

NMR에 의한 anti-Ex-A IgG의 항원결합부위 해석

김하형[#] · 이광표 · 가토 코이치* · 아라타 요우지*

중앙대학교 약학대학, *동경대학 약학부

(Received June 5, 1996)

Paratope Mapping of Anti-Ex-A IgG as Studied by NMR

Ha Hyung Kim[#], Kwang Pyo Lee, Koichi Kato* and Yoji Arata*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113, Japan

Abstract—The anti-Ex-A IgG was specifically labeled with stable isotopes, DL-His-2,4-d₂, L-Phe-d₅, L-Trp-d₅, L-Tyr-2,6-d₂ and L-[1-¹³C]Trp, by growing hybridoma cell in serum-free medium. By use of NMR spectroscopy with selectively labeled Fab fragment, we applied a paratope mapping on antigen-antibody complex. Assignments of the observed carbonyl carbon resonances have been determined by using ¹³C-¹⁵N double labeling method in order to assign the Trp resonances. Photo CIDNP was also applied to investigate the antigen-binding site(s) on the surface residues of antibody. We found that Trp 36, which is located at the V_H domain, is an important residue to bind to Ex-A, however, two Tyr on the surface of anti-Ex-A IgG plays no crucial role to bind to antigen. On the basis of these results, we demonstrate that stable isotope-aided NMR strategy can be extended to molecular structural analyses of the complex of an Fab fragment and a protein antigen.

Keywords □ anti-Ex-A IgG, paratope mapping, NMR, stable-isotope, photo CIDNP.

면역글로부린 G (IgG)는 고등동물의 생체방어계에 있어서 중심적인 역할을 하고 있는 분자량 약 150 kDa의 다기능성 단백질로, 2개의 heavy chain 과 2개의 light chain으로 구성되어 있다. Heavy chain은 V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} domain으로 구성되어 있으며, light chain은 V_L, C_L domain으로 구성되어 있다. C_{H1}과 C_{H2} domain은 hinge영역에 의해 연결되어 있고, papain과 같은 protease처리로, 항원에 특이적으로 결합하는 기능을 갖는 Fab 프라그먼트와 그로 인하여 항원항체 복합체를 형성하고, 보체계 혹은 세포표면에 존재하는 receptor등의 분자와 결합하는 Fc 프라그먼트를 얻을 수 있다. Fab 프라그먼트에는 V_H와 V_L의 양 domain에 각각 3개씩, 6개의 CDR영역으로 구축된 loop부분이 항원과의 결합에 중요한 역할

을 하고 있는 것이 알려져 있다. 즉, 항체가 가지고 있는 항원에 대한 결합의 특이성, 다양성은 이 CDR영역을 규정하는 유전자의 재편성과 돌연변이에 의해 생기게 된다.^{1,2)} 그러므로, 특정항체에 있어서 항원과의 결합에 CDR 영역을 포함하여 어느 아미노산 부분이 관여하고 있는가에 관한 구조적 정보는, 보다 기능이 향상된 항체를 인위적으로 창조하는데 중요한 정보를 제공하게 된다.

항체의 항원결합부위의 구조를 해석하는데에는, 항원결합부위의 원자좌표를 3차구조적으로 나타내는 X선결정구조해석^{3,4)}이 유력한 방법중 하나이다. 그러나, 항원항체 복합체의 순수한 결정체를 얻는 것이 용이하지는 않은 것으로 부터, 용액상태에서의 단백질의 구조적 정보를 원자레벨의 분해능으로 해석할 수 있는 NMR에 의한 해석은 항원항체 복합체의 구조를 해석하는데 보다 유용한 해석방법으로 생각할 수 있다.

본 연구실에서는, NMR을 이용하여 IgG의 구조해석

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-812-5612 (팩스) 02-812-5606

을 하기 위하여, 먼저 불균일한 분자종의 철저한 분리, 정제법을 확립하여 IgG를 얻은 후, 수용액중에서의 IgG의 고차구조를 각각의 원자에서 유래하는 시그널을 프로브로하여 해석하는 방법론을 확립하였다.⁵⁻¹⁰ 그리고 그 결과를 응용하여, Fab프라그먼트에서의 hapten과 같은 작은 물질과의 결합부위의 해석을 행하였고¹¹, 분자량이 큰 단백질 항원을 이용하여 Fab 프라그먼트와 복합체를 형성시킨후, 항원결합부위의 구조를 해석하는 방법론을 제시하였다.¹²

본 연구에서 해석 대상으로 이용한 항원은, *Pseudomonas aeruginosa*에서 분비되는 독소 exotoxin-A (Ex-A)로서, *Corynebacterium diphtheriae* (diphtheria toxin), *Vibrio cholerae* (cholera toxin), *Shigella dysenteriae* (shiga toxin), *Bacillus anthracis* (anthra toxin)와 같이 외분비되는 exotoxin으로 알려져 있다.¹³ Ex-A는 포유동물에 있어서 cholera toxin, diphtheria toxin과 같이 polypeptide chain 연장 인자 (EF 2)를 ADP-ribosyl화 하여 peptide의 합성을 저해함으로 인해 독소로서의 기능을 발휘하게 되는데¹⁵ 특히, 화상환자나 면역기능이 약화된 사람의 몸에 침투후 2차감염을 일으키며, 항생물질의 작용을 받기 어려운 독소로 알려져 있다.¹⁴ 분자량은 67 kDa으로 3개의 domain으로 이루어져 있으며, 그 3차구조는 Allured 등이 X선결정구조해석에 의해 3.0Å의 분해능으로 보고하였다.¹⁵

본 연구에서는, anti-Ex-A IgG를 안정동위체 아미노산으로 표지한후, NMR을 이용하여 각 아미노산 유래의 시그널을 선택적으로 추출하였다. 그리고, 항원항체 복합체를 형성하였을때 단백질 독소항원과의 결합에 의한 Fab 프라그먼트 유래 시그널의 변화를 해석하고, 각 시그널이 어느 아미노산의 원자단에서 유래하는가, 즉 귀속(assignment)을 하였다. 또한 표면에 존재하는 아미노산은 항원과의 결합에 중요한 역할을 담당하고 있을 가능성이 높은 것으로 부터, photo CIDNP (Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization) 측정법을 이용한 NMR에 의해 항체의 표면에 존재하는 방향족 아미노산의 항원결합에의 영향을 해석하였다. 카르보닐 탄소를 표지한 경우의 시그널의 귀속은, Kainosho 등¹⁶에 의해 발표된 ¹³C-¹⁵N double labeling법, 즉 아미노산 선택적으로 카르보닐 탄소와 아미드 질소에 ¹³C과 ¹⁵N을 각각 도입하여 일차구조상 인접한 아미노산 잔기간의 ¹J_{CN} 카플링을 관측하는 방

법을 이용하였다.

실험방법

시약 및 재료

*Pseudomonas aeruginosa*로부터 생성된 독소 Ex-A에 대한 mouse monoclonal anti-Ex-A IgG1(k) Cell line Ex-3C7은 스미토모화학공업주식회사 타카라주카 종합연구소의 노구치 히로시막사로 부터 제공 받았다. 다음 시약들은 구입 후 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다. Ex-A (Swiss Serum and Vaccine Institute, Berne), L-[1-¹³C] Trp (Isocommerz GmbH), DL-[α-¹⁵N]Val (CIL), 그 이외의 다른 안정동위체 표지아미노산 (ICON Service), papain (Sigma).

안정동위체 표지 IgG의 조제

anti-Ex-A IgG를 생산하는 하이브리도마 Ex-3C7을 무혈청배지에 순응시킨후, L-[1-¹³C] Trp을 배지 1l당 7.3 mg을 넣어 플라스크에서 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. Double labeling한 IgG를 조제하는 경우, transaminase에 의해 촉매되는 아미노산 전이반응에 의한 안정동위체의 희석을 방지하기 위하여, β-chloro-L-alanine과 L-Ala을 배지 1l당 각각 16 mg, 100 mg씩 넣고, DL-[α-¹⁵N]Val을 47.0 mg씩 넣어 배지에서 배양하였다. 또한, photo CIDNP에 의한 해석의 경우, DL-His-2,4-d₂, L-Phe-d₅, L-Trp-d₅, L-Tyr-2,6-d₂를 각각 배지 1l당 27.7 mg, 22.8 mg, 9.9 mg, 7.3 mg씩을 넣고 배양하였다. 세포가 완전히 사멸한후, 배양액을 회수하여 Millipore Minitan System을 이용하여 농축한 후, Affigel protein A (Bio-Rad) 컬럼에 의해 정제하였다. 배양액 1l당 약 20 mg의 항체를 얻었다.

IgG의 프라그먼트화 및 분리

IgG를 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 75 mM NaCl, 2 mM EDTA에 녹여 papain을 이용하여 분해하였다. 항체의 농도를 5 mg/ml로 하고, 효소부활제로서 2 mg/ml의 L-Cys · HCl · H₂O와 함께 효소대 기질의 비를 1 : 50 (w/w)로 하여 90분간 반응을 시킨 후, 50 mM N-ethylmaleimide로 반응을 정지시켰다. 반응액은 20 mM tris-HCl (pH8.5)로 투

석을 한 후, Mono Q 컬럼 (Pharmacia)을 이용하여 NaCl의 농도를 0~400 mM의 범위에서 변화시켜 Fab 와 Fc 프라그먼트를 분리하였다. 분리한 프라그먼트는 전기영동으로 순도를 확인하였다.

전기영동

Laemmli¹⁷⁾에 의해 보고된 방법에 준한 SDS-PAGE로 하였으며, 12% (w/v)의 polyacrylamide slab gel을 이용하였다.

항원항체 복합체의 형성

항체 anti-Ex-A Fab 프라그먼트와 Ex-A를 1 : 1 (mol/mol)로 반응시킨후, gel filtration Superose 12 (Pharmacia) 컬럼으로 분자량이 약 120 kDa임을 확인하여 미반응의 Fab 프라그먼트가 없음을 확인하였다.

NMR 측정 시료조제

각각의 시료는 한외여과에 의한 centriprep (ami-con)으로 농축 후, 5 mM sodium phosphate, 200 mM NaCl, 3 mM NaN₃ (pH7.3)를 포함하는 ²H₂O 용액으로 치환후, 최종 농도를 0.2~0.7 mM로 하여, 직경 10 mm의 시료관을 이용하여 측정하였다. Photo CIDNP측정시에는 5 mm의 시료관을 이용하였다.

NMR 측정조건

Bruker AM 400분광기를 이용하여, WALTZ 16 composite pulse에 의해 proton decoupling을 행한 후, 측정하였다. 스펙트럼 폭 24,000 Hz, 데이터 포인트 32 K, 펄스의 repetition time을 1.0초로 6,400~200,000회 적산을 하였다. FID (Free Induction Decay)는 지수함수 혹은 가우스 함수를 행한후, Fourier변환을 시켰다. Chemical shift는 내부표준액으로 dioxane으로 부터의 ppm으로 나타내었다. 측정온도는 30°C로 하였다. Photo CIDNP 측정시에는 광원으로서, NEC GLG-3300 argon laser를 이용하였고, 시료용액중에는 0.2 mM 3-(carboxymethyl)lumiflavin을 가한후 측정하였다. FID데이터 수집전에, HDO 피크를 미리 조사하여 포화시켰다. 데이터는 레이저광을 조사한 상태와 조사하지 않은 상태와의 차를 스펙트럼으로 나타내었다.

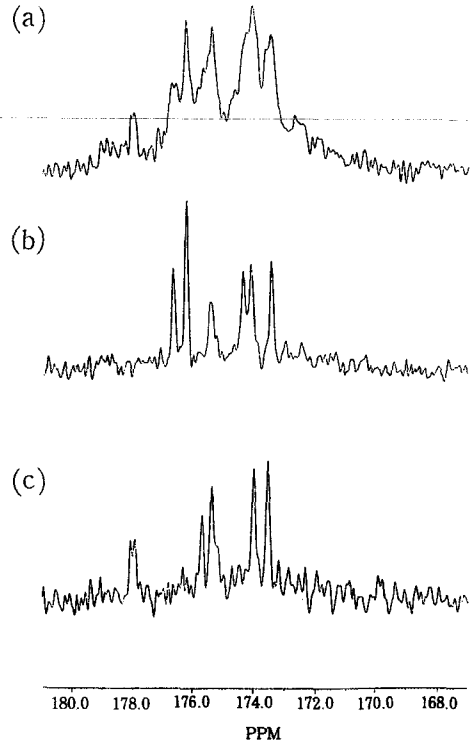


Fig. 1—The 100 MHz ¹³C-NMR spectra of [W] anti-Ex-A IgG. (a) intact, (b) Fab and (c) Fc fragment.

실험결과

NMR 시그널의 관측

본 연구에서 이용한 anti-Ex-A IgG1의 V_H, V_L domain의 일차구조는 이미 보고되어 있다.¹⁰⁾ Anti-Ex-A IgG에는 총 11개의 Trp이 존재하며, Trp의 카르보닐 탄소를 ¹³C로 표지한 경우, NMR에 의해 각각을 분리하여 검출할 수 있게 되었다(Fig.1). 이 IgG를 papain으로 처리 하여 Mono Q 음이온교환 크로마토그래피로 분리후, 항원과의 결합에 관여하는 Fab 프라그먼트와 에펙터 기능을 발현하는 Fc 프라그먼트를 얻어 NMR을 측정한 결과를 Fig. 1 (b), (c)에 각각 나타내었다. 즉, 1500여 아미노산으로 구성되어 있는 anti-Ex-A IgG1에는 Trp이 Fab 프라그먼트에 6개 (V_H: 36, 103, V_L: 158, C_{H1}: 158, C_L: 148, 163)와 Fc 프라그먼트에 5개 (C_{H2}: 277, 313, C_{H3}: 381, 383, 417)¹⁰⁾가 있으며, 이들을 각각 분리하여 관측하였다.

항원항체 복합체 형성시 항체의 NMR 시그널의 변화

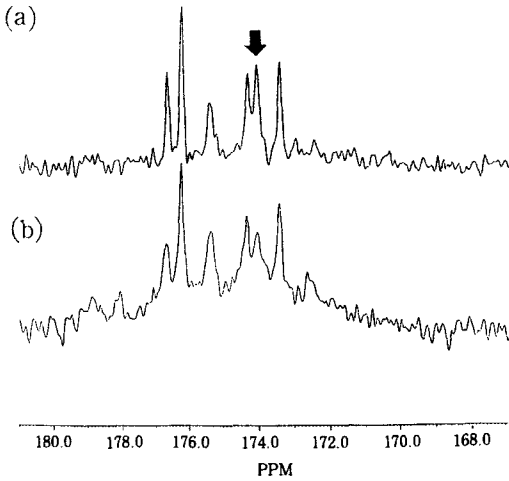


Fig. 2—The 100 MHz ¹³C-NMR spectra of [W] anti-Ex-A Fab (a) in the absence and (b) in the presence of Ex-A.

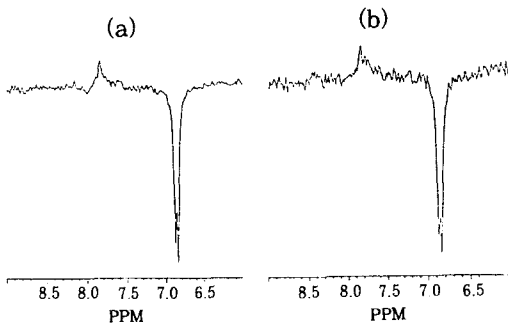


Fig. 3—Photo CIDNP spectra of anti-Ex-A IgG (a) in the absence and (b) in the presence of Ex-A.

Trp의 카르보닐 탄소를 ¹³C로 표지한 Fab와 항원 Ex-A를 결합시켜 항원항체 복합체를 형성시킨 후, NMR을 측정하였다. 그 결과, Fig. 2 (b)에 화살표로 나타낸 174.1 ppm 유래의 시그널만이 현저하게 broad하게 된 변화를 관측할 수 있게 되었다.

한편, anti-Ex-A IgG에 플라빈 색소를 공존시켜, 여기에 레이저 광선을 쬐이면 발기된 플라빈 색소가 항체 표면의 방향족 아미노산 측쇄와 라디칼 측쇄를 형성하게 되고, 측쇄의 ¹H의 에너지 상태가 변하게 된다. 레이저광선을 쬐었을 때와 쬐이지 않았을 때의 NMR 시그널의 차 스펙트럼에 대한 CIDNP 시그널로부터, 수소결합을 형성하고 있는 아미노산 이외의 방향족 아미노산 잔기의 표면 노출도를 알 수 있게 된다. 본 연구에서는 선택적으로 중수소 라벨을 하여,

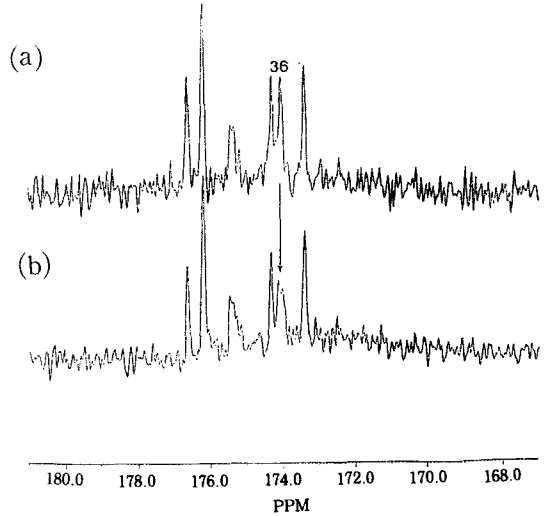


Fig. 4—The 100 MHz ¹³C-NMR spectra of (a) [W] anti-Ex-A Fab and (b) [W, V] anti-Ex-A Fab.

Tyr의 3, 5위치의 ¹H만을 관측할 수 있는 Fab프래그먼트를 조제하였다. CIDNP의 측정결과로부터 anti-Ex-A IgG의 표면에는 수소결합을 형성하고 있지 않은 Tyr이 2개 존재하고 있음을 알게 되었다 (Fig. 3(a)). 이 Fab에 항원을 결합시켜 CIDNP를 측정된 결과, 시그널에 아무런 변화가 없는 것으로 부터, anti-Ex-A IgG에는 2개의 Tyr이 표면에 노출되어 있지만, 항원과의 결합에는 관여하고 있지 않음을 알게 되었다 (Fig. 3(b)).

NMR 시그널의 귀속 항원과의 결합에 의해 현저하게 broad하게 된 시그널, 즉 Fig. 2(a)에서의 174.1 ppm 유래의 시그널은 카르보닐 탄소를 ¹³C로 표지하고 동시에 Val의 아마이드질소를 ¹⁵N으로 double labeling하여 NMR을 측정된 결과, 1) ¹J_{CN} 커플링에 의해 doublet이 관측된 점(Fig. 4(b)), 2) Val이 옆잔기인 Trp은 V_H domain의 Trp36인 것¹⁰⁾으로부터 174.1 ppm 유래의 시그널은 Trp36으로 귀속할 수 있게 되었다. Anti-Ex-A IgG의 아미노산 일차배열¹⁰⁾로부터 Trp36은 heavy chain의 CDR 1 loop (Asn31~His 35) 근처에 존재하는 아미노산임을 알 수 있다.

고 찰

이미, 본 연구실에서는 anti-dansyl antibody의 Fv프래그먼트 (V_H, V_L)의 항원 결합부위의 해석에 카

르보닐 탄소를 ^{13}C 로 표지하여 NMR에 의한 해석을 하고 그 결과를 발표하였다.¹²⁾ 또한, 안정동위체 아미노산으로 표지한 단백질항원에 대한 항체의 항원결합부위를 해석하는데, NMR이 유용한 정보를 제공함을 보고 하였다.⁵⁻¹¹⁾

본 연구에서는 NMR에 의한 해석방법론을 보다 확장시켜, 항원결합부위의 mapping을 하고자는 목적에서 연구를 하였다. 구체적으로는, 안정동위체를 이용한 NMR에 의해 고분자량 단백질복합체의 고차구조해석 수법을 개척하고, 그 결과를 Ex-A와 그에 대한 항체와의 결합양식의 해석에 응용하였다. 즉, 항체를 생산하는 세포를 안정동위체 표지 아미노산을 포함하는 무혈청배지에서 배양하여 특정부위를 선택적으로 표지한 anti-Ex-A IgG를 얻어, papain 효소반응에 의해 조제한 Fab 프라그먼트를 이용하여 NMR의 측정을 하고 double labeling법에 의해 시그널을 귀속하였다. Trp의 카르보닐탄소를 선택적으로 ^{13}C 로 표지한 항체의 Fab 프라그먼트에 Ex-A를 결합시켜, ^{13}C -NMR을 측정한 결과, V_H domain 유래 Trp36의 시그널에서 선택적으로 선폭에 변화가 인정되었다. 본 연구실에서 이미 발표한 바와 같이 anti-Ex-A IgG의 V_L domain 유래 Met33의 시그널에서도 항원결합에 의해 선폭의 변화가 관측된 결과¹⁰⁾와 본 연구에서 얻어진 결과를 종합하면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

1) anti-Ex-A IgG에 의한 항원의 결합에는 V_H , V_L 의 domain이 동시에 관여하고 있다.

2) Met33을 포함하는 light chain의 CDR1 loop (Arg24~His34)와 Trp36과 일차배열상 근처의 heavy chain CDR1 loop(Asn31~His35)는 항원결합에 특히 중요한 역할을 한다. 현재, 다른 아미노산의 카르보닐 탄소를 ^{13}C 표지한 항체의 항원결합에 의한 NMR 시그널의 변화에 관하여서도 연구를 진행중이다.

3) anti-Ex-A IgG의 Fab 프라그먼트에는 현저한 CIDNP 시그널을 나타내는 Tyr 잔기가 2개 존재하지만, 이들은 항원과의 결합에는 관여하고 있지 않음을 알게 되었다.

본 연구에서는 NMR 시그널의 선폭의 변화를 지표로 하여 해석을 하였다. 현시점에서, NMR 시그널의 chemical shift나 선폭의 변화에 따른 구조적 변화를 정량적으로 논하는 데에는 무리가 있다. 그러나, 여러 예에서 보고된 바와 같이 항원결합에 의해 NMR 시그

널의 chemical shift나 선폭에 변화를 나타내는 부분은 X선결정구조해석에 있어서도 ligand 등과의 결합에 관여하는 중요한 부분임이 밝혀지고 있다.¹⁸⁻²¹⁾ 그러므로, 본 연구에서 이용한 NMR에 의한 해석 방법은, 수용액 상태에서의 항원과 결합하는 항체의 결합부위의 구조해석에 유용한 정보를 제공할 뿐만이 아니라, 항체가 특유의 기능발휘를 위하여 결합하는 기타 여러 단백질 분자와의 결합부위의 구조해석에도 유용한 방법으로 응용될 것이 기대된다.

문 헌

- 1) Burton, D. R. : Immunoglobulin G: functional sites. *Mol. Immunol.* **22**, 161 (1985).
- 2) Padlan, E. A. : Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169 (1994).
- 3) Colman, P. M. : Structure of antibody-antigen complexes: implication for immune recognition. *Adv. Immunol.* **43**, 99 (1988).
- 4) Davies, D. R., Padlan, E. and Sheriff, S. : Antigen-antibody complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439 (1990).
- 5) Kato, K., Matsunaga, C., Igarashi, T., Kim, H. H., Odaka, A., Shimada, I. and Arata, Y. : Complete assignment of the methionyl carbonyl carbon resonances in switch variant antidansyl antibodies labeled with [^{13}C] Methionine. *Biochemistry* **30**, 270 (1991).
- 6) Kim, H. H., Kato, K., Higuchi, A., Nomura, N., Noguchi, H. and Arata, Y. : ^{13}C -NMR spectral analysis of the structures of mouse immunoglobulin G1 carrying allotypes a and j. *J. Immunol. Methods* **153**, 223 (1992).
- 7) Kim, H. H., Matsunaga, C., Yoshino, A., Kato, K. and Arata, Y. : Dynamical structure of the hinge region of immunoglobulin G as studied by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **236**, 300 (1994).
- 8) Kim, H. H., Yamaguchi, Y., Masuda, K., Mastunaga, C., Yamamoto, K., Irimura, T., Takahashi, N., Kato, K. and Arata, Y. : O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. *J. Biol. Chem.* **269**, 12345 (1994).

- 9) Kato, K., Lian, L., Barsukov, I. L., Derrick, J. P., Kim, H. H., Tanaka, R., Yoshino, A., Shiraishi, M., Shimada, I., Arata, Y. and Roberts G. C. K. : Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure* **15**, 79 (1995).
- 10) Kim, H. H., Kato, K., Yamato, S., Igarashi, T., Mastunaga, C., Ohtsuka, H., Higuchi, A., Nomura, N., Noguchi, H. and Arata, Y. : Application of ^{13}C NMR spectroscopy to paratope mapping for large antigen-Fab complexes. *FEBS Lett.* **346**, 246 (1995).
- 11) Yamaguchi, Y., Kim, H. H., Kato, K., Masuda, K., Shimada, I. and Arata, Y. : Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. *J. Immunol. Methods* **181**, 259 (1995).
- 12) Kato, K., Matsunaga, C., Odaka, A., Yamato, S., Takaha, W., Shimada, I. and Arata, Y. : Carbon-13 NMR study of switch variant anti-dansyl antibodies : antigen binding and domain-domain interaction. *Biochemistry* **30**, 6604 (1991).
- 13) Middlebrook, J. L. and Dorland, R. B. : Bacterial toxins, cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.* **48**, 199 (1984).
- 14) Cross, A. S., Sadoff, J. C., Iglewski, B. H. and Sokol, P. A. : Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. *J. Infect. Dis.* **142**, 538 (1980).
- 15) Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F. and McKay, D. B. : Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Ångstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1320 (1986).
- 16) Kainosho, M. and Tsuji, T. : Assignment of the three methionyl carbonyl resonances in *Streptomyces* subtilisin inhibitor by a carbon-13 and nitrogen-15 double-labeling technique. A new strategy for structural studies of proteins in solution. *Biochemistry* **21**, 6273 (1982).
- 17) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680 (1970).
- 18) Chen, Y., Reizer, J., Saier, M. H. Jr., Fairbrother, W. J. and Wright, P. E. : Mapping of the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIA_{glc}. *Biochemistry* **32**, 32 (1993).
- 19) van Nuland, N. A., Kroon, G. J., Dijkstra, K., Wolters, G. K., Scheek, R. M. and Robillard, G. T. : The NMR determination of the IIA(mtl) binding site on HPr of the Escherichia Coli phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system. *FEBS Lett.* **315**, 11 (1993).
- 20) Kato, K., Gouda, H., Takaha, W., Yoshino, A., Matsunaga, C. and Arata, Y. : ^{13}C NMR study of the mode of interaction in solution of the B fragment of staphylococcal protein A and the Fc fragments of mouse immunoglobulin G. *FEBS Lett.* **328**, 49 (1993).
- 21) Lumb, K. J., Cheetham, J. C. and Dobson, C. M. : ^1H nuclear magnetic resonance studies of hen lysozyme-N-acetylglucosamine oligosaccharide complexes in solution. Application of chemical shifts for the comparison of conformational changes in solution and in the crystal. *J. Mol. Biol.* **235**, 1072 (1994).