説

# 受容体型チロシンキナーゼ Kit の構造生物学

湯 沢 聡, ジョセフ シュレシンジャー

受容体型チロシンキナーゼ(RTK)は細胞外のシグナルをリガンドの結合という形で受け取り、細胞内の自身のチロシンキナーゼ活性を亢進することで細胞内シグナル伝達系に そのシグナルを伝える.RTKのチロシンキナーゼの活性制御が乱れることが、がんや白血病をはじめ様々な疾病に関与することから、RTK あるいはそのリガンドは抗がん剤の 分子標的として興味が持たれている.最近、筆者らは血小板由来増殖因子(PDGF)受容 体ファミリーに属する Kit について、リガンドである幹細胞増殖因子(SCF)刺激前後に おける細胞外ほぼ全領域の結晶構造を解くことに成功した.その中で、2分子の Kit 受容 体は二量体を形成している SCF に結合することで架橋され、細胞膜近傍のドメインを介 した受容体間相互作用が誘導されていた.この相互作用が細胞質内のキナーゼの活性化に 重要な役割を果たしていることが明らかとなった.

#### 1. はじめに

受容体型チロシンキナーゼ(RTK)は細胞表面で働く受 容体の一種であり、その機能は細胞外で受け取ったシグナ ルを細胞内シグナルに変換することにある。細胞の最も基 本的な活動である増殖・分化・生存・代謝・移動を制御 し、さまざまな組織や器官の発達と生理応答、造血や免疫 応答など高次の生命現象を制御するという重要な役割を 担っている. 典型的な RTK は、細胞外の特異的なリガン ドへの結合領域と細胞内のチロシンキナーゼ領域(チロシ ン残基へのリン酸基転移酵素領域)が1回細胞膜貫通領域 により連結するという構造を持つ<sup>1)</sup>. RTK を介したシグナ ル伝達では、増殖因子などの特異的なリガンドが RTK の 細胞外領域へ結合し、それにより受容体の二量体化または 多量体化が誘導され、受容体の細胞内領域のチロシンキ ナーゼが会合している分子の間で相手のチロシン残基をリ ン酸化することでシグナルが伝達される. すなわち, 増殖 因子のシグナルが細胞外から細胞内へ伝達される最初のス テップが,RTK へのリガンドの結合とその結果誘導され る二(多)量体化である.リガンド結合により二(多)量

Structural biology of receptor tyrosine kinase Kit Satoru Yuzawa and Joseph Schlessinger (Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, CT 06520, U.S.A.)

体化したという情報が細胞膜を通過して細胞内に伝わり, RTK のキナーゼの活性化、さらに下流のシグナル分子の リン酸化という過程でシグナルが伝達される1~4).正常な 状態では RTK を介したシグナル伝達は適切に制御されて いるが、RTK のチロシンキナーゼの活性制御が損なわれ ることで細胞間・細胞内シグナル伝達の混乱を引き起こ す. PDGF 受容体ファミリーを含む多くの RTK において 様々なクラスの機能獲得型変異が報告され、がんや白血病 などの疾病との関係が示されている5~7). RTK あるいはそ のリガンドは早くから抗がん剤の分子標的としても興味を 持たれ応用研究が進められており、その進展は目覚まし い.RTKを標的にした阻害剤の開発は成功を収め、すで に RTK の活性阻害剤が有効な抗がん剤として利用されて いる. イマチニブやスーテントは PDGF 受容体ファミ リーを含むさまざまな RTK のキナーゼ阻害剤として働く. また、エルビタックスは上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体 細胞外リガンド結合領域に対するヒト化モノクローナル抗 体で、リガンド結合部位の一部をリガンドである EGF と 競合し受容体の自己阻害状態を維持する<sup>®</sup>.RTK の活性制 御の仕組みを分子レベルで理解することは,RTK を制御 する新しいタイプの薬剤を設計する上でも大きな利点とな る. 最近, PDGF 受容体ファミリーのキナーゼドメインの 構造情報が蓄積することで、このファミリーの活性制御あ るいは機能獲得型変異についての分子基盤が急速に明らか になってきた<sup>9</sup>. 筆者らはこのファミリーで初めて, Kit 受容体の細胞外ほぼ全域のリガンド刺激前後の結晶構造を解 くことに成功した<sup>10</sup>. その結果, リガンドと受容体の相互 作用の詳細とともに, 二量体形成により誘導される受容体 間の相互作用が活性化に重要であることが明らかになって きた.本稿では Kit の結晶構造を中心に, 細胞外リガンド 結合領域と細胞内キナーゼ領域の構造解析から得られた知 見とあわせ, PDGF 受容体ファミリーの活性化のメカニズ ムについて最近の知見を紹介する.

## 2. PDGF 受容体ファミリー RTK とそのリガンドの特徴

ヒトゲノムの解析から 518 種類のキナーゼが同定され, そのうち 90 種類の遺伝子がチロシンキナーゼをコードし ている<sup>11,12</sup>. チロシンキナーゼは受容体型チロシンキナー ゼ (RTK) と細胞内に存在する非受容体型チロシンキナー ゼ (NRTK) に大別され,さらに RTK はキナーゼドメイ ンのアミノ酸配列とそのドメイン構成により 20 種類のサ ブファミリーに分類されている<sup>11,13</sup>. RTK の細胞外リガン

ド結合領域には様々なドメインがタンデムに連なった構造 が見られ、それぞれのサブファミリーに特徴的なドメイン 構成を持つ (図1). PDGF 受容体ファミリーはクラス III RTK とも呼ばれ, Kit(c-kit, SCF 受容体, CD117)<sup>14)</sup>, CSF1 (colony-stimulating factor 1)受容体(M-CSF 受容体, c-fms), Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3) そして PDGFα, β 受容体 (PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ) がこのファミリーに属する<sup>6,15,16</sup>. このクラスの RTK は他の多くの RTK と同様、1 分子のポ リペプチド鎖で構成され、細胞外リガンド結合領域、1回 細胞膜貫通領域そしてキナーゼドメインからなる基本構造 を持つ<sup>1)</sup>.このファミリーには共通した三つの特徴があり、 (1) 五つのイムノグロブリン (Ig) 様のドメインからなる 細胞外リガンド結合領域, (2) キナーゼの活性制御を担う 細胞膜近傍領域(JMR:jaxstamembrane region), (3) 様々 な長さの挿入配列 (KID: kinase insertion domain) により 分割されたキナーゼドメインを持つ (図1)<sup>14~16</sup>.

一方, PDGF 受容体ファミリーのリガンドは二つのクラスに分類することができる (図 2). SCF (stem cell factor),



図1 受容体型チロシンキナーゼ (RTK) のドメイン構成の模式図

クラス I から V までの RTK のドメイン構成の模式図を示す. クラス I から V はそれぞ れ, EGF 受容体ファミリー, インスリン受容体ファミリー, PDGF 受容体ファミリー, FGF 受容体ファミリー, VEGF 受容体ファミリーとも呼ばれる. イムノグロブリン (Ig) 様ドメイン, L ドメイン, システインリッチ (CR) ドメイン, フィブロネクチン タイプ 3 (Fn3) ドメイン, 細胞膜貫通ドメイン, キナーゼドメイン, キナーゼ挿入領 域 (KID: kinase insertion domain) を, それぞれ模式的に示した. SCF

CSF1





short helical cytokine fold



cytokine knot fold

図2 PDGF 受容体ファミリーのリガンド PDGF 受容体ファミリーのリガンドの構造をリボンモ デルで示す.上から SCF (stem cell factor), CSF1 (colony stimulating factor), Flt3L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand), PDGF-BB (platelet-derived growth factor) を示 す.それぞれ図に使用したモデルの PDB コードは 1EXZ (SCF), 1HMC (CSF1), 1ETE (Flt3L), 1PDG (PDGF-BB) である.

CSF1 と Flt3L (Flt3 ligand) は4本のヘリックスからなる バンドル構造を持ち、サイトカインにしばしば見られる small helical cytokine foldを持つ<sup>17~20)</sup>. CSF1 のプロトマー 間はジスルフィド結合による共有結合を持ち,SCFとFlt3L は共有結合を持たず会合しているが、いずれのリガンドも ホモ二量体として機能する<sup>17~20)</sup>. SCF と Kit, CSF1 と CSF 受容体, Flt3L と Flt3 というように, リガンドと受容体は 1対1で関係づけられる.これに対して、PDGFRのリガ ンドである PDGF は cytokine knot fold を持つ<sup>21)</sup>. PDGF 二 量体はA鎖,B鎖,C鎖とD鎖の異なった組み合わせか ら PDGF-AA, -BB, -CC と-DD のホモ二量体に加え, AB 鎖からなるヘテロ二量体も存在する<sup>22)</sup>. これらの PDGF リ ガンドに対して、PDGFRの特異性により PDGFRα-PDGFRα または PDGFRβ-PDGFRβ のホモ二量体, あるい は PDGFRα-PDGFRβ のヘテロ二量体を形成する<sup>22)</sup>. PDGF 受容体ファミリーは、明らかに異なるクラスのリガンドを 持つが、リガンドは二量体で機能するため2箇所の受容体 結合部位を持つという共通の構造的特徴がある.

#### 3. 受容体の二量体形成と活性化

RTK はリガンド非存在下でインスリン受容体を除き, 単量体として存在する.細胞外のリガンド結合領域に特異 的なリガンドが結合することで安定な二(多)量体が形成 される. 会合している受容体間で, キナーゼは活性中心近 傍のチロシン残基を互いに自己リン酸化し活性が亢進す る1~4).活性化したキナーゼにより、受容体自身のさらな るリン酸化が進む.RTK 自身に含まれるリン酸化部位と その周辺のアミノ酸配列は、シグナル伝達の下流のタンパ ク質に含まれる SH2 (Src homology 2) や PTB (phosphotyrosine binding) ドメインの結合部位となる<sup>1,6)</sup>. RTK に結 合した下流の標的タンパク質は活性化した RTK の基質と してリン酸化され、さらに下流のタンパク質と結合したり 自身の酵素活性が亢進する.このようなシグナル分子の複 合体はさらに様々な経路を活性化する. RTK を介したシ グナル伝達において、リガンド結合により誘導される受容 体の二(多)量体の形成が最初の重要な過程となる.

受容体活性化に必要な二量体形成は、それぞれのリガン ドにより異なった戦略がとられている23~25).最も単純なモ デルがリガンド仲介 (ligand-mediated) 型の二量体形成で ある<sup>1,3,4)</sup>. ヒト成長因子 (hGH)-hGH 受容体複合体と EPO (erythropoietin)-EPO 受容体の結晶構造から、1分子のリガ ンドが2分子の受容体に結合していることが示され た<sup>26~28)</sup>. リガンド仲介型の二量体形成では, hGH や EPO 受 容体のようにリガンドやリガンド-アクセサリー分子複合 体が受容体の二量体化を仲介する.Flt-1 受容体(VEGFR-1) のリガンド結合に関わる2番目のIg様ドメイン (D2) と そのリガンドである血管内皮増殖因子(VEGF)の結晶 構造から、2分子の VEGFR-1 がリガンドである二量体 VEGF へ同時に結合し, VEGF が VEGFR-1 を効果的に架 橋することで VEGF: VEGFR-11:2 複合体を形成するこ とが示されている<sup>29)</sup>. これは RTK におけるリガンド仲介 型の二量体形成の典型的な例となっている. PDGFと VEGF 受容体ファミリーは共に、1番目から3番目の Ig 様 ドメイン (D1-D2-D3) がリガンド結合に必要であるこ と<sup>30~35)</sup>,特にリガンド結合の中心である D2 のアミノ酸配 列の類似性が示されている<sup>20</sup>. また, PDGF と VEGF 受容 体ファミリーのリガンドは共に cytokine knot fold を持つ二 価二量体リガンドである<sup>21,36)</sup>. PDGF/VEGF 受容体ファミ リー間のこのような類似性から、両ファミリーは同様の二 量体形成の分子機序を持つと考えられている<sup>20)</sup>.他にもこ のようなリガンド仲介型二量体形成は、NGF (nerve growth factor)-TrkA 受容体でも報告されている<sup>37,38)</sup>.

# 4. チロシンキナーゼ受容体 Kit のリガンド認識の特徴と 二量体形成

PDGF 受容体ファミリーに属する Kit は造血系の前駆細胞の生存・分化・増殖の制御に関わる. さらに, 肥満細胞・メラノサイト・始原生殖細胞・カハール細胞の成長に重要な役割を果たしている<sup>39,40</sup>. このような細胞における正常な機能ばかりではなく, その制御が乱れることにより引き起こされる消化管間質腫瘍 (GIST), 肥満細胞症 (mastocytosis) や急性骨髄性白血病 (AML) などの疾病との関係も明らかになりつつある<sup>5~7)</sup>.

我々は、SCFリガンド刺激前後における、ヒトKit 受容 体の細胞外ほぼ全領域(D1-D2-D3-D4-D5)の結晶構造決 定に成功した(図3)<sup>10)</sup>.また、同時期にマウスKit 細胞外 リガンド結合領域(D1-D2-D3)とSCFとの複合体の結晶 構造も報告された<sup>41)</sup>.SCF-Kit 複合体の結晶構造は二量体 リガンド SCF により 2 分子の受容体が架橋された SCF-Kit 2:2 複合体を示し、これらの構造から Kit 受容体による SCF の分子認識が明らかとなった<sup>10,41)</sup>.Kit 受容体の細胞 外ドメインはその役割の違いから、細胞膜遠位の三つの Ig 様ド メイン(D4-D5)に分けることができる、細胞膜遠位の D1-D2-D3 はリガンド認識に関わるのに対し、細胞膜近位の D4-D5 はリガンド結合には関与せず、リガンド結合時に促進される受容体間相互作用に関わる (図 3)<sup>10</sup>.

# 4-1 リガンド-受容体相互作用

Kit 2 分子の細胞膜遠位の D1-D2-D3 領域が、2 回対称で 関係づけられた二量体リガンド SCF と複合体を形成して いる. そのなかで、Kit1分子のD1-D2-D3領域は1分子 の SCF プロトマーのみと相互作用している、すなわち、 Kit D1-D2-D3 領域において受容体間の相互作用は存在せ ず、二量体リガンド SCF により受容体が架橋されてい る<sup>10,41)</sup>. この点で, SCF-Kit D1-D2-D3 2:2 複合体は, VEGF-VEGF 受容体 D2 複合体の構造から予想されたよう に典型的なリガンド仲介型の二量体形成様式を持つと考え ることができる. リガンド刺激前後の Kit D1-D2-D3 の構 造を比較すると、それぞれのドメイン自身もドメイン間の 相対配置にもリガンド結合前後で大きな変化は見られな かった.このことは受容体がリガンド結合部位を提示し, リガンド結合を待っていることを示している10. 受容体の 構造変化が最小限に抑えられている例は、 リガンドである アンギオポイエチン2刺激前後のTie2受容体の結晶構造 でも見られる<sup>42)</sup>. SCF-Kit 2:2 複合体においてリガンドと



## 図3 SCF 刺激前後の Kit の細胞外リガンド結合領域の構造

幹細胞増殖因子(SCF: stem cell factor)による刺激前後の受容体チロシンキナーゼ Kit の細胞外ドメ インの構造を表面構造モデルで示す. Kit 分子は SCF 結合に関わらず細長くのびた構造を持ち,その 分子長は 170Åに達する.細胞膜遠位の三つの Ig 様ドメイン(D1, D2, D3)は SCF 結合に関与し SCF 結合前後で同様のドメインの配置を持つ.細胞膜近位の二つの Ig 様ドメイン(D4, D5)は受容体間 の相互作用に関わり, SCF 結合前後でドメインの相対配置が変化する.それぞれの PDB コードは 2EC8 (Kit 単体), 2E9W(SCF-Kit 複合体)である.



D1

D2

D3

D4



図4 SCF-Kit 2:2 複合体におけるリガンド-受容体相互作用 SCF-Kit 複合体における受容体によるリガンド認識部位を分子表面モデルで示す. SCF と Kit の相互作 用に関わる領域を濃い灰色で示す.リガンド-受容体相互作用面は3箇所の特徴的な相互作用部位(サ イト1,2,3)に分けられる.D1に位置するサイト1とD3に位置するサイト3は,リガンド-受容体 相互作用に際し SCFの構造変化が重要な役割を果たしていると特徴づけられる.一方,D2に位置する サイト2は SCF(酸性残基に富む)と Kit(塩基性残基に富む)の間の相補的な静電相互作用が大きな 特徴となっている.

受容体の相互作用面は、その特徴から三つのサブサイトに 分けることができる(図4).2番目のサブサイトは主に D2(受容体)とαBαC(SCF)へリックスに位置し、その 相互作用は相補的な静電相互作用と特徴づけることができ る.主に、受容体は塩基性残基に富むのに対しリガンドは 酸性残基に富み、静電的に相補的な分子表面を形成してい る.一方、1番目のサブサイトはD1(受容体)とN末端 領域(SCF)、3番目のサブサイトはD3(受容体)とαCβ2ループ(SCF)に位置し、その相互作用はリガンドが 構造変化を伴い受容体を認識していると特徴づけることが できる<sup>10,41)</sup>.リガンドー受容体の相互作用に際し、受容体の 構造変化が最小限に抑えられているのに対し、リガンドは 受容体結合に合わせて構造を受容体に適合するよう変化す る.この点が、SCF-Kit 2:2複合体の大きな特徴となって いる.

# 4-2 受容体-受容体相互作用

SCF-Kit 2:2 複合体の結晶構造から,リガンド結合時に 促進される D4 と D5 を介した受容体間の相互作用の存在 が明らかとなった<sup>10)</sup>. D4:D4 相互作用面(~360Å<sup>2</sup>)は, SCF-Kit 相互作用面(~2000Å<sup>2</sup>)あるいは SCF-SCF 相互 作用面(~1500Å<sup>2</sup>)に比べ驚くほど小さい. 図5に示す ように,その相互作用は主に2組のアルギニンとグルタミ ン酸との間の塩橋により保持されている.この相互作用に 関与するアルギニン,グルタミン酸あるいは両アミノ酸を



図5 SCF-Kit 2:2 複合体における受容体--受容体相互作用 SCF-Kit 複合体の4番目のIg様ドメイン(D4)を介した受容 体間の相互作用の詳細を示す.主要な相互作用に関わるアルギ ニン残基とグルタミン酸残基は、D4のストランドβEとスト ランドβFを繋ぐループに位置し、2組の塩橋を形成している. 文献10より改変.

アラニンに置換した変異体では、リガンド結合には影響せ ず受容体のキナーゼ活性と共に下流のシグナル伝達が損な われた10).キナーゼの活性化には、リガンド結合と同時に D4 を介した受容体間の相互作用が必要であることが明ら かになった. 図6に示すように, PDGF 受容体ファミリー (Flt3を除く)において、D4における受容体間の相互作用 に関わる残基およびその周辺の配列はよく保存されてい る<sup>10</sup>. このことは、生化学的な実験から Kit や PDGF 受容 体の4番目のIg様ドメイン(D4)が、受容体間の相互作 用とキナーゼの活性化に関係している可能性が示唆されて きたことともよく一致する43~45).また,D4に対するモノ クロナール抗体がリガンド依存的な Kit や PDGF 受容体の 活性化を阻害することが報告されている43,45). D4 を介した 受容体間の相互作用が、キナーゼの活性化に関与する細胞 膜近傍の位置決定に重要な役割を果たしていることが示唆 される.興味深いことに、VEGF 受容体の7番目の Ig 様 ドメイン (D7) に, PDGF 受容体ファミリーの D4 で見ら

れた受容体間の相互作用に関わるモチーフが見られた(図 6).最近報告された VEGF 刺激前後の VEGF 受容体の細 胞外リガンド結合領域の電子顕微鏡像から, VEGF-VEGF 受容体複合体は1:2複合体を形成し,その複合体のD7 付近で受容体間の相互作用が観察された<sup>46)</sup>. PDGF 受容体 ファミリーが細胞外ドメインに五つの Ig 様ドメインを持 つのに対し, VEGF 受容体ファミリーは七つの Ig 様ドメ インを持つという違いはあるが(図1参照), PDGF 受容 体ファミリーと VEGF 受容体ファミリー RTK は分子系統 学的な解析から進化的に近縁な関係にあることが示唆され ている<sup>47)</sup>. PDGF や VEGF 受容体ファミリーにおいて,二 量体リガンドによるリガンド仲介型の二量体形成という共 通点ばかりではなく, Kit で見られたキナーゼドメインの 活性化と同様の仕組みを持つのかもしれない.

D4 において受容体間相互作用に関与する残基の置換は 自身のキナーゼの活性を損うことから、キナーゼの活性化 において細胞膜近傍の適切な配置の形成に D4 を介した受

	βEβF	
		200
		390 101
		384
ー ノー ノ ツメガエル	NNRYVSELHLIRIKGTEKGIYTEYSSNSD	390
サンショウウオ	NSRYISELHLIRLKGAERGIYTEHVDNSD	394
ゼブラフィッシュ A	N-SYTSELKLVRLKVSESGIYTFSCLNRD	392
ゼブラフィッシュ B	Y-RYISELRLVRVHGSEGGIYTFSANHKY	456
CSF1R		
Еŀ	TYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPG	387
マウス	IYRYTFKLFLNRVKASEAGQYFLMAQNKA	385
		397
トラフク B	RSEASLLLKRVRQEDHGSYTFHFSNSF	462
	ETRYRSKI KLIRAKEEDSGGHYTTVAONE	300
マウス		399
		000
PDGFRβ		
	ETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHED	402
マウス	ETRYVSELILVRVKVSEAGYYTMRAFHED	401
VEGFR		
<u>(/ 番日の lg 禄ドメイン)</u>		707
$\Box \land VEGED2 (VDD)$		131
$\Box$ $\Box$ VEGED2 (EI+_4)		751
	LADONGREDIGRAREDAGRIEGOVGNAR	754

図6 D4:D4 受容体間相互作用に関わる残基のアミノ酸配列の比較 D4:D4 受容体間相互作用に関わる残基周辺のアミノ酸配列を示す.ア ミノ酸配列の上に Kit D4 の二次構造(ストランドEとF)を示した. 相互作用に関わるアルギニンとグルタミン酸およびその周辺の配列は, PDGF 受容体ファミリー(Flt3 除く)と VEGF 受容体ファミリーの7番 目の Ig 様ドメインでよく保存されていた.相互作用に関わる酸性残基 と塩基性残基にシャドーをつけた.文献 10 より改変. 容体間相互作用の重要性が示された<sup>10)</sup>. これに対して2分 子のKit D5の間には直接相互作用が観察されなかったこ とから,D5を介した受容体間の相互作用はD4を介した 受容体間の相互作用とは対照的に付加的な役割を持つのか もしれない.しかしながら,そのドメインの配置自体には キナーゼの活性化と強い関係がある可能性がある.消化管 間質腫瘍(GIST),肥満細胞症(mastocytosis)や急性骨髄 性白血病(AML)に関係する機能獲得型の変異のうち, あるクラスは細胞外領域に分布している<sup>7.48~52)</sup>.これらの 変異はD5のストランド  $\beta$ Aと $\beta$ Gを介した受容体間の相 互作用面に集中していることが明らかとなった<sup>10)</sup>.これら の変異がどのようにキナーゼ活性亢進に寄与しているか, その分子基盤は今後の研究の進展を待たなければならない が,活性化に必要な受容体間相互作用の安定化に寄与して いるのかもしれない.

# 4-3 リガンド結合に伴う細胞膜近位のドメインの再配置 と細胞膜近傍

細胞膜近位の二つの Ig 様ドメイン D4 と D5 は、リガン ドとの相互作用には関与しないが、リガンドにより誘導さ れ二量体化した受容体間の相互作用に関わることが明らか となった<sup>10</sup>. リガンド結合前後での Kit の D4 と D5 の相対 位置の違いを可視化するため,結晶構造解析により得られ たリガンド結合前の受容体(リガンドが結合していない受 容体)2 分子が仮想的にリガンドに結合したリガンド:受 容体2:2 複合体のモデルを作成した(図 7). リガンド結 合前後で,それぞれの Ig 様ドメインまたリガンド結合部 位の構造にも大きな変化は見られないが,D4 と D5 の相 対配置には大きな違いが見られた. リガンド結合前の D4 と D5 は,仮に2 分子の受容体がリガンドに結合する配置 を持ったとしても,その相対配置が適切でないため相互作 用できない<sup>10)</sup>. リガンド結合に伴い D3-D4 と D4-D5 のヒ ンジ領域が適切な自由度を持つことで D4 と D5 の相対配 置が変化し,受容体間の相互作用を誘導している. その結 果,細胞外リガンド結合領域から膜貫通領域に繋がる D5 のカルボキシル末端は 75 Å から 15 Å まで近接する<sup>10)</sup>.

RTK の細胞外領域における細胞膜近傍の構造情報は限られている.SCF-Kit 2:2 複合体では受容体の末端の距離は細胞膜近傍で約15Åまで近接し,12 残基(スプライシングアイソフォームでは16 残基)を介して膜貫通領域に繋がる<sup>10</sup>.VEGF-VEGF 受容体複合体におけるD7間の距離はKit D5 と同様,非常に近接していることが示され



図7 リガンド結合に伴う細胞膜近位のドメインの再配置と細胞膜近傍領域

2 分子の SCF 刺激前の Kit 単量体分子を SCF の上に重ね合わせた仮想的複合体の構造(a)と SCF-Kit 2:2 複合体の結晶構造(b)をリボンモデルで示した.2 分子の Kit 単量体の仮想的二量体では,そのドメインの配置から D4:D4とD5:D5 受容体間の相互作用を形成することができない.2 分子の受容体は,D5のC 末端で互いに約 75 Åの距離で隔てられている.一方,SCF-Kit 複合体では,D4:D4 また D5:D5 受容体間の相互作用によりその距離が 15 Å まで近接する.

ている<sup>40</sup>. 三つの Ig 様ドメインからなる繊維芽細胞増殖 因子(FGF)受容体は、2番目と3番目の Ig 様ドメインに リガンド(FGF)が結合し、さらに2分子のアクセサリー 分子(ヘパリン)が二量体を架橋することでリガンド:受 容体:アクセサリー分子2:2:2複合体を形成する.FGF-FGF 受容体-ヘパリン複合体の場合、膜貫通領域に繋がる 細胞膜近傍のD3のカルボキシル末端はやや離れており、 約50Åの距離にある<sup>53~55)</sup>.

複数のドメインからなる受容体で複合体形成時に細胞膜 近傍が互いに近接している例が、あるサイトカイン受容体 でも報告されている。サイトカイン受容体は分子内にチロ シンキナーゼを持たないが、分子内で NRTK の JAK (Janus kinase) 型チロシンキナーゼが非共有結合で会合し、受容 体へのリガンド結合と JAK 型チロシンキナーゼの活性化 は同期している50. サイトカイン受容体 gp130 の細胞外領 域は、細胞膜遠位の三つのリガンド結合ドメインと、細胞 膜近位の三つの Fn3 ドメインから構成される.gp130 受容 体が IL-6 と IL-6 受容体あるいは IL-11 と IL-11 受容体と 複合体を形成する時、細胞膜近位の6番目のFn3ドメイ ン(D6)が近接していることが電子顕微鏡による構造解 析により報告されている57,58). Kit における細胞膜近傍の適 切な配置がキナーゼの活性制御に大きな影響を持つよう に、他の受容体においても細胞膜近傍のドメインが互いに 近づき適切な配置を持つことが、キナーゼ領域の活性化制 御に関係があるのかもしれない.

#### 5. チロシンキナーゼ活性の制御

チロシンキナーゼドメインは、細胞膜貫通領域から細胞 内の細胞膜近傍領域 (JMR) を介して、アミノ末端側の N-ローブとカルボキシル末端側のC-ローブがヒンジで接続 された構造を持つ<sup>9,13)</sup>. N-ローブは主に, ATP 結合ループ を介して ATP への結合とその配置に関わっている. C-ローブは基質の結合,標的タンパク質の認識および ATP 結合の一部に関わっている. 基質認識や酵素反応を担うキ ナーゼの活性の中心は、二つのローブの溝に位置する 20-25 残基からなる A-ループ (activation segment/loop) であ る.不活性状態でキナーゼドメインは、A-ループが折り 畳まれたコンフォメーションを持ち、その酵素活性は低く 抑えられている.一方,活性状態では A-ループは活性型 のコンフォメーションをとり、A-ループ内のリン酸化さ れたチロシン残基が活性型の安定化に寄与している.この ような A-ループの構造変化による活性制御は、基底状態 での活性を低く抑える自己阻害の仕組みの一つである<sup>9</sup>. 細胞内の細胞膜近傍領域(JMR)は、細胞膜貫通領域から キナーゼドメインを繋ぐおよそ 30 から 40 残基からなる領 域である. PDGF 受容体ファミリーにおける JMR の重要 性は、あるクラスの機能獲得型変異がこの領域に集中して

見られることからも示唆されてきた. さらに, Eph 受容体 ファミリーのキナーゼドメインの構造解析から JMR が活 性制御に関わることが明らかとなった<sup>59</sup>.

PDGF 受容体ファミリーのキナーゼドメインの結晶構造 解析が進み、ATP 競争型阻害剤との複合体、活性型ある いは自己阻害状態の不活性型の構造など様々な状態での構 造が報告されている60~64). これら異なった状態の構造か ら、このクラスの RTK のキナーゼドメインに共通に見ら れる活性制御の機序が明らかになりつつある.図8に Kit の活性状態および自己阻害による不活性状態の構造を示し た.多くのチロシンキナーゼで見られるように, A-ルー プのコンフォメーションは活性状態と自己阻害状態で大き く異なる<sup>61,62)</sup>. さらに,自己阻害状態では JMR が活性状態 における A-ループのコンフォメーションを模倣する形で 二つのローブの間に挿入され, JMR の一部がキナーゼド メインの疎水性領域と相互作用することで自己阻害状態の 構造を安定化している<sup>61,62)</sup>. A-ループは活性型のコンフォ メーションを持つにもかかわらずリン酸化されていなかっ た.一方,JMRのキナーゼドメインとの相互作用部位付 近のチロシン残基はリン酸化している.活性状態ではこの リン酸化のために、JMR は自己阻害状態で見られるキ ナーゼドメインとの相互作用を形成することができない. Kit ばかりでなくこのクラスのキナーゼドメインの活性制 御には、1)酵素活性の中心に位置する A-ループの構造変 化に加え、2)キナーゼドメインと JMR との相互作用によ り自己阻害状態が安定化されている、という共通した特徴 があることが明らかとなった<sup>60~64)</sup>. PDGF 受容体ファミ リーにおいて、細胞内 JMR に起こる重複・欠損・変異に より受容体は機能を獲得し、がんや白血病といった疾病に 関係してくることが報告されている5~70. これらのクラス の変異が、JMR によるキナーゼの活性制御機構を損なう ことにより引き起こされることが明らかになった.

活性に関わる A-ループのチロシン残基のリン酸化部位 に加えて、キナーゼ領域の分子表面には多数のリン酸化部 位が点在している.FGF 受容体キナーゼでは、分子内で リン酸化を受ける厳密な順序が存在し、キナーゼの活性制 御に関与していることが報告されている<sup>65)</sup>.このようなリ ン酸化を受ける順序が存在することは他の様々な RTK で も示唆されている<sup>66~68)</sup>.この多段階のリン酸化状態がシグ ナル伝達の制御の一端を担っていると考えられている<sup>65)</sup>. Kit の場合、チロシン残基のリン酸化部位が1箇所 A-ルー プに位置する他、7箇所のチロシン残基がリン酸化され る<sup>40)</sup>.これらのチロシンリン酸化部位は、シグナル伝達下 流のタンパク質結合部位となる<sup>40)</sup>.Kit は A-ループのリン 酸化に先立ち、JMR のチロシン残基がリン酸化されるこ とが報告されている<sup>61)</sup>.Kit にもこのようなリン酸化を受 ける部位の厳密な順序によるキナーゼの活性制御と、シグ





Kit のキナーゼ領域の自己阻害不活性状態(a)と活性状態(b)の構造をリボンモデルで示した.キナーゼドメ インの N-ローブと C-ローブ,細胞膜近傍領域(JMR: jaxtamembrane region), A-ループ,キナーゼ挿入配列 (KID: kinase insertion domain)を示した. ADP はスティックモデルで,マグネシウムイオンは球で示した.JMR に位置する2残基のチロシン残基(Tyr568とTyr570)もスティックモデルで示した.不活性状態において A-ルー プは折り畳まれ,JMR が活性状態の A-ループのコンフォメーションを模倣するように, N-ローブと C-ローブの 間に挟まるように結合している.JMR のチロシン残基(Tyr568と Tyr570)はリン酸化されていない.活性状態 において, A-ループはキナーゼに共通に見られる活性型の構造を持つ.一方,JMR に分布するチロシン残基 (pTyr568と pTyr570)はリン酸化され,キナーゼドメインとの相互作用が解除されている.それぞれ図に用いた モデルの PDB コードは 1PKG(活性状態),1T45(自己阻害状態)である.

ナル伝達系の制御が存在するのかもしれない.

## 6. RTK の活性制御のメカニズム

PDGF 受容体ファミリーにおける特異的リガンドの役割 は、2分子の受容体の細胞外領域を細胞膜遠位のD1-D2-D3 領域を介して架橋することにある.この点で、これま で考えられてきた"リガンド仲介型"の二量体形成の分子 機構を持つことが示された.PDGF 受容体ファミリーの二 量体形成には、それぞれのRTK に対する特異的な二量体 リガンドが重要な役割を持つ.リガンド結合に引き続き、 D4:D4 相互作用を介した受容体間の相互作用が、キナー ゼの活性化に重要であることが示された.さらに、D5:D5 相互作用面には直接相互作用が見られなかったが、疾病に 関係する機能獲得型の変異が集中している.このことか ら、D4:D4とD5:D5による受容体間相互作用は細胞膜 近傍の適切な配置に関与し、その配置はキナーゼの活性化 において重要な役割があることが示唆される.

キナーゼの自己阻害機構を含むさまざまな仕組みにより,正常な細胞では基底状態でのRTKのキナーゼの活性が低く抑えられている<sup>69</sup>. PDGF 受容体ファミリーでは, キナーゼドメインに共通に見られる A-ループのコンフォ メーションによる自己阻害機構に加え,キナーゼと JMR との相互作用により自己阻害状態が安定化されている.リ

ガンドによる刺激がないとき,RTK はこれらの自己阻害 機構によりキナーゼ活性を低い状態に保っている.細胞内 キナーゼの自己阻害を解除するためには、リガンドにより 受容体が架橋され二量体化するだけではなく、D4とD5 を介した受容体間の相互作用が重要な役割を担っている. しかし、D4 を介した受容体間の相互作用は二量体化を安 定化するというより、キナーゼの活性化に必要な細胞膜近 傍の位置の決定に貢献しているのかもしれない. Kit の細 胞外領域の可溶性欠損変異体 D1-D2-D3 と D1-D2-D3-D4-D5の間には受容体の SCF に対する親和性に違いがないこ とから、D4 を介した受容体間相互作用は複合体の安定化 にあまり貢献していないことが示されている<sup>33)</sup>. D5 は活 性化に必要な複合体の安定化において補助的な役割かもし れないが、機能獲得型の変異が D5:D5 相互作用面に集中 することから、その厳密な位置はキナーゼの活性化に関係 があるようである. リガンドが結合していないとき, D4 を介した受容体間相互作用だけでは、キナーゼが活性化す るのに必要となる安定な二量体を形成するには不十分であ る. このことは、リガンド刺激のないとき受容体間の相互 作用を介してキナーゼドメインの偶発的な活性化を引き起 こす可能性を減らすのに役立つ.2分子の受容体が二量体 リガンドにより架橋され、受容体の局所的な濃度が高くな るときのみ、D4 を介した相互作用は有効になる。細胞外 の細胞膜近傍領域が適切な配置を持つことにより,細胞外 の2分子の受容体の位置に関する情報が細胞内に伝達さ れ,細胞内のキナーゼは活性化に適した位置に置かれる. その結果,キナーゼドメインとJMRとの相互作用が解除 されるのかもしれない.細胞外の位置情報が,細胞膜貫通 領域を介して細胞内にどのような仕組みで伝えられるの か,またどのようにキナーゼドメインとJMRとの相互作 用が解除されるのか,その詳細な分子機構も今後解決され なければならない課題である.

# 7.まとめ

RTK の中でも構造に基づいた活性制御の理解が進んで いる分子の一つである Kit を例として, PDGF 受容体ファ ミリーに共通する仕組みについて最近の知見を紹介した. Kit で見られた二量体形成により誘導される受容体間の相 互作用と、キナーゼと JMR による活性制御のメカニズム は、PDGF 受容体ファミリーで保存されている可能性が高 く、VEGF 受容体ファミリーをはじめ他の RTK にも見ら れる一般的な分子機序かもしれない.また、このクラスの 細胞外リガンド結合領域に見られる特徴は、これまでとは 異なった新しいクラスの RTK 阻害剤の開発に役立つかも しれない. D4やD5をターゲットとしたモノクロナール 抗体は、受容体間相互作用を阻害することでリガンド依存 的な RTK の活性を制御することができるだろう. D3-D4 や D4-D5 というドメイン間のヒンジの動きをブロックす るような分子も、活性に必要なドメインの配置を阻害する ことでRTKの阻害剤として働くかもしれない.これまで に, Kit 分子の活性状態と不活性状態について 80% 以上の 構造が明らかになった.細胞外のリガンド結合と細胞内の キナーゼ領域は、わずか40残基程度でつながれている. ところが細胞膜貫通領域を含むこの重要な40残基のため に、細胞外で起こるリガンド結合というシグナルがどのよ うに細胞内に伝達されるのか、という根本的な疑問が依然 として残る.細胞外で起こるリガンド結合に続く受容体間 相互作用の誘起と、細胞内で起こる自己阻害の解除とキ ナーゼの活性化という二つの現象が、細胞膜貫通領域を介 してどのようにリンクするのかは今後の研究を待たなけれ ばならない.

# 謝辞

最後に、ここに紹介した研究は、Yarden Opatowsky博 士, Zhongtao Zhang博士, Valsan Mandiyan博士と Irit Lax 博士との共同研究の成果です.この研究は、上原記念生命 科学財団からのフェローシップ、アメリカ国立衛生研究所 からの研究費の支援を受けて行ったものです.この場をお 借りして深く感謝申し上げます.

#### 文 献

- 1) Schlessinger, J. (2000) Cell, 103, 211-225.
- 2) Schlesinger, J. (1988) Trends. Biochem. Sci., 13, 443-447.
- Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. (1994) Trends. Biochem. Sci., 19, 459–463.
- 4) Jiang, G. & Hunter, T. (1999) Curr. Biol., 9, R568-571.
- Robertson, S.C., Tynan, J., & Donoghue, D.J. (2000) Trends. Genet., 16, 265–271.
- 6) Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001) Nature, 411, 355-365.
- Corless, C.L., Fletcher, J.A., & Heinrich, M.C. (2004) J. Clin. Oncol., 22, 3813–3825.
- Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J., Kussie, P., & Ferguson, K.M. (2005) *Cancer Cell*, 7, 301–311.
- 9) Hubberd, S.R. (2004) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 5, 464-471.
- Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., & Schlessinger, J. (2007) *Cell*, 130, 323–334.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M., & Lin, S.F. (2000) Oncogene, 19, 5548–5557.
- 12) Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002) Science, 298, 1912–1934.
- Hubbard, S.R. & Till, J.H. (2000) Annu. Rev. Biochem., 69, 373–398.
- 14) Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., & Ullrich, A. (1987) *EMBO J.*, 6, 3341–3351.
- 15) Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) Cell, 61, 203-212.
- 16) Fantl, W.J., Johnson, D.E., & Williams, L.T. (1993) Annu. Rev. Biochem., 62, 453–481.
- 17) Pandit, J., Bohm, A., Jancarik, J., Halenbeck, R., Koths, K., & Kim, S.H. (1992) *Science*, 258, 1358–1362.
- 18) Savvides, S.N., Boone, T., & Andrew Karplus, P. (2000) Nat. Struct. Biol., 7, 486–491.
- 19) Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J., & Kong, X.P. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 7732– 7737.
- 20) Jiang, X., Gurel, O., Mendiaz, E.A., Stearns, G.W., Clogston, C.L., Lu, H.S., Osslund, T.D., Syed, R.S., Langley, K.E., & Hendrickson, W.A. (2000) *EMBO J.*, 19, 3192–3203.
- 21) Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F.K., Eggimann, B., & Hosang, M. (1992) *EMBO J.*, 11, 3921–3926.
- 22) Hoch, R.V. & Soriano, P. (2003) Development, 130, 4769– 4784.
- 23) Schlessinger, J. (2002) Cell, 110, 669-672.
- 24) Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., & Yokoyama, S. (2003) *Mol. Cell*, 541–552.
- 25) Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M. (2007) Cell, 130, 213-215.
- 26) de Vos, A.M., Ultsch, M., & Kossiakoff, A.A. (1992) Science, 255, 306–312.
- 27) Syed, R.S., Reid, S.W., Li, C., Cheetham, J.C., Aoki, K.H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T.D., Chirino, A.J., Zhang, J., Finer-Moore, J., Elliott, S., Sitney, K., Katz, B.A., Matthews, D.J., Wendoloski, J.J., Egrie, J., & Stroud, R.M. (1998) *Nature*, 395, 511–516.
- 28) Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., & Wilson, I.A. (1999) Science, 283, 987–990.
- 29) Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H.W., Eigenbrot, C., Wells, J.A., & de Vos, A.M. (1997) Cell, 91, 695–704.
- 30) Yu, J.C., Mahadevan, D., LaRochelle, W.J., Pierce, J.H., &

Heidaran, M.A. (1994) J. Biol. Chem., 269, 10668-10674.

- 31) Heidaran, M.A., Mahadevan, D., & Larochelle, W.J. (1995) FASEB J., 9, 140–145.
- 32) Lev, S., Blechman, J., Nishikawa, S., Givol, D., & Yarden, Y. (1994) Mol. Cell. Biol., 13, 2224–2234.
- 33) Lemmon, M.A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I., & Schlessinger, J. (1997) J. Biol. Chem., 272, 6311–6317.
- 34) Shinkai, A., Ito, M., Anazawa, H., Yamaguchi, S., Shitara, K.,
  & Shibuya, M. (1998) J. Biol. Chem., 273, 31283–31288.
- 35) Fuh, G., Li, B., Crowley, C., Cunningham, B., & Wells, J.A. (1998) J. Biol. Chem., 273, 11197–11204.
- 36) Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., & de Vos, A.M. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7192–7197.
- 37) Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., & de Vos, A.M. (1999) Nature, 401, 184–188.
- 38) Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H., & Garcia, K.C. (2007) Neuron, 53, 25–38.
- 39) Ashman, L.K. (1999) Int. J. Biochem. Cell Biol., 31, 1037– 1051.
- Roskoski, R. Jr. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., 337, 1–13.
- 41) Liu, H., Chen, X., Focia, P.J., & He, X. (2007) EMBO J., 26, 891–901.
- 42) Barton, W.A., Tzvetkova-Robev, D., Miranda, E.P., Kolev, M. V., Rajashankar, K.R., Himanen, J.P., & Nikolov, D.B. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 524–532.
- 43) Blechman, J.M., Lev, S., Barg, J., Eisenstein, M., Vaks, B., Vogel, Z., Givol, D., & Yarden, Y. (1995) *Cell*, 80, 103–113.
- 44) Omura, T., Heldin, C.H., & Ostman, A. (1997) J. Biol. Chem., 272, 12676–12682.
- 45) Lokker, N.A., O'Hare, J.P., Barsoumian, A., Tomlinson, J.E., Ramakrishnan, V., Fretto, L.J., & Giese, N.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 33037–33044.
- 46) Ruch, C., Skiniotis, G., Steinmetz, M.O., Walz, T., & Ballmer-Hofer, K. (2007) Nat. Struct. Mol. Biol., 14, 249–250.
- 47) Grassot, J., Gouy, M., Perrière, G., & Mouchiroud, G. (2006) *Mol. Biol. Evol.*, 23, 1232–1241.
- 48) Gari, M., Goodeve, A., Wilson, G., Winship, P., Langabeer, S., Linch, D., Vandenberghe, E., Peake, I., & Reilly, J. (1999) Br. J. Haematol., 105, 894–900.
- 49) Lux, M.L., Rubin, B.P., Biase, T.L., Chen, C.J., Maclure, T., Demetri, G., Xiao, S., Singer, S., Fletcher, C.D., & Fletcher, J. A. (2000) Am. J. Pathol., 156, 791–795.
- 50) Hirota, S., Nishida, T., Isozaki, K., Taniguchi, M., Nakamura, J., Okazaki, T., & Kitamura, Y. (2001) J. Pathol., 193, 505– 510.

- 51) Kohl, T.M., Schnittger, S., Ellwart, J.W., Hiddemann, W., & Spiekermann, K. (2005) *Blood*, 105, 3319–3321.
- 52) Hartmann, K., Wardelmann, E., Ma, Y., Merkelbach-Bruse, S., Preussner, L.M., Woolery, C., Baldus, S.E., Heinicke, T., Thiele, J., Buettner, R., & Longley, B.J. (2005) *Gastroenterology*, **129**, 1042–1046.
- 53) Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., & Mohammadi, M. (1999) *Cell*, **98**, 641–650.
- 54) Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J., & Mohammadi, M. (2000) Cell, 101, 413–424.
- 55) Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., & Mohammadi, M. (2000) *Mol. Cell*, 6, 743–750.
- 56) O'Sullivan, L.A., Liongue, C., Lewis, R.S., Stephenson, S.E., & Ward, A.C. (2007) Mol. Immunol, 44, 2497–2506.
- 57) Skiniotis, G., Boulanger, M.J., Garcia, K.C., & Walz, T. (2005) Nat. Struct. Mol. Biol., 12, 545–551.
- 58) Matadeen, R., Hon, W.C., Heath, J.K., Jones, E.Y., & Fuller, S. (2007) Structure, 15, 441–448.
- 59) Wybenga-Groot, L.E., Baskin, B., Ong, S.H., Tong, J., Pawson, T., & Sicheri, F. (2001) Cell, 106, 745–757
- 60) Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., & Saxena, K. (2004) Mol. Cell, 13, 169– 178.
- 61) Mol, C.D., Lim, K.B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E.Y., Sang, B.C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N., & McRee, D. E. (2003) J. Biol. Chem., 278, 31461–31464.
- 62) Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.C., & Wilson, K.P. (2004) J. Biol. Chem., 279, 31655–31663.
- 63) Schubert, C., Schalk-Hihi, C., Struble, G.T., Ma, H.C., Petrounia, I.P., Brandt, B., Deckman, I.C., Patch, R.J., Player, M.R., Spurlino, J.C., & Springer, B.A. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 4094–4101.
- 64) Walter, M., Lucet, I.S., Patel, O., Broughton, S.E., Bamert, R., Williams, N.K., Fantino, E., Wilks, A.F., & Rossjohn, J. (2007) J. Mol. Biol., 367, 839–847.
- 65) Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., & Anderson, K.S. (2006) Mol. Cell, 21, 711–717.
- 66) Wei, L., Hubbard, S.R., Hendrickson, W.A., & Ellis, L. (1995) J. Biol. Chem., 270, 8122–8130.
- 67) Favelyukis, S., Till, J.H., Hubbard, S.R., & Miller, W.T. (2001) Nat. Struct. Biol., 8, 1058–1063.
- 68) Till, J.H., Becerra, M., Watty, A., Lu, Y., Ma, Y., Neubert, T. A., Burden, S.J., & Hubbard, S.R. (2002) *Structure*, 10, 1187– 1196.
- 69) Schlessinger, J. (2003) Science, 300, 750-751.