生理的なタンパク質間相互作用の解析を可能にする細胞内光クロスリンク技術

樋野 展正

A Method for Protein Photo-cross-linking in Living Cells Facilitating Analysis of Physiological Interactions of Proteins

Nobumasa Hino

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received June 29, 2015)

In living cells, most proteins form complexes with other proteins to exert their functions. Since protein functions are regulated in response to changes in the cellular environment, the components of the complexes can vary; therefore, proteins often interact in a weak and transient manner. To capture such labile protein interactions, we have developed a method for photo-cross-linking of proteins directly interacting in mammalian cells; this method involves expansion of the genetic code and site-specific incorporation of photoreactive amino acids into proteins. Upon cross-linking, protein complexes are stabilized by a covalent bond and can be readily isolated from cell extracts without the problems usually associated with simple affinity purification methods such as co-immunoprecipitation. Photo-cross-linkers have another benefit: they react exclusively with molecules within a range defined by the linker length. This property becomes useful for determining the binding interface of two proteins because the linkers can be introduced in a site-directed manner with our method. In this review, we first describe the expansion of the genetic code of mammalian cells for the incorporation of non-natural amino acids into proteins. Then, we introduce our recent applications and developments of the cross-linking method: identification of intracellular binding partners of the signaling protein growth factor receptor binding protein 2; analysis of the binding between membrane proteins on the cell surface; and a novel photoreactive amino acid that enables wide-ranging photo-cross-linking.

Key words—photo-cross-linking; non-natural amino acid; expanded genetic code; protein-protein interaction

1. はじめに

生細胞内において多くのタンパク質は他のタンパク質と複合体を形成することでその機能を発揮している。一方で、タンパク質の機能は種々の細胞外刺激や環境の変化に応じて正確に調節されているため、複合体の構成因子はその都度変化する。それゆえ、生理的なタンパク質間相互作用を解析するには、細胞内で実際に形成されているタンパク質複合体をいかに単離するかが鍵となる。タンパク質複合体の解析には研究対象のタンパク質に対する抗体を用いた共免疫沈降法を用いるのが一般的である。すなわち、抗体の持つ高い特異性を利用して細胞抽出液から目的のタンパク質複合体を高純度に精製し、

その構成成分を質量分析によって同定するという戦略である。しかしながら、この手法は複合体が十分に安定である場合にのみ適用可能であり、また、単離したタンパク質複合体が実際に細胞内で形成されたものか、あるいは、細胞から抽出された後に試験管内で形成されたものかについては逐一検証する必要があるという問題も指摘されている。¹⁾

クロスリンカーを用いればタンパク質複合体を安定化することができる。しかしながら、従来の低分子クロスリンカーはあらゆるタンパク質をランダムに修飾してしまうという問題があり、細胞内におけるタンパク質間相互作用の解析への応用は限定的であった。筆者らは、2005年に、光クロスリンカーとして機能する「非天然型アミノ酸」を哺乳類細胞内でタンパク質に部位特異的に導入することに成功し、また、その細胞に光を照射することで相互作用するタンパク質との間に共有結合を形成させる「細胞内光クロスリンク技術」の開発に成功した (Fig.

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

e-mail: hino@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成 26 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Illustration of Protein Photo-cross-linking in Living Cells

Upon photo-irradiation, a photo-reactive amino acid at the protein surface reacts with a nearby molecule and forms a covalent bond.

1).²⁾ これにより、生細胞内で実際に生じているタンパク質複合体を安定化し、単離・解析することが可能になることから、この技術は共免疫沈降法の欠点を補完するツールとして非常に有用であると考えられる。さらに、クロスリンカーには自身のリンカー長に規定される範囲内に近接した分子とだけ反応するという性質がある。筆者らの技術を用いれば、光クロスリンカーをタンパク質の望みの部位に導入できるので、その導入箇所とクロスリンク形成の有無の関係を調べることで2つのタンパク質の相互作用表面について解析することも可能である。本総説では、まずこの技術の原理について概説し、さらに、この技術を用いた細胞内相互作用因子の同定例及び膜タンパク質の相互作用様式の解析例について紹介する。

2. 拡張遺伝暗号とタンパク質への部位特異的な非天然型アミノ酸導入

細胞内光クロスリンク技術は、光クロスリンカーとして機能する非天然型アミノ酸を細胞内でタンパク質に部位特異的に導入する手法に立脚している。これは、哺乳類細胞の持つ遺伝暗号を拡張し、本来アミノ酸をコードしていないコドン（例えば終止コドンの1つであるUAGコドン）に対して非天然型アミノ酸を特異的に割り当てることで達成される。

遺伝暗号拡張（genetic code expansion）は、2001年に米Scripps研究所のSchultzらによって大腸菌細胞で達成されたのを皮切りに、ついで2002年には理化学研究所の横山、坂本らによって哺乳類細胞で、その後、酵母細胞や昆虫細胞、線虫においても達成され、様々な非天然型アミノ酸の導入に用いられている。³⁻⁷⁾

UAGコドンに対して非天然型アミノ酸を導入するには、UAGコドンと対合するtRNA（以下、サプレッサーtRNAとする）と、このtRNAに非天然型アミノ酸を特異的に付加するよう改変されたアミノアシルtRNA合成酵素（aminoacyl-tRNA synthetase; aaRS）を細胞内にも同時に発現させればよい。この際、望みの部位をUAGコドンに置換した標的タンパク質の遺伝子を同時に発現させることで、非天然型アミノ酸を部位特異的に含むタンパク質が合成されるという仕組みである〔Fig. 2(A)〕。^{4,8)} ただし、非天然型アミノ酸をUAGコドンに特異的に割り当てるには、サプレッサーtRNAが宿主細胞の持つすべてのaaRSに認識されないこと、また、改変型aaRSが宿主細胞のすべてのtRNAや細胞内に存在するアミノ酸を認識しないことが必須の条件となる。このような関係性は「直交性（orthogonality）」と呼ばれている。哺乳類細胞において直交性を満たすtRNAとaaRSのペアとしては、真正細菌のサプレッサーチロシンtRNA（sup-tRNA^{Tyr}）・チロシルtRNA合成酵素（TyrRS）のペアやある種の古細菌が持つピロリジンという特殊なアミノ酸を認識するピロリジンtRNA（tRNA^{Pyl}）・ピロリジルtRNA合成酵素のペアが主に利用されている。^{4,9-11)} さらに、多様な側鎖構造を持つ非天然型アミノ酸のそれぞれを特異的に認識して自身の基質とする改変型TyrRSや改変型PylRSの開発が精力的に進められた結果、現在では、様々なフェニルアラニン誘導体やリジン誘導体をタンパク質に導入することができるようになってい

植野展正

大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野助教。2000年大阪大学薬学部製薬化学科卒業。2002年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。2005年東京大学大学院理学系研究科博士後期課程修了（理学博士）。2005年理化学研究所リサーチアソシエイト、特別研究員、研究員を経て2012年より現職。

Fig. 2. Site-specific Incorporation of Non-natural Amino Acids into Proteins in Mammalian Cells

(A) An orthogonal pair of suppressor tRNA and engineered aminoacyl tRNA synthetase assigns a non-natural amino acid to the UAG codon. (B) Structures of photo-reactive amino acids; α and * represent the α -carbon and photoreaction center, respectively.

る.^{12,13)}

3. 細胞内光クロスリンク技術

上記の遺伝暗号拡張技術を用いて、筆者らは、光クロスリンカーとして機能する3つの非天然型アミノ酸 *p*-benzoyl-L-phenylalanine (*p*Bpa), *p*-trifluoromethyl-diaziriny-L-phenylalanine (tmdPhe), *N*ε-(((4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)-benzyl)oxy)carbonyl)-L-lysine (tmdZLys) を哺乳類培養細胞内でタンパク質に導入することに成功した [Fig. 2(B)].^{2,14,15)} これらのアミノ酸は光反応性を持つベンゾフェノン骨格若しくはジアジリン骨格を有しており、360 nm 付近の波長を持つ光照射に応じて活性化し、近傍の分子と共有結合を形成するという特徴を持っている。そこで、これらのアミノ酸を導入したタンパク質を細胞内に発現させ、その細胞に光を照射した場合に、相互作用因子との間にクロスリンクが形成されるかについて調べることにした。²⁾

光クロスリンカーとしては *p*Bpa を選択し、その導入標的としては様々なシグナル伝達を媒介するタンパク質である growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) を選択した。GRB2 はリン酸化チロシンを含む配列に結合する SH2 ドメインとプロリンリッチ配列に結合する2つの SH3 ドメインから構成されるが、この SH2 ドメインにはリン酸化さ

れた EGF 受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) が結合することが知られている。そこで、GRB2 の SH2 ドメインとリン酸化リガンドの複合体構造から、リガンドの近傍に位置し、かつリガンドとの相互作用には関与しないと予想される111番目のロイシン残基を *p*Bpa に置換し、EGFR とのクロスリンクを試みた [Fig. 3(A)]. チャイニーズハムスター卵巣細胞に FLAG タグを付加した野生型 GRB2 [GRB2 (WT)] 若しくは *p*Bpa を導入した GRB2 変異体 [GRB2 (L111*p*Bpa)], 及び、相互作用因子である EGFR をともに発現させた。この細胞に EGF を添加して EGFR のリン酸化を誘導した後、365 nm の波長を持つ光を照射したところ、GRB2 (L111*p*Bpa) を発現させた場合にのみ約 200 kDa の分子量を持つタンパク質成分が生じることがわかった [Fig. 3(B)]. この産物は、EGF 刺激及び光照射に応じて生じたこと、また、EGFR 及び FLAG タグに対する抗体のどちらを用いた場合でも検出されたこと、さらに、GRB2 の分子量 25 kDa と EGFR の分子量 170 kDa を足し合わせた 200 kDa 程度の分子量を持つことから、GRB2 と EGFR のクロスリンク複合体であると考えられた。以上のことより、光クロスリンカーとして機能する非天然型アミノ酸をタンパク質に導入すること

Fig. 3. Photo-cross-linking between Growth Factor Receptor-bound Protein 2 (GRB2) and the Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor (EGFR)

(A) Crystal structure of the SH2 domain of GRB2 (cartoon model) binding with a phosphorylated ligand (stick model). The leucine residue at position 111 and the lysine residue at position 109 are shown in ball-and-stick representation. The β -strand of GRB2 extending across the bound ligand (positions 103–112) is shown in dark gray. (B) Analysis of photo-cross-linking between wild-type (WT) GRB2 or GRB2 containing pBpa and EGFR under the indicated conditions. The cross-linked products were detected by western blotting (WB) with antibodies to EGFR and FLAG tag.

で、細胞内におけるタンパク質間相互作用を捉えられることが示された。

4. GRB2 の新規相互作用因子の同定

GRB2 は SH2 ドメインを介して EGFR 以外にも様々なリン酸化タンパク質と相互作用することが知られている。そこで、細胞にリン酸化シグナルを惹起した際に GRB2 の SH2 ドメインと結合するタンパク質を細胞内光クロスリンク技術を用いて網羅的に同定することを試みた。¹⁴⁾ 光クロスリンク能を持つ非天然型アミノ酸としては tmdPhe を用いた [Fig. 2(B)]。この理由として、tmdPhe は前述の pBpa よりもサイズが小さく、また、クロスリンク反応に要する時間が短いため、非天然型アミノ酸の導入による相互作用因子の結合阻害を軽減できると同時に、一過的にリン酸化修飾を受けたタンパク質との相互作用を捉えるのに有効であることが期待されたためである。

まず、GRB2 の SH2 ドメインに対する tmdPhe の導入箇所について既知の相互作用因子である EGFR 及び SHC とのクロスリンク形成を指標に検討したところ、109 番目のリジン残基の位置に tmdPhe を導入することが最適であることがわかった [Fig. 3(A)]。そこで、この tmdPhe 導入 GRB2 変異体と EGFR を 293 c18 細胞内に共発現させ、EGF 刺激後、365 nm の光に暴露した際に、GRB2 変異体とクロスリンクする内在性のタンパク質を網羅的に探索した。クロスリンク複合体は精製過程でも安定に存在するため、最終精製産物には通常の複

合体よりも多く含まれているはずである。そこで、光照射をした細胞群と光照射をしない細胞群のそれぞれから GRB2 複合体を精製し、光照射群に多く含まれるタンパク質を比較定量性に優れた質量分析手法である stable isotopic labeling of amino acids and cell culture (SILAC) 法によって同定した。その結果、共発現した EGFR や既知の相互作用因子である SHP2 に加え、EGF 刺激下でリン酸化されるという報告のある GIT1 や AF6、さらには、これまで機能的な相関が全く知られていなかった複数の RNA 結合性タンパク質を GRB2 の SH2 ドメインに結合する新規相互作用因子として同定することに成功した。一方で、GRB2 の SH3 ドメインと結合することが知られている SOS や Dynamin といった因子は、光照射群、非照射群から同程度に検出されたことから、今回用いた GRB2 変異体と相互作用はするものの、クロスリンクはしないという結果が得られた。これらの結果は、クロスリンカーとして機能する非天然型アミノ酸を部位特異的に導入することで、タンパク質の特定のドメインと細胞内でダイレクトに結合する因子を特異的に同定できることを示している。

5. タンパク質複合体構造の検証

タンパク質に部位特異的に光クロスリンカーを導入できるというこの技術の利点は、細胞内におけるタンパク質複合体の相互作用様式について調べる上でも有用である。1 回膜貫通型タンパク質である receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) は

Fig. 4. Photo-cross-linking of Receptor Activity Modifying Protein 2 (RAMP2) Containing *p*Bpa with Calcitonin-receptor-like Receptor (CRLR) on the Cell Surface

(A) Crystal structure of the RAMP2/CRLR extracellular domain complex. The serine residue at position 94 and the phenylalanine residue at position 121 are shown in ball-and-stick representation. (B) Western blot (WB) analysis of photo-cross-linking between RAMP2 variants containing *p*Bpa at the indicated positions and Myc-tagged CRLR. Cross-linked and non-cross-linked CRLR were detected by anti-Myc antibody.

クラス B GPCR であるカルシトニン受容体様受容体 (calcitonin-receptor-like receptor; CRLR) と互いの細胞外ドメインを介して相互作用するが、細胞膜上ではこのヘテロ二量体が血管拡張性ペプチドであるアドレノメデュリンの受容体として機能することが知られている。筆者らは、これらのタンパク質の細胞外ドメインを *in vitro* でそれぞれ合成し、複合体を形成させた上で、その結晶構造を解析することに成功した [Fig. 4(A)].¹⁶⁾ そこで、RAMP2 と CRLR を生細胞膜上に全長のタンパク質として発現させた場合に同様の複合体構造を取り得るのかどうかについて、光クロスリンク実験により検証することにした。前述のように、光クロスリンカーは、相互作用タンパク質の表面に位置するアミノ酸残基が近傍に存在する場合にのみ反応して共有結合を形成する。そこで、既に明らかにした結晶構造を基に、CRLR との相互作用表面を形成する RAMP2 の 2 本の α ヘリックス構造中に存在するいずれかの残基を *p*Bpa に置換した計 8 種類の変異体を作製し、CRLR とクロスリンクする箇所について調べた。その結果、予想された通り、結晶構造中で CRLR の近傍に存在し、かつ、相互作用自体を阻害しないと考えられる 97 番目あるいは 121 番目の位置に *p*Bpa が導入された場合にのみクロスリンクが形成されることがわかった [Figs. 4(A) and (B)]. このことは、本研究により得られた結晶構造が、細胞膜上で実際に形成される複合体の構造を反映したものであることを示している。同様の手法は、細胞膜上で形成されるインターロイキン-5 とその受容体の複合体構造及び CD38 抗原のダイマー構造の検証

に用いられ、また、CRF 受容体とそのリガンドであるウロコルチン-1 の相互作用部位の同定にも応用されている。¹⁷⁻¹⁹⁾

6. 広域反応性光クロスリンカーの開発

これまでの研究で光クロスリンカーとして用いた非天然型アミノ酸 *p*Bpa, tmdPhe は、 α 炭素から反応中心までの距離が 7 Å 程度であった。すなわち、原理上はタンパク質の主鎖から 7 Å 程度の距離に相互作用因子が近接しないとクロスリンクが形成されないことになる。実際に、複合体構造を基にクロスリンクを形成させるのに適していると思われる位置にこれらのクロスリンカーを導入しても、効率のよいクロスリンクが確認されるのは 10 ヶ所中 2 ヶ所程度である。これを解決するため、 α 炭素から反応中心までの距離が 15 Å である非天然型アミノ酸 tmdZLys を新たに設計・合成した [Fig. 2(B)]. このアミノ酸は、長い側鎖を持つアミノ酸を導入可能な改変型ピロリジル tRNA 合成酵素とピロリジン tRNA のペアを利用することで、哺乳類培養細胞内でタンパク質に比較的高い効率で導入することが可能であった。そこで、前述した GRB2 の SH2 ドメインに対し、その結晶構造中でリガンドに直交するように伸びる β シート上の各残基 (103-112 番目のアミノ酸残基) と置換する形で tmdZLys を導入した [Fig. 3(A)]. これらの GRB2 変異体と EGF 受容体とのクロスリンク実験を行ったところ、*p*Bpa や tmdPhe ではリガンドのすぐ近くに導入された 2 変異体でのみ効率よくクロスリンクが形成されたのに対し、^{2,14)} tmdZLys を用いた場合には 10 ヶ所中 5 ヶ所という広範囲の導入箇所に

においてクロスリンクが確認された。¹⁵⁾ このような広域反応性を持つ tmdZLys を利用することで、最適なクロスリンカー導入部位の探索が容易になると同時に、結合様式の異なる様々な相互作用因子の同定にも役立つと考えられる。

7. おわりに

質量分析機器の飛躍的な高感度化やゲノムデータベースの充実により、現在では、試料中に含まれるごくわずかなタンパク質でも同定することが可能になっている。これに伴い、共免疫沈降実験により同定される相互作用タンパク質の候補も膨大なものとなることが予想され、大量の夾雑物の中から生理的な相互作用因子を選択的に同定するための技術が求められている。また、タンパク質複合体の構造解析においても、細胞外で再構成された複合体の構造が、細胞内における複合体構造を反映するのかどうかについては常に議論されるところである。筆者らの開発した細胞内光クロスリンク技術は、細胞内で実際に生じているタンパク質複合体を対象として解析できる特長を持つことから、これらの問題を解決する 1 つのツールとして有用であると考えられる。また、クロスリンクによって複合体を安定化できるという利点は、高濃度の塩や界面活性剤といった強い溶出条件を必要とする膜タンパク質や核内タンパク質の相互作用解析に特に威力を発揮すると考えられ、今後その活用の幅が広がることが期待される。

一方で、この技術についてはいまだいくつかの解決すべき課題が残っている。1 つめは、タンパク質に対する非天然型アミノ酸の導入効率である。終止コドンの 1 つである UAG コドンに対して非天然型アミノ酸を割り当てる場合、リボソーム上では、本来このコドンに結合して翻訳を終結させる eRF1 と外来性に発現させたサプレッサー tRNA が常に競合している。そのため、UAG コドンに対する非天然型アミノ酸導入効率は 20% 程度に留まることが多い。実は、大腸菌では 2 つの翻訳終結因子 RF1 (UAG コドンと UAA コドンを認識)、RF2 (UAA コドンと UGA コドンを認識) のうち前者を欠損させることによって、非天然型アミノ酸の導入効率を 100% にすることが実現している。²⁰⁾ 大腸菌ではそもそも UAG コドンの使用率が低いということもあるのだが、このようにして作製された RF1 欠損大腸菌株では、UAG コドンは非天然型アミノ酸用の

コドンとして再定義されている。しかしながら、哺乳類細胞では eRF1 という 1 つの翻訳終結因子が 3 つの終止コドンを認識すること、また、3 つの終止コドンがほぼ均等に用いられていることから大腸菌と同様の戦略を取ることが難しい。これまでに、siRNA による eRF1 のノックダウンや、²¹⁾ UAA 及び UGA コドンのみを認識する eRF1 変異体の過剰発現によって UAG コドンに対する非天然型アミノ酸導入効率の向上が試みられているが、²²⁾ 根本的な解決には全く新しいメカニズムによる UAG コドンの再定義が必要であると考えられる。

もう 1 つの課題は、非天然型アミノ酸を導入するための宿主細胞の問題である。これまでの哺乳類細胞を用いた研究では、アミノアシル tRNA 合成酵素及びサプレッサー tRNA の遺伝子をプラスミドベクターに搭載して細胞内に導入しているケースがほとんどである。しかしながら、例えば組織特異的に発現するタンパク質の相互作用を調べたい場合には、その組織に由来する初代培養細胞などを用いた解析が必要になるが、プラスミドベクターによる遺伝子導入を許容するのは限られた細胞株のみである。近年、レンチウイルスベクターやバキュロウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって、いくつかの細胞内で非天然型アミノ酸をタンパク質に導入することが可能であるとの報告がなされた。^{23,24)} 今後はより汎用性の高いアデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを用いた非天然型アミノ酸導入法の開発が期待される。

謝辞 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野並びに理化学研究所生命分子システム基盤研究領域で行われた研究であり、ご指導を賜りました土井健史教授、横山茂之領域長、坂本健作チームリーダーに心より感謝いたします。また、研究を遂行するにあたり多大なご支援を頂きました共同研究者の先生方、研究員の皆様、並びに学生の皆様に感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Markham K., Bai Y., Schmitt-Ulms G., *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 461–473 (2007).

- 2) Hino N., Okazaki Y., Kobayashi T., Hayashi A., Sakamoto K., Yokoyama S., *Nat. Methods*, **2**, 201–206 (2005).
- 3) Wang L., Brock A., Herberich B., Schultz P. G., *Science*, **292**, 498–500 (2001).
- 4) Sakamoto K., Hayashi A., Sakamoto A., Kiga D., Nakayama H., Soma A., Kobayashi T., Kitabatake M., Takio K., Saito K., Shirouzu M., Hirao I., Yokoyama S., *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4692–4699 (2002).
- 5) Chin J. W., Cropp T. A., Anderson J. C., Mukherji M., Zhang Z., Schultz P. G., *Science*, **301**, 964–967 (2003).
- 6) Mukai T., Wakiyama M., Sakamoto K., Yokoyama S., *Protein Sci.*, **19**, 440–448 (2010).
- 7) Greiss S., Chin J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14196–14199 (2011).
- 8) Hino N., Hayashi A., Sakamoto K., Yokoyama S., *Nat. Protoc.*, **1**, 2957–2962 (2006).
- 9) Liu W., Brock A., Chen S., Chen S., Schultz P. G., *Nat. Methods*, **4**, 239–244 (2007).
- 10) Mukai T., Kobayashi T., Hino N., Yanagisawa T., Sakamoto K., Yokoyama S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 818–822 (2008).
- 11) Chen P. R., Groff D., Guo J., Ou W., Cellitti S., Geierstanger B. H., Schultz P. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 4052–4055 (2009).
- 12) Dumas A., Lercher L., Spicer C. D., Davis B. G., *Chem. Sci.*, **6**, 50–69 (2015).
- 13) Hino N., Sakamoto K., Yokoyama S., *Methods Mol. Biol.*, **794**, 215–228 (2012).
- 14) Hino N., Oyama M., Sato A., Mukai T., Iraha F., Hayashi A., Kozuka-Hata H., Yamamoto T., Yokoyama S., Sakamoto K., *J. Mol. Biol.*, **406**, 343–353 (2011).
- 15) Yanagisawa T., Hino N., Iraha F., Mukai T., Sakamoto K., Yokoyama S., *Mol. Biosyst.*, **8**, 1131–1135 (2012).
- 16) Kusano S., Kukimoto-Niino M., Hino N., Oh-sawa N., Okuda K., Sakamoto K., Shirouzu M., Shindo T., Yokoyama S., *Protein Sci.*, **21**, 199–210 (2012).
- 17) Kusano S., Kukimoto-Niino M., Hino N., Oh-sawa N., Ikutani M., Takaki S., Sakamoto K., Hara-Yokoyama M., Shirouzu M., Takatsu K., Yokoyama S., *Protein Sci.*, **21**, 850–864 (2012).
- 18) Hara-Yokoyama M., Kukimoto-Niino M., Terasawa K., Harumiya S., Podyma-Inoue K. A., Hino N., Sakamoto K., Itoh S., Hashii N., Hiruta Y., Kawasaki N., Mishima-Tsumagari C., Kaitsu Y., Matsumoto T., Wakiyama M., Shirouzu M., Kasama T., Takayanagi H., Utsunomiya-Tate N., Takatsu K., Katada T., Hirabayashi Y., Yokoyama S., Yanagishita M., *Structure*, **20**, 1585–1595 (2012).
- 19) Coin I., Katritch V., Sun T., Xiang Z., Siu F. Y., Beyermann M., Stevens R. C., Wang L., *Cell*, **155**, 1258–1269 (2013).
- 20) Mukai T., Hayashi A., Iraha F., Sato A., Ohtake K., Yokoyama S., Sakamoto K., *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8188–8195 (2010).
- 21) Janzen D. M., Geballe A. P., *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4491–4502 (2004).
- 22) Schmied W. H., Elsässer S. J., Uttamapinant C., Chin J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 15577–15583 (2014).
- 23) Shen B., Xiang Z., Miller B., Louie G., Wang W., Noel J. P., Gage F. H., Wang L., *Stem Cells*, **29**, 1231–1240 (2011).
- 24) Chatterjee A., Xiao H., Bollong M., Ai H.-W., Schultz P. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11803–11808 (2013).