

ヒト CD161 分子 (NKRP1A/KLRB1) による LLT1 認識の分子基盤の解明

上敷領淳

Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKRP1A/KLRB1)

Jun Kamishikiryo

ABSTRACT

Human Th17 cells express high levels of CD161, a member of the Killer cell lectin-like receptor (KLR) family (also referred to as NK receptor-P1A (NKRP1A) or KLRB1), as a representative marker. CD161 is also expressed on natural killer (NK) cells and NKT cells. Lectin-like transcript 1 (LLT1), another KLR family member, was recently identified as a ligand for CD161. This interaction may play pivotal roles in the immunomodulatory functions of Th17 cells, as well as those of NK and NKT cells. However, the molecular basis for the interaction is poorly understood. Here we show that the extracellular domain of CD161 bound directly to LLT1 with a Kd of 48 μ M, and with the fast kinetics typical of cell-cell recognition receptors. Mutagenesis revealed that the similar membrane-distal β -sheet and loop regions of both CD161 and LLT1 were utilized for the binding, and notably, these regions correspond to the ligand-binding sites for major histocompatibility complex (MHC)-recognizing KLRs. Furthermore, we found a pair of detrimental mutations for both molecules that restored the binding. These results reveal a new template model for the recognition mode between the KLR family members, and provide insights into the molecular mechanism underlying Th17/NK/NKT-mediated immune responses.

1. はじめに

ヒト CD161 タンパク質は T ヘルパー 17(Th17) 細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞などに発現している免疫細胞表面受容体である。CD161 タンパク質は Killer cell lectin-like receptor (KLR) ファミリーに属する 2 型の膜貫通型糖タンパク質であり、ジスルフィド結合を介して 2 量体を形成する¹⁾。長い間 CD161 タンパク質のリガンドは不明であったが、2005 年によくそのリガンドとして Lectin-like transcript-1 (LLT1) タンパク質が同定された^{2,3)}。面白いことに、LLT1 タンパク質も CD161 タンパク質同様に、KLR ファミリーに属する 2 型の膜貫通型糖タンパク質であり、ジスルフィド結合を介して 2 量体を形成していることが明らかになった。また、染色体上でも CD161 と LLT1 は隣接する位置にコードされており、CD161、LLT1 とともに、その細胞外領域に C 型レクチン様ドメインと呼ばれるドメイン構造を 1 つ持っている。これまでに、C 型レクチン様ドメインを持つ KLR ファミリー分子はタンパク質を含め、様々なリガンドを認識し、結合することが知られていた^{4,9)}。しかし、KLR ファミリー分子同士の結合が明らかになったのは、CD161-LLT1 相互作用が初めてのものであり、どのような分子機構でお互いを認識しているのか興味を持たれる。

今回、筆者らは、速度論的解析、熱力学的解析により、CD161-LLT1 相互作用の詳細な性質を明らかにし、また、広範囲にわたる変異体解析により、CD161-LLT1 相互作用の結合領域、及び結合様式を明らかにしたのでここに概説する¹⁰⁾。

2. 表面プラズモン共鳴法による CD161-LLT1 相互作用解析

今回筆者らは、相互作用解析に表面プラズモン共鳴の原理を利用した相互作用測定装置 Biacore3000 を用いた。Biacore ではセンサーチップ上に固定化したサンプルの質量の変化をセンサーチップ近傍の屈折率の変化として観測する。相互作用における結合と解離をリアルタイムに観測することが出来るため、免疫沈降や ELISA などでは相互作用が観測されないような、解離過程の速い相互作用も観測することが出来る。このような特徴から、相互作用の速度論的解析によく用いられている。

今回、測定に際しては、CD161、LLT1 とともに膜につながったままでは再現性のあるデータの取得が困難になるため、細胞外ドメインのみを可溶性タンパク質として発現させ、測定に用いた。LLT1 タンパク質に関しては大腸菌発現系により、活性を持たない（立体構造を持たない）不溶性の封入体として得られたため、巻き戻し反応を行うことで立体構造を形成させた（立体構造の形成は、円偏光二色性 (CD) スペクトルにより確認した)。CD161 タンパク質に関しては、大腸菌を用いた巻き戻し系による調製が困難であったため、哺乳類細胞 (Human embryonic kidney (HEK)293 細胞) を用いて発現させた。表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用実験では、一方の分子をセンサーチップ上に固定化し、他方の分子を固定化した分子上に添加する。固定化する分子は少ないサンプル量で測定を行うことができるため、発現量の少ない分子を固定化することが多い。LLT1 タンパク質は大腸菌 1 L 培養当たり約 80 mg と

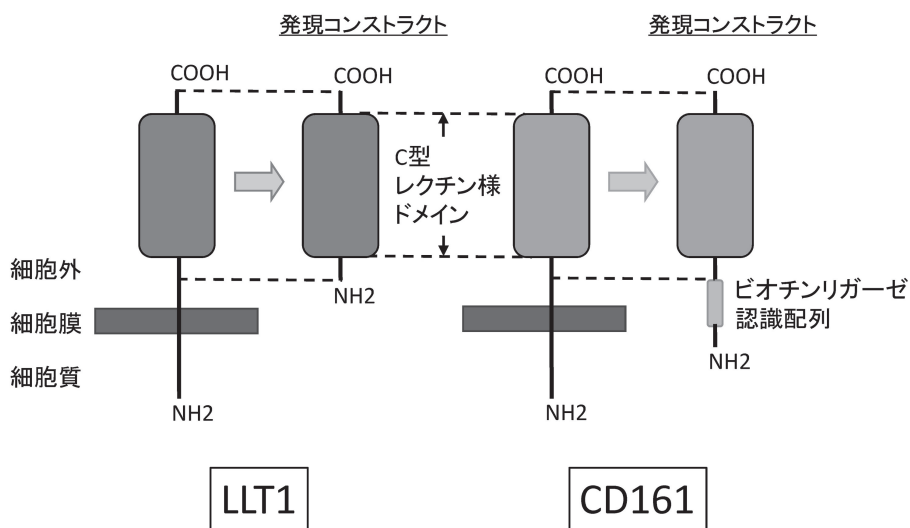


Fig. 1 The structure and expression construct of LLT1 and CD161.

大量に得ることができるが、CD161 タンパク質は HEK293 細胞で微量しか発現しないため、CD161 タンパク質を固定化することにした。その際、細胞膜上での配向と同じ配向で固定化するために、CD161 タンパク質の N 末端にビオチンリガーゼ認識配列が付加した状態で発現させ、部位特異的にビオチン化を行った (Fig. 1)。ビオチン化 CD161 タンパク質は、ビオチン-アビジンの非常に強力な結合 (解離定数: 10^{-15} M) を利用して、ストレプトアビジンを化学的に固定化したセンサーチップ上に固定化した。

2-1. 結合解析

CD161-LLT1 相互作用の親和性を平衡結合解析により求めたところ、解離定数 $K_d = 53 \mu\text{M}$ で相互作用することが分かった。相互作用をさらに詳しく調べるために、速度論的解析及び熱力学的解析を行おうとしたが、調製した LLT1 タンパク質が調製後 24 時間程度で沈殿してしまうために測定を行うことが出来なかった。

LLT1 タンパク質のアミノ酸配列中にはシステイン残基が 5 個あり、2 本のジスルフィド結合を形成したとしても 1 個のシステイン残基が残ることになる。ジスルフィド結合を形成しないシステイン残基は分子間でランダムにジスルフィド結合を形成し、凝集・沈殿の原因になりやすい。そこで、KLR ファミリータンパク質のうち、アミノ酸配列が LLT1 タンパク質と最もよく似ている (アミノ酸配列相同性 40%) ヒト CD69 タンパク質 (hCD69) と配列アラインメントを行い、ジスルフィド結合を形成できないシステイン残基の予測を行った (Fig. 2)。アラインメントの結果、LLT1 タンパク質では、CD69 タンパク質で Cys186 に相当する位置がヒスチジン残基になっているためにジスルフィド結合を形成できなくなっている

ことが分かった。そこで、LLT1 タンパク質の安定性を改善するために、ジスルフィド結合を形成出来るようにした変異体 (H176C) 及び、ジスルフィド結合を形成出来ないシステイン残基を除いた変異体 (C163S) を作製した。変異を入れたことで、CD161 タンパク質との相互作用に影響がないか、また、安定性が改善されているかを確かめた。

CD161 タンパク質との相互作用に関しては、LLT1 野生型、C163S 変異体、H176C 変異体それぞれ解離定数 53 μ M、52 μ M、48 μ M であることが確かめられ、変異を入れたことによる影響は見られなかった。また、H176C 変異体に関しては安定性が改善されており、沈殿を形成しなくなった。しかし、C163S 変異体に関しては野生型と同様沈殿してしまい、安定性は改善されていない。そこで、速度論的解析及び熱力学的解析は LLT1 H176C 変異体を用いて行うことにした。

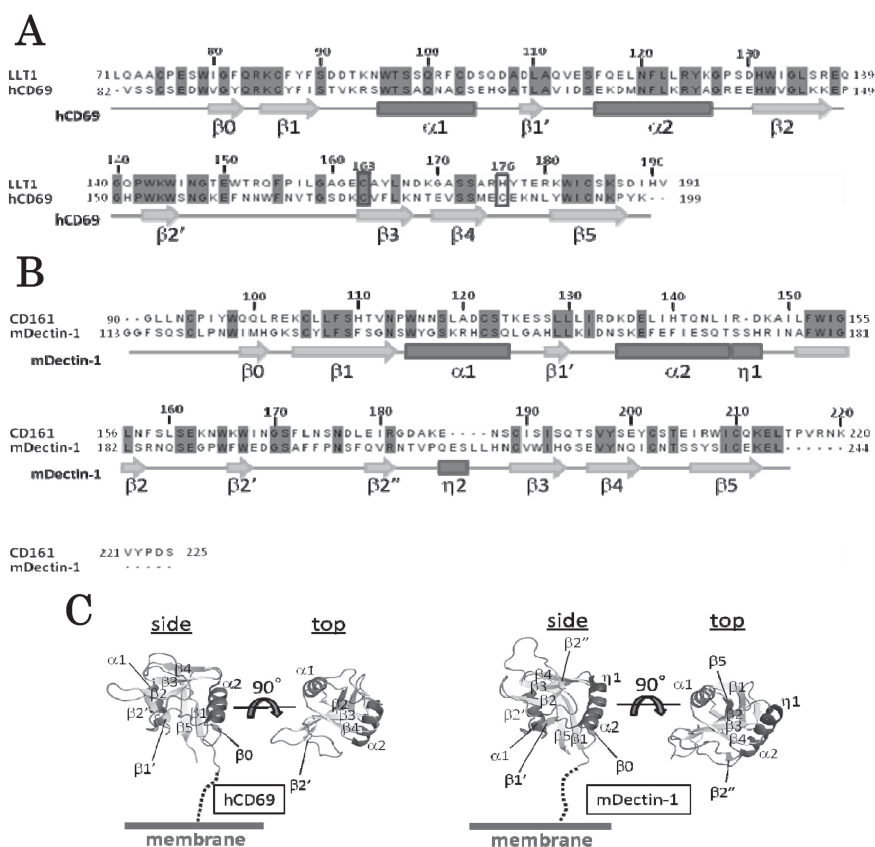


Fig. 2 Amino acid sequence alignment of the CTLDs of (A) LLT1 with human CD69 (hCD69), and (B) CD161 with murine Dectin-1 (mDectin-1). Secondary structure elements (β -strands (β), α -helices (α), and 3_{10} helices (η) of hCD69 and mDectin-1 are displayed below the alignments. (C) Ribbon diagrams of hCD69 (left) and mDectin-1 (right). Each diagram shows side and top views. Secondary structure elements are labeled.

2-2. 速度論的解析及び熱力学的解析

Fig. 3 に示す速度論的解析の結果、CD161-LLT1 相互作用は結合速度定数 $k_{on}=1.1 \pm 0.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数 $k_{off}=5.3 \pm 0.55 \text{ s}^{-1}$ と速い結合、速い解離を示すことが分かった。

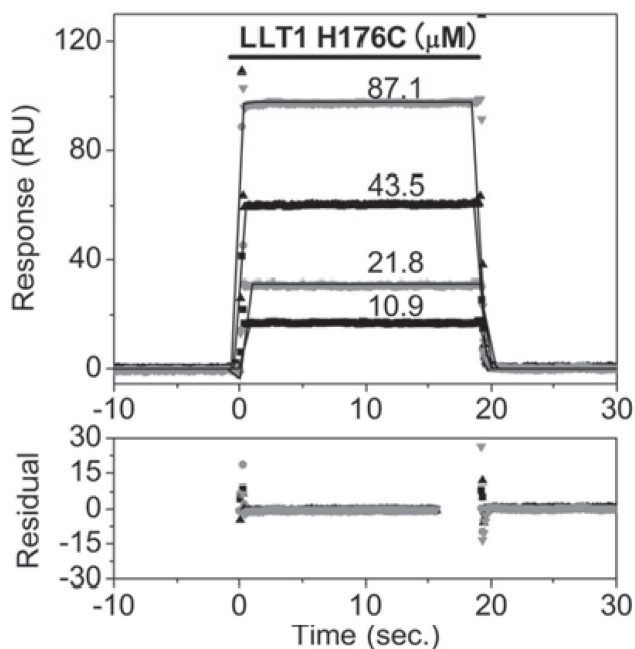


Fig. 3 Kinetic analysis of the CD161-LLT1 interaction. LLT1 (H176C) at the indicated concentrations, was injected (solid bar) over CD161 (430 response units (RU)). Rate equations derived from the 1:1 binding model were fitted to the association and dissociation phases of all four injections (global fitting). Residual errors from the fits are shown in the bottom panel.

また、解離定数から (式 1) を用いて結合に伴うギブス自由エネルギー変化 (ΔG) を求め、さらに、異なる 5 点の温度で測定を行うことで、(式 2) から結合に伴うエンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 ($-T\Delta S$)、また、熱容量変化 (ΔC_p) を求めた (Fig. 4A、Table 1)。

$$\Delta G = RT \ln K_d \quad (\text{式 1})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S + \Delta C_p(T - 298.15) - \Delta C_p T \ln(T/298.15) \quad (\text{式 2})$$

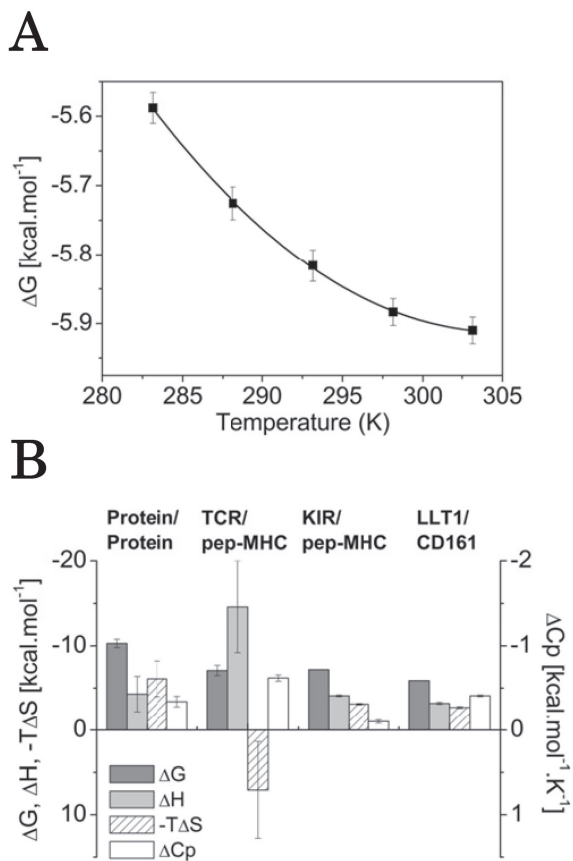


Fig. 4 (A) Thermodynamic analysis of the CD161-LLT1 interaction. **(B)** Comparison of the thermodynamic properties of several protein-protein interactions (at 298.15 K). The values for protein-protein interactions (excluding antibody-antigen interactions) are the mean \pm S.E. of 30 distinct interactions.

Table 1 Thermodynamic parameters of the interactions at 25°C

| Analyte | Immobilized | ΔG | ΔH | $-T\Delta S$ | ΔC_p |
|------------|--------------------|------------------|---------------------------|------------------|--|
| | | | (kcal.mol ⁻¹) | | (kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹) |
| LLT1 H176C | CD161 ^a | - 5.9 \pm 0.02 | - 3.2 \pm 0.13 | - 2.7 \pm 0.11 | - 0.41 \pm 0.01 |
| TCR | MHC | - 7.1 \pm 0.6 | - 14.6 \pm 5.4 | 7.1 \pm 5.7 | - 0.62 \pm 0.37 |
| KIR2DL3 | HLA-Cw7 | - 7.2 | - 4.1 | - 3.1 | - 0.1 |

^aThe values are means \pm standard error of 3 experiments.

熱力学的解析の結果、CD161-LLT1 相互作用は結合に伴って、エンタルピー変化及びエントロピー変化が好ましい方向へ変化する「エンタルピー・エントロピー駆動型」の相互作用であることが分かった (Fig. 4B)。CD161 タンパク質と同様に免疫細胞表面受容体として知られるものに、T 細胞受容体 (TCR) がある。TCR は主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) を認識し、結合するが、その相互作用は結合に伴って、エントロピー変化が好ましくない方向に大きく変化し、熱容量変化も大きいという特徴を持っている (Fig. 4B)¹¹⁻¹⁶⁾。さらに、TCR-MHC 相互作用は結合・解離速度が遅いことが分かっている ($k_{on}=0.009\sim 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off}=0.01\sim 0.1 \text{ s}^{-1}$)。この TCR-MHC 相互作用の特徴は、結合に際して TCR のフレキシブルなループ構造が結合に適したコンホメーションへと変化し (誘導適合 (induced-fit) モデル)、さらに、結合界面に水分子を捕捉するためであると考えられている。CD161-LLT1 相互作用は中程度の熱容量変化 ($\Delta C_p \sim 0.41 \pm 0.01 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) を示し、エンタルピー・エントロピー駆動型、速い結合・解離をすることから、結合に際して大きなコンホメーション変化は起こらないと考えられる。

3. CD161-LLT1 複合体の解析

速度論的解析及び熱力学的解析から CD161-LLT1 相互作用は結合に伴って大きなコンホメーション変化が起こらないことが分かった。そこで、すでに立体構造が明らかになっている KLR ファミリータンパク質をもとにして、CD161、LLT1 とともにモデル構造を作製し、それをもとに相互作用様式の推測を行うことにした。

先にも述べたように、LLT1 タンパク質は hCD69 とアミノ酸配列が良く似ている。また、CD161 タンパク質はマウス Dectin-1 タンパク質 (mDectin-1) とアミノ酸配列が似ている (相同性 30%) ことから (Fig. 2B)、それぞれ hCD69 と mDectin-1 の立体構造をもとにしてモデル構造を作製した。続いて、CD161、LLT1 とともに相互作用にどのような領域を用いているかの予測を行った。KLR ファミリータンパク質の中にはリガンドとの複合体の結晶構造が明らかになっているものが複数ある (KLRG1-E-Cadherin¹⁷⁾、CD94/NKG2A-HLA-E¹⁸⁾、Ly49C-H-2K^b⁷⁾) (Fig. 5)。そこで、それら複合体の立体構造をもとに CD161 と LLT1 の相互作用領域を予測した。Fig. 5 に挙げた KLR ファミリータンパク質の相互作用領域を見ると、全て細胞膜から離れた β -シートとループ構造からなる領域を使ってリガンドと相互作用していることが分かる。そこで、CD161、LLT1 とともに、同様の領域を使って相互作用していると仮定し、変異体を作製した。

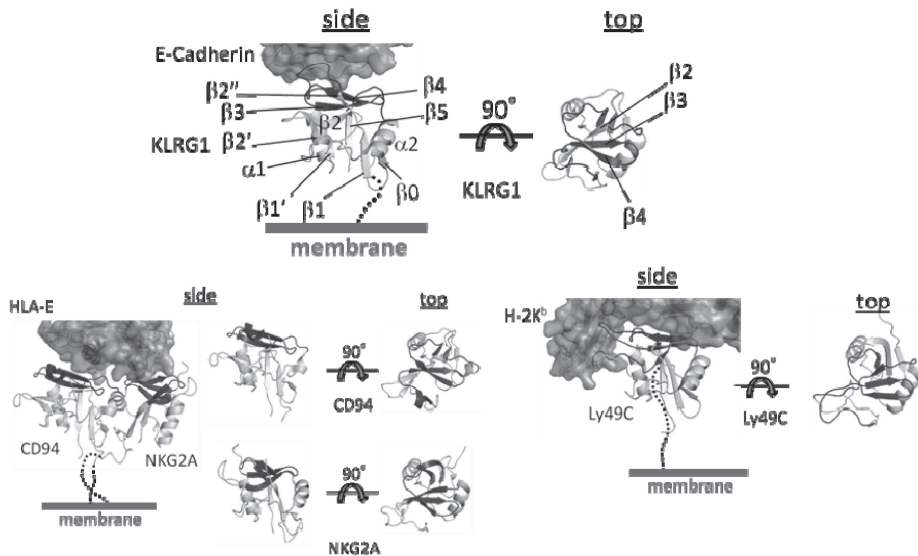


Fig. 5 Structure of the KLR-Ligand complex structures. KLRs are depicted by ribbon diagram. Ligand binding region of KLR is colored dark grey. Ligands are shown as dark grey surface representation. Two views of KLRs are presented (side and top views). Secondary structure elements are labeled.

3-1. 変異体解析を用いた相互作用領域のマッピング

CD161、LLT1 の相互作用領域と予想される領域の中から、特に相互作用への関与が大きそうな残基を選択して変異を導入したものをそれぞれ作製した。

はじめに、LLT1 の変異体 (Y165A、N167A、K169E、R175E、R180E、K181E) と CD161 (野生型) との相互作用を調べた (Fig. 6)。その結果、全ての変異体で相互作用が弱くなっており、K169E、R175E、R180E、K181E 変異体に関しては CD161 との相互作用が全くなくなってしまうことが分かった。

続いて、CD161 の変異体 (E162R、E179R、E179A、R181E、D183R、K185E、K185A、E186R、Y198A、E200R、E200A、Y201A、E205R) と LLT1 (野生型) との相互作用を調べた (Fig. 6)。その結果、E179R、K185E、E200R 変異体は LLT1 との相互作用に影響を及ぼさないことが分かった。しかし、同じ位置のアラニン変異体 (E179A、K185A、E200A) は LLT1 との相互作用が大きく低下することが分かった。R181E、E186R 変異体は LLT1 との相互作用が中程度低下し、E162R、D183R、Y198A、Y201A、E205R 変異体は LLT1 との相互作用が全くなくなってしまうことが分かった。

以上のことから、結合に関わると予測した領域の変異体全てが CD161-LLT1 相互作用に影響を及ぼしていることが分かる。従って、CD161、LLT1 とともに、他の KLR ファミリータン

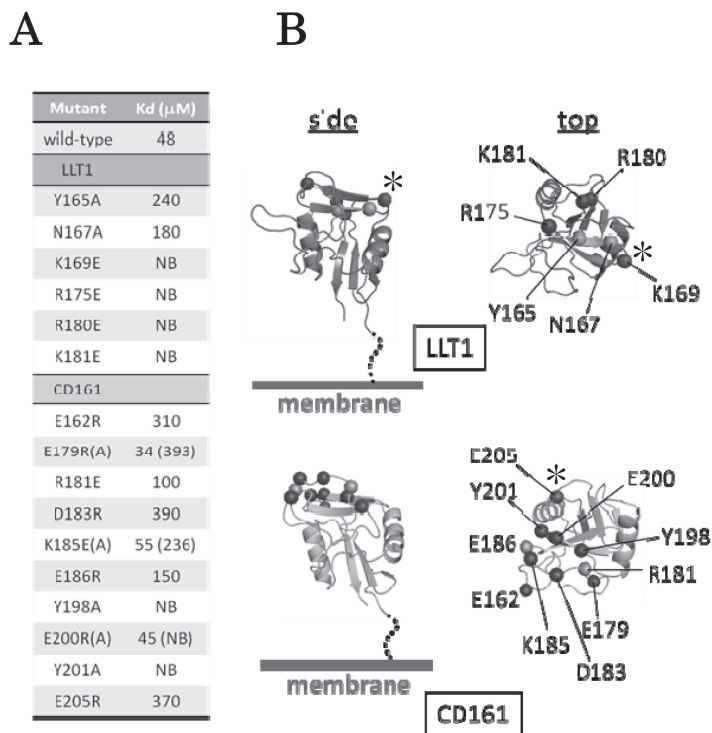


Fig. 6 (A) Binding affinities of LLT1 mutants for immobilized CD161 mutants at 298.15 K. (B) Ribbon diagrams of model structures of LLT1 (upper, dark grey) and CD161 (bottom, grey). Each diagram shows side and top views. Residues mutated in this study are shown as spheres with detrimental effect in dark grey, and modest effect in grey. Dark grey spheres with asterisk indicate the pair of residues that showed detrimental effects when mutated independently, but restored the binding when mutated simultaneously.

パク質と同様、膜から離れた β -シートとループ構造からなる領域を使って相互作用していると考えられる。

3-2. 復帰変異探索による CD161-LLT1 複合体モデルの構築

CD161-LLT1 相互作用において、お互いにどの領域を使って相手を認識しているのかが明らかになったので、続いてアミノ酸残基レベルで結合の相手を決めるために復帰変異の探索を行った。用いる戦略は、以下のとおりである (Fig. 7)。まず、CD161-LLT1 相互作用において、片方に変異を入れた場合に結合がなくなる、もしくは、結合が弱くなる変異を見つけることが出来た。今回、変異を入れた多くの残基は電荷が逆転するように変異を入れている

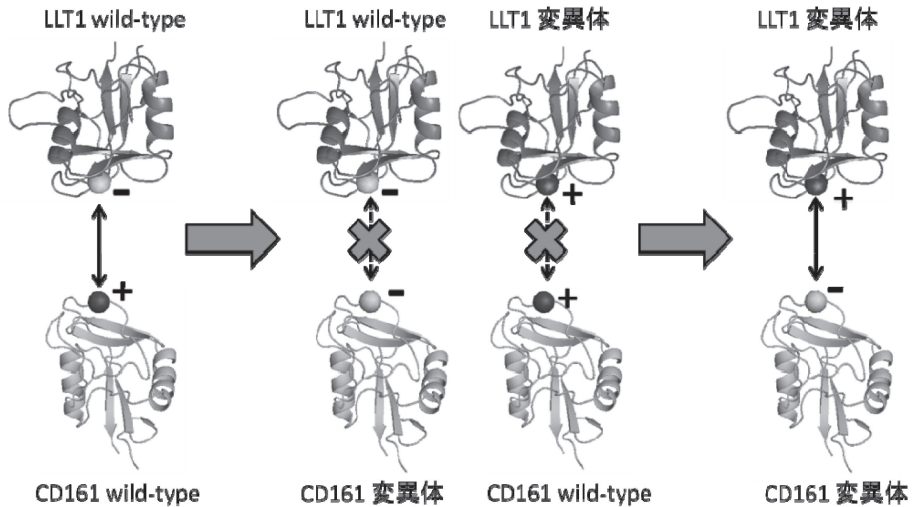


Fig. 7 Binding analysis strategy of combinations between the LLT1 and CD161 mutants, to identify the mutation combination(s) restoring the binding activity.

ので、結合に影響が出たものの多くは、相互作用界面で電荷の反発が起こったと予想される。そこで、変異を入れていない相手分子にも変異を入れて、相互作用が復活するものがあれば、お互いの分子で変異を入れたアミノ酸残基同士は相互作用していると考えることが出来る。

CD161 変異体及び LLT1 変異体全ての組み合わせで相互作用を調べた結果 (Table 2)、1 組のペア (E205R (CD161)、K169E(LLT1)) で相互作用が復活することが分かった (Fig. 8)。このことは、CD161 の Glu205 が LLT1 の Lys169 と直接相互作用していることを強く示唆している。

今回明らかになった Glu205(CD161)-Lys169(LLT1) 相互作用と静電相互作用、親水性 / 疎水性などを考慮し、それぞれのモデル構造を用いて CD161-LLT1 複合体のモデル構造を構築した (Fig. 9)。構築した複合体のモデル構造では、お互いに膜から離れた β -シートとループ構造からなる領域が向かいあう形で接しており、相互作用界面を境にしてほぼ対称の形をとっていることが分かる。さらに、生体内で実際に機能している 2 量体でのモデル構造を再現してみると、今回得られた変異体解析での実験結果と矛盾することなく複合体モデルを組むことが出来た (Fig. 10)。

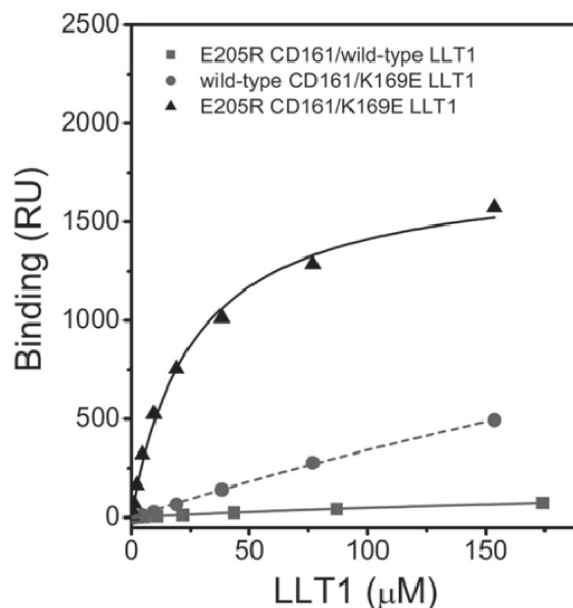


Fig. 8 SPR binding analyses of combinations between the LLT1 and CD161 mutants. Filled square and solid line, E205R CD161/wild-type LLT1; filled circle and dashed line, wild-type CD161/K169E LLT1; filled triangle and solid line, E205R CD161/K169E LLT1

Table 2. Binding affinities of LLT1 mutants for immobilized CD161 mutants at 25°C.

| CD161 | Kd (μM) | | | | | | |
|-----------|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|
| | LLT1 wild-type | Y165A | N167A | K169E | R175E | R180E | K181E |
| wild-type | 48 | 240 | 180 | nb ^a | nb | nb | nb |
| E162R | 310 | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| E179R | 34 | 150 | 120 | 300 | nb | nb | nb |
| E179A | 393 | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| R181E | 100 | 210 | 140 | nb | nb | nb | nb |
| D183R | 390 | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| K185E | 55 | 170 | 140 | 310 | nb | nb | nb |
| K185A | 236 | 180 | 149 | 318 | nb | nb | nb |
| E186R | 150 | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| Y198A | nb | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| E200R | 45 | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| E200A | nb | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| Y201A | nb | nb | nb | nb | nb | nb | nb |
| E205R | 370 | nb | nb | 26 | nb | nb | nb |

^anb, no detectable binding.

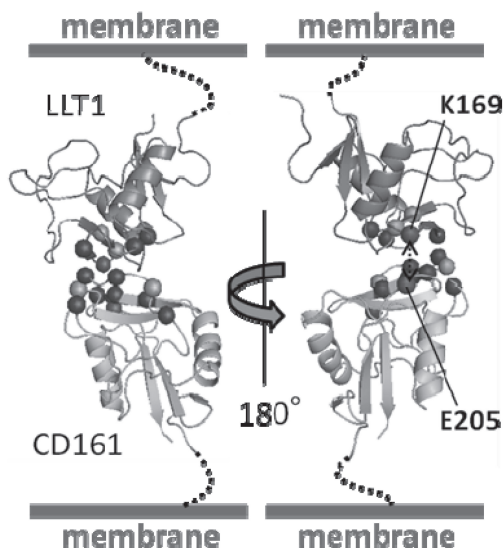


Fig. 9 Schematic model of LLT1 recognition by CD161. Residues mutated in this study are shown as spheres.

4. 総括

今回我々は CD161-LLT1 相互作用が弱い親和性で、速い結合・解離を示す、エントロピー・エンタルピー駆動型の相互作用であることを明らかにした。この特徴は、細胞表面受容体同士の相互作用で一般的に見られる特徴と良く似たものである。また、CD161-LLT1 相互作用は、お互いに膜から離れた β -シートとループ構造からなる領域を用いて、相互作用界面を軸に対称な形で複合体を形成することが分かった。

CD161 は Th17 細胞や、NK 細胞、NKT 細胞などに発現していることが分かっている。Th17 細胞はインターロイキン 17 の分泌を介して関節リウマチなど自己免疫疾患や炎症性の疾患に関与していることが示唆されている¹⁹⁾。また、CD161 の Th17 細胞での発現レベルが炎症性の疾患患者で上昇するという報告がある²⁰⁾。NK 細胞では、LLT1 は CD161 と相互作用することで NK 細胞による細胞障害活性を抑制するという報告もある²¹⁾。免疫細胞でどのようにして CD161 の活性が制御されているのか詳しいメカニズムは明らかになっていないが、今回我々が明らかにした相互作用部位をターゲットにすることで、炎症性疾患に対する新たな戦略が立てられるのではないかと期待している。

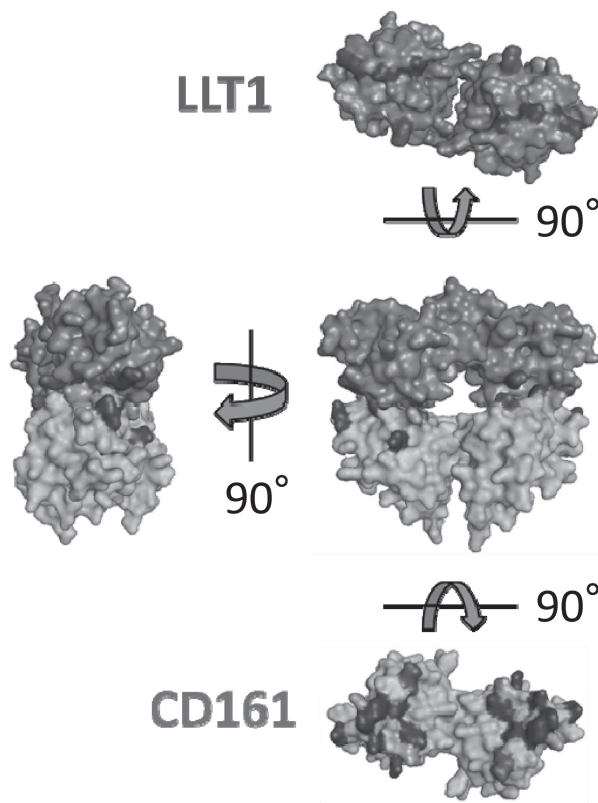


Fig. 10 The model structure of the complex between CD161 dimer (grey) and LLT1 dimer (dark grey).

References

- 1) Mesci, A., Ljutic, B., Makrigiannis, A. P., and Carlyle, J. R. (2006) *Immunol Res* **35**, 13-26
- 2) Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F., Fremont, D. H., and Yokoyama, W. M. (2003) *Nat Immunol* **4**, 801-807
- 3) Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., and Raulet, D. H. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3527-3532
- 4) Boyington, J. C., Motyka, S. A., Schuck, P., Brooks, A. G., and Sun, P. D. (2000) *Nature* **405**, 537-543
- 5) Fan, Q. R., Long, E. O., and Wiley, D. C. (2001) *Nat Immunol* **2**, 452-460
- 6) Willcox, B. E., Thomas, L. M., and Bjorkman, P. J. (2003) *Nat Immunol* **4**, 913-919
- 7) Dam, J., Guan, R., Natarajan, K., Dimasi, N., Chlewicki, L. K., Kranz, D. M., Schuck, P., Margulies, D. H., and Mariuzza, R. A. (2003) *Nat Immunol* **4**, 1213-1222

- 8) Shiroishi, M., Kuroki, K., Rasubala, L., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kurimoto, E., Kato, K., Kohda, D., and Maenaka, K. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16412-16417
- 9) Yang, Z., and Bjorkman, P. J. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10095-10100
- 10) Kamishikiryo, J., Fukuhara, H., Okabe, Y., Kuroki, K., and Maenaka, K. (2011) *J Biol Chem* **286**, 23823-23830
- 11) Willcox, B. E., Gao, G. F., Wyer, J. R., Ladbury, J. E., Bell, J. I., Jakobsen, B. K., and van der Merwe, P. A. (1999) *Immunity* **10**, 357-365
- 12) Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D. S., and Davis, M. M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11446-11451
- 13) Garcia, K. C., Radu, C. G., Ho, J., Ober, R. J., and Ward, E. S. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6818-6823
- 14) Anikeeva, N., Lebedeva, T., Krogsgaard, M., Tetin, S. Y., Martinez-Hackert, E., Kalams, S. A., Davis, M. M., and Sykulev, Y. (2003) *Biochemistry* **42**, 4709-4716
- 15) Lee, J. K., Stewart-Jones, G., Dong, T., Harlos, K., Di Gleria, K., Dorrell, L., Douek, D. C., van der Merwe, P. A., Jones, E. Y., and McMichael, A. J. (2004) *J Exp Med* **200**, 1455-1466
- 16) Davis-Harrison, R. L., Armstrong, K. M., and Baker, B. M. (2005) *J Mol Biol* **346**, 533-550
- 17) Li, Y., Hofmann, M., Wang, Q., Teng, L., Chlewicki, L. K., Pircher, H., and Mariuzza, R. A. (2009) *Immunity* **31**, 35-46
- 18) Petrie, E. J., Clements, C. S., Lin, J., Sullivan, L. C., Johnson, D., Huyton, T., Heroux, A., Hoare, H. L., Beddoe, T., Reid, H. H., Wilce, M. C., Brooks, A. G., and Rossjohn, J. (2008) *J Exp Med* **205**, 725-735
- 19) Genovese, M. C., Van den Bosch, F., Roberson, S. A., Bojin, S., Biagini, I. M., Ryan, P., and Sloan-Lancaster, J. (2010) *Arthritis Rheum* **62**, 929-939
- 20) Kleinschek, M. A., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E. E., Turner, S. P., Raskin, L., Desai, B., Faubion, W. A., de Waal Malefyt, R., Pierce, R. H., McClanahan, T., and Kastelein, R. A. (2009) *J Exp Med* **206**, 525-534
- 21) Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., and Lanier, L. L. (2005) *J Immunol* **175**, 7796-7799