

実験講座



近位依存性ビオチン標識技術を用いた空間的プロテオームの解読

高野 哲也

Key words : 近位依存性ビオチン標識, BioID, TurboID, Split-TurboID, シナプス

近位依存性ビオチン標識 (proximity labeling ; PL) 技術は、標的タンパク質の近接タンパク質成分を標識し網羅的に解析する技術である。この PL 技術は、従来の解析技術と比較して非常に高い検出能と空間解像度でタンパク質成分を解析できることから、近年ますます注目されている。本稿では、この PL 技術を利用したタンパク質間相互作用、タンパク質-核酸相互作用、オルガネラ、コンパートメントのプロテオーム解析についての最前線を解説する。

更に近年では、PL 技術を発展させた空間的プロテオーム解析技術 TurboID-surface と Split-TurboID が登場した。これらの技術により、生体組織から特定の細胞間相互作用を標的にした空間的プロテオームデータの取得が可能となり、生体内での細胞間コミュニケーションの新たな役割が見え始めている。本稿では、これらの筆者らが開発した脳内の空間的プロテオーム解析技術について最新の知見も紹介する。

I. 近位依存性ビオチン標識 (proximity labeling ; PL) 技術

1. 空間的なタンパク質ネットワークの理解に向けて

ヒトの体内には約 10 万種類のタンパク質が存在し、非常に複雑な生理機能を制御している。こ

れらのタンパク質が細胞の中で適所に配置し、他のタンパク質と複合体を形成することで多様な役割を担っている。そのため、生物学的現象を理解するためには、空間的なタンパク質の構成成分と機能を明らかにすることが必須である。また、タンパク質の機能破綻は非常に多くの疾患と関連しており、タンパク質の機能解析は病態メカニズムの解明のみならず、抗体医薬や分子医薬など新たな創薬開発にもつながる非常に重要な研究分野である。

これまでのプロテオーム解析には、細胞分画法、密度勾配遠心法、免疫沈降法、アフィニティー精製法、そして近年ではフローサイトメトリと密度勾配遠心法を組み合わせた FASS (fluorescence activated synaptosome sorting) 法が大きく貢献してきた¹⁾。しかしながら、いずれの方法もタンパク質の精製過程において生体組織や細胞すべてを破碎するために、タンパク質成分の十分な空間情報が得られなかった。更に、これらまでの解析では、界面活性剤を用いたサンプルの可溶化によって非常に多くのタンパク質成分を見落としていた可能性がある。例えば、従来の方法では、リガンドと受容体のような結合力の弱いタンパク質複合体、酵素と基質のような一過的に結合するタンパク質、そして生体内の特定の細胞間隙に存在するタンパク質成分を解析することは非常

Deciphering the spatial proteome by proximal-dependent labeling

Takano Tetsuya : 慶應義塾大学医学部生理学 (神経生理) 教室 (〒 160-8582 東京都新宿区信濃町 35), 科学技術振興機構 さきがけ

0370-9531/04/¥500/論文/JCOPY

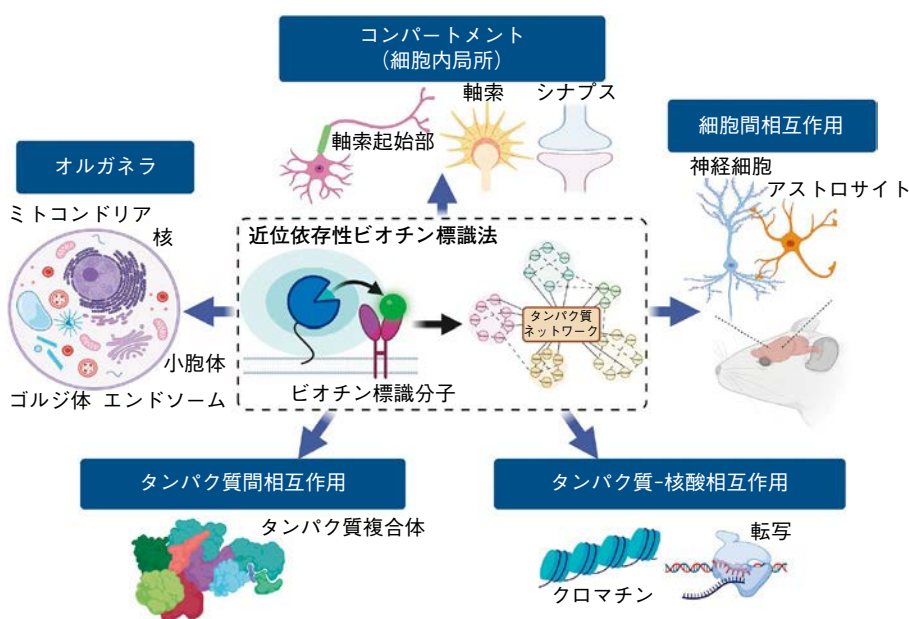


図 1 PL 技術を用いた解析例

に困難とされていた。

2. PL 技術の原理と種類

近年、プロテオーム解析のなかでも特に注目が集まっているのが PL 技術である^{2,3)}。この方法は、酵素を用いて標的タンパク質の近傍に存在するタンパク質を一網打尽にビオチン標識する技術である(図 1)。ビオチン標識されたタンパク質は、アビジン-ビオチン結合を利用することで容易にタンパク質成分の詳細な解析が可能である。この PL 技術では、結合力の弱い場合や一時的な結合でタンパク質間の結合が乖離した場合にも、ビオチン標識されていれば目的タンパク質と相互作用するタンパク質の同定が可能である。そのため、PL 技術は高い検出能と空間解像度を有しており、タンパク質間相互作用やタンパク質-核酸相互作用、オルガネラやコンパートメント(細胞内局所)に存在するタンパク質成分、そして近年では細胞間相互作用に関わるタンパク質成分の解析など、非常に幅広い研究分野のタンパク質ネットワーク解析に貢献している(図 1)。また、最近ではビオチン標識分子の精製法も改良されており、通常のアビジンを用いた方法に加え、タマビジン[®] 2-REV を用いることで精度の高いビオチン標識タンパク質成分を解析できることが報告さ

れている⁴⁾。

PL 技術には、大腸菌由来の変異型ビオチン化酵素 BirA^{*}-R118 G を用いた BioID と、大豆由来の変異型アスコルビン酸ペルオキシダーゼを用いた APEX がある(図 2)。BioID では、BirA をベイトタンパク質に融合し細胞に導入すると、BirA は中間体の反応性ビオチン(biotinoyl-5'-AMP)を産生し、約 10 nm 範囲内のタンパク質のリジン残基にビオチンを共有結合する。この BioID に用いられるビオチン化酵素は由来種や変異型を含めて多様であり、BioID2, BASU, miniTurbo, TurboID, UltraID, MicroID, MicroID2, AriID などが存在する^{2,3,5)}(図 2)。

APEX では、BioID と同様に APEX をベイトタンパク質に融合し細胞に導入すると、過酸化水素(H₂O₂)の存在下でビオチン-フェノールをビオチン-フェノールラジカル触媒することで、1 分以内に周囲 10-20 nm 範囲内のタンパク質のチロシン残基をビオチン標識する。この APEX は、培養細胞を用いたプロテオーム解析やイメージング解析、そして近年ではタンパク質-核酸相互作用の解析に適用できることが報告されている³⁾。また、APEX はジアミノベンジジン(DAB)の酸化と沈着を触媒することで細胞を染色し、電子顕

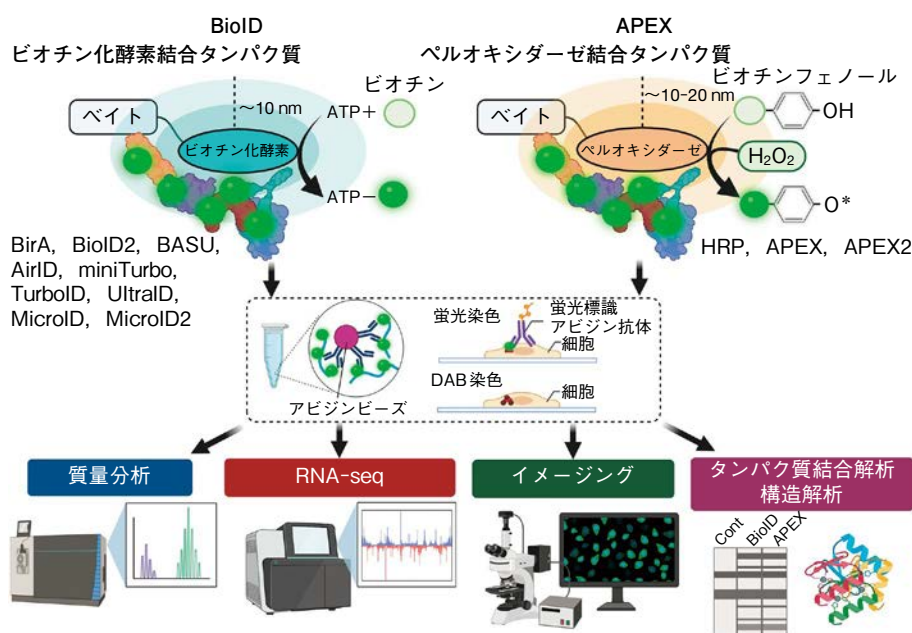


図 2 PL 技術のワークフロー

顕微鏡を用いたイメージングにも有用である(図2)。

APEX には HRP や APEX2 などの酵素が含まれるが、これらのビオチン標識反応には毒性のある過酸化水が必要となるため、組織サンプルを用いた解析が難しい点が課題となっている。一方で、組織サンプルを用いた解析には BioID が広く使用されており、この PL 技術は生体内 BioID (iBioID) 法と呼ばれている^{6,7)}。

II. PL 技術を用いた解析

1. タンパク質間相互作用

PL 技術は、酵素-基質複合体や受容体-リガンド複合体のような一過的なタンパク質間相互作用、そしてタンパク質凝集体のような不溶性タンパク質のタンパク質間相互作用の解析において有効とされている。実際に、PL 技術を用いて非常に多くのシグナルネットワークのプロテオーム解析が行われている。例えば、Ras/分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) シグナル伝達経路、Hippo シグナル伝達経路、ヘッジホッグシグナル伝達経路、NF- κ B シグナル伝達経路や G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor;

GPCR) シグナル伝達経路、E3 ユビキチンリガーゼのタンパク質間相互作用の解析など、多くの生物学的現象や疾患に関わるシグナルネットワークが解読されている⁸⁻¹⁴⁾。

更に、BioID を用いた不溶性のタンパク質凝集体のインタラクトーム解析も報告されている。TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43)-BirA を用いた解析により、核膜孔複合体や核細胞質間輸送体関連タンパク質が同定され、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) や前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia; FTD) の病態メカニズムに核内輸送の異常が関与していることが示されている¹⁵⁾。

2. タンパク質-核酸相互作用

PL 技術はタンパク質間相互作用ばかりでなく、タンパク質-核酸相互作用のインタラクトーム解析にも幅広く用いられている。これらの解析は、遺伝発現機構やクロマチンリモデリングを理解するうえで非常に重要な知見を提供する。代表的なものとして、APEX を用いた ALaP (タンパク質-DNA 相互作用解析) と APEX-RIP (タンパク質-RNA 相互作用解析) がある^{16,17)}。これらの方法は、APEX を用いて核酸結合タンパク質を

ビオチン標識し、アビジンビーズによる精製後に qPCR や次世代シーケンシングによって解析するものである。従来のクロマチン沈降シーケンス (ChIP-seq) や UV クロスリンク沈降シーケンス (CLIP-seq), RNA 沈降シーケンス (RIP-seq) などの手法に比べて, ALaP および APEX-RIP は検出感度と空間解像度が高いことが報告されている。

これらの技術に加えて, PL 技術を用いたタンパク質-DNA 相互作用解析については, 近年 CRISPR/dCas9 を用いた dCas9-APEX と ChromID という技術が開発されている^{18,19)}。dCas9-APEX では, APEX に不活性 Cas9 (dCas9) を融合し, 特定のゲノム配列を標的にすることで, その近傍のテロメアやセントロメアなどの関連タンパク質成分を質量分析で解析する手法である。また, ChromID は BASU とクロマチン修飾に特異的な配列 (クロマチンリーダー) を融合することで, 近傍のクロマチン結合タンパク質を網羅的に解析することができる。PL 技術を用いたタンパク質-RNA 相互作用解析については, CRISPR/dCas13 を用いた dCas13-APEX2 と RaPID という技術が開発されている^{20,21)}。dCas13-APEX2 では, APEX2 に不活性 Cas13 (dCas13) を融合し, ヒトテロメアーゼ RNA など特定の RNA 配列を標的にすることで, その近傍のタンパク質成分を解析する手法である。また, RaPID はバクテリオファージ λ N ペプチドに BASU を融合することで, 標的 RNA の BoxB 近傍の RNA 結合タンパク質を網羅的に解析することができる。

このように, PL 技術を用いたタンパク質間-核酸相互作用の解析技術は発展しており, これまで知られていなかった新たな遺伝発現機構やクロマチンリモデリングの制御機構が次々と明らかになっている。

3. オルガネラプロテオーム解析

PL 技術は高い空間解像度でのプロテオーム解析が可能であることから, ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) を用いたオルガネラタンパク質の大規模な解析が報告されている²²⁾。192 のオルガネラ分子マーカーに BirA を融合することで, 核, 小胞体, ミトコンドリア, ゴルジ体, 細胞骨

格, 細胞膜など 20 種類ものオルガネラ特異的タンパク質成分が 4,424 分子と多数同定されている。現在, これらの個々のオルガネラタンパク質情報は, Cell MAP (<https://humancellmap.org/explore/maps>) で情報が提供されている。

また, オルガネラ分子マーカーにエピトープタグと BirA を融合した MAC タグを用いることで, 免疫沈降法とアビジンによるプルダウンアッセイの両方を用いたタンパク質成分の精製手法が報告されている²³⁾。この方法により, 18 種類のオルガネラ特異的タンパク質として免疫沈降法を用いた精製から 679 分子, アビジンによるプルダウンアッセイを用いた精製から 2,218 分子が同定されている。今後, 神経細胞, グリア細胞のような細胞種ごとやがん細胞などの疾患に関連した細胞でのオルガネラタンパク質の網羅的な探索が予想され, ハイスループットにタンパク質の局在情報を一括して解析することが可能となる。

4. コンパートメント (細胞内局所) に存在するタンパク質成分の解析

脳内の神経細胞は情報伝達に特化した細胞形態を示しており, 高度にコンパートメント (区分) 化した細胞である。神経細胞は 1 本の軸索と複数の樹状突起を有しており, 軸索の先端部と他の神経細胞の樹状突起の先端部にシナプスと呼ばれる細胞接着構造を形成する。

これらシナプスは, 興奮性シナプスと抑制性シナプスという 2 種類のシナプスに大別することができる。興奮性シナプスは信号を受け取ると脱分極し, 活動電位の発火を促進する。一方で, 抑制性シナプスは信号を受け取ると過分極し, 活動電位の発生を抑制する。これら 2 つのシナプスは, 存在するタンパク質成分も大きく異なることが知られているが, 従来の方法ではこのような異なる種類のシナプスを区別して単離し, 機能するタンパク質成分を調べることができなかった。そこで, 興奮性シナプス分子 PSD-95 に BirA を融合し, そして抑制性シナプス分子 gephyrin に BirA を融合することで, 脳内の 2 つのシナプスを区別した網羅的なプロテオーム解析が行われた⁶⁾。興味深いことに, 同定したプロテオーム情報には全く新しいタンパク質も含まれており, この新たな

シナプス分子は InSyn1 と命名され、抑制性シナプスの新たな分子機序が明らかにされた⁶⁾。

更に、同様の iBioID 解析が行われており、細胞骨格制御分子 Rac-GAP (Wrp)-BirA を用いた神経細胞の樹状突起スパイン、シナプス小胞性制御分子 Synapsin-BioID2 を用いたシナプス前終末、そして細胞接着分子 Neurofascin-BirA を用いた軸索起始部 (axon initial segment: AIS) のプロテオーム解析などが行われてきた²⁴⁻²⁶⁾。驚くべきことに、これらの多くの iBioID 解析では、これまで知られていなかった非常に多くのタンパク質ネットワークが同定されており、未知の分子制御機構が多く存在していることが示唆されている。

Ⅲ. PL 技術を用いた細胞間相互作用のプロテオーム解析

1. 脳内のグリア細胞-神経細胞間に PL 技術が導入された背景

脳内には神経細胞の 10 倍以上ものグリア細胞が存在している。グリア細胞は発見以来、神経細胞の保護や栄養供給を担う支持細胞として考えられてきた。グリア細胞の一つにアストロサイト (星状膠細胞) が知られている。アストロサイトは、星の輝きに似た多数の微細突起を持つ細胞であり、脳内において最も多く存在するグリア細胞である。近年、このアストロサイトの微細突起は多くのシナプス (約 50-75%) と接続していることが判明し、これまで脳内の支持細胞として考えられてきたアストロサイトが、脳機能を担うシナプスの形成や再編成に積極的に関与していることがわかってきた。アストロサイト-神経細胞間相互作用は“三者間シナプス (tripartite synapse)”と呼ばれ、この三者間シナプスは神経回路の形成と機能に関する理解を変えつつあり、最も注目されている神経科学研究トピックの一つである。

更に最近の研究により、三者間シナプスの機能的および構造的破綻は統合失調症や自閉スペクトラム症、躁うつ病など非常に多くの精神・神経疾患に関連していることも示唆されている。しかしながら、従来の方法では脳組織において特定の細胞膜上や細胞間隙のタンパク質成分を単離することは容易ではなく、三者間シナプスで機能するタ

ンパク質成分を解析するためには大きな障壁があった。そのような背景のなか、PL 技術を応用した脳内の空間的プロテオーム技術 TurboID-surface および Split-TurboID が登場し、三者間シナプスのような脳内の異種性の細胞間接着構造を担うタンパク質成分を解析することが可能となった^{2,7)}。

2. TurboID-surface を用いたアストロサイト微細突起のプロテオーム解析

筆者らは、脳内からアストロサイトの微細突起表面に局在するタンパク質成分のみを網羅的に同定するために、細胞膜表面分子探索技術 TurboID-surface を開発した^{2,7)} (図 3)。TurboID-surface は、高活性型ビオチン化酵素 TurboID にグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) から成る細胞膜表面局在シグナル GRAPHIC (GPI anchored reconstitution-activated proteins high-light intercellular connections) を融合したものである^{2,7,27)} (図 3)。この TurboID-surface とアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) による細胞種選択的遺伝発現技術を組み合わせることで、脳内の特定の細胞種での細胞膜表面プロテオーム解析が可能になった。実際に、このアストロサイト選択的 TurboID-surface をマウス大脳皮質に発現し、アストロサイトの微細突起上のタンパク質成分が TurboID-surface によってビオチン標識されることが *in vivo* で確認された⁷⁾。

次に TurboID-surface により標識されたタンパク質を定量的 LC-MS/MS 分析により網羅的に測定し、*in vivo* におけるアストロサイト細胞膜特異的プロテオーム情報を取得した⁷⁾。これらのタンパク質は、可溶性 TurboID をコントロールとしたエンリッチメント解析により、アストロサイト細胞膜表面上で有意に多いことがわかった。SYNGO データベースにより、アストロサイト微細突起上にはシナプスタンパク質を含む、178 の細胞膜タンパク質が存在することが明らかになった (fold-change > 1.5, $p < 0.05$)⁷⁾。このように、筆者らは TurboID-surface の開発により、脳内の特定の細胞種の細胞膜表面に存在するタンパク質成分を初めて網羅的に明らかにした。

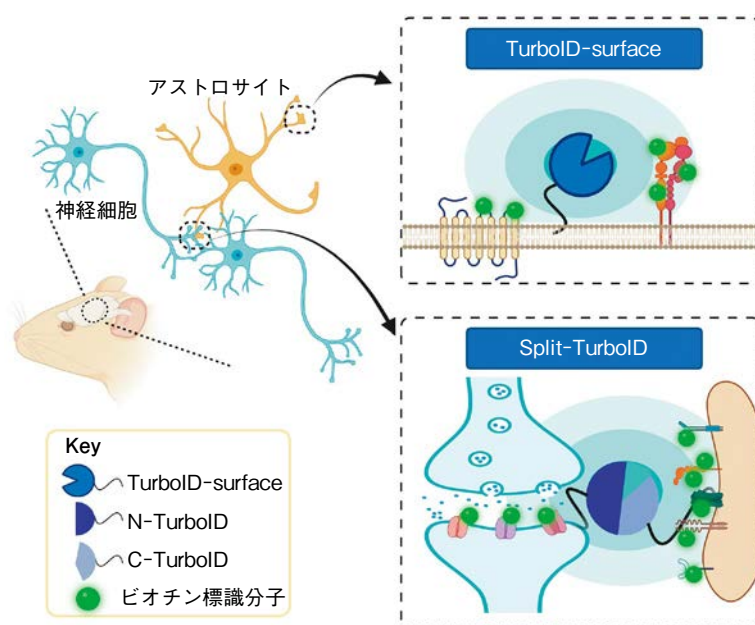


図 3 空間的プロテオーム技術 TurboID-surface と Split-TurboID の原理

3. Split-TurboID を用いた細胞間相互作用の プロテオーム解析

筆者らは、脳内のアストロサイトと神経細胞の細胞接着構造である三者間シナプスに局在するタンパク質を同定するために、Split-TurboID を開発した^{2,7)}。Split-TurboID は TurboID を N 末端断片 (N-TurboID) と C 末端断片 (C-TurboID) に分割し、それぞれに GRAPHIC を融合したものである。これらの Split-TurboID の断片を細胞種選択的発現技術により 2 つの異なる細胞種に別々に発現させると、細胞同士が近接する接着部位でのみ TurboID が再活性化する (図 3)。つまり、Split-TurboID は脳組織における特定の異種細胞間の接着部位に存在するタンパク質成分を一括してビオチン標識する (図 3)。実際に、AAV を用いて Split-TurboID の各断片を神経細胞とアストロサイトにそれぞれ発現し、脳組織内の三者間シナプスの構成成分を測定したところ、この接着部位に存在する 118 種類ものタンパク質成分の同定に成功した。そのなかには、既知の三者間シナプス構成タンパク質である Neuroligin-3, Neurexin-1, カルシウムチャネル補助サブユニット (CACNA2D3, CACNG2, CACNG3), 興奮性シナプス分子 (GRIA2, GRIA3), 抑制性シナプス

分子 (GABRA1, GABRA4, GABRB2, GABRG2) などが含まれていた。

次に、機能的アノテーションを行ったところ、同定された三者間シナプスのタンパク質成分には既知のシナプス間隙分子 (29 分子), 細胞接着分子 (18 分子), イオンチャネル (18 分子), GPCR とその関連タンパク質 (4 分子), その他の受容体 (16 分子), 分泌分子や細胞外足場タンパク質 (34 分子) が含まれることがわかった。興味深いことに、三者間シナプス構成タンパク質成分のなかには、統合失調症や自閉スペクトラム症などの精神・神経疾患関連分子が非常に多く含まれていた (34 分子)²⁾。これらの結果は、Split-TurboID を使用した PL 技術が、*in vivo* で特定の細胞間接着構造を担うタンパク質ネットワークを網羅的に同定する強力な手法であることを示唆しており、従来の解析技術では不可能であった組織からの空間的プロテオーム解析が実現した^{2,7)} (図 3)。

4. 三者間シナプスにおける新規機能の発見

筆者らは、前述の TurboID-surface と Split-TurboID により同定した新たな三者間シナプス構成タンパク質のなかから、これまで神経細胞の細胞接着分子として報告されていた neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) に着目し、詳細な機

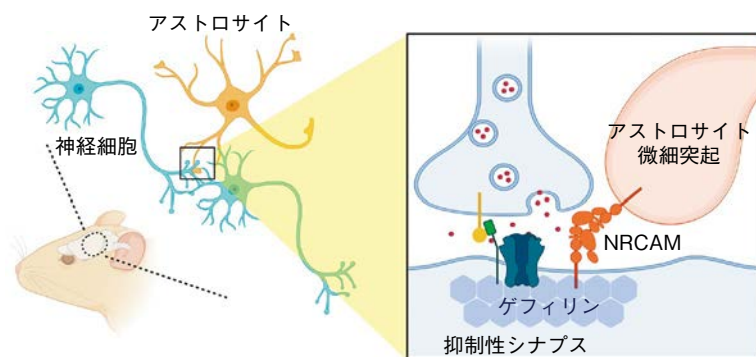


図 4 アストロサイトによる抑制性シナプスの制御機構

能解析を行った。興味深いことに、これまでの定説と異なり、脳内において NRCAM は神経細胞よりもアストロサイトで高発現しており、NRCAM は三者間シナプス間隙に局在していることがわかった。更に、細胞種選択的 CRISPR-Cas9 法を用いてアストロサイトの NRCAM を遺伝子欠損させると、脳内におけるアストロサイトの微細突起の複雑化に加え、抑制性シナプスおよび抑制性シナプス後電流の減弱がみられた。

次にそのしくみについて検討したところ、アストロサイト特異的 NRCAM は神経細胞特異的 NRCAM とのホモフィリック結合を介して、抑制性シナプスの足場タンパク質ゲフィリンと結合していた。以上の結果から、アストロサイトの NRCAM は神経細胞の NRCAM、ゲフィリンを介して抑制性シナプスを安定化していることが示唆された^{2,7)} (図 4)。

このように、アストロサイトが三者間シナプス接着構造を介して直接的に神経細胞の抑制性シナプスを制御するという知見は、本研究が初めてである (図 4)。

おわりに

近年、特にシングルセル RNA シークエンスを用いたトランスクリプトーム解析や超解像度顕微鏡を用いたイメージング解析によって、生体内の細胞種ごとの遺伝子情報や複雑な細胞動態に関する知見が著しく蓄積している。一方で、生体内で機能するタンパク質成分の空間的な情報については、これまで十分な解析方法がなかったために研

究が遅れていた。実際に、神経科学分野においても Allen Brain Map (<https://portal.brain-map.org/>) には多くの遺伝子情報と神経回路情報が提供されているにもかかわらず、タンパク質成分についての情報はいまだに欠落している。ここまで述べてきたように、PL 技術は従来の解析では不可能とされていた多くの生物学的現象に関わるタンパク質成分を、高い空間解像度で網羅的に解析することが可能である。このような空間的プロテオーム解析は、多くの生理現象を理解するうえで必須であるばかりでなく、タンパク質の機能破綻による多くの疾患の病態メカニズムの解明や新たな治療戦略に直結するなど、非常に有益な情報を提供する。そのため、今後も PL 技術はこれまで知られていなかった全く新しい分子機序の解明に貢献し、これまでの生物学的知見を覆す多くのブレイクスルーをもたらすものと考えられる。

例えば、生体内でどのようにして細胞はダイバーシティーを獲得し機能しているのだろうか、組織内のヘテロな細胞集団がどのようにして連携し細胞間コミュニケーションを行っているのだろうか、そして、身体を構成する臓器・器官はどのようにして互いに情報をやりとりしているのだろうか。このような重要な課題を解決するためには、筆者らが開発してきた TurboID-surface や Split-TurboID を含めた PL 技術による空間的プロテオーム解析が突破口になるものと期待される。

最後に、本稿を最後まで拝読してくださった先生、そして若手研究者や研究者を目指す多くの学生がこれらの空間的プロテオーム解析に興味を持

ち、この生体を理解するための生命科学研究が更に発展していくことを祈る。

●文 献

- 1) Takano T, Wu M, Nakamuta S et al : *Nat Commun.* **8** : 33, 2017
- 2) Takano T, Soderling SH : *Neurosci Res.* **173** : 14-21, 2021
- 3) Qin W, Cho KF, Cavanagh PE, Ting AY : *Nat Methods.* **18** : 133-143, 2021
- 4) Motani K, Kosako H : *J Biol Chem.* **295** : 11174-11183, 2020
- 5) Kido K, Yamanaka S, Nakano S et al : *Elife.* **9** : e54983, 2020
- 6) Uezu A, Kanak DJ, Bradshaw TW et al : *Science.* **353** : 1123-1129, 2016
- 7) Takano T, Wallace JT, Baldwin KT et al : *Nature.* **588** : 296-302, 2020
- 8) Cui Y, Groth S, Troutman S et al : *Oncogene.* **38** : 6370-6381, 2019
- 9) Dumont AA, Dumont L, Berthiaume J, Auger-Messier M : *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* **1866** : 118557, 2019
- 10) Couzens AL, Knight JD, Kean MJ et al : *Sci Signal.* **6** : rs15, 2013
- 11) Mirza AN, McKellar SA, Urman NM et al : *Cell.* **176** : 198-212.e15, 2019
- 12) Phelan JD, Young RM, Webster DE et al : *Nature.* **560** : 387-391, 2018
- 13) Paek J, Kalocsay M, Staus DP et al : *Cell.* **169** : 338-49.e11, 2017
- 14) Mannix KM, Starble RM, Kaufman RS, Cooley L : *Development.* **146** : dev176644, 2019
- 15) Chou CC, Zhang Y, Umoh ME et al : *Nat Neurosci.* **21** : 228-239, 2018
- 16) Kurihara M, Kato K, Sanbo C et al : *Mol Cell.* **78** : 493-505.e8, 2020
- 17) Kaewsapsak P, Shechner DM, Mallard W et al : *Elife.* **6** : e29224, 2017
- 18) Myers SA, Wright J, Peckner R : *Nat Methods.* **15** : 437-439, 2018
- 19) Villaseñor R, Pfaendler R, Ambrosi C et al : *Nat Biotechnol.* **38** : 728-736, 2020
- 20) Han S, Zhao BS, Myers SA et al : *Proc Natl Acad Sci U S A.* **117** : 22068-22079, 2020
- 21) Ramanathan M, Majzoub K, Rao DS et al : *Nat Methods.* **15** : 207-212, 2018
- 22) Go CD, Knight JDR, Rajasekharan A et al : *Nature.* **595** : 120-124, 2021
- 23) Liu X, Salokas K, Tamene F et al : *Nat Commun.* **9** : 1188, 2018
- 24) Spence EF, Dube S, Uezu A et al : *Nat Commun.* **10** : 386, 2019
- 25) O'Neil SD, Rácz B, Brown WE et al : *Elife.* **10** : e63756, 2021
- 26) Hamdan H, Lim BC, Torii T et al : *Nat Commun.* **11** : 100, 2020
- 27) Kinoshita N, Huang AJY, McHugh TJ et al : *iScience.* **15** : 28-38, 2019