



日本学術振興会・産学協力委員会

R022 量子構造生物学委員会

第10回 研究会 資料

2023年6月20日（火）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）

R022 量子構造生物学委員会 第 10 回研究会 プログラム

2023 年 6 月 20 日（火）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F
(現地会場で開催／オンライン接続はありません)

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:35 – 14:35 （講演 1）

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

構造情報に基づく生命分子相互作用解析の現状と今後

東京大学・大学院工学系研究科
津 本 浩 平

14:35 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：運営委員・村田武士（千葉大学）

膜タンパク質構造解析とその応用

東京大学・大学院総合文化研究科
加 藤 英 明

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

構造情報に基づく生命分子相互作用解析の現状と今後

Current Status of Analyses of Biomolecular Interactions Based on Structural Information

東京大学大学院工学系研究科 医科学研究所

津 本 浩 平

Kouhei Tsumoto, Ph.D.

School of Engineering and The Institute of Medical Science,
The University of Tokyo

蛋白質科学は、構造、機能、物性という三つの観点が三位一体となって研究が展開され、生命科学に、そして最近では特に創薬に大きく貢献している。生命現象の中核は生命分子相互作用であり、相互作用を構成する分子群の構造解析、物性解析におけるイノベーションは、生命科学研究、創薬研究を加速させている。本講演では、構造情報を基盤とした生命分子相互作用解析の現状について、創薬を中心に用いられる手法について概説したのち、我々の研究例をもとに現状を紹介し、今後を議論したい。

1. はじめに

創薬において最も重要なのは、何をおいても治療効果等の生物学的機能である。その機能を最大限に発揮できること、ならびに標的となる分子について十分な特性解析を実施すること（ターゲットバリデーション）を前提に、1）標的分子に対する相互作用を物理化学的に、また構造科学的に詳述すること、2）医薬候補品となる抗体等分子の構造安定性とコロイド安定性の双方を吟味すること、が重要である。標的蛋白質との結合に関する特異性が、低分子・中分子に比べて作用点の数が多い分だけ担保されるが、作用機序の生物学的記述と、いわゆるエピトープと呼ばれる標的分子の作用点に関する解析が必須である。

このような相互作用の記述には、創薬標的の組換え蛋白質を用いた相互作用解析から結合を示すことが重要であり、原理の異なる複数の分析手法で相互作用することを確定する必要がある。さらに、可能であれば複合体の立体構造を決定し、各種変異体の解析結果とを検証することで（低分子、中分子でいわれる構造活性相関は抗体の場合も同様である）、生物学的特性と構造との関連を議論することが強く望まれる。

2. 相互作用解析の実際

2-1 生命分子相互作用の物理化学解析

実験的手法に関して、主な物理化学的解析技術を表 1 に示す。これらの解析の強みは、スクリーニングによって選抜された分子種のバリデーションにある。つまり、候補物質と標的分子との結合を定量的に解析することで、特異的結合に関する相互作用様式を精密に議論することができるところにある。さらに、これらの解析技術は各々で固有の測定原理に基づくデータを得ることができるため、組み合わせて多角的に評価することが重要である。王道な解析方法はどれなのか、と選ぶのではなく、多様化する標的分子に対して、その分子の特性を正確に捉え、柔軟な視点で物理化学的解析を実行することが望ましい。また、最近では、精密な構造情報に基づいた分子動力学計算が威力を発揮しており、特に分子の運動性に関する精緻な議論が可能になっている。

表 1. 主な物理化学的解析技術とその特徴

分析手法	得られるパラメータ	測定の特徴
結晶 X 線回折	原子、分子間距離	厳密な原子の立体配置が決定される
クライオ電子顕微鏡	立体構造	液体窒素冷却下で電子線を照射して得られる分子像を平均化して 3D 構造を得る
表面プラズモン共鳴 Surface plasmon resonance, SPR	K_D , k_{on} , k_{off} , ΔH_{VH} , ΔS_{VH}	精密な速度論パラメータが得られる
核磁気共鳴 Nuclear magnetic Resonance, NMR	立体構造、 1H シグナルシフト or 消失	溶液系でノンラベル解析が可能、候補物質の混合条件でも測定・解析が可能である
サーマルシフト Differential Scanning Fluorometry, DSF Differential Scanning Calorimetry, DSC)	T_m , 変性 ΔH	蛋白質のフォールディング状態を議論できる
等温滴定型熱量計 Isothermal Titration Calorimetry, ITC	K_D , ΔH , ΔS , ΔC_p	精密な熱量測定ができる、溶液系でノンラベル解析が可能である

質量分析 Mass Spectrometry、 MS	質量	精密な質量が測定できる。HD 交換を利用した HDX-MS が相互作用解析では威力を発揮する
バイオレイヤー干渉法 Bio-layer Interferometry、 BLI	K_D , k_{on} , k_{off} , ΔH_{VH} , ΔS_{VH}	精密な速度論パラメータが得られる
マイクロスケール熱泳動 Microscal Thermophoesis, MST	K_D , ΔH_{VH} , ΔS_{VH}	溶液系、夾雑の多いサンプルも可能、膜タンパク質も評価しやすい

3. 抗体工学における相互作用解析

3-1 抗体親和性向上

既存の抗体を改良し、機能や物性を付加・向上させることでその価値を高める次世代抗体戦略への期待は大きい。中でも抗体の親和性向上は抗体工学における主要なステップの1つである (Fig.1)。抗体を改変するためには、各アミノ酸のエネルギー的寄与、その熱力学的性質を知ることが重要である。そこで、抗体への部位特異的変異導入による相互作用解析について、ITC や SPR を用いた議論が活用される [1]。また、計算科学によるシミュレーションの導入は、改変抗体の合理的かつ高速な分子設計を可能にする。ITC 測定による熱力学・速度論パラメータとシミュレーション結果を組み合わせることにより、より効率的な抗体の高機能化設計が期待される (Fig.1)。ここでは、著者らの熱測定を活用した親和性向上に関する研究例を紹介する [2]。

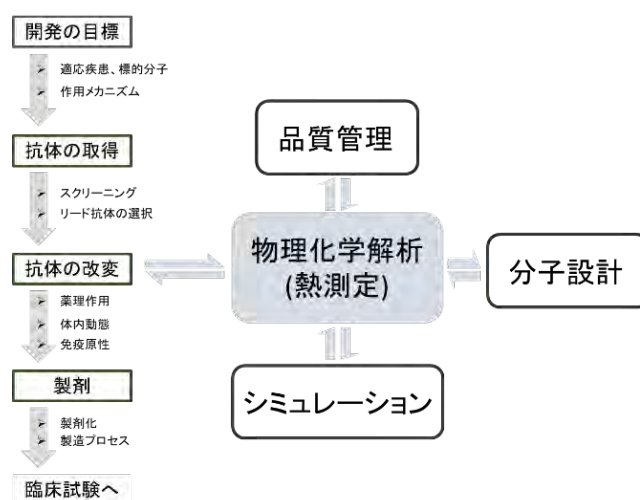


Fig. 1 抗体医薬品開発における物理化学解析を活用したワークフローの概要

モデル標的分子として肝がん細胞表面に特異的に発現する受容体 ROBO1 に対する一本鎖抗体 5209B scFv の結合に関し、複数のアラニン変異体に対して ITC による解析を行った (Fig.2A)。そのうち H 鎖の 103 番目のプロリン (P103A^H) において、Table 1 に示すようにエンタルピーの貢献による 20 倍の親和性向上が観察された。分子動力学計算 (MD) を用いて、原子レベルでの相互作用メカニズムを解析したところ、P103A^H 変異体では相互作用界面がわずかに動いたことにより塩橋が強まる距離に近接し、その結果エンタルピーが獲得されていることが明らかとなった。一方、L 鎖の 30 番目のリジンに関するアラニン変異体 (Y30A^L) においては、エントロピー的貢献により親和性が 5 倍上昇することが分かった (Table 1)。Y30A^L においては、MD 解析よりこちらも相互作用界面がわずかに近接し合ったことにより、脱水和が効率的に行われエントロピーを獲得している可能性が示された (Fig.2B)。非共有結合数を減らすことを期待したアラニン変異によって親和性が上昇したことは、相互作用界面のバランスや水分子の寄与を微細にコントロールすることで、親和性を上げることができる可能性を強く示唆するものである。抗体の部位特異的変異導入や改変抗体の相互作用評価を熱力学パラメータにより議論することにより、結晶構造だけでは推察できない抗体の相互作用様式とその強弱に関する有力な情報を得ることができると考えられる (Fig.2B)。近年、scFv は二重特異性抗体や細胞療法においてその活用方法に改めて注目が集まっており、これらの結果は次世代型の低分子化抗体設計において重要な知見を与えている。

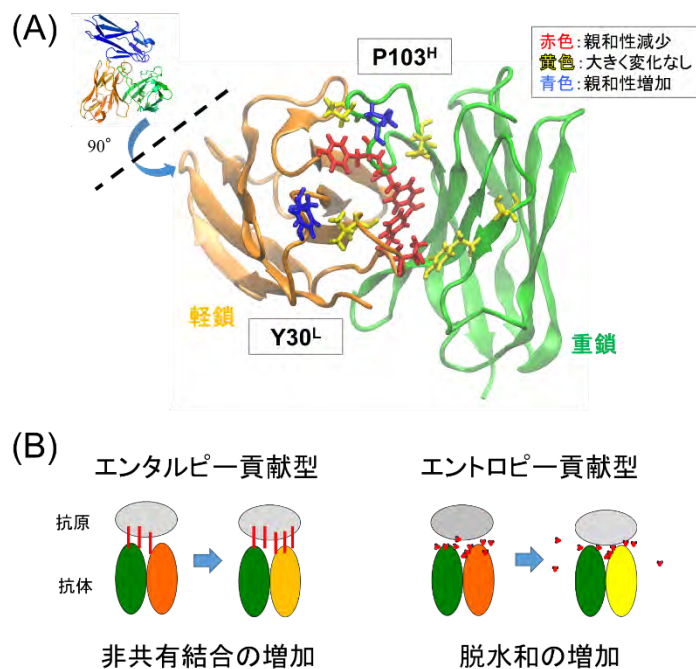


Fig. 2 (A) 抗 ROBO1 抗体 scFv の相互作用界面とアラニン変異導入箇所
(B) 抗体-抗原の相互作用界面の変動における熱力学パラメータの変化

Table 1. ROBO1 に対する scFv とそのアラニン変異体の熱力学パラメータ

	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$-T \Delta S$ (kJ/mol)
野生型	-37.7 ± 0.4	-69.0 ± 4.2	31.3 ± 4.2
P103A ^H	-46.0 ± 0.4	-79.1 ± 2.1	33.1 ± 2.1
Y30A ^L	-41.8 ± 0.8	-58.2 ± 5.0	15.9 ± 5.0

3-2 Fc 受容体の相互作用解析と精製

免疫学研究において重要な標的の一つである抗体定常領域 (IgG-Fc) 特異的受容体 (Fc γ R) が示す相互作用は、例えば、抗体の医薬品としての作用機序においても鍵を握る。その原子レベルでの相互作用に関する記述は、90 年代以降結晶構造解析を含む物理化学的アプローチにより試みられてきた。

我々は、東ソーライフサイエンス研の井出ら、国立衛研の石井、木吉らと共同で、特に Fc γ RI (I 型, CD64) と Fc γ RIII (III 型, CD16) に焦点をあて、抗体精製リガンドとして開発された (Fig.3) これらの膜外ドメイン (ECD) と Fc の相互作用について、結晶構造、熱力学、そして動力学解析により、その詳細な解析結果を報告してきた。

I 型に関しては、世界に先駆けてその結晶構造を明らかにし、Fc 領域の揺らぎに関する不均一性が相互作用に重要である可能性を指摘している (Fig.4 [3] [4])。

III 型に関しては、抗体の Fc 領域に付加された糖鎖の構造の相違による相互作用の変化を多角的に解析し、糖鎖構造と分子の揺らぎとの関連が、III 型 ECD を固定化した樹脂による抗体の精製に重要であることを提案している (Fig.5 [5] [6])。

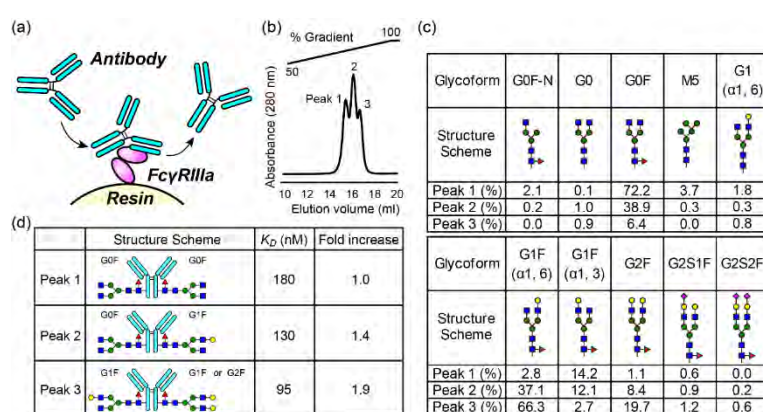


Fig.3 (a) Fc γ RIIIa 固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーの模式図 (b) リツキシマブを試料とした時のアフィニティークロマトグラム (c) Peak1, 2, 3 に含まれる抗体の Fc 糖鎖 (d) Peak 1, 2, 3 に含まれる抗体の模式図と、SPR を用いて求めた Fc γ RIIIa に対する親和性

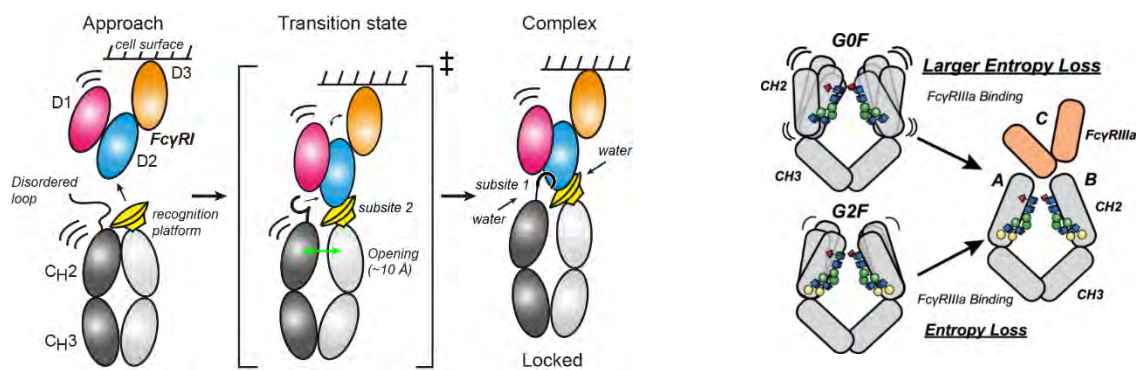


Fig.4 (左図) Fc-Fc γ RI 結合の分子モデル (文献 [3]より一部改変)

Fig.5 (右図) Fc γ RIII(III 型受容体)と Fc との相互作用モデル：末端ガラクトースによって制御されるコンフォメーションエントロピーが相互作用エネルギーを決定している。

4. 物理化学解析から膜タンパク質を捉える

医薬品開発において、その標的として膜タンパク質は非常に有望な分子であり、アゴニスト、アンタゴニストといった薬剤探索が盛んに行われている。しかしながら、標的膜タンパク質に対する特異的な薬剤の設計は今なお容易ではない。その理由のひとつとして、薬剤探索や化合物最適化がフェノタイプを軸に行われていることが考えられる。膜タンパク質は、細胞内の可溶性タンパク質と異なり、脂質二重膜に埋め込まれた状態でタンパク質としての構造と活性が保持されるため、分子を安定に調製することが必ずしも容易ではない。適切なタンパク質調製方法を適用、物理化学スクリーニングを活用して有望な新規薬剤の候補を選抜する報告例が増えてきている。X 線結晶構造解析、NMR、SPR、そして DSF によるフラグメントスクリーニングが主に知られている。最近では、熱泳動を原理としたマイクロスケール熱泳動法 (MST) も注目されている。我々も SPR と MST を組み合わせて GPCR のリガンド活性に関する詳細な議論に成功している [7]。GPCR のリガンド活性は、脂質二重膜の流動性の影響を受けることが分かり、流動性の低い脂質二重膜よりも、適度に流動性のある脂質二重膜の方が GPCR のリガンド活性が高いことを示している (Fig.6A)。この流動性は分子動力学計算 MD でも再現できている (Fig.6B)。今後、シミュレーションにおける分子状態や分子環境に対応した物理化学的パラメータに関する議論や、そのパラメータに基づく計算科学を活用したリガンド設計が進むものと期待される。

5. 最後に

最近我々は VHH 抗体の分子認識機構とその応用に関する研究を進めている [8-11]。VHH とはラクダ科の動物が産生する重鎖抗体の可変領域であり、シングルドメインで

(a)	POPC	DLPC	DOPC	DMPC
Lipid bilayer membrane				
$D (\times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	6.4 ± 0.5	9.3 ± 0.3	7.2 ± 1.2	4.3 ± 0.3
5-HT binding in Nanodisc				
$K_D, \text{MST (nM)}$	40.6 ± 0.6	3.9 ± 0.3	23.3 ± 1.0	N/A
$k_{on}, \text{SPR} (\times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	0.98 ± 0.03	1.25 ± 0.04	0.93 ± 0.11	N/A
$k_{off}, \text{SPR} (\times 10^{-1} \text{ s}^{-1})$	1.25 ± 0.13	0.46 ± 0.01	0.86 ± 0.08	N/A
$K_D, \text{SPR (nM)}$	12.8 ± 0.99	3.7 ± 0.19	9.3 ± 0.31	N/A

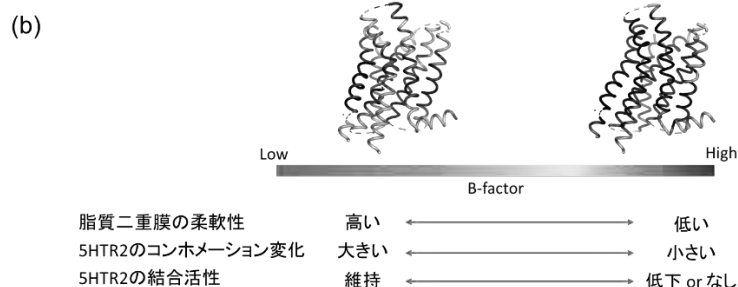


Fig.4 (a)膜タンパク質 5HTR2 とリガンドの結合解析 (SPR と MST) と脂質二重膜の流動性に対する依存性 (b)分子動力学計算による脂質二重膜の流動性と 5HTR2 ダイナミクスとの相関関係

標的に特異的に結合する。その小さな構造から抗体と低分子の中間の特性を有し、また分子デザインの自由度が高いという、創薬モダリティとして魅力的な特徴を備えている。これらの最近の研究例についても可能な限り紹介したい。

生命分子相互作用解析から得られる物理化学パラメーターに基づく議論は、構造情報を積極的に取り入れるようになり、さらに進化した。抗原抗体相互作用については、いよいよデザインへの期待も高まっている。精密解析を基盤として、親和性の向上、いわゆるイチジュウ（1→10）設計は可能になったものの、de novo 設計、いわゆるゼロイチ（0→1）設計はこれからの課題である。機械学習に基づくアプローチがこの課題を解決すると考えられるが、学習させることのできる精確かつ信頼性の高いデータをいかに迅速に取得するかがカギを握っている。

-
1. Akiba H and Tsumoto K, *J. Biochem.* **158**, 1-13 (2015)
 2. Yamashita T, *et al. Structure* **27**, 519-527 (2019)
 3. Kiyoshi M, *et al. Nature Commun.* **6**: 6866 (2015)
 4. Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Tsumoto K. *Immunol Rev.* **268**(1): 201-21 (2015)
 5. Kiyoshi M, *et al. Sci Rep.* **8**(1): 3955 (2018)
 6. Kosuge H, Nagatoishi S, Kiyoshi M, Ishii-Watabe A, Tanaka T, Terao Y, Oe S, Ide T, Tsumoto K. *Biotechnol. Prog.* e3016 (2020)
 7. Yoshida, K, *et al. Biochemistry* **58**, 504-508, (2019)
 8. Akiba H, *et al. Sci. Rep.* **9**, 1-11 (2019)
 9. Yokoo T, *et al. J. Biol. Chem.* **298**, 101962 (2022)
 10. Ikeuchi E, *et al. Sci. Rep.* **11**, 20624 (2021)
 11. Kuroda D and Tsumoto K, *Methods Mol Biol.* Vol **2552**, 61-70 (2022)

膜タンパク質構造解析とその応用

Control of Protein Solution and Industrial Application

東京大学 大学院総合文化研究科 先進科学研究機構

加 藤 英 明

Hideaki Kato

Komaba Institute for Science, The University of Tokyo

膜タンパク質構造解析について

“the cell is the fundamental element of organization”とは、フランスの医師であり生理学者でもあるアンリ・デュトロシェが 1824 年に残した言葉である [1]。生命の基本単位は細胞であり、細胞は細胞膜という脂質二重膜を用いて内部 (= 自己) と外部 (= 非自己) を区別している。細胞が生命として恒常的にその活動を維持し続けるためには、単に外部と内部を区別するだけでなく、適切なタイミングで適切な分量だけ、必要な物質を取り込み不要な物質を排出する必要がある。こうした物質や情報のやり取りに必要なとなるのが、細胞膜上に発現しているタンパク質、すなわち膜タンパク質である。

膜タンパク質はその生理的重要性や創薬標的としての重要性の高さなどから古くより注目されており、その構造機能相関を理解するため、そしてその機能を制御するために様々な構造解析研究が行われてきた。膜タンパク質は細胞内に包埋された状態では安定である一方、界面活性剤を用いて膜から可溶化すると安定性が著しく低下する。そのため、膜タンパク質の構造解析は水溶性タンパク質のそれと比較して約 30 年遅れをとっており、初めて水溶性タンパク質（ミオグロビン）の構造解析がなされたのが 1957-8 年であるのに対し [2]、初の膜タンパク質（光合成反応中心）の構造解析が達成されたのは 1984-5 年のことである [3]。1980-90 年代の膜タンパク質高分解能構造解析では、主に蒸気拡散法と呼ばれる結晶化方法により得られた三次元結晶を用い、X 線結晶構造解析の手法によりその構造が決定されていた。しかし、構造解析に必要な高品質の結晶が得られるまでには 5 年以上の時間がかかることも珍しくなく、膜タンパク質構造解析の難易度は高いというのが共通認識であった。1996 年に脂質キュービック相法と呼ばれる結晶化方法が開発され [4]、2007 年に同手法を用いて G タンパク質共役型受容体（GPCR）の 1 つである $\beta 2$ アドレナリン受容体の構造解析が達成されると [5]、この手法は急速に膜タンパク質構造解析業界に広まり、結晶化を含めた構造解析にかかる時間は 3-5 年程度に短縮されるようになっていった。

そうした状況がさらに変化したのは 2012-13 年に起こったクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析 (Single-Particle Analysis: SPA) における技術革新、俗にいう “Resolution Revolution (分解能革命)” である。CMOS 型直接電子検出器の開発やそ

れに伴う画像解析ソフトウェアの進歩により、従来”blob-ology”と揶揄されていた SPA は劇的な進化を遂げた。2013 年に報告されたイオンチャネル(TRPV1)の構造を皮切りに [6]、2014-16 年には膜酵素(γ -secretase) [7]や一次能動輸送体(PCAT) [8]、2018 年には GPCR-G タンパク質複合体(MOR-Gi) [9]、2019 年には二次能動輸送体(SERT) [10]、2021-22 年には微生物型ロドプシン (GPR、ChRmine) と [11,12]、年々 SPA の適用範囲は広がりを見せ、より分子量が小さく、高難度の膜タンパク質構造解析が可能となってきた。また、近年では単一サンプルから複数状態の構造を同時に決定する解析技術や、細胞内での in situ 構造解析技術であるクライオ電子顕微鏡トモグラフィー (cryo-ET) も目覚ましい発展を遂げつつある。

一方で、X 線結晶構造解析は X 線自由電子レーザーと結びつくことにより、高い時間分解能を持つ時分割構造解析への道を切り開いた。特に、光によって励起されるタンパク質を中心に技術革新が進み、反応開始からフェムト秒後のような非常に速い時間スケールでの高分解能構造解析を可能とする唯一無二の手法として進化しつつある [13]。これらの手法は、NMR や高速 AFM、膨張顕微鏡法などの構造解析・イメージング技術、AlphaFold2、ESMfold などのタンパク質構造予測技術の発展と入り混じりながら、今日もお互いの技術を磨き、高めあっている。

こうして得られた様々な構造・ダイナミクスの情報は、単にタンパク質が有する複雑な機能の分子基盤を明らかにしてくれるだけではない。タンパク質に結合し、その活性を制御する化合物のデザインは創薬シーズの導出へと結びつき、タンパク質その物の改変は新たな分子ツール、バイオテクノロジーの創出へと繋がることで、我々の実生活にも影響を与えている。

微生物型ロドプシンの構造解析と光遺伝学ツール開発

前項で述べた膜タンパク質の構造解析や分子ツール開発の例として、微生物型ロドプシン・光遺伝学ツールについて紹介したい。

ヒトから微生物まで多くの生物は光エネルギー、あるいは光情報を受容して生命活動を営んでいるが、多くの場合この光受容には、発色団としてレチナールと呼ばれる低分子を結合したロドプシンファミリータンパク質が用いられている。このうち、特に微生物が有するロドプシンファミリータンパク質を総称して微生物型ロドプシンと呼ぶ。微生物型ロドプシンの歴史は、1971 年に光駆動型外向きプロトンポンプとして働くバクテリオロドプシンが発見されたところに端を発するが [14]、現在ではイオンポンプ、イオンチャネル、環状ヌクレオチド合成・分解酵素など、様々な分子機能を有する多彩な微生物型ロドプシンが発見されている (図 1)。このうち、特にイオンポンプやイオンチャネルとして機能するロドプシン (イオン輸送型ロドプシン) は、2005-6 年に神経科学と結びついたことで「光遺伝学」と呼ばれる新たなバイオテクノロジーの創出に結びついた。

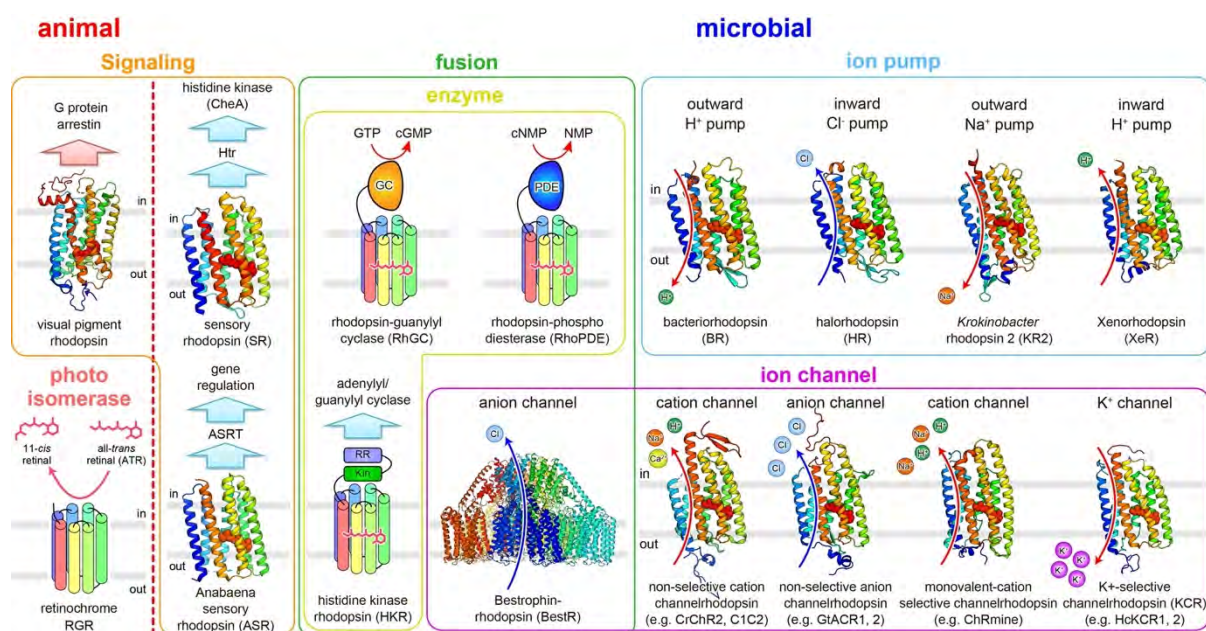


図 1. ロドプシンファミリータンパク質の概観

光遺伝学とは、2005 年にサンフランシスコで行われた神経科学の国際会議において作られた造語であり、狭義には「イオン輸送型ロドプシンを用いて神経細胞の活動制御を行う技術」のことを指す。例えば、非選択的陽イオンチャネル型ロドプシンである CrChR2 を神経細胞に発現させて光を照射すると、細胞内膜電位が上昇（脱分極）し、その神経細胞は興奮（発火）する。逆に内向き塩化物イオンポンプである NpHR を発現させた神経細胞に光を照射すると、細胞内膜電位は低下（過分極）し、神経細胞の発火は抑制される。つまり、神経科学者はイオン輸送型ロドプシンを用いることで光により可逆的に特定の神経細胞の興奮状態を制御してやることが可能になったわけである。光遺伝学は脳内の神経細胞発火と行動表出の因果関係を明快に調べることが可能な方法として着目され、現在では神経科学を中心に幅広い生命科学分野において必須の技術となっている。また 2021 年には、イオンチャネル型ロドプシンを用いて網膜色素変性症により 40 年間ほぼ失明状態にあったヒト患者の一部視力を回復させることに成功するなど、遺伝子治療への応用も積極的に模索されている [15]。

しかしながら、自然界より最初期に発見されたイオン輸送型ロドプシンは、イオンの輸送効率や活性化に必要な光の波長、光感度、キネティクスなど様々な面で制約が存在していた。そのため、光遺伝学をより使いやすい技術へと昇華させるには、イオン輸送型ロドプシンの構造機能相関をより深く理解し、各種性質を改変する必要があると考えられていた。

そうした背景を踏まえ、本講演では私たちの研究グループがこれまで取り組んできたイオンチャネル型ロドプシンの構造機能解析と、構造情報を利用した光遺伝学ツール開発について紹介したい（図 2） [12,16-21]。

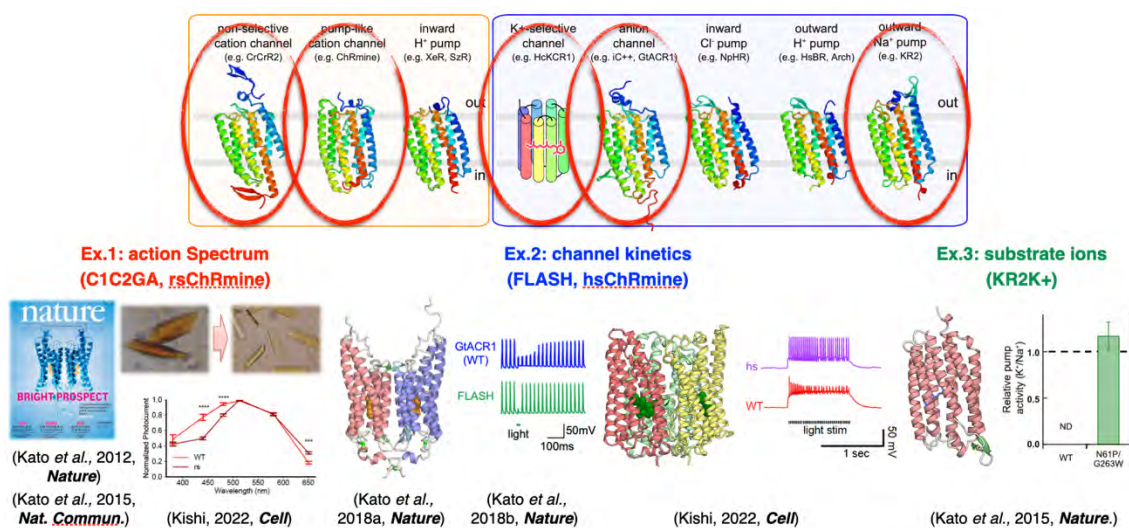


図 2. これまでのイオン輸送型ロドプシン構造解析と光遺伝学ツール開発の例

1. Dutrochet H, J.B. Baillière (ed). Paris, 1824
2. Kendrew JC et al., *Nature*, **181**, 662-6, 1958
3. Deisenhofer J et al., *Nature*, **318**, 618-624, 1985
4. Landau EM and Rosenbusch JP, *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 14532-5, 1996
5. Rosenbaum DM et al., *Science*, **318**, 1266-73, 2007
6. Liao M et al., *Nature*, **504**, 107-12, 2013
7. Lu P et al., *Nature*, **512**, 166-70, 2014
8. Lin DY et al., *Nature*, **523**, 425-30, 2015
9. Koehl A et al., *Nature*, **558**, 547-52, 2018
10. Coleman JA et al., *Nature*, **569**, 141-5, 2019
11. Hirschi S et al., *Nat. Commun.*, **12**, 4107, 2021
12. Kishi KE et al., *Cell*, **185**, 672-89, 2022
13. Nogly P et al., *Science*, **361**, eaat0094, 2018
14. Oesterhelt D and Stoeckenius W, *Nature*, **233**, 149-52, 1971
15. Sahel JA et al., *Nat. Med.*, **27**, 1223-9, 2021
16. Kato HE et al., *Nature*, **482**, 369-74, 2012
17. Kato HE et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7177, 2015
18. Kim YS* and Kato HE* et al., *Nature*, **561**, 343-48, 2018
19. Kato HE* and Kim YS* et al., *Nature*, **561**, 349-54, 2018
20. Marshel et al., *Science*, **365**, eaaw5202, 2019
21. Tajima et al., *bioRxiv*, 10.1101/2022.10.30.514430, 2022