

NMR 法による免疫グロブリンと Fc レセプターの相互作用の構造生物学的研究

加藤 晃一

名古屋市立大学薬学部, 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

Structural Basis of the Interaction between Immunoglobulins and Fc Receptors
Provided by NMR Spectroscopy

Koichi KATO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

(Received February 23, 2001)

Fc γ Receptors (Fc γ R) are membrane glycoproteins that bind the Fc portion of immunoglobulin G (IgG). The cross linking of Fc γ R-bound IgG by multivalent antigens allows clustering of the Fc γ R and initiates a variety of effector mechanisms which play a key role in immune defenses against pathogens. The Fc region is composed of two identical polypeptide chains, which are related to each other by a two-fold axis. Recent elucidation of the crystal structure of human Fc γ R2 provided two distinct views of modes of IgG-Fc γ R interactions, which is controversial against each other. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy provides a unique and irreplaceable tool to solve these issues. We recently studied the interaction between the Fc fragment of mouse IgG2b and the extracellular domain of mouse Fc γ R2 by this method. We showed that Fc γ R2 binds to a negatively charged area of the C_H2 domain, corresponding to the lower hinge region, and that the binding of Fc γ R2 onto one of the two symmetrically related sites on the Fc induces a conformational change in the other site. This conformational change may account for the 1 : 1 stoichiometry that we and others observed between Fc γ R and Fc. We therefore propose a model that explains why the interaction between IgG molecules and Fc γ R does not trigger cellular responses in the absence of cross linking by multivalent antigens and does not lead to spontaneous inflammatory responses that would be deleterious for the organism.

Key words—Immunoglobulin; Fc receptor; NMR spectroscopy; interaction; stoichiometry

1. はじめに

マクロファージ, 好中球, 肥満細胞をはじめ免疫担当細胞の大部分は免疫グロブリン (Ig) の Fc 領域に対する受容体を発現している。¹⁻⁴⁾ これらの受容体は Fc レセプター (FcR) と総称される糖タンパク質である。IgG, IgE, IgA クラスの免疫グロブリンに対する FcR はそれぞれ Fc γ R, Fc ϵ R, Fc α R と呼ばれる。Fc γ R は Fc γ RI, Fc γ R2, Fc γ R3 という 3 つのグループに大別される。Fc γ RI は単量体の IgG に対しても高い親和性を示すが, Fc γ R2 と Fc γ R3 は IgG に対して低い親和性しか示さないため, 複数の IgG 分子が多価の抗原に結合することによって形成された免疫複合体に対する avidity によって結合を行う。また, それぞれの Fc γ R クラスは IgG の各サブクラスに対して異なった親和性を示す。いずれの場合も, Fc γ R に結合した IgG が多

価抗原を介して架橋されることにより, Fc γ R の会合が起こり, これを契機として細胞内にシグナルが伝達されて細胞の活性化あるいは抑制が引き起こされる (Fig. 1)。例えば, 肥満細胞の表面に発現している Fc γ R3 は免疫複合体と結合して脱顆粒を誘起するシグナルを発生し, 炎症の開始因子として働いていると考えられている。また, NK 細胞表面に発現している Fc γ R3 は抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) を媒介している。また, マクロファージの表面に発現している Fc γ RI と Fc γ R3 は貪食作用に関与しており, 抗原提示を促進することが示されている。一方, B 細胞上に発現している Fc γ R2 は免疫複合体と結合することにより B 細胞の増殖・分化をフィードバック的に阻害して抗体産生の調節を行っている。このように Fc γ R は細胞性免疫と体液性免疫をリンクする重要な働きをしている。

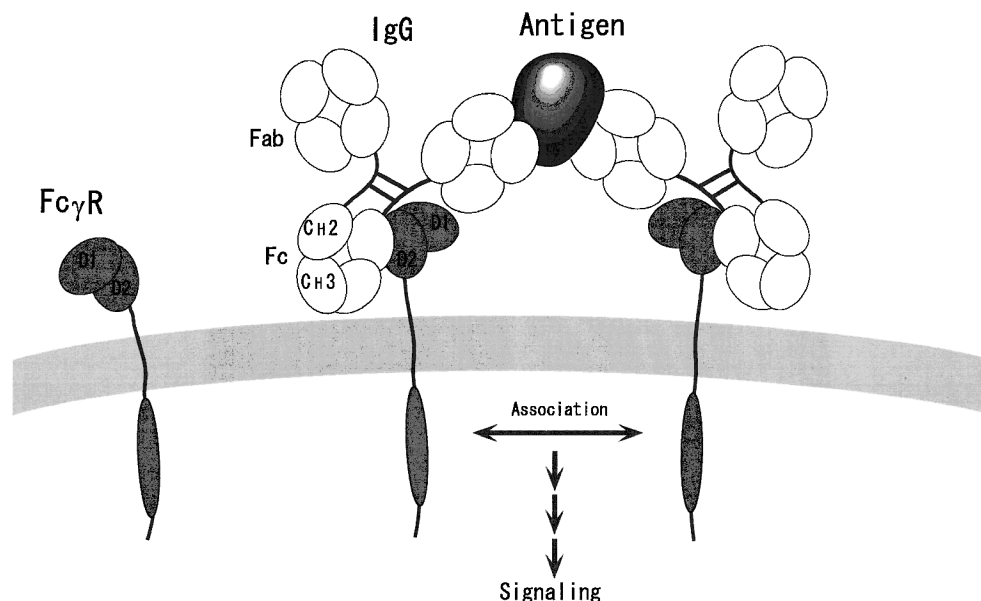


Fig. 1. Schematic Drawing of the Interactions between IgG and Fc γ R Molecules on the Cell Surface
Cross-linking of membrane Fc γ R is the first step in the receptor-mediated activation of cells.

Fc γ Rの多くは細胞外領域が複数のIg様ドメインから構成されている。また、Fc γ Rにはスプライシングの違いなどにより、膜貫通領域の長さが異なる複数のアイソフォームが存在するが、細胞外ドメインのみが膜から遊離した可溶性Fc γ R (sFc γ R)として血中に存在しているものもある。⁵⁾ sFc γ Rは膜型Fc γ Rが細胞表面付近でプロテアーゼによる加水分解を受けることによって生じる。⁶⁾ これらのsFc γ Rは膜型Fc γ RとIgGとの結合を阻害したり、⁷⁾ 補体レセプター3のような細胞表面の受容体と相互作用する⁸⁾ ことによって免疫応答を調節する作用を有すると考えられている。

IgGとFc γ Rの相互作用システムをターゲットとする薬物は、アレルギーや自己免疫疾患の治療薬としての効果が期待される。⁹⁻¹¹⁾ こうした薬物を合理的に設計するためにはIgGとFc γ Rの相互作用の仕組みを詳細に理解する必要がある。

2. 免疫グロブリンFc領域の構造

IgGのFc領域は柔軟なヒンジ領域を介して抗原結合を担うFab領域と連結している。¹²⁾ Fc領域は、CH2とCH3という2つのドメインからなる相同な2本のポリペプチド鎖から構成されており、全体として二回軸対称な構造をしている (Fig. 2)。したがって、後述するように1分子のIgGは2分子のFc γ Rと結合する可能性がある。

これまでに行われた部位特異変異実験等の結果から、IgGのヒンジ領域の下流に位置するアミノ酸残基がFc γ Rとの結合に重要であることが示されている¹³⁻¹⁷⁾ が、それ以外の領域においてもFc γ Rとの結合に関わる可能性のあるアミノ酸残基の存在が提唱されている。^{15,18-22)} それらのうちのいくつかはCH2ドメインに分布しているが、一部にはCH3ドメインに属するアミノ酸残基がFc γ Rとの第二の結合サイトを構成しているという可能性も報告されている。また、CH2ドメインのAsn297には複合型二本鎖糖鎖が普遍的に結合しているが、この糖鎖を取り除くとIgGのFc γ R結合能は著しく低下してしまうことが知られている。^{23,24)}

3. Fc γ Rの結晶構造

1999年にSondermannら²⁵⁾とMaxwellら²⁶⁾が、大腸菌を用いて発現したヒトsFc γ RIIbとバキュロウィルスを用いて発現したヒトsFc γ RIIaの結晶構造をそれぞれ報告した。いずれの結晶構造においてもsFc γ RはIgフォールドからなるドメインが2つタンデムにつながった構造をしていた (Fig. 3)。これまでの部位特異変異実験の結果に基づいて提唱されたFc γ R上のFc結合サイトは、第2ドメイン(D2)の3つのループに集中している。Sondermannら²⁵⁾はFc及びsFc γ RIIbの結晶構造を基に分子形状と電荷の相補性を考慮した両者のドッキング

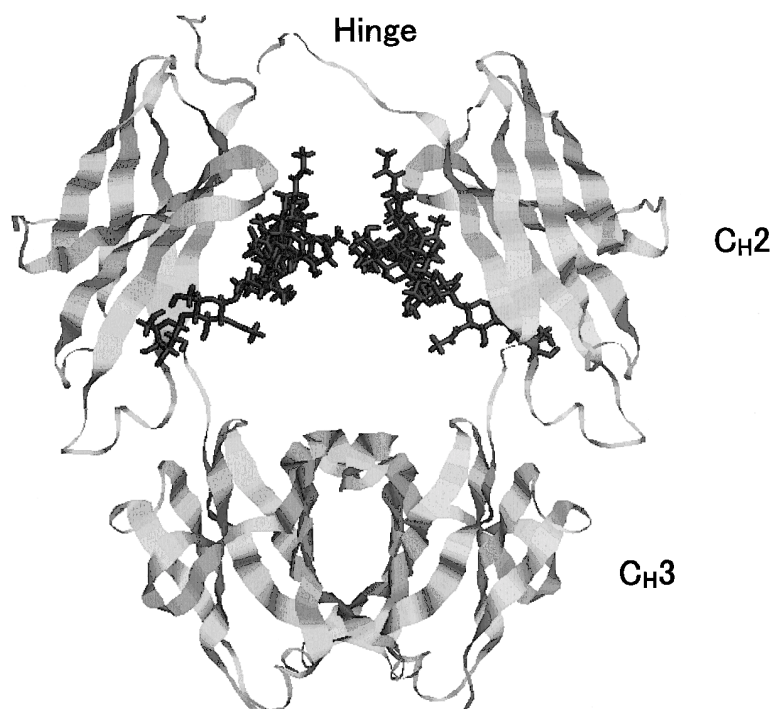


Fig. 2. The Fc Portion of the Crystal Structure of Mouse IgG2a (PDB Accession Code 1IGT)¹²⁾
The oligosaccharides attached to Asn297 are packed between the two C_{H2} domains.

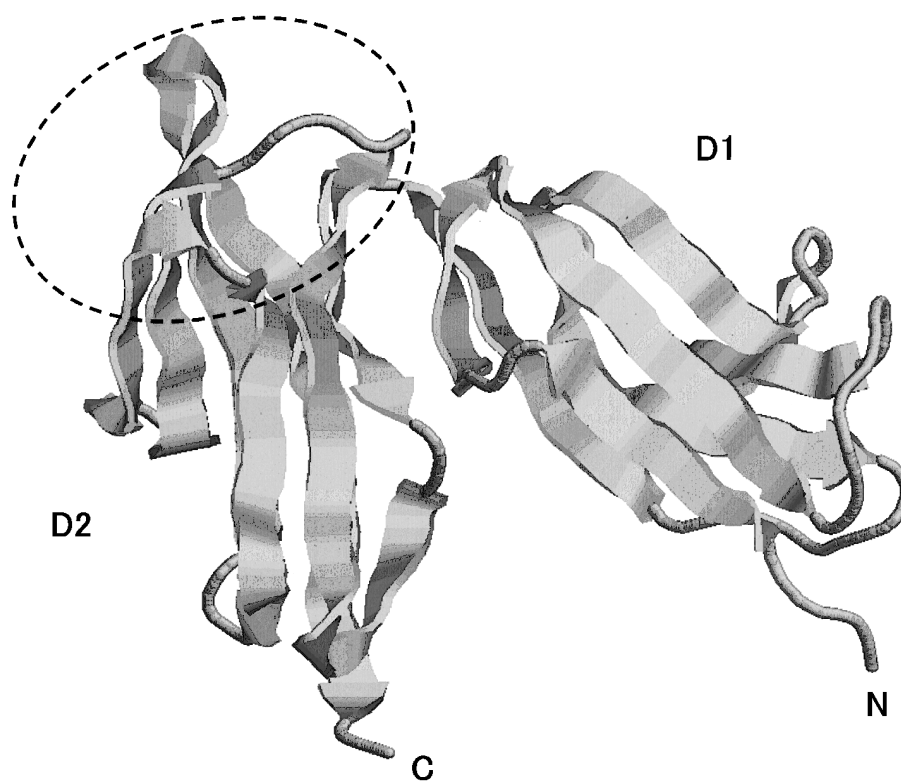


Fig. 3. The Crystal Structure of Human sFc γ RIIb (PDB Accession Code 2FCB)²⁵⁾
The putative IgG-binding area is indicated with a dotted oval.

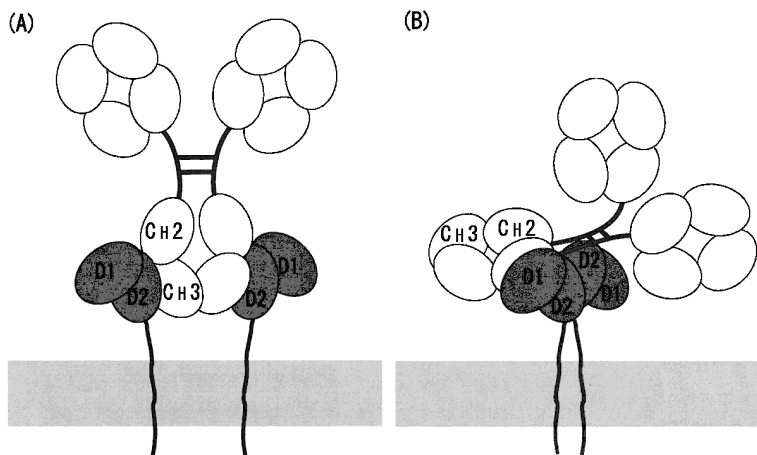


Fig. 4. Working Models of Interaction between IgG and Fc γ R Proposed on the Basis of the Crystal Structures of Human sFc γ RII (A) Two Fc γ R molecules bind symmetrically to one IgG molecule; the contact involves the interface between the C_{H2} and C_{H3} domains.²⁵⁾ (B) The Fc γ R molecules form a dimer that interact with the lower hinge regions of both heavy chains and with one loop of the C_{H2} domain.²⁶⁾

モデルを提唱した。このモデルでは、1分子のIgGに対して2分子のFc γ Rが二回軸対称な様式で、C_{H2}とC_{H3}の境界領域に結合している (Fig. 4A)。一方、Maxwellらは結晶中で2分子のsFc γ RIIaがFc結合ループを隣り合わせる格好でホモ二量体を形成していると報告している。この結果に基づき、Maxwellら²⁶⁾は、二量体を形成したFc γ Rが非対称な様式でIgGのヒンジ領域付近に結合するというモデルを提唱している (Fig. 4B)。このように2つのモデルは、1分子のIgGに2分子のFc γ Rが結合しているという点は共通であるが、その結合サイトも結合様式も全く異なっていた。一般に、結晶中において見出されたタンパク質分子同士の相互作用が、溶液中においても実際に存在するのか、あるいは単に結晶中においてのみ存在するのかということの判定することは必ずしも容易ではない。実際にタンパク質複合体の結晶構造において、溶液中に存在しない相互作用の影響により、タンパク質に非生理的なコンフォメーション変化が生じていたという例もある。^{27,28)} こうした状況を踏まえて、筆者らは核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて水溶液中におけるFcとFc γ Rの相互作用様式を明らかにすることに取り組んだ。

4. NMR解析の戦略

高分子量タンパク質のNMR解析を行うためには試料を¹³Cや¹⁵Nなどの安定同位体で標識することが必須であり、そのために通常は大腸菌を利用したタンパク質の大量発現系が用いられる。しかしなが

ら、本研究で対象とするFcとFc γ Rはいずれも糖タンパク質であり、先述したように少なくともFcに結合している糖鎖はFc γ Rとの結合に不可欠であるため、NMR試料の調製には大腸菌発現系を用いることができない。筆者らの共同研究者であるCatherine Sautès-Fridman博士のグループ (仏・Curie研究所) はBHK細胞のホローファイバー培養系を用いて数十ミリグラムオーダーのマウスsFc γ RIIを簡便に得るシステムを確立している。^{29,30)} 得られたsFc γ RIIは1分子中に3つのアスパラギン結合型糖鎖を含んでおり、その分子量は26 Kである。一方、マウスハイブリドーマ細胞を無血清培養することによりIgG2bを調製し、パパインを用いた限定加水分解を行ってFcフラグメント (分子量52 K) を得た。2–4 Lの無血清培養を行うことにより最終的に約20 mgのFcを得ることができた。NMRによりFc上のFc γ R結合サイトを決定するためにはFcに安定同位体標識を施す必要があるが、FcとFc γ Rのような高分子量タンパク質からなる巨大な複合体を対象とする場合は、アミノ酸残基タイプ別に主鎖カルボニル炭素を選択的に¹³C標識する方法が有効である。^{31–35)}

Fig. 5Aはイソロイシン残基の主鎖カルボニル炭素を選択的に¹³C標識したIgG2bのFcフラグメントの¹³C NMRスペクトルである。スペクトル中の各ピークはIgG2b-Fcに含まれる11個のイソロイシン残基のいずれかに由来しているわけであるが、個々のピークを特定のイソロイシン残基に帰属する

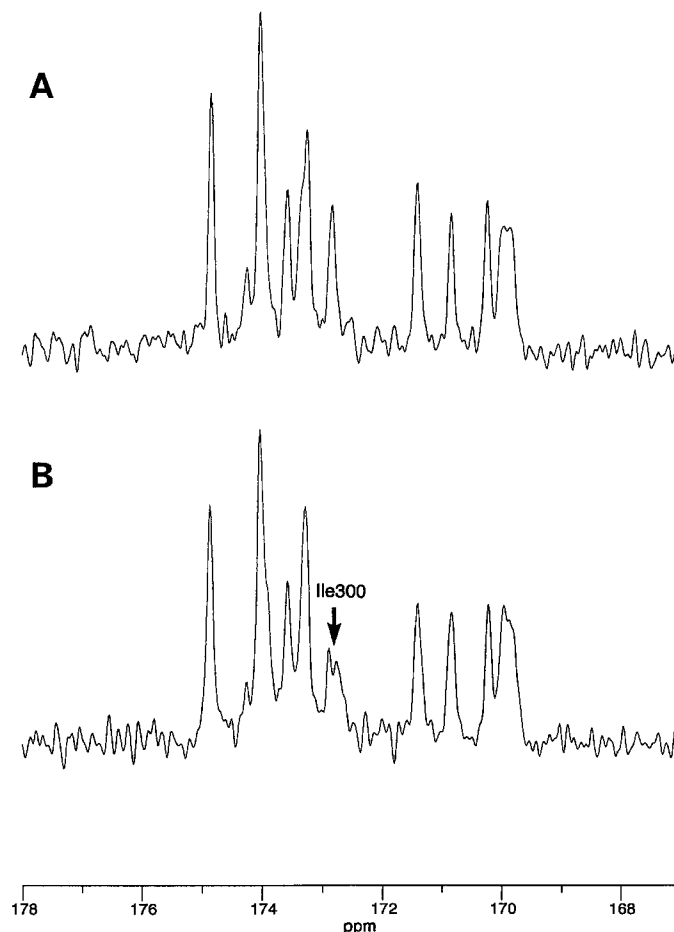


Fig. 5. 100-MHz ^{13}C NMR Spectra of the Fc Fragment of Mouse IgG2b Labeled with $[1-^{13}\text{C}]\text{Ile}$ (A) and Doubly Labeled with $[1-^{13}\text{C}]\text{Ile}$ and $[\alpha-^{15}\text{N}]\text{Arg}$

ために ^{13}C — ^{15}N 二重標識法^{31–35})を用いた。Fig. 5B は結果の一例³⁶)で、イソロイシン残基の主鎖カルボニル炭素を ^{13}C で、アルギニン残基の主鎖アミド窒素を ^{15}N でそれぞれ選択的に標識した Fc フラグメントのスペクトルである。観測される 11 個の Ile シグナルのうちで矢印で示したピークのみが異種核間のスピン結合 ($^1J_{\text{CN}} \approx 15 \text{ Hz}$) によってダブルットに分裂して観測されている。したがって、このピークは Fc 中に存在するイソロイシン残基の中で唯一アルギニン残基が C 末端側に隣接している Ile300 に帰属することができる。同様にして様々な ^{15}N 標識アミノ酸を組み合わせることで多種類の二重標識試料を調製してそれらの NMR スペクトルを観測することにより、他のイソロイシンシグナルの帰属を行った。同様にしてイソロイシン以外の多くのアミノ酸残基に由来するシグナルについての帰属を確定した。^{27,32–34,36)}

5. Fc γ R 結合サイトのマッピング

前節において述べた方法を用いて帰属を確定した NMR シグナルをプローブとして Fc と sFc γ R の相互作用解析を行った。³⁶⁾ 例えば、イソロイシン残基の主鎖カルボニル炭素を ^{13}C 標識した Fc に sFc γ RII を加えると Ile300 番に由来するシグナルのみに選択的な化学シフト変化が誘起された (Fig. 6)。同様の実験を他の 9 種類のアミノ酸残基 (Ala, Arg, Cys, His, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr) に由来する主鎖カルボニル ^{13}C シグナルについても行った。このようにして観測された sFc γ RII の結合に伴う化学シフト変化をマウス IgG2a の Fc 部分の結晶構造上にマッピングした結果が Fig. 7 である。有意な化学シフト変化を示した残基はヒンジ領域の下流にあたる部分とその空間的近傍に集中しており、それ以外の領域には変化が生じていないことが明らかとなった。したがって sFc γ RII との結合サイトはヒンジ

領域の下流とその空間的近傍に位置するアミノ酸残基のみから構成されており、それ以外に付加的な sFcγRII 結合サイトは存在しないことが明らかとなった。

Fc 表面の静電ポテンシャルを計算すると NMR により決定された sFcγRII 結合サイトは負電荷に富んでいることが明らかとなった。一方、様々な FcγR 改変体を用いて同定されたマウス FcγRII 上の IgG 結合サイトは塩基性アミノ酸残基に富んでいることが報告されている。³⁷⁻⁴⁰⁾ したがって、IgG と FcγRII の間の電荷的な相補性が両者の結合に寄与している可能性がある。そこで、表面プラズモン共鳴法により IgG と FcγRII の結合の NaCl 濃度依存性を調べた結果、予想通り、溶液中のイオン強度の上昇に伴って結合定数は顕著に低下した (Fig. 8)。したがって、IgG と FcγRII の結合には静電相互作用の有意な寄与があることが明らかとなった。

6. IgG—FcγR 相互作用のストイキオメトリー

先に述べたように Sodermann ら²⁵⁾ と Maxwell ら²⁶⁾ が独立に提唱した IgG と FcγR の複合体についての 2 つのモデルはいずれも 1 分子の IgG に 2 分子の FcγR が結合しているものであった。Sodermann ら⁴¹⁾ は sFcγR 溶液で平衡化したゲルろ過カラムを用いた分析の結果に基づいて、ヒト IgG は 2 分子の sFcγRII と非協同的に結合すると結論している。これに対して、Ghirlando ら⁴²⁾ は超遠心分析の結果に基づいてヒトの IgG1—Fc と sFcγRIII の結合のストイキオメトリーは 1 : 1 であるという結果を報告している。また、ゲルろ過及び超遠心実験の結果、IgE と FcεRI との相互作用のストイキオメトリーも 1 : 1 であると報告されている。⁴³⁾ 筆者らはマウス IgG2b の Fc とマウス sFcγRII の結合のストイキオメトリーをゲルろ過及び超遠心 (沈降平衡法及び沈降速度法) により解析を行い、いずれの方法を用いても結合のストイキオメトリーは 1 : 1 であ

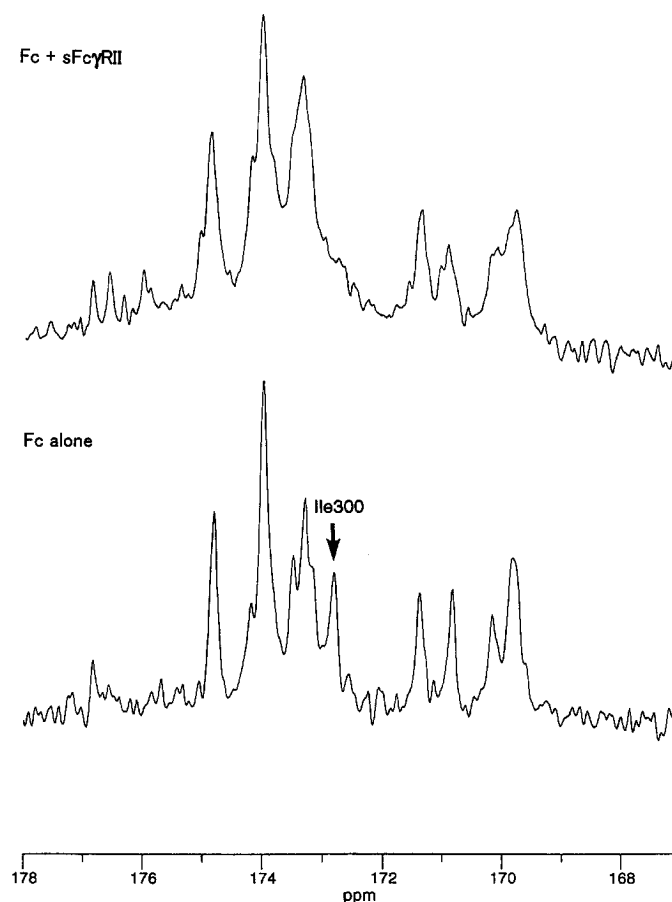


Fig. 6. 100-MHz ^{13}C NMR Spectra of the Fc Fragment of Mouse IgG2b Labeled with ^{13}C at the Carbonyl Groups of the Ile Residues in the Presence (Upper) and Absence (Lower) of Soluble FcγRII (sFcγRII)

Upon addition of sFcγRII, the resonance originating from Ile300 was selectively perturbed.

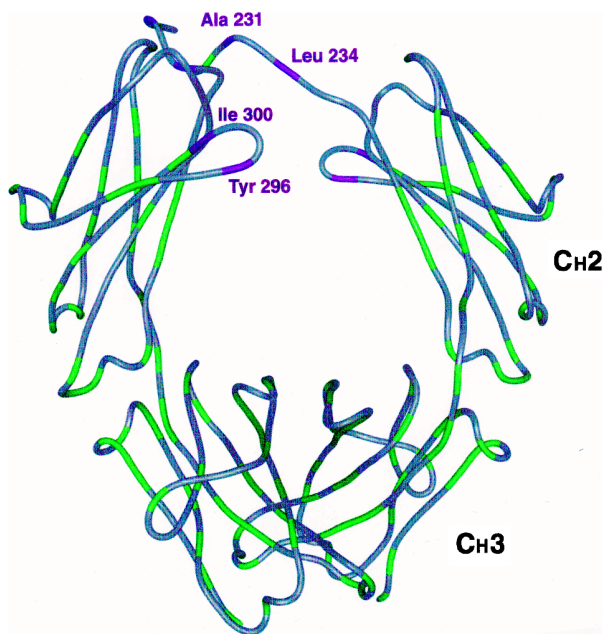


Fig. 7. Mapping of the Mouse sFc γ R11-Binding Site on the Fc Portion of IgG on the Basis of the Chemical Shift Perturbations of the Carbonyl ^{13}C Resonances of Ala, Arg, Cys, His, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, and Tyr Residues

The residues that shows chemical shift change larger (red) and smaller (green) than 0.1 ppm are presented on the Fc portion of the crystal structure of mouse IgG2a.

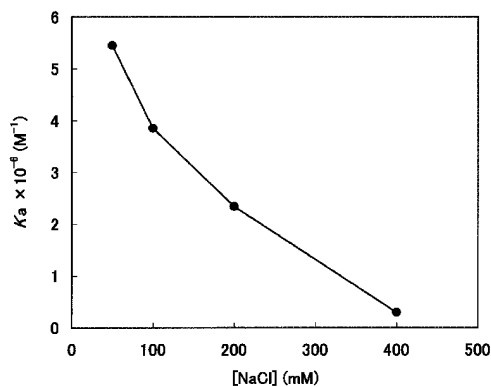


Fig. 8. Dependence upon the NaCl Concentration of the Association Constant (K_a) of sFc γ R11 for Mouse IgG2b Immobilized onto a Sensor Chip

Affinity was estimated by surface plasmon resonance measurements with a BIAcore 1000 instrument. Mouse sFc γ R11 (0–40 μM) was dissolved in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, containing 3.4 mM EDTA, 0.005 % (v/v) Tween 20, and various concentrations (50–400 mM) of NaCl, and then injected over the immobilized IgG2b at a flow rate of 25–40 $\mu\text{l}/\text{min}$.

るといふ結果を得た。これらの結果によれば Fig. 4 に示した複合体モデルは少なくとも水溶液中においてはいずれもあてはまらないことになる。それでは何故 sFc γ R11 は Fc 上で 2 回軸対称な位置にある 2 つの結合サイトのうちの一方にしか結合できないの

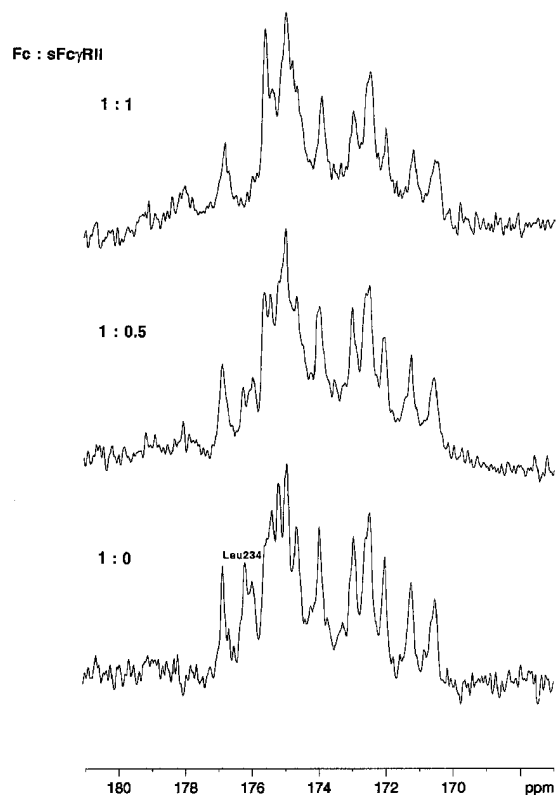


Fig. 9. 100-MHz ^{13}C NMR Spectra of the Fc Fragment of Mouse IgG2b Labeled with [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Leu at Varying sFc γ R11/Fc Molar Ratio

It should be noted that Leu 234 gives a double peak in the uncomplexed state, indicating that the sFc γ R11-binding sites exhibit conformational multiplicity. Upon addition of sFc γ R11, the Leu 234 resonance showed a progressive change in intensity and completely diminished in the presence of one molar equivalent of sFc γ R11, indicating that the binding of one receptor molecule induces microenvironmental changes in the lower hinge region of *both* heavy chains.

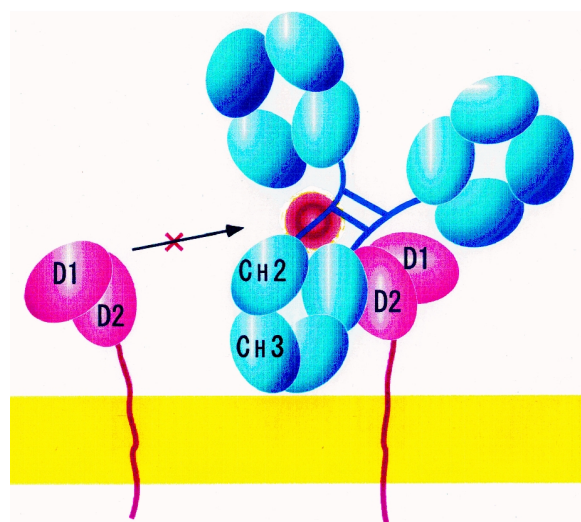


Fig. 10. The Model of Interaction between IgG and Fc γ R Proposed on the Basis of the NMR data³⁶⁾

One IgG binds one Fc γ R only owing to a microenvironmental change that occurs in the lower hinge region of both heavy chains during the interaction and precludes the binding of the second Fc γ R to the second binding site.

であろうか？ 一つの可能性は、Fc上に1分子のsFcγRIIが結合すると立体障害により第二のsFcγRIIが結合できなくなるということである。もう一つの可能性は、Fc上の一方の結合サイトにsFcγRIIが結合すると他方のサイトにコンフォメーション変化が誘起され、第二のsFcγRIIの結合が阻止されるという、いわゆる負のアロステリック効果による結合の阻害が起こることである。これまで、ヒトIgG1とsFcγRIIIの相互作用に伴う熱力学的パラメーターの変化に基づいて複合体形成に伴ってIgG分子に局所的なコンフォメーション変化が起こる可能性が示唆されている。⁴²⁾ また、円二色性スペクトルの解析により、IgEとFcεRIの相互作用に伴ってIgE分子にコンフォメーション変化が生ずる可能性も示唆されている。⁴⁴⁾ しかしながら、これらの実験の結果では、いずれの分子のいずれの部位にコンフォメーション変化が生じているのかを明確にすることはできない。FcγRとの結合に伴ってIgG分子上のもう1つのFcγR結合サイトにコンフォメーション変化が生ずるか否かという問題に対して解答を与えるために、筆者らはNMRを用いたアプローチを行った。³⁶⁾

7. FcγR結合サイトのコンフォメーション変化

Fig. 9はロイシン残基の主鎖カルボニル炭素を選択的に¹³C標識したIgG2b-Fcの¹³C NMRスペクトルである。興味深いことに、ヒンジ領域下流に位置するLeu234のカルボニル炭素はスペクトル中においてダブルピークを与えている。このことはIgG分子上のFcγR結合サイトはFcγRが存在しない条件下では、少なくとも2通りのコンフォメーションをとっていることを意味する。さらに興味深いことは、FcのAsn297に結合している糖鎖をエンドグリコシダーゼDで処理することによって還元末端側の二糖(Fuc-GlcNAc)にまで短鎖化すると、このようなFcγR結合サイトの多形性は消失し、それに伴ってFcγRに対する親和性が顕著に低下することが明らかになった(未発表データ)。すなわち、Fcに結合している糖鎖は、FcγR結合サイトの多形性をも含めた適切な動的な高次構造の構築に寄与していると考えられる。

このFc試料にsFcγRIIを加えていくにつれてLeu234に由来するダブルピークの強度は徐々に減

少し、モル比で1等量のsFcγRIIを加えた時点で完全な消失が認められた。この結果は、1分子のsFcγRIIが結合するとFcを構成する2つのサブユニットの両方においてLeu234周辺の微視的環境が変化することを意味している。このことは、Fc上で2回軸対称な関係にある2つのsFcγRII結合サイトのうちの一方にsFcγRIIが結合すると他方のサイトにもコンフォメーション変化が誘起されることを示唆し、その結果、第2のsFcγRII分子の結合が阻止されるという負のアロステリックモデルを支持する(Fig. 10)。以上の結果は、FcγRの結晶構造解析の結果に基づいて提唱されたFcとの複合体の2つのモデルのいずれをも否定するものである(脚注*)。

8. おわりに

はじめに述べたようにFcγRを介した細胞内のシグナル伝達の最初のステップは複数のFcγR分子が会合することである。もしも仮に、IgGとFcγRの結合のストイキオメトリーが1:2であったならば、1分子のIgGは抗原が存在しない条件下においても自発的に2分子のFcγRを架橋して細胞を活性化してしまい、生体にとって望ましくない応答を引き起こしてしまう可能性がある。しかし、実際には、NMRを用いて示したFcγR結合サイトのコンフォメーション変化の結果、IgGとFcγRの相互作用は1分子:1分子の結合にとどまる。そして、多価抗原との結合によりIgGが架橋されることによってはじめてFcγRの会合が起こりシグナルが伝達されると考えられる。こうしたIgG分子のコンフォメーション変化を基盤とするメカニズムによって免疫応答の発現は適切にコントロールされているということが、筆者がNMR解析を通じて到達した結論である。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、終始ご指導

脚注*: ごく最近になって、SondermannらはヒトIgG1のFcフラグメントとsFcγRIIIの複合体の結晶構造解析に成功し、分解能3.2 Åの結晶構造を報告している。⁴⁵⁾ その結果によると、(1)FcとsFcγRIIIは1:1の複合体を形成しており、(2)Fc上におけるsFcγRIIIの結合サイトはヒンジ領域の下流とその空間的近傍であり、(3)sFcγRIIIが結合するとFcにコンフォメーション変化が誘起されFcの二回軸対称性はやぶれるということである。この結果は、筆者らがNMR解析の結果導いた結論を大筋において裏付けるものとなっている。

ご援助を賜りました嶋田一夫東京大学教授に深く感謝いたします。本研究は東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室で行われたものであり共に研究を行った山口芳樹博士、榎園淳一修士、山田雅子修士、滝沢剛修士に感謝いたします。また、共同研究を行っていただきました仏・Curie 研究所・Catherine Sautès-Fridman 教授、Wolf Herman Fridman 教授、大阪大学大学院薬学研究科・小林祐次教授、内山進博士、小林薫博士に深謝いたします。本研究は日本学術振興会日仏科学協力事業の援助のもとに遂行されたものであります。

本稿の執筆を終えるにあたり、筆者が学生の頃よりご指導ご鞭撻を賜りました荒田洋治東京大学名誉教授に御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Fridman W. H., Bonnerot C., Daëron M., Amigorena S., Teillaud J.L., Sautès C., *Immunol. Rev.*, **125**, 49–76 (1992).
- 2) Hulet M.D., Hogarth M.P., *Adv. Immunol.*, **57**, 1–127 (1994).
- 3) Gavin A., Hulet M., Hogarth P.M., In: *The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity* ed. by van de Winkel J. G. J., Hogarth P. M., pp. 11–35 (1998).
- 4) Takai T., Ravetch J. V., In: *The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity* ed. by van de Winkel J. G. J., Hogarth P. M., pp. 37–48 (1998).
- 5) Fridman W. H., Teillaud J. L., Bouchard C., Teillaud C., Astier A., Tartour E., Galon J., Mathiot C., Sautès C., *J. Leukoc. Biol.*, **54**, 504–512 (1993).
- 6) Galon J., Paulet P., Galinha A., Lorès P., Bonnerot C., Jami J., Fridman W.H., Sautès C., *Intern. Rev. Immunol.*, **16**, 87–112 (1997).
- 7) Esposito-Farèse M.E., Sautès C., de la Salle H., Latour S., Bieber T., de la Salle C., Ohlmann P., Fridman W. H., Cazenave J. P., Teillaud J.L., Daëron M., Bonnerot C., Hanau D., *J. Immunol.*, **155**, 1725–1736 (1995).
- 8) Galon J., Gauchat J. F., Mazières N., Spagnoli R., Storkus W., Lotze M., Bonnefoy J. Y., Fridman W. H., Sautès C., *J. Immunol.*, **157**, 1184–1192 (1996).
- 9) Clarkson S. B., Bussel J. B., Kimberly R. P., Valinsky J. E., Nachman R.L., Unkeless J. C., *N. Engl. J. Med.*, **314**, 1236–1239 (1986).
- 10) Clynes R., Ravetch J.V., *Immunity*, **3**, 21–26 (1995).
- 11) Hazenbos W. L. W., Gessner J. E., Hofhuis F. M. A., Kuipers H., Meyer D., Heijnen I. A. F. M., Schmidt R. E., Sandor M., Capel P. J. A., Daëron M., van de Winkel J. G. J., Verbeek J. S., *Immunity*, **5**, 181–188 (1996).
- 12) Harris L. J., Larson S. B., Hasel K. W., McPherson A., *Biochemistry*, **36**, 1581–1597 (1997).
- 13) Duncan A. R., Woof J. M., Partridge L. J., Burton D. R., Winter G., *Nature*, **332**, 563–564 (1988).
- 14) Lund J., Winter G., Jones P.T., Pound J. D., Tanaka T., Walker M. R., Artymiuk P. J., Arata Y., Burton D. R., Jefferis R., Woof J. M., *J. Immunol.*, **147**, 2657–2662 (1991).
- 15) Lund J., Pound J. D., Jones P. T., Duncan A. R., Bentley T., Goodall M., Levine B. A., Jefferis R., Winter G., *Mol. Immunol.*, **29**, 53–59 (1992).
- 16) Sarmay G., Lund J., Rozsnyay Z., Gergely J., Jefferis R., *Mol. Immunol.*, **29**, 633–639 (1992).
- 17) Morgan A., Jones N. D., Nesbitt A. M., Chaplin L., Bodmer M.W., Emtage J. S., *Immunology*, **86**, 319–324 (1995).
- 18) Diamond B., Boccumini L., Birshstein B. K., *J. Immunol.*, **134**, 1080–1083 (1985).
- 19) Gergely J., Sarmay G., *FASEB J.*, **4**, 3275–3283 (1990).
- 20) Canfield S. M., Morrison S. L., *J. Exp. Med.*, **173**, 1483–1491 (1991).
- 21) Chappel M. S., Isenman D. E., Everett M., Xu Y.-Y., Dorrington K. J., Klein M. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 9036–9040 (1991).
- 22) Greenwood J., Clark M., Waldmann H., *Eur. J. Immunol.*, **23**, 1098–1104 (1993).
- 23) Nose M., Wigzell H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6632–6636 (1983).
- 24) Tao M.-H., Morrison S. L., *J. Immunol.*, **143**, 2595–2601 (1989).
- 25) Sondermann P., Huber R., Jacob U., *EMBO*

- J.*, **18**, 1095–1103 (1999).
- 26) Maxwell K. F., Powell M. S., Hulett M. D., Barton P. A., Mc Kenzie I. F. C., Garrettt T. P. J., Hogarth P. M., *Nature Struct. Biol.*, **6**, 437–442 (1999).
- 27) Kato K., Gouda H., Takaha W., Yoshino A., Matsunaga C., Arata Y., *FEBS Lett.*, **328**, 49–54 (1993).
- 28) Gouda H., Torigoe H., Saito A., Sato M., Arata Y., Shimada I., *Biochemistry*, **31**, 9665–9672 (1992).
- 29) Sautès C., Galinha A., Bouchard C., Mazières N., Spagnoli R., Fridman W. H., *J. Chromatography B*, **662**, 197–207 (1994).
- 30) Teillaud J. L., Bouchard C., Astier A., Teillaud C., Tartour E., Michon J., Galinha A., Moncuit J., Mazières N., Spagnoli R., Fridman W. H., Sautès C., *Immunomethods*, **4**, 48–64 (1994).
- 31) Kainosho M., Tsuji T., *Biochemistry*, **21**, 6273–6279 (1982).
- 32) Kato K., Matsunaga C., Nishimura Y., Waelchli M., Kainosho M., Arata Y., *J. Biochem.*, **105**, 867–869 (1989).
- 33) Kato K., Matsunaga C., Igarashi T., Kim H., Odaka A., Shimada I., Arata Y., *Biochemistry*, **30**, 270–278 (1991).
- 34) Kato K., Matsunaga C., Odaka A., Yamato S., Takaha W., Shimada I., Arata Y., *Biochemistry*, **30**, 6604–6610 (1991).
- 35) Arata Y., Kato K., Takahashi H., Shimada I., *Methods in Enzymology*, **239**, 440–464 (1994).
- 36) Kato K., Sautès-Fridman C., Yamada W., Kobayashi K., Uchiyama S., Kim H., Enokizono J., Galinha A., Kobayashi Y., Fridman W.H., Arata Y., Shimada I., *J. Mol. Biol.*, **295**, 213–224 (2000).
- 37) Hulett M. D., Witort E., Brinkworth R. I., McKenzie I. F., Hogarth P. M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15287–15293 (1994).
- 38) Hulett M. D., Witort E., Brinkworth R. I., McKenzie I. F., Hogarth P. M., *J. Biol. Chem.*, **270**, 21188–21194 (1995).
- 39) Henry A. J., Cook J. P., McDonnell J. M., Mackay G. A., Shi J., Sutton B. J., Gould H. J., *Biochemistry*, **36**, 15568–15578 (1997).
- 40) Cook J. P., Henry A. J., McDonnell J. M., Owens R. J., Sutton B. J., Gould H. J., *Biochemistry*, **36**, 15579–15588 (1997).
- 41) Sondermann P., Jacob U., Kutscher C., Frey J., *Biochemistry*, **38**, 8469–8477 (1999).
- 42) Ghirlando R., Keown M. B., Mackay G. A., Lewis M. S., Unkeless J. C., Gould H. J., *Biochemistry*, **34**, 13320–13327 (1995).
- 43) Keown M. B., Ghirlando R., Mackay G. A., Sutton B. J., Gould H. J., *Eur. Biophys. J.*, **25**, 471–476 (1997).
- 44) Sechi S, Roller P.P., Willette-Brown J., Kinet J. P., *J. Biol. Chem.*, **271**, 19256–19263 (1996).
- 45) Sondermann P., Huber R., Oosthuizen V., Jacob U., *Nature*, **406**, 267–273 (2000).