

非天然アミノ酸導入を利用した新たな細胞内情報伝達経路創製への挑戦 — EGF レセプターの構造解析から改変まで —

細胞情報分子研究グループ
グループリーダー・齋藤 一樹

1. はじめに

細胞情報分子研究グループでは、人工的な情報処理システム創製の対象として、細胞の持つ情報処理システムを研究してきた。しかし、細胞間や細胞内の情報処理にはさまざまな因子が複雑に関与しており、遺伝情報の処理における“セントラル・ドグマ”のような包括的なシステムが細胞情報の処理システムには存在しない。また、遺伝情報と細胞情報とは日本語では同じ“情報”だが、英語にすると遺伝情報は“Information”なのに対して細胞情報はむしろ“Signaling”と表現される。細胞の情報処理は、蓄積されたり発現したりすることより、むしろ空間的・時間的に伝達されることに注意が注がれているのである。

細胞内外にはいろいろな情報処理(伝達)があるわけだが、その中でも最も興味深いものの一つが、細胞外からの刺激が細胞内への2次情報と変換される細胞膜上での情報処理である。成長因子やホルモンなどの細胞外から刺激は、細胞膜上に存在するレセプター(受容体)の細胞外ドメインに結合し、それがきっかけとなって、レセプターの細胞内ドメインの酵素活性が上昇して、信号が細胞内へと伝達されて行く。

細胞情報分子研究グループでは、そのような細胞膜上のレセプターにおける情報変換に注目し、その機構を分子レベルで明らかにしながら、さらにそれを人工的に改変して新たな情報伝達経路を創製することに挑戦した。

2. EGF レセプターの構造を探る

この5年間、私たちのグループでは、上皮成長因子(epidermal growth factor, 略してEGF)というリガンドのレセプターを材料に研究を進めてきた。哺乳類のEGFは、たかだか53残基の短いペプチドではあるが、ジスルフィド結合を分子内に3つ持ち、柔軟性に劣った非常に固い構造をしていると考えられる(図1)。実際に、すでにいくつかのグループによってその立体構造が解かれており[1-4]、過去には、総括責任者の研究室でもその構造解析が行われていた[5-7]。

そこで、まず、何とかレセプター側の立体構造を解明し、その立体構造にもとづいて、EGFとEGFレセプターとの接触部位を改変して、人工的なリガンド-レセプター系を構築できないかを試みることにした。特に、総括責任者の研究室では、EGFを対象にして、非天然アミノ酸をペプチド・タンパク質中に導入する手法を開発していたので、立体構造がわかれば、非天然アミノ酸を導入した改変が可能だと考えたからである[7,8]。

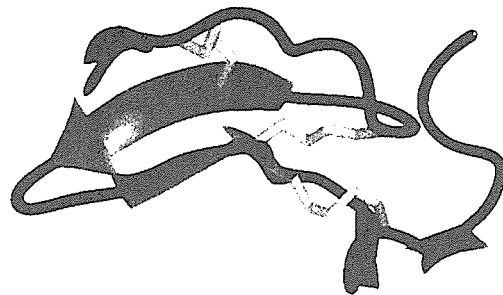
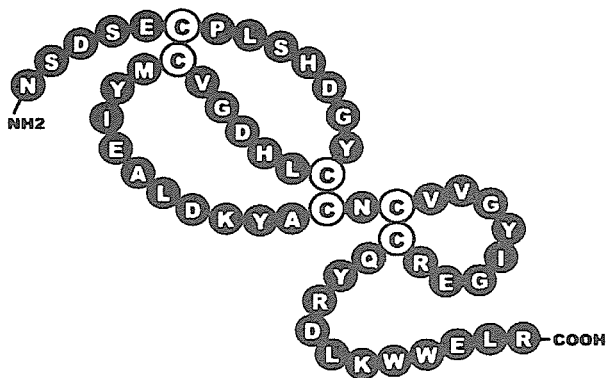
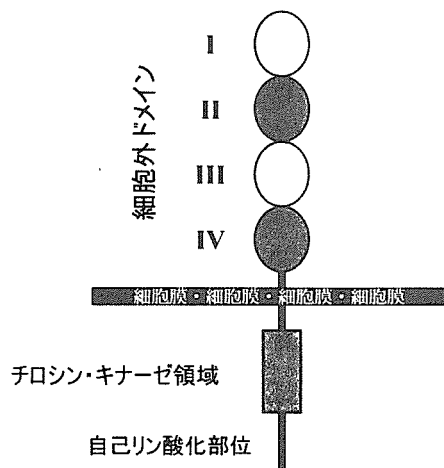


図1. ヒト上皮成長因子 (EGF) のアミノ酸配列と立体構造

哺乳類の EGF は、たかだか 53 残基のアミノ酸が連なった短いペプチドだが、短い配列の中にジスルフィド結合が3つもあるため、コンパクトで固い構造をしている(左)。すでに、立体構造も解かれている(右)。

EGF レセプターは、タンパク質中のチロシン残基をリン酸化する酵素(チロシン・キナーゼ)活性を細胞内に持つ ErbB と呼ばれるレセプター群の1つであり、またの名を ErbB-1 と呼ばれている。ErbB 群の中には、EGF などをリガンドとする ErbB-1 の他に、ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4 というメンバーがある(図2)。それらのアミノ酸配列は互いに似ているが、ErbB-2 にはいまだリガンドが見つかっておらず、ErbB-3 のキナーゼ活性は非常に弱い。ErbB-4 は、EGF レセプター(ErbB-1)と似てはいるが、EGF には反応せず、neuregulin などのリガンドと反応する。



	ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
リガンド	EGF 等	なし	neuregulin 等	
キナーゼ活性	○	◎	×	○

図2. ErbB 群レセプターの構造の模式図と特徴

ErbB 群レセプターは、ErbB-1 から ErbB-4 までの4種類あり、ErbB-1 は EGF レセプターとも呼ばれる。いずれも細胞膜を1回貫通した構造をしており、細胞外には4つのドメイン、細胞内にはチロシン・キナーゼ領域と自己リン酸化部位を持つ。

そこで、まず、それらのリガンドが、ErbB 群レセプターの細胞外ドメインのどの部分に結合しているのかを見出すために、ErbB-1 と ErbB-4 とのキメラを作って、リガンドとの結合(図 3)やそれに伴って引き起こされるレセプターの自己リン酸化などを解析した。4 つある細胞外ドメイン(domain I から IV)のうち、ErbB-1 に関しては、これまで架橋実験などから domain I と domain III とがリガンド結合に関わっているとされてきたが[9, 10], ErbB-4 などその他の ErbB 群レセプターに関してはリガンド結合部位がまったく解明されていなかった。その結果、確かに EGF も neuregulin もレセプターの domain I と domain III とに結合しているが、EGF が domain I よりも domain III に強く結合しているのに対し、neuregulin は主に domain I に結合していることが判明した[11]。

結合部位の解析結果をもとに、EGF レセプター(ErbB-1)の細胞外ドメイン(sEGFR)のいろいろなコンストラクションを作成し、EGF との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析を用いて明らかにすることにした。細胞内にチロシン・キナーゼ活性を持つレセプターはいくつかの型に分類され[12], 最近になって IGF-1 レセプター[13](II 型レセプター)や FGF レセプター[14], NGF レセプター[15](III 型レセプター)の細胞外ドメインの立体構造が次々と明らかにされてはきたが、EGF レセプターの属する I 型レセプターの立体構造はいまだ解かれていない。

そこで、EGF レセプターの結晶化に先立ち、EGF レセプターに結合している糖鎖の解析を行った。その結果、EGF レセプターの細胞外ドメインには、10 本の N 型糖鎖が結合しており、そのうちの 1 本はグリコシダーゼ処理では除去しにくい糖鎖であることも判明した[16]。

現在、糖鎖除去処理をした sEGFR と EGF との複合体に関して、4 Å 弱の分解能を示す結晶が得られ(図 4), 播磨の高輝度放射光施設 SPring-8 で X 線回折の測定を進めている。また、Se-Met を含む培地で sEGFR 分泌細胞を培養することにより、重原子を含むレセプターの結晶も調製されているので、その重原子含有結晶を用いれば、構造解析過程で必要な位相決定も可能になるだろう。そう遠くない将来、EGF レセプターの立体構造を解くことができると思われる。

Guo らは、ヒト成長ホルモンのレセプターの立体構造にもとづき、レセプターやリガンドの一部を削り、その代わりにそこに入り込む低分子化合物を探して、低分子化合物が介在する人工的なレセプターをデザインすることに成功している[17]。EGF レセプターに関しても、リガンドとの結合部位の立体構造が明らかになれば、非天然アミノ酸を導入した EGF を受容する人工レセプターなどのデザインが可能となり、人工的な情報処理システムの創製に結びつけることができるだろう。

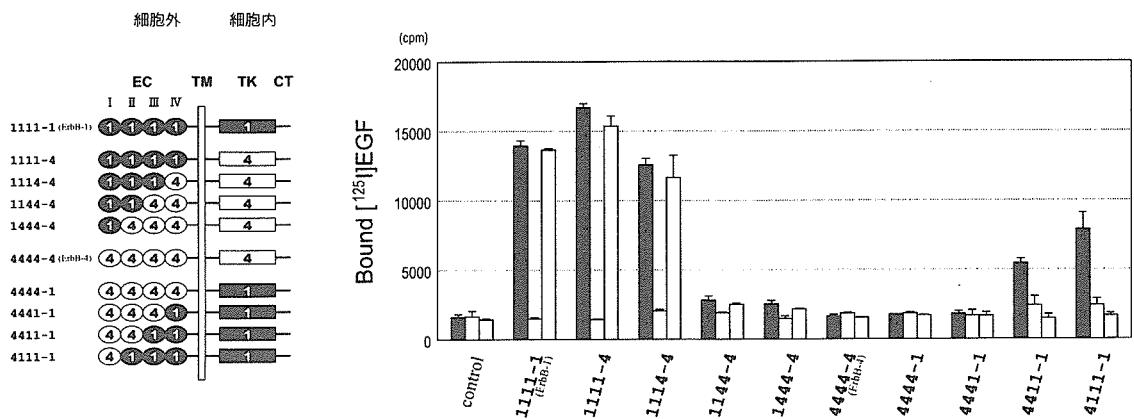


図3. ErbB-1 (EGF レセプター) と ErbB-4 とのキメラの作成とそれらに対する EGF の結合

ErbB-1 (EGF レセプター) および ErbB-4 のリガンド結合位置を確認するために、それらのレセプターのキメラを作成した(左)。EC: 細胞外領域(さらに domain I から IV に分かれている), TM: 細胞膜貫通領域, TK: チロシン・キナーゼ領域, CT: 自己リン酸化をうける C 末端部分。

それらのレセプターを発現した CHO 細胞に対して、どの程度 [¹²⁵I]EGF が結合するかを測定したもの(右図・黒棒)。白棒、灰棒は、それぞれ、 [¹²⁵I]EGF の結合実験の際に非標識の EGF, neuregulin を共存させて測定したときのもの。

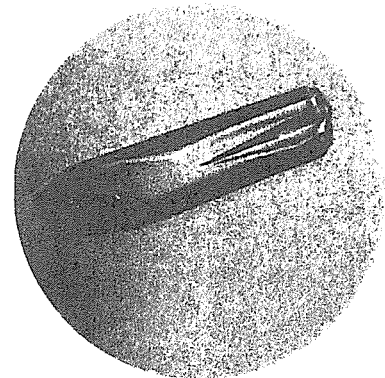
まず、 [¹²⁵I]EGF の結合(黒棒)だけを見てみると、1111-4, 1114-4 は ErbB-1 と同等の結合を示しているが、1144-4 や 1444-4 になると急激に [¹²⁵I]EGF を結合しなくなることがわかる。これは、ErbB-1 の domain III が EGF の結合には重要であることを示している。その証拠に ErbB-1 の domain III を持つ 4411-1, 4111-1 でも [¹²⁵I]EGF の結合は見られる。しかし、4411-1, 4111-1 への [¹²⁵I]EGF の結合は ErbB-1 などと比べると小さく、domain I も EGF 結合に関与していることがわかる。1144-4, 1444-4 もわずかながら EGF を結合している。

次に、 [¹²⁵I]EGF の結合が非標識の neuregulin でどれだけ抑えられるかを見てみると(灰棒)、4411-1, 4111-1 への [¹²⁵I]EGF 結合は大きく抑えられているものの、1144-4, 1144-4 にわずかに結合した [¹²⁵I]EGF はほとんど抑えられていない。これは、neuregulin が ErbB-4 の domain I に強く結合することを示している。

図4. EGF レセプターの細胞外ドメインと EGF との複合体の結晶の一例

糖鎖除去処理した EGF レセプターの細胞外ドメイン(アミノ酸残基 1-619)と EGF との複合体を結晶化した。現時点では、4 Å 弱程度の分解能を示すデータが得られている。

また、細胞を selenomethionine (Se-Met) を含む培地で培養することにより、重原子(Se)を含むレセプターの結晶も得られることを確認しており、位相決定にもこの結晶を用いることができるだろう。



3. EGF レセプター活性化の仕組みを利用する

EGF レセプターの立体構造解析は、まだ途上ではあるが、それと並行して EGF レセプター活性化の仕組みを探り、その仕組みに手を加えることによって人工的な方法でレセプターを活性化できるかを探ってみた。

EGF レセプターは、細胞外ドメインにリガンドが結合すると、まず、レセプターの二量化が引き起こされ、それに伴ってレセプターの自己リン酸化が起こることが知られている[18]。そこで、ErbB 群レセプターに人工的な二量化の仕組みを施してみた。

ErbB-2 は、本来、結合するリガンドを持たないため、自分自身のみで二量化することはない。この ErbB-2 の domain II を DNA gyrase の B ドメイン(GyrB)に置き換えることにより、GyrB の二価性の阻害剤(Novobiocin の合成 dimer や Coumermycin A₁)でレセプターを二量化することを試みた(図5)。すると、確かに、GyrB を含む ErbB-2 の変異体は Novobiocin dimer によって二量化することが判明したが、現時点では、残念ながら二量化に伴うレセプターの自己リン酸化やその下流の活性化は確認されていない[19]。これは、たとえレセプターが二量化しても、正しい配向を持ってレセプターが向き合わないと自己リン酸化が起こらないということを示している。より緻密な二量化の仕組みをデザインしないと、人工的なレセプター活性化システムを構築することはできないだろう。また、最近になって、ErbB 群のレセプターの中でもリガンドを持たない ErbB-2 は、他のメンバーとは異なる仕組みで活性化されているという学説も現れてきている[20]。人工情報伝達経路の構築にあたって、ErbB 群レセプターの二量化の仕組みそのものを利用するには、さらにいろいろな研究を積み重ねる必要があるだろう。

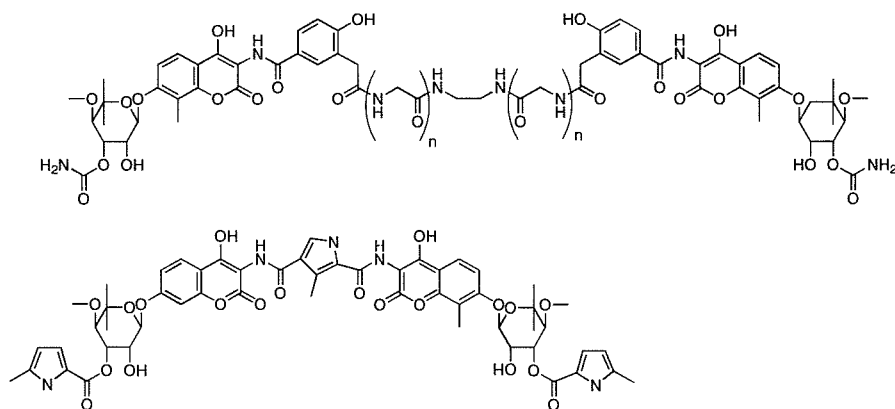


図5. 合成した Novobiocin dimer と Coumermycin A₁ の構造

私たちが合成した Novobiocin の dimer (上)とこれまで GyrB の二量化に用いられてきた天然の GyrB 阻害剤 Coumermycin A₁ (下)の化学構造。私たちが開発した Novobiocin dimer の方が、スペーサーの部分の長さを変えられるので、より効率よく二量化を引き起こせる。GyrB を含む ErbB-2 変異体の場合にも、Coumermycin よりも Novobiocin dimer の方が、二量化効率は高かったが、残念ながら二量化によるレセプターの活性化は確認できなかった。

4. EGF レセプターの細胞内ドメインに非天然アミノ酸を組み込む

EGF レセプターは、その細胞内ドメインの立体構造もいまだに解かれていない。しかし、細胞膜 1 回貫通型のレセプターの細胞内ドメインに存在するチロシン・キナーゼ領域のアミノ酸配列は非常に相同性が高く、すでに立体構造が解かれている insulin レセプター[21]や FGF レセプター[22]のキナーゼ領域の構造と似ていると考えられる。また、EGF レセプターの下流に存在して、EGF レセプターに直接結合することが明らかになっている Grb2 や Shc というアダプター・タンパク質も、すでに立体構造が明らかになっているものが多い。そこで、それらの構造をもとに議論すれば、EGF レセプターの下流に人工的な情報伝達経路を構築できるのではないかと考えた。しかし、細胞外から与えることができるリガンドの場合とは異なり、EGF レセプターの細胞内ドメインやそこに結合するアダプター分子に非天然アミノ酸を導入するには、非天然アミノ酸を含むタンパク質(alloprotein)を細胞内に注入するか、細胞が自ら alloprotein を生合成するように仕組まなければならない。

alloprotein を調製するには、有機化学的な方法もあるが、最近では無細胞合成系や大腸菌を用いてタンパク質中の任意の位置に非天然アミノ酸を導入する技術も確立されつつある。しかし、そのように細胞外で調製したタンパク質を細胞内に注入するのでは、細胞内に新たな人工情報伝達経路を創製したことにはならないので、哺乳類等の培養細胞の中でそのような alloprotein を発現させる仕組みを用意しなくてはならない。

遺伝情報分子研究グループで、3-iodo-tyrosine という非天然アミノ酸(チロシンの類似体)を大腸菌の tRNA^{Tyr} にチャージする tyrosyl-tRNA 合成酵素(TyrRS)の変異体を開発中だったので、まず、これと組み合わせて使うことができる tRNA の変異体を培養細胞中で発現することを試みた。tRNA はその配列内部に自分自身の転写を制御する配列(内部プロモーター)を有するため、大腸菌そのままの配列では、培養細胞中では tRNA は発現できなかった。しかし、東京大学との共同研究で、tRNA の配列に工夫を施すことにより、非天然アミノ酸導入用の tRNA を哺乳類細胞内で発現させることに成功した。なお、非天然アミノ酸導入用の tRNA は、将来的には、遺伝情報分子研究グループが開発・設計した非天然塩基を用いて調製することを目指しているが、現段階では、終止コドン(Amber)をサプレスするような tRNA (tRNA^{Amb})の変異体を調製している。

まだ予備的な結果だが、3-iodo-tyrosine に対応した TyrRS 変異体と非天然アミノ酸導入用の tRNA^{Amb} 変異体とを組み合わせると培養細胞内で発現させることにより、培地への 3-iodo-tyrosine の添加に依存して、Amber コドンがサプレスされて細胞内で蛍光タンパク質が発現されていることが確認された。このシステムを更に改良することは必要だが、この手法を用いれば、細胞のタンパク質(ここでは EGF レセプター)の任意の位置に 3-iodo-tyrosine を導入することができ、非天然アミノ酸導入を利用した新たな細胞内情報伝達経路創製の道具立てとなるだろう。

5. 非天然アミノ酸を認識するシステムの構築

EGF レセプターの細胞内ドメインで、チロシンが活躍する場といえば、リガンドによるレセプター活性化に伴って自己リン酸化されるC末端部分の5つのチロシン残基である。EGF レセプターのリン酸化部位のチロシンがリン酸化されて phospho-tyrosine になると、下流のいろいろな情報伝達経路が駆動されるが[23]、最もよく知られているのは、phospho-tyrosine を含む周辺配列を特異的に認識して結合する Grb2 や Shc といったアダプター・タンパク質を介した経路である。ここでは、EGF レセプターの5つのリン酸化部位のうち、リン酸化されると Grb2 を結合するチロシン残基(Tyr¹⁰⁶⁸)に 3-iodo-tyrosine を導入することにした。

まず、レセプターのリン酸化部位に導入された 3-iodo-tyrosine が、チロシン残基と同様に EGF レセプターのキナーゼ活性によってリン酸化されるかどうかを確認した。過去の文献では、3-iodo-tyrosine は EGF レセプターのキナーゼの基質にはならず、むしろ阻害剤になるという報告があった[24]。しかし、EGF レセプターの Tyr¹⁰⁶⁸ を含む周辺配列のペプチドを合成し、Tyr¹⁰⁶⁸ を 3-iodo-tyrosine に置換してキナーゼの基質となるかを見たところ、チロシンそのものが基質となった場合には劣るが、チロシンが 3-iodo-tyrosine に置換されてもペプチドのリン酸化は起きていた(図6)[25]。これにより、3-iodo-tyrosine もチロシンと同様に、リン酸化によって ON/OFF されるスイッチの役目を果たすことが明らかとなった。

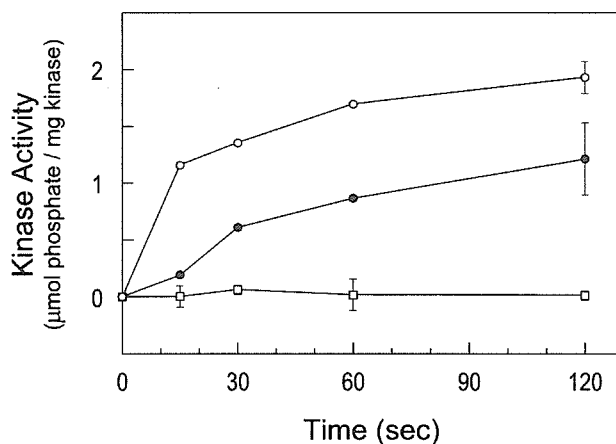


図6. EGF レセプターのキナーゼ活性による 3-iodo-tyrosine のリン酸化

EGF レセプターのリン酸化部位の一つである Tyr¹⁰⁶⁸ の周辺配列のペプチド
 Pro-Val-Pro-Glu-Tyr¹⁰⁶⁸-Ile-Asn-Gln-Ser-Val-Pro-Lys-Arg
 を基質にした、EGF レセプターのキナーゼ反応の時間変化。○は Tyr のままのペプチド、●は 3-iodo-tyrosine に置換したときのもの、□は negative control として行った Phe に置換した場合のものである。Tyr には劣るが、3-iodo-tyrosine も十分基質となっている。別途行った Michaelis-Menten 解析では、Tyr 体が $K_m = 86 \pm 9 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 8.8 \pm 0.8 \mu\text{mol/min/mg}$ であったのに対し、3-iodo-tyrosine 体では $K_m = 300 \pm 40 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 12 \pm 0.1 \mu\text{mol/min/mg}$ であった。これは、よく用いられる仮想基質 Angiotensin II が同条件で $K_m = 660 \pm 160 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 14 \pm 1 \mu\text{mol/min/mg}$ であることを考えると、リン酸化が起きていると言ってよい。

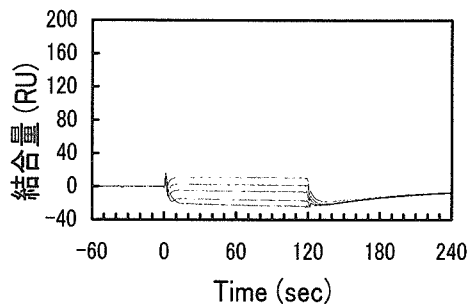
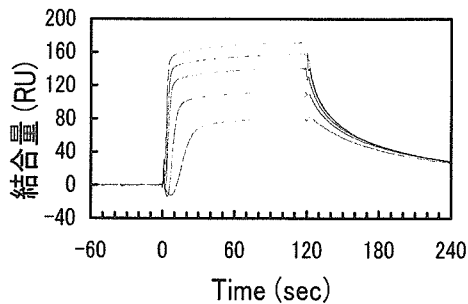
そこで、次に、リン酸化された 3-iodo-tyrosine (phospho-3-iodo-tyrosine) に結合する Grb2 の変異体を開発することにした。このような Grb2 の変異体が作成できれば、Tyr¹⁰⁶⁸ が 3-iodo-tyrosine に置換された EGF レセプターの変異体(alloprotein)が細胞に発現されたときに、そのリン酸化に応じて、そこに結合して情報を伝達する新たな経路を構築できるからである。

Grb2 は SH3_N-SH2-SH3_C というドメイン構造を持つ比較的小さなタンパク質であるが、phospho-tyrosine を含む配列と結合するのは中央の SH2 というドメインであるということが知られている。Grb2 の SH2 ドメインと phospho-tyrosine を含むペプチドとの複合体の立体構造はすでにいくつかのグループで解かれており[26-30]、それらの構造をもとに Grb2-SH2 変異体をデザインした。リン酸化ペプチドの phospho-tyrosine 残基の周りには、いくつかの SH2 ドメインの残基が取り囲んでいるが、リン酸基との結合に関わる残基を変異させてしまうとリン酸化ペプチドが結合しなくなってしまうので、リン酸基との結合には関係なく、しかしヨウ素原子を受け入れるためには邪魔となっている残基に変異を入れて phospho-3-iodo-tyrosine を受容させなければならない。そのような残基の第一候補は Ser⁹⁶ だが、セリンはもともと側鎖の短いアミノ酸なので、この邪魔になる側鎖を削るには、アラニンかグリシンに置換するしかない。

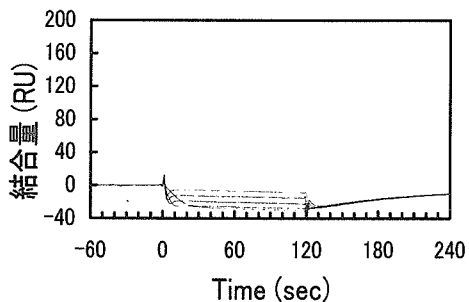
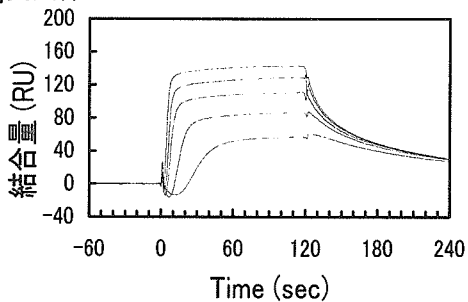
大腸菌の発現系を用いて、Grb2 の SH2 ドメイン(アミノ酸残基 55-160)およびその変異体([S96A], [S96G])を調製した。精製したそれらのタンパク質の、EGF レセプターの Tyr¹⁰⁶⁸ 周辺配列のリン酸化ペプチドに対する結合は、BIACORE を用いて測定した(図 7)。[S96A]変異体は、野生型の Grb2-SH2 とほぼ同じような結合の様子を示し、phospho-tyrosine を含むペプチドには結合するが、phospho-3-iodo-tyrosine を含むペプチドにはまったく結合しなかった。これに対し、[S96G]変異体は、phospho-tyrosine を含むペプチドに対する結合は 10 分の 1 に弱くなり、その代わりに phospho-3-iodo-tyrosine を含むペプチドに対して、phospho-tyrosine を含むペプチドに対するよりも強く結合するようになった。

今後、[S96G]変異体にさらなる改質を施す必要はあるが、この SH2 変異体を含む Grb2 を調製したり、その SH2 変異体との融合アダプター・タンパク質を設計したりすれば、EGF レセプターのリン酸化部位に導入した 3-iodo-tyrosine を、リガンド刺激にしたがってリン酸化されたときだけ特異的に結合するアダプター・タンパク質を開発したことになり、新たな細胞内情報伝達経路の創製が可能となるだろう。

野生型



[S96A]変異体



[S96G]変異体

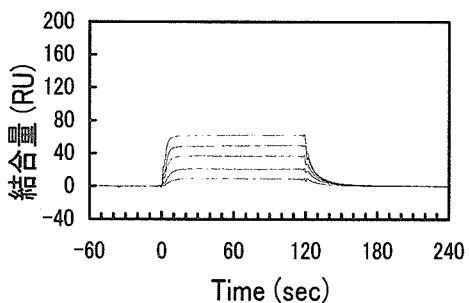
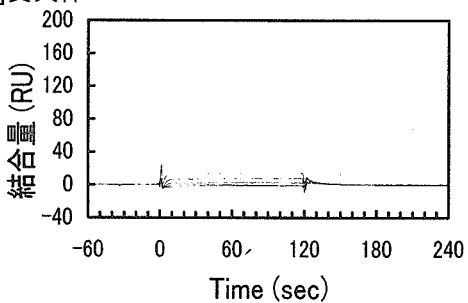


図7. Grb2-SH2 ドメインの変異体の BIACORE センサーグラム

EGF レセプターのリン酸化部位の一つである Tyr¹⁰⁶⁸ の周辺配列のペプチド biotin-Ahx-Pro-Val-Pro-Glu-pTyr¹⁰⁶⁸-Ile-Asn-Gln-Ser-Val-Pro-Lys-Arg および pTyr¹⁰⁶⁸ を phospho-3-iodo-tyrosine に置換したペプチドを, streptavidin でコートされた Sensor Chip SA 上に, それぞれおよそ 100 RU ずつ固定した. (pTyr, Ahx は, それぞれ phospho-tyrosine, スペーサーとして用いた 6-aminohexanoic acid を表す) 1000, 750, 500, 250, 100 nM の濃度の Grb2-SH2 タンパク質を温度 25°C, 流速 20 μ l/min で 40 μ l ずつ流したときのセンサーグラムを示した. 各試料タンパク質とも, 左が phospho-tyrosine を含むペプチドへの結合で, 右が phospho-3-iodo-tyrosine を含むペプチドへの結合を示す.

センサーグラムを非線形最小二乗法でフィッティングして, 結合定数を求めると,

	phospho-tyrosine 含有ペプチド	phospho-3-iodo-tyrosine 含有ペプチド
野生型	4 μ M	結合せず
[S96A]変異体	7 μ M	結合せず
[S96G]変異体	80 μ M	20 μ M

となった.

6. 最後に

複雑極まりない細胞の情報伝達システムに、非天然アミノ酸導入というメスをもって切り込むことは、特にプロジェクト立ち上げ当初は、闇の中を手探りで歩いて行くようなものであった。ここで紹介した結果のほかにも、多くの失敗を繰り返し、山のような negative data が積み上がった。しかし、まだ新たな細胞内情報伝達経路を創製したとは言えないものの、そのための登場人物はほぼ出揃ったと言えるのではないかと思う。

今後、これらの結果をもとに、分子構造に基礎をおいた、人工情報伝達経路の構築をさらに押し進めて行きたい。

謝辞

この研究は、プロジェクト総括責任者・横山茂之先生のご指導のもとで行われた。ErbB 群レセプターや Grb2 に関連する多くのタンパク質の調製やキメラ・レセプターの活性測定は、金載勲研究員を中心に行われた。sEGFR やリガンドの発現系は山中麻里技術員によって構築され、小木曾英夫技術員はその精製や結晶化に努力を惜しまず傾倒した。sEGFR の糖鎖解析は、研究推進委員・神田大輔先生(生物分子工学研究所)との共同研究である。人工二量体試薬やペプチドの有機化学的調製およびその活性測定は、宮崎真佐也研究員が担当した。押切恵子技術員・向井文子技術員・宮本朝子技術員は、その有機化学的調製の一端を担った。レセプター二量体に関する検出法の開発や生化学的実験は橋爪智恵子技術員が行った。培養細胞における tRNA の発現や Amber サプレッションに関する実験は、研究推進委員・坂本健作先生(東京大学大学院理学系研究科)のご指導のもと、林明子技術員が行った。EGF レセプターのキナーゼ領域の発現は尾上伸二技術員がトライし、3-iodo-tyrosine のリン酸化実験は中村理香研究員が担当した。プロジェクト内外にも、ここには書ききれないほどの方々にお世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。最後に、研究室の立ち上げ時に尽力してくれた草野陽子技術員、事務という側面から研究を支えてくれた樫田美知技術員・菊地万里技術員に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Campbell, I. D., Cooke, R. M., Baron, M., Harvey, T. S. & Tappin, M. J. (1989) The solution structures of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Prog. Growth Factor Res.*, **1**, 13–22.
- [2] Hommel, U., Harvey, T. S., Driscoll, P. C. & Campbell, I. D. (1992) Human epidermal growth factor. High resolution solution structure and comparison with human transforming growth factor α . *J. Mol. Biol.*, **227**, 271–282.
- [3] Montelione, G. T., Wüthrich, K., Burgess, A. W., Nice, E. C., Wagner, G., Gibson, K. D. & Scheraga, H. A. (1992) Solution structure of murine epidermal growth factor determined by NMR spectroscopy and refined by energy minimization with restraints. *Biochemistry*, **31**, 236–249.
- [4] Kohda, D. & Inagaki, F. (1992) Three-dimensional nuclear magnetic resonance structures of mouse epidermal growth factor in acidic and physiological pH solutions. *Biochemistry*, **31**, 11928–11939.

- [5] Koide, H., Muto, Y., Kasai, H., Kohri, K., Hoshi, K., Takahashi, S., Tsukumo, K., Sasaki, T., Oka, T., Miyake, T., Fuwa, T., Kohda, D., Inagaki, F., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1992) A site-directed mutagenesis study on the role of isoleucine-23 of human epidermal growth factor in the receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 257–261.
- [6] Koide, H., Muto, Y., Kasai, H., Hoshi, K., Takusari, H., Kohri, K., Takahashi, S., Sasaki, T., Tsukumo, K., Miyake, T., Fuwa, T., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1992) Recognition of an antiparallel β -sheet structure of human epidermal growth factor by its receptor. Site-directed mutagenesis studies of Ala-30 and Asn-32. *FEBS Lett.*, **302**, 39–42.
- [7] Koide, H., Yokoyama, S., Katayama, Y., Muto, Y., Kigawa, T., Kohno, T., Takusari, H., Oishi, M., Takahashi, S., Tsukumo, K., Sasaki, T., Miyake, T., Fuwa, T., Kawai, G. & Miyazawa, T. (1994) Receptor-binding affinities of human epidermal growth factor variants having unnatural amino acid residues in position 23. *Biochemistry*, **33**, 7470–7476.
- [8] Koide, H., Yokoyama, S., Kawai, G., Ha, J.-M., Oka, T., Kawai, S., Miyake, T., Fuwa, T. & Miyazawa, T. (1988) Biosynthesis of a protein containing a nonprotein amino acid by *Escherichia coli*: l-2-aminohexanoic acid at position 21 in human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 6237–6241.
- [9] Woltjer, R. L., Lukas, T. J. & Staros, James V. (1992) Direct identification of residues of the epidermal growth factor receptor in close proximity to the amino terminus of bound epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 7801–7805.
- [10] Summerfield, A. E., Hudnall, A. K., Lukas, T. J., Guyer, C. A. & Staros, J. V. (1996) Identification of Residues of the epidermal growth factor receptor proximal to residue 45 of bound epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19656–19659.
- [11] Kim, J.-H., Saito, K. & Yokoyama, S. (2001) Chimeric receptor analyses of the interactions of the ectodomains of ErbB-1 with epidermal growth factor and those of ErbB-4 with neuregulin. *submitted*.
- [12] Yarden, Y. & Ullrich, A. (1988) Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*, **27**, 3113–3119.
- [13] Garrett, T. P. J., McKern, N. M., Lou, M., Frenkel, M. J., Bentley, J. D., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Cosgrove, L. J. & Ward, C. W. (1998) Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature*, **394**, 395–399.
- [14] Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R. & Mohammadi, M. (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*, **98**, 641–650.
- [15] Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. & de Vos, A. M. (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*, **401**, 184–188.
- [16] Sato, C., Kim, J.-H., Abe, Y., Saito, K., Yokoyama, S. & Kohda, D. (2000) Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor. *J. Biochem.*, **127**, 65–72.
- [17] Guo, Z., Zhou, D. & Schultz, P. G. (2000) Designing small-molecule switches for protein-protein interactions. *Science*, **288**, 2042–2045.
- [18] Yarden, Y. & Schlessinger, J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*, **26**, 1443–1451.
- [19] Miyazaki, M., Kim, J.-H., Oshikiri, K., Saito, K. & Yokoyama, S. (1999) Synthesis of dimeric novobiocins as chemical inducers of dimerization for DNA gyrase-fused proteins. “*Peptide Science - Present and Future*” (Ed. by Shimonishi, Y.) Proceedings of the 1st International Peptide Symposium, pp.210-211, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [20] Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 193–200.

- [21] Hubbard, S. R., Wei, L., Ellis, L. & Hendrickson, W. A. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*, **372**, 746–754.
- [22] Mohammadi, M., Schlessinger, J. & Hubbard, S. R. (1996) Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism, *Cell*, **86**, 577–587.
- [23] Fujioka, T., Kim, J.-H., Adachi, H., Saito, K., Tsujimoto, M., Yokoyama, S. & Ui, M. (2001) Further evidence for involvement of insulin receptor substrates in epidermal growth factor-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Eur. J. Biochem.*, in press.
- [24] Fry, D. W., McMichael, A., Singh, J., Dobrusin, E. M. & McNamara, D. J. (1994) Design of a potent peptide inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase utilizing sequences based on the natural phosphorylation sites of phospholipase C- γ 1. *Peptides*, **15**, 951–957.
- [25] Nakamura, R., Saito, K. & Yokoyama, S. (2001) 3-Iodo-tyrosine as an alternative substrate for the epidermal growth factor receptor kinase. *to be submitted*.
- [26] Rahuel, J., Gay, B., Erdmann, D., Strauss, A., García-Echeverría, C., Furet, P., Caravatti, G., Fretz, H., Schoepfer, J. & Grütter, M. G. (1996) Structural basis for specificity of Grb2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 586–589.
- [27] Rahuel, J., García-Echeverría, C., Furet, P., Strauss, A., Caravatti, G., Fretz, H., Schoepfer, J. & Gay, B. (1998) Structural basis for the high affinity of amino-aromatic SH2 phosphopeptide ligands. *J. Mol. Biol.*, **279**, 1013–1022.
- [28] Etmayer, P., France, D., Gounarides, J., Jarosinski, M., Martin, M.-S., Rondeau, J.-M., Sabio, M., Topiol, S., Weidmann, B., Zurini, M. & Bair, K. W. (1999) Structural and conformational requirements for high-affinity binding to the SH2 domain of Grb2. *J. Med. Chem.*, **42**, 971–980.
- [29] Furet, P., García-Echeverría, C., Gay, B., Schoepfer, J., Zeller, M. & Rahuel, J. (1999) Structure-based design, synthesis, and X-ray crystallography of a high-affinity antagonist of the Grb2-SH2 domain containing an asparagine mimetic. *J. Med. Chem.*, **42**, 2358–2363.
- [30] Ogura, K., Tsuchiya, S., Terasawa, H., Yuzawa, S., Hatanaka, H., Mandiyan, V., Schlessinger, J. & Inagaki, F. (1999) Solution structure of the SH2 domain of Grb2 complexed with the Shc-derived phosphotyrosine-containing peptide. *J. Mol. Biol.*, **289**, 439–445.