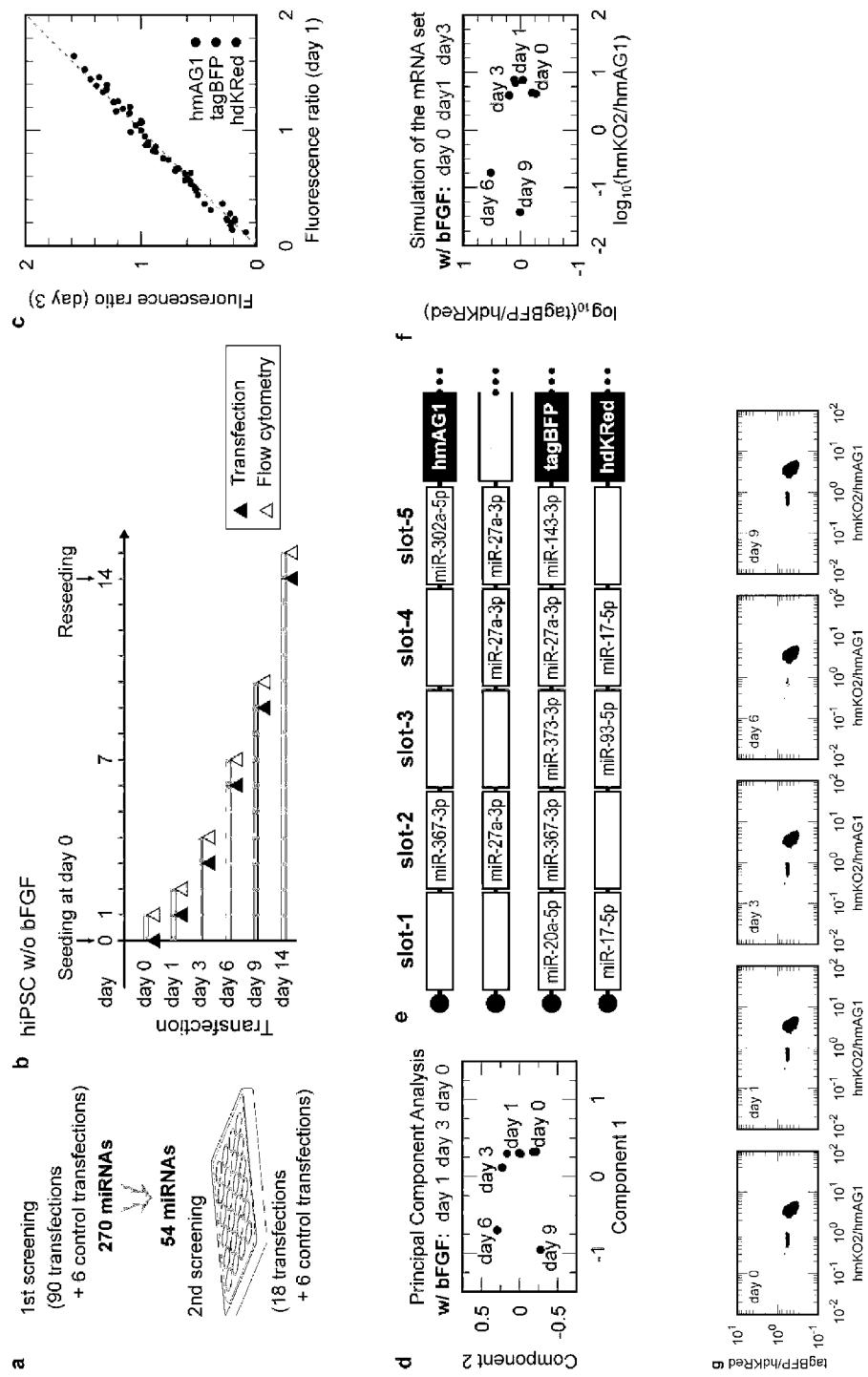
[図2]



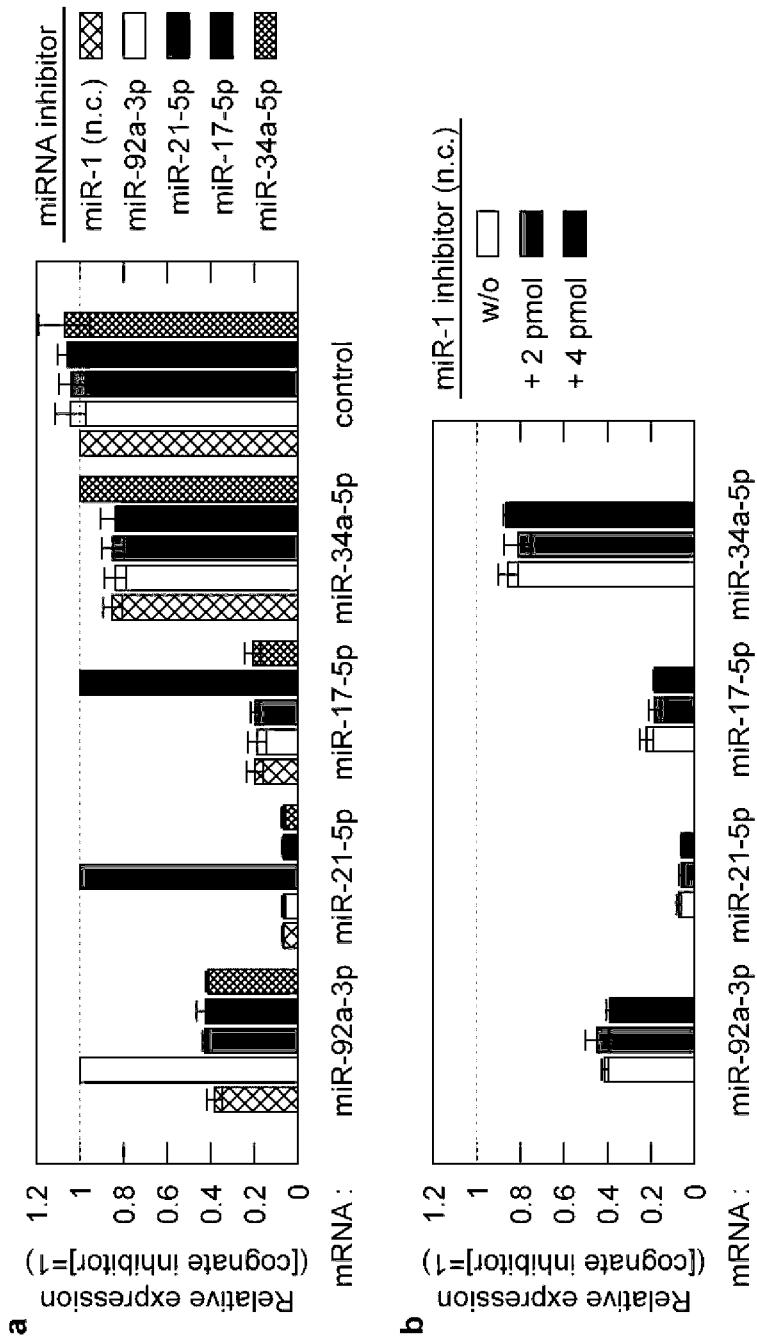
[図3]



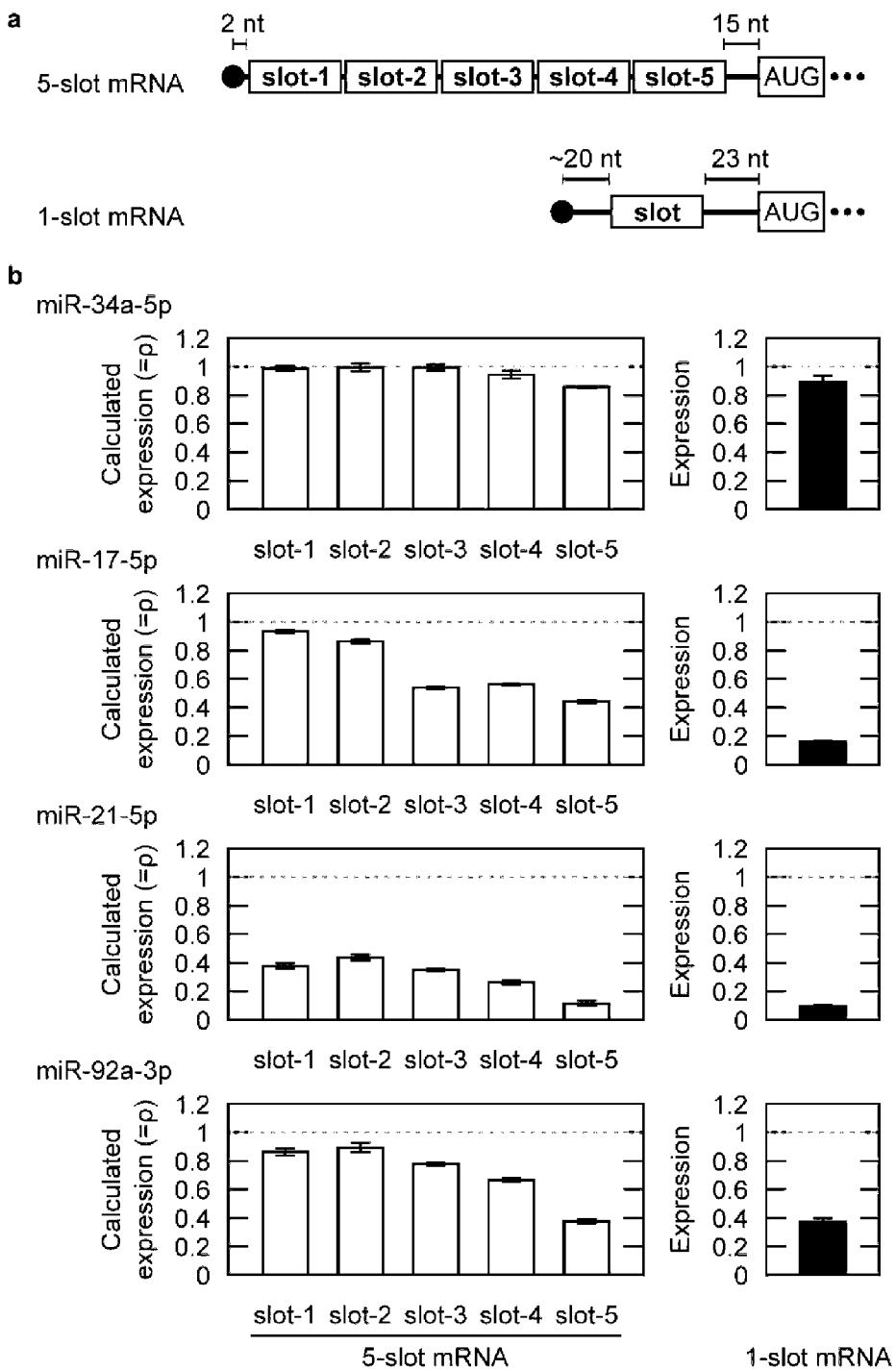
[图4]



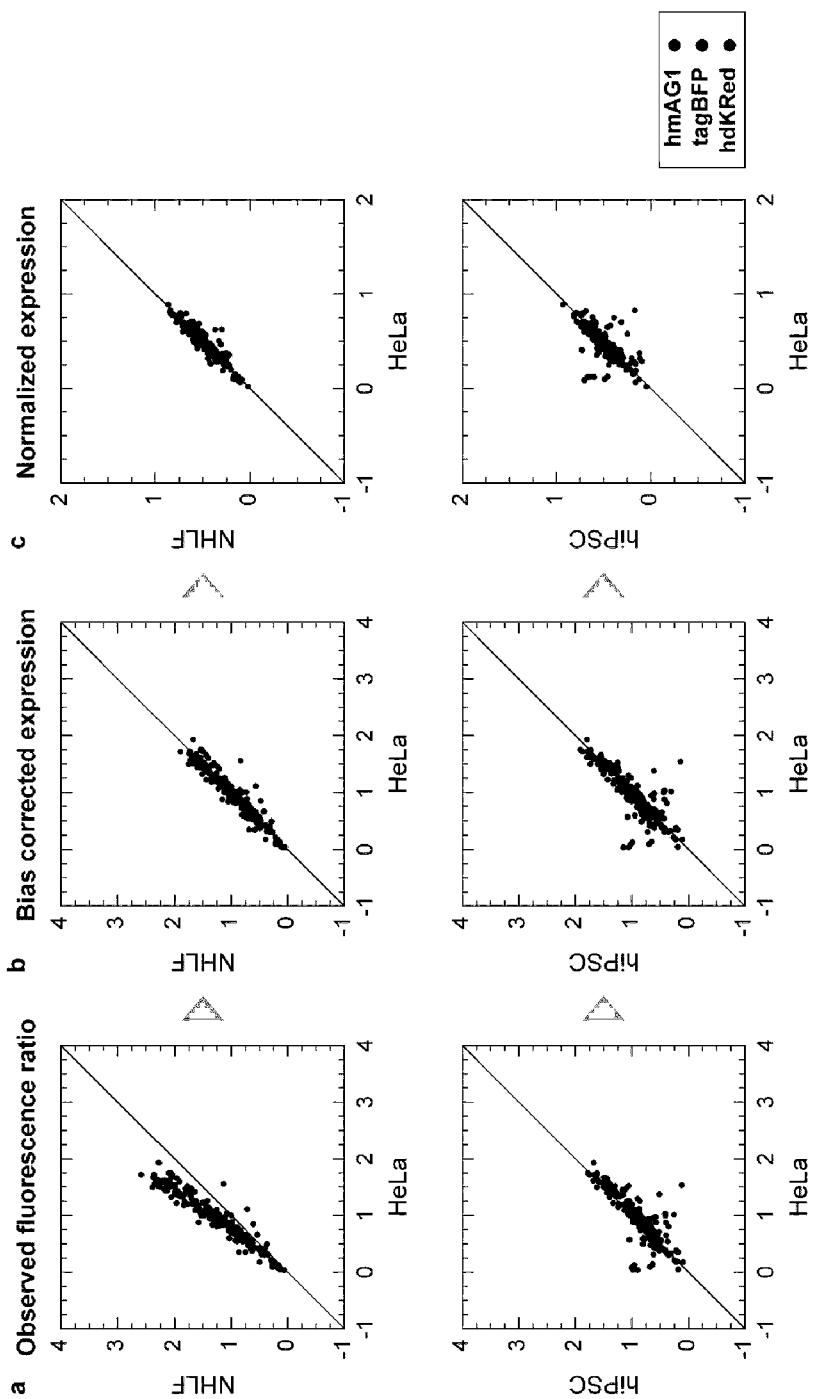
[図5]



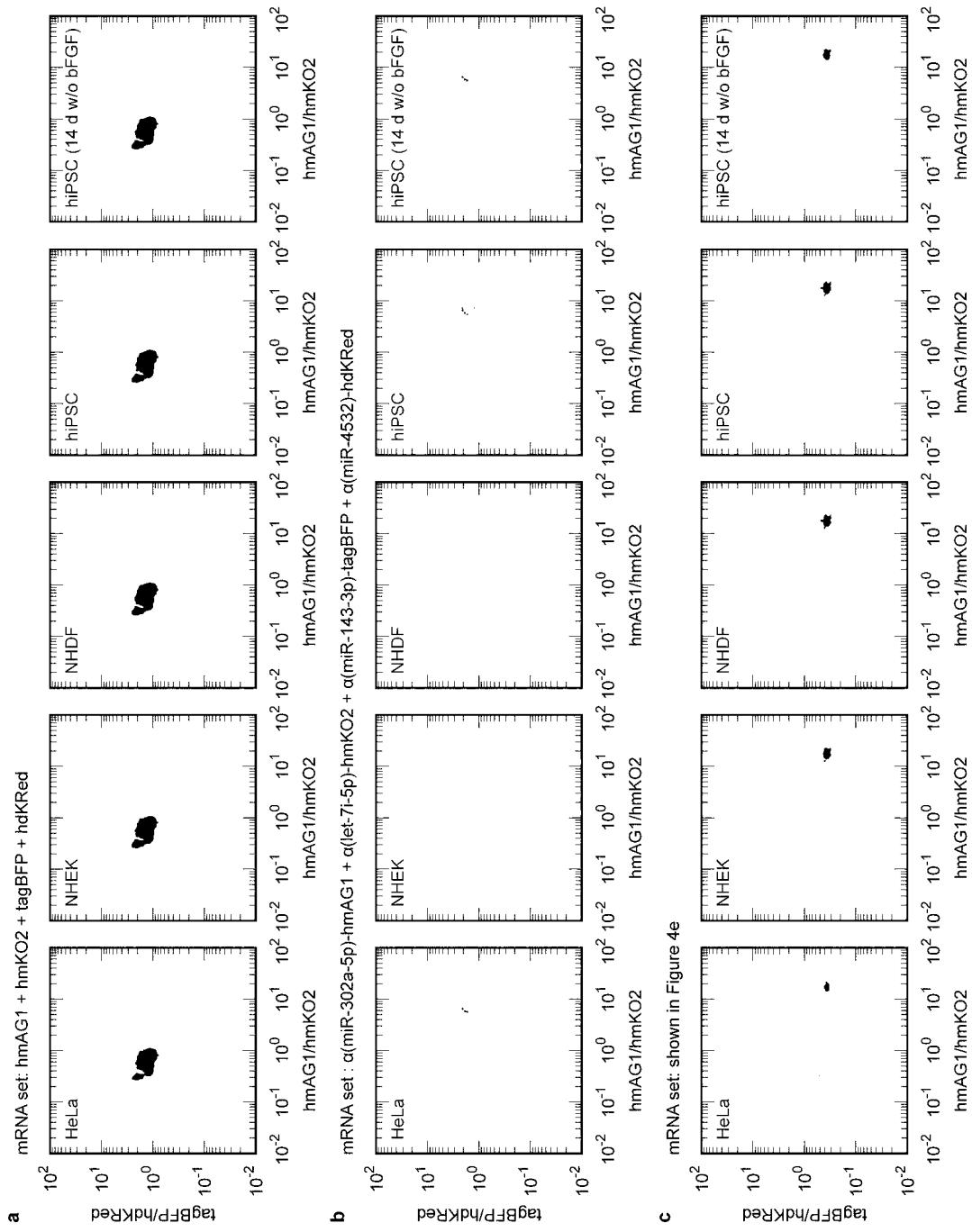
## [図6]



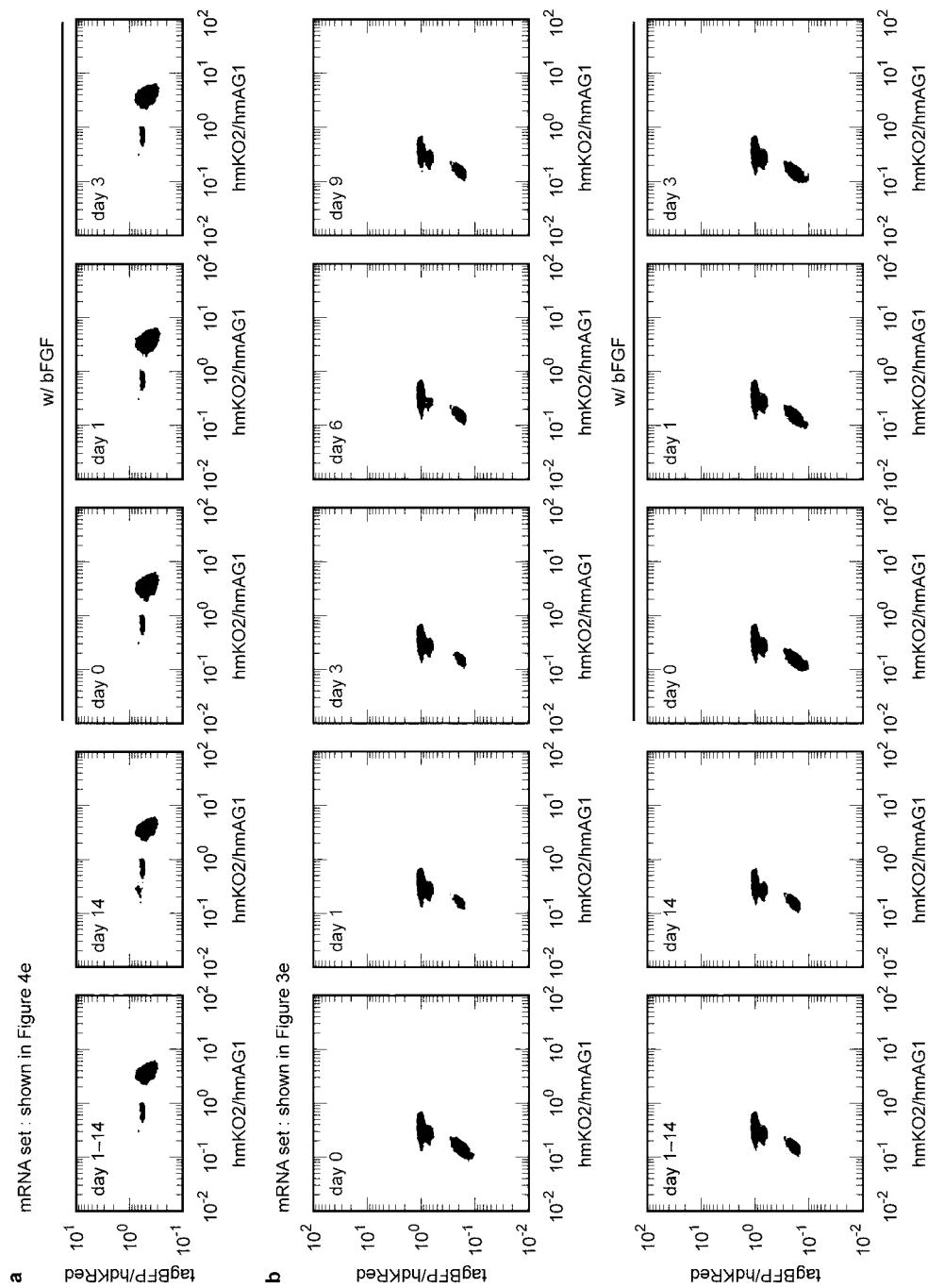
[図7]



[图8]



[图9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/081692

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12Q1/68  
(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/00, C12N5/071, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIKI K., et al., Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches, Cell Stem Cell, 2015.06.04, Vol. 16, pp. 699-711, SUMMARY, Fig. 1, Fig. 3, Fig. 7	1-7
A	Kenji MIKI et al., Efficient detection and purification of cells by synthetic microRNA switches, Regenerative Medicine, 2015.02.01, Vol. 14, Suppl, p. 188, O-04-5, ISSN 1347-7919, entire text	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* 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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 January 2017 (19.01.17)

Date of mailing of the international search report  
31 January 2017 (31.01.17)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/081692

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5405312 B1 (Japan Science and Technology Agency), 05 February 2014 (05.02.2014), paragraphs [0069] to [0073]; fig. 19, 20 & US 2010/0323356 A1 paragraphs [0139] to [0146]; fig. 19, 20 & WO 2009/066758 A1 & EP 2221371 A1	1-7
P,A	WO 2016/114354 A1 (Kyoto University), 21 July 2016 (21.07.2016), entire text (Family: none)	1-7
P,A	ENDO K. et al., High-resolution Identification and Separation of Living Cell Types by Multiple microRNA-responsive Synthetic mRNAs, Scientific Reports, 2016.02, 6:21991(pp. 1-8), entire text	1-7

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)n

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/00, C12N5/071, C12Q1/68

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MIKI K., et al., Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches, Cell Stem Cell, 2015.06.04, Vol. 16, pp. 699-711, SUMMARY、Fig. 1、Fig. 3、Fig. 7 等	1-7

※ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 19.01.2017	国際調査報告の発送日 31.01.2017
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 鈴木 崇之 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 4152

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	三木健嗣、他, Efficient detection and purification of cells by synthetic microRNA switches, 再生医療 日本再生医療学会雑誌, 2015.02.01, Vol. 14, Suppl, p. 188, 0-04-5, ISSN 1347-7919, 全文	1-7
A	JP 5405312 B1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2014.02.05, [0069]-[0073]、図19、図20 & US 2010/0323356 A1, [0139]-[[0146]], FIG. 19, FIG. 20 & WO 2009/066758 A1 & EP 2221371 A1	1-7
P, A	WO 2016/114354 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.07.21, 全文 (ファミリーなし)	1-7
P, A	ENDO K. et al., High-resolution Identification and Separation of Living Cell Types by Multiple microRNA-responsive Synthetic mRNAs, Scientific Reports, 2016.02, 6:21991(pp. 1-8), 全文	1-7