

HGF-Met シグナル伝達の構造的基盤

Structural basis of HGF-Met signaling

海津正賢*, 高木淳一

Masataka UIMITSU, Junichi TAKAGI



海津正賢

2003年3月 国際基督教大学 (ICU) 教養学部卒業

2005年3月 大阪大学大学院医学系研究科医科学修士課程修了

2010年3月 東京大学大学院医学系研究科博士課程修了 博士 (医学)

東京大学大学院理学系研究科およびOntario Cancer Institute (Toronto, Canada) でのポスドクを経て

2013年7月より現所属の大阪大学蛋白質研究所特任研究員

2014年度より同特任助教 (現職)

Key words: HGF, Met, structural biology, proteolysis

Points

- ① HGF-Met シグナリング経路は通常の発生過程およびがんの進展において重要な役割を果たしている。
- ② HGF は 1 本鎖前駆体として細胞外に分泌後切断を受け、2 本鎖の活性化型 HGF となる。両者ともに Met に結合するが、2 本鎖 HGF のみが Met を活性化できる。
- ③ これまでに得られている HGF および Met 部分構造情報からは、細胞外領域における HGF の結合がどのように Met の細胞内キナーゼ領域を活性化するのかという疑問に答えることができていない。
- ④ 今後、構造生物学的手法により、高分解能での HGF の切断に伴う構造情報取得と HGF-Met 複合体構造決定により、そのシグナリング機構の解明が期待される。

1. はじめに

HGF (肝細胞増殖因子) は線溶系の中心酵素プラスミノゲンの類縁蛋白質であり¹⁾、多くの血液凝固因子同様に肝臓で合成され血中に分泌されるが、その生理的本体は増殖因子であり、チロシンキナーゼ

型受容体である Met (または c-Met ともいう) に結合して増殖シグナルを ON にする²⁾。このシグナリング経路は通常の発生過程において多様で重要な役割を担っているとともに、その異常な活性化はがんの進展や薬剤耐性の獲得に寄与しており (図 1)、それゆえ、HGF-Met シグナリング経路の活性状態をコントロールするための阻害剤の開発が精力的に行われている³⁾。しかし、その多くは細胞内のキナーゼ領域を標的にしており、膨大な数の Met キナーゼ領域の立体構造が化合物との複合体の状態で解かれているが⁴⁾、細胞外領域において HGF がどのように Met

*責任者連絡先:

大阪大学蛋白質研究所分子創製学研究室

〒565-0871 吹田市山田丘 3-2

Tel: 06-6879-8607, Fax: 06-6879-8609

E-mail: mumitsu@protein.osaka-u.ac.jp

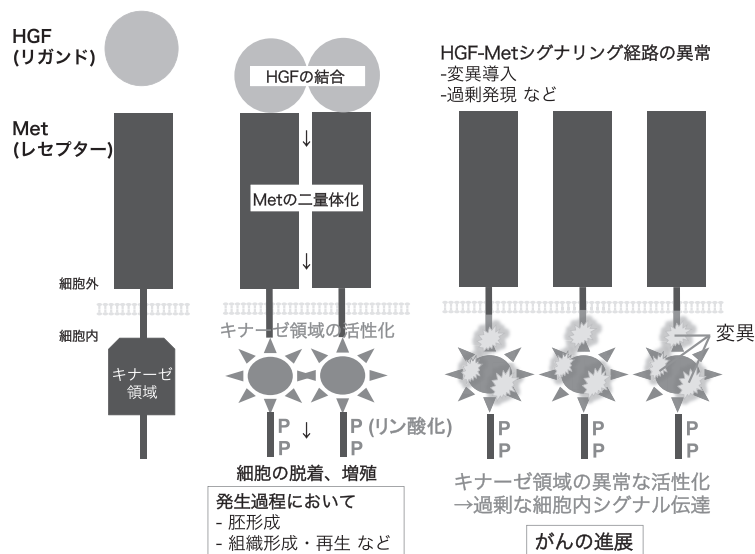


図1 HGF-Met シグナリング経路の概念図

レセプターに結合し、細胞膜部分を経て、細胞内へとそのシグナルを伝えるかという疑問に答えるに十分な構造学的情報は今のところ得られていない。本稿では、プラスミノーゲンと同様な「活性化」を受けるHGFについて、その活性化機構とMetへの結合機構について現在までに得られている構造生物学的知見を整理し、HGF-Metシグナリング機構に関する未解明の問題や今後の展望について概説したい。

2. HGFとMetレセプターの一次構造および立体構造

1980年代後半に発見されたHGF^{5,6)}はMetレセプターの唯一のリガンドであり、約700アミノ酸からなる糖タンパク質である。その構成は、N末端(N)ドメインに続き、4つのKringle(K1~4)ドメインとC末端のセリンプロテアーゼ(SP)様ドメインの6つのドメインからなる(図2A)。HGFは1本鎖前駆体(single chain: sc)として細胞外に分泌後、K4とSPの間のリンカー部位において血中に存在するHGF activatorなどのプロテアーゼによる切断を受け、ジスルフィド結合で連結された2本鎖(two chain: tc)の活性化型HGFとなることが知られている(図3A)。HGFの上記のドメイン構造はプラスミノーゲンと相同であり(ただしプラスミノーゲンはKringleを5

つ持つ)¹⁾、しかもSPドメインの直前で切断されて活性化型に変換されるという点もまったく同じである。しかしHGF(およびその近縁の増殖因子であるMSP)はcatalytic triadを持たず、したがってセリンプロテアーゼ活性は持たない。これまでにHGFのSPドメインおよびNドメインからK1まで、あるいはK2ドメインまで(それぞれNK1, NK2断片と呼ぶ)については立体構造が報告されているが、K3, K4ドメイン部分や、HGF全長の構造はまだ解かれていない(図2B)。

HGFのレセプターであるMetは一回膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体である⁷⁾。その細胞外領域(約900アミノ酸)は、神経ガイダンス因子セマフォリンの受容体であるプレキシン蛋白質と類似の構造をしており、N末端のセマフォリン(Sema)ドメイン(ここに主要なHGF結合領域が存在する)に続いてPSIドメインと4つのIPTドメインがストーク(茎)領域を形成している(図2A)。Semaドメイン内にはfurinで切断を受けるループ部位があるが、その生理的意義は不明である。一回の膜貫通領域に続く細胞内領域(約430アミノ酸)にはキナーゼドメインおよび複数のリン酸化部位があり、これらのリン酸化のON/OFFが細胞内で引き起こされる下流の反応のスイッチとなる。現在受け入れられているシナリオでは、HGF結合に伴い、Metが二量体化するこ

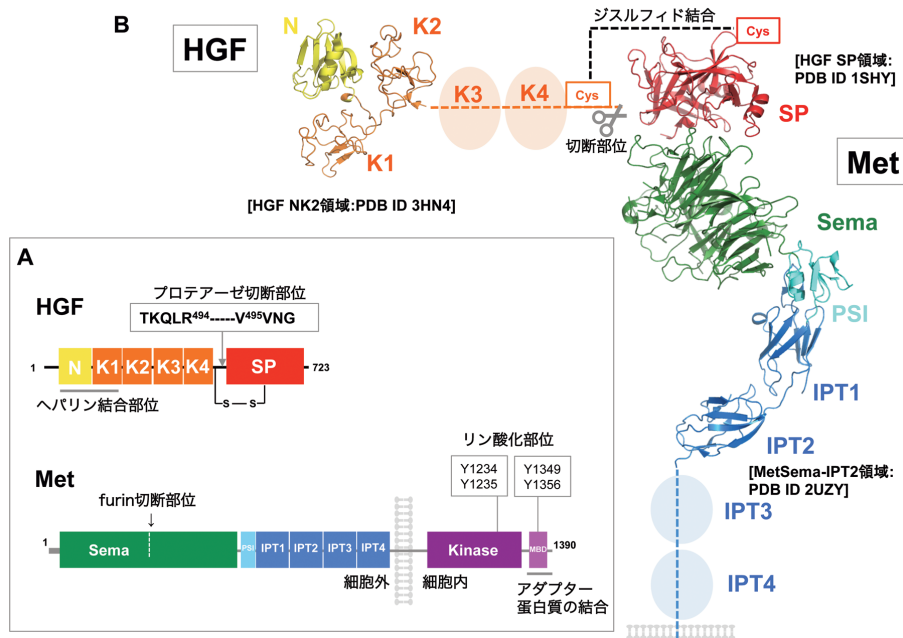


図2 HGF および Met 一次構造と既知立体構造によるモデル図

HGF および Met についての (A) 一次構造と (B) 既知の立体構造について示した。各立体構造図については、HGF NK2 領域 (PDB ID 3HN4)、HGF SP 領域 (PDB ID 1SHY) および Met Sema-IPT2 領域 (PDB ID 2UZY) のそれぞれの PDB ファイルを元に Pymol で作成した。また、HGF SP 領域と Met Sema 領域の複合体部分については (PDB ID 1SHY) の構造を元にモデル構造を作成した。

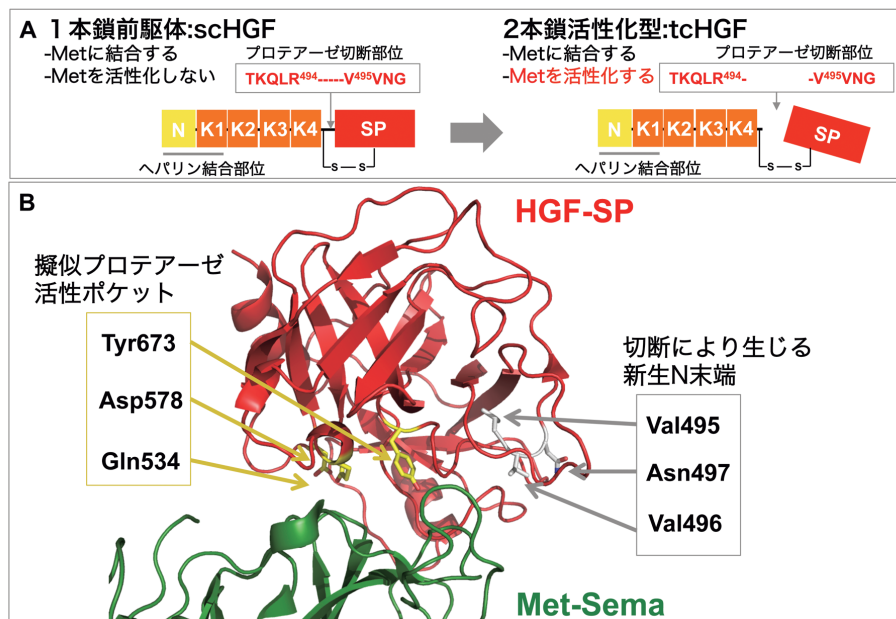


図3 HGF の切断と活性化型 SP 領域構造

(A) 1本鎖前駆体 (sc: single chain) HGF と 2本鎖活性化型 (tc: two chain) HGF の一次構造。HGF は血中のプロテアーゼにより 494 番目の Arg 残基と 495 番目の Val 残基の間で切断を受け、ジスルフィド結合によりリンクされた 2本鎖の活性化型 HGF となる。

(B) 活性化型 HGF SP 領域と Met-Sema~PSI 領域との複合体構造 (PDB ID 1SHY)。図は PDB ファイルより Pymol を用いて作成。HGF SP 構造中 (赤色) のうち、切断後の新生 N 末端残基 (495VVN) については灰色、擬似プロテアーゼ活性ポケット (Gln534, Asp578, Tyr673) については黄色で示した。

とでキナーゼ領域同士が近接し、キナーゼ領域に存在する Y1234 および Y1235 がリン酸化されると考えられている²⁾(図 1)。活性化状態となったキナーゼ領域は、さらに C 末端にある Y1349 および Y1356 の自己リン酸化を引き起こし²⁾、このリン酸化部位に Gab1 をはじめとするアダプター蛋白質が結合することで一連の細胞内カスケード反応が進み⁸⁾、最終的に基質への接着を低化させて細胞の脱着をうながす cell scattering とよばれる応答を引き起こす。この一連の生物学的活性は、通常の発生過程および組織の再生、修復など様々な局面で重要となる²⁾。

Met 細胞外領域の立体構造に関しては、これまでに Sema-PSI ドメイン部分が HGF の SP との複合体で決定されているほか⁹⁾、Sema ドメインから 2 番目の IPT ドメインまでの断片がリステリア菌の接着因子インターナリン B との複合体として結晶構造解析されている¹⁰⁾(図 2B)。前者の構造情報によって、リガンド(HGF)と受容体(Met)の結合という、シグナル伝達において最初に起こる重要なイベントについて原子分解能の詳細が得られているにもかかわらず、HGF 結合がどうやって Met の二量体化を引き起こし、細胞内にシグナルが伝わるのかというメカニズムは全く不明なままである。それを明らかにするには、以下に述べるように、scHGF から tcHGF への変換によってどのような構造変化が起こるのか、そして全長の活性型 tcHGF がどのようにして Met 細胞外領域に結合するのかという 2 つの疑問に答える必要がある。

3. HGF のプロテアーゼ切断による活性化メカニズム

前述のように HGF の前駆体からの活性型への変換はプラスミノゲンのそれと全く同じように起こる。プラスミノゲンは closed form と呼ばれるコンパクトなコンフォメーションを取っていて¹¹⁾、切断部位(Arg561-Val562)を含むリンカーは隠れているが、いったんこれが露出して切断を受けプラスミンになると、新たに現れる N 末端である Val562 の α アミノ基が活性中心ポケットに差し込まれ、セリンプロテアーゼの活性中心が構成される¹²⁾。これと同時に、切断によって解放された Kringle ドメインは基

質に対するエキソサイトとして働くようになると考えられている。これに対し、HGF でも相同なサイトである Arg494-Val495 間で切断が起きると、新生 N 末端の Val495 が同様に分子内部に差し込まれた構造を取ることが、SP ドメイン単体の結晶構造解析^{9, 13)}から分かっている(ただし、切断前の scHGF の構造はまだ決定されていない)(図 3B)。もしも、切断前の scHGF が Met に結合できず、tcHGF になって初めて Met に結合できるというのであれば、上記のプラスミノゲン様の構造変化によって出来る疑似プロテアーゼ活性サイトのなかに Met 結合部位を形成されれば話は単純である。実際に、HGF の SP 断片と Met の Sema-PSI 断片の複合体構造では Met 結合部位は HGF の疑似プロテアーゼ活性ポケットと重なっており、上の仮説と合う。ところが現実には、tcHGF だけがシグナル伝達活性を持つにもかかわらず、scHGF も tcHGF もともに Met レセプターに対して高親和性で結合できるのである^{14, 15)}。つまり、受容体への結合の有無とは別に、HGF の生物活性を制御している機構があるということになる。明らかに、HGF は Met に「ただ結合する」のでは不十分で、ある特定の「シグナル伝達型複合体」を細胞上に形成することが Met の活性化(細胞内領域のリン酸化)に必要であることが予想できる。このメカニズム解明のためには、シグナリング活性をもつ tcHGF と持たない scHGF が構造的にどのように異なるかを明らかにする必要がある。また、前述の Met チロシンキナーゼドメインの活性化メカニズムを考えれば、「二量体化」がキーワードになることは明らかであり、その意味で次に述べる HGF の N 末端断片についての知見は興味深い。

4. HGF の N 末端側領域の構造と生物活性

上記のように不活性の scHGF も活性型の tcHGF もともに Met レセプターへの高親和性結合部位を持つ訳だが、それは HGF のどこにあるのだろうか。この点については、複数の研究から N 末端の N~K1 ドメインのどこかにあることが示唆されている¹⁵⁻¹⁷⁾。HGF は、生体内では全長タンパク質だけでなく NK1 のみおよび NK2 のみの短い産物が選択的スプライシングにより生じることが知られている。この両者

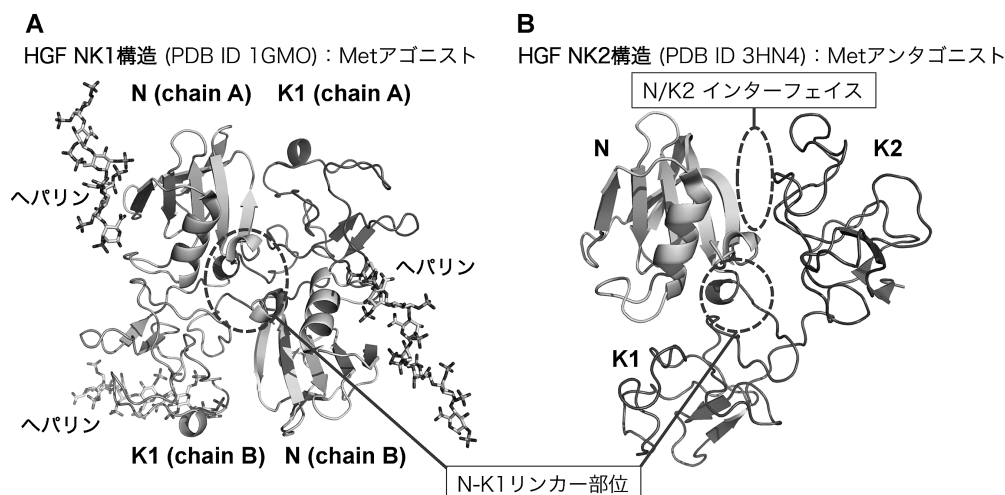


図4 選択的スプライシングにより生じる HGF NK1 および NK2 の立体構造
(A)HGF-NK1 構造(PDB ID 1GMO). 結合しているヘパリンはスティックモデルで表示した.
(B)HGF-NK2 構造(PDB ID 3HN4). NK1 のダイマー化に重要とされる N-K1 リンカー部位 (KDYIRN) を図示した. また, N/K2 インターフェイスを図(B)中に図示した. いずれも図は PDB ファイルより Pymol を用いて作成した.

はともに Met への高親和性で結合出来るのだが, このうち NK1 バリエントはさらに Met を活性化できる (すなわちアゴニスト活性を有する). ところが, NK1 より Kringle を 1 つ多く持つ NK2 では逆に Met に対してアンタゴニスト活性を有するのである¹⁸⁾. この一見矛盾するような生物活性の差については両者の X 線結晶構造解析の結果から説明が可能になっている. まず NK1 は結晶の非対称単位中でダイマー構造をとっており, 溶液中においてもヘパリン依存性のダイマー形成が確認されていて¹⁹⁻²¹⁾, さらには細胞に対する NK1 のアゴニスト活性にもヘパリンの結合が必須である²²⁾ (図 4A). よって NK1 は, 細胞上のヘパリン様糖鎖の助けを借りてダイマーを形成し, 前述の高親和性部位を介して Met に結合してこれを二量体化させ, 活性化すると考えられる. 一方, NK2 は結晶構造中において NK1 で見られたダイマー構造が存在せず²³⁾, N ドメインと K2 ドメインがコンタクト (N/K2 インターフェイス) することにより Closed なコンフォメーションをとり, ダイマー化に必要な部分が隠されている様に見える (図 4B). すなわち NK2 はモノマーの状態でも Met に結合してしまうことで, NK1 や全長の HGF に対してアンタゴニストとして働くのだと考えられる. この考えは, 変異導入によって N/K2 インターフェイスを破壊する

と NK2 がダイマー化できるようになって, 同時にアゴニスト活性を獲得するという結果からも理解できる²³⁾. このように, NK1 および NK2 についての生物活性および構造解析の結果は, HGF による Met の活性化において NK1 領域が極めて重要な意味を持つことを示している.

NK1 領域に Met への高親和性結合部位が存在するのであれば, 次なる疑問はこの NK1 領域は Met のどこに結合するのだろうかということである. これまでのところ HGF と Met の複合体構造は先に述べた HGF-SP と Met の Sema ドメインのそれ以外には報告されておらず, 上記の高親和性相互作用の詳細は不明であるが, Gherardi らは SAXS と Cryo-EM により低分解能で全長 HGF と Met の複合体の全体像を示し²⁴⁾, さらにクロスリンクによる生化学実験と合わせて NK1 の結合位置を Met の Sema 領域のブレード 5~6 のあたり (Sema ドメインは 7 枚の β シートがリング状に配置する β プロペラー構造をしているが, この構造では 7 枚の β シートをそれぞれ「ブレード (羽根)」と呼ぶならわしとなっている) と予測している¹⁶⁾. この予想は最近報告された Met-Sema/HGF-SP/抗 Met 抗体 (Fab) の 3 者複合体構造²⁵⁾ からも支持されている (図 5). ここで用いられた抗 Met 抗体 (onartuzumab) は細胞上で Met のシグナリングを阻

害するが、HGF-SPとMetの結合を直接競合的にブロックする訳ではない(もしそうならそもそもこの3者が複合体を形成するはずがない)。したがって、onartuzumabはもう一方の相互作用(つまりHGFのNK1領域とMet)を阻害している可能性が高い。上記の3者構造を見ると、HGF-SPがMetのSemaドメインのブレード2~3の位置に結合するのに対し、抗体はそれとは反対側のブレード5から6あたりに結合しており、このあたりがNK1結合部位である可能性を示唆している。

5. 全体の構造モデルと今後の展望

前述のSAXSとCryo-EMによる低分解能構造からは、NK1のダイマー化同様、HGF全長においてもNK1部分でダイマー化が起こるとされ、HGFとMetが2:2の活性化型複合体をつくるモデルが提唱されている²⁴⁾(図6A)。しかしながら、実際にはMetの細胞外領域すべてを含む断片を用いると、全長HGFとの間には1:1の複合体しかできない²⁴⁾。また、NK1の結合部位についてはMetのIPT3-4のあたりにあるとの報告もあり²⁶⁾、非常に混乱している。さらに、Blundellらは一つのHGF分子内のN末端のNK1領域とC末端のSP領域がそれぞれ異なる二分子のMetにヘパリン依存性に結合し、細胞上でこれを架橋するという、オリゴマー構造モデルを提唱している²⁷⁾(図6B)。同様なヘパリン依存性の相互作用の重要性はFGFとFGFR^{28,29)}などの複数のリガンド・レセプターペアのシグナリングで指摘されているし、事実ヘパリンはNK1によるMetの活性化に必要なのであるが、全長HGFの場合には必須ではないとの報告もあり²²⁾、HGF-Metのシグナリング機構はますます混沌としてしまっている。

そもそも6つのドメインからなる全長のHGFとそのうち2つしか持たないNK1がともにMet活性化能を持つというのは非常に不思議だが、ともにMet結合能とダイマー化能という2つの性質を保持しており、言い換えれば、この2つの能力を持つことが最低限のMetアゴニストとしての条件だということになる。しかし、2つの活性化型HGF分子種がまったく同じシグナルを入れるとは考えにくく、Metと一点でしか結合できないNK1と、少なくとも二点

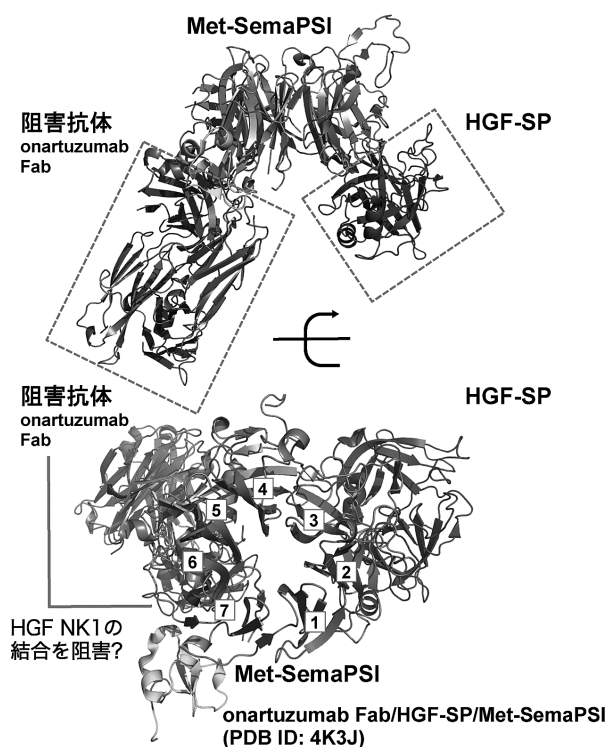


図5 HGF SP-Met-阻害抗体の3者複合体構造
HGF-SP領域/Met-Sema~PSI領域/Fab化阻害抗体 onartuzumabの3者複合体構造(PDB ID 4K3J)。図はPDBファイルよりPymolを用いて作成した。Met Sema領域におけるは7枚のβシート(ブレード1-7)を図示した。HGF-SP領域がMetのSemaドメインのブレード2~3の位置に結合するのに対し、抗体は反対側のブレード5から6のあたりに結合している。

で結合できる全長HGFは、Met活性化シグナルの伝達において異なるメカニズムを有すると考えるのが自然だろう。とくに後者に特有の相互作用であるHGF-SPによるMet-Semaの認識モードは、HGFのホモログであるMSPとMetのホモログであるRon受容体の結晶構造でもほぼ保たれているため³⁰⁾、たんなる結晶化のアーティファクトとは考えられず、かならずや生理的なHGFシグナル伝達において鍵となっているはずである。このように見てくると、全長のtcHGFがどうやってMetと結合してダイマー化を引き起こすのかという疑問は、シグナリング能を持たないscHGFがtcHGFに変換されると何がどう変わるのかという第一の疑問と密接に関連していることがわかる。これまでにscHGFとtcHGFの構造比較は先のGherardiらによるSAXSとCryo-EM

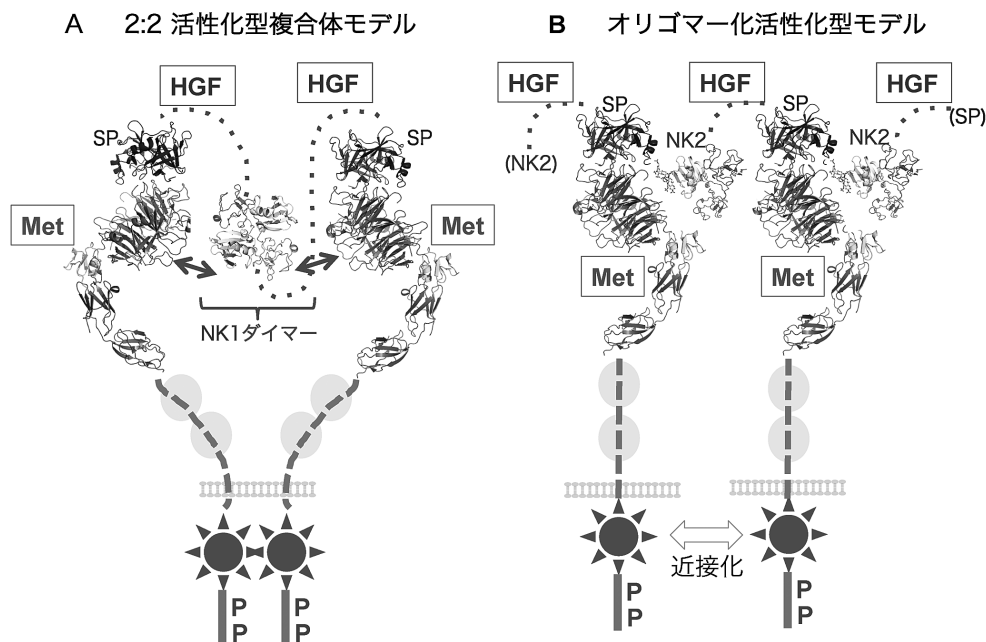


図6 細胞外領域における HGF-Met 結合のモデル図

(A)2:2 活性化型複合体モデルは、文献 24(Gherardi et al. PNAS 2006)を参考に作成。(B)オリゴマー化活性化型モデルは、文献 27(Blaszczuk et al. Prog Biophys Mol Biol 2015)を参考に作成。図中の構造図は、図2および図4で使用した PDB ファイルを元に Pymol で作成した。ヘパリンのモデルは HGF-NK1 構造(PDB ID 1GMO)由来のものを表示した。

による検討しかされて居らず、エビデンスに乏しい構造変化のモデルが提唱されているに過ぎない²⁴⁾。上記の問題を理解するためには、SP 領域を含むより大きな HGF 断片について scHGF と tcHGF の高分解の構造情報取得とその比較が必須である。

これまで構造生物学は多くの生命現象を可視化してきた。しかし、その過程においては蛋白質が精製出来ること、X線結晶構造解析においては結晶化しやすいことなどが条件となるため、ターゲット蛋白質の部分断片などの扱いやすい領域からスタートすることが一般的であった。したがって、全長の蛋白質での解析が遅れ、今回の HGF-Met シグナリングのケースのように全長タンパク質の構造情報が無いために、たとえたくさんの立体構造が解かれていても、そのシグナリング機構を理解できないケースが多く残っているのが現状である。しかし、近年の蛋白質科学および構造生物学分野における技術の発展はめざましく、これまでには得ることが困難であった全長蛋白質の生産や結晶化を可能にし、見るのできなかった生命現象を次々と可視化している。

「HGF はどのように Met レセプターに結合し活性化するのか?」という疑問に対する答えも近いうちに解明されると期待したい。

著者全員の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Donate LE, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S, Blundell TL: Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci* **3**: 2378–2394, 1994.
- 2) Petriani I: Biology of MET: a double life between normal tissue repair and tumor progression. *Ann Transl Med* **3**: 2015.
- 3) Ghiso E, Giordano S: Targeting MET: why, where and how? *Curr Opin Pharmacol* **13**: 511–518, 2013.
- 4) Cui JJ: Targeting receptor tyrosine kinase MET in cancer: small molecule inhibitors and clinical progress. *J Med Chem* **57**: 4427–4453, 2014.
- 5) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**:

- 440–443, 1989.
- 6) Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J: Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**: 239–242, 1987.
 - 7) Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117–1134, 2010.
 - 8) Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W: Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* **149**: 1419–1432, 2000.
 - 9) Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C: Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *EMBO J* **23**: 2325–2335, 2004.
 - 10) Niemann HH, Jäger V, Butler PJ, van den Heuvel J, Schmidt S, Ferraris D, Gherardi E, Heinz DW: Structure of the human receptor tyrosine kinase met in complex with the Listeria invasion protein InlB. *Cell* **130**: 235–246, 2007.
 - 11) Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BG, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC: The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep* **1**: 185–190, 2012.
 - 12) Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC: Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **281**: 1662–1665, 1998.
 - 13) Kirchhofer D, Yao X, Peek M, Eigenbrot C, Lipari MT, Billeci KL, Maun HR, Moran P, Santell L, Wiesmann C, Lazarus RA: Structural and functional basis of the serine protease-like hepatocyte growth factor beta-chain in Met binding and signaling. *J Biol Chem* **279**: 39915–39924, 2004.
 - 14) Graveel CR, Tolbert D, Vande Woude GF: MET: A critical player in tumorigenesis and therapeutic target. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: 1–17, 2013.
 - 15) Lokker NA, Mark MR, Luis EA, Bennett GL, Robbins KA, Baker JB, Godowski PJ: Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J* **11**: 2503–2510, 1992.
 - 16) Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, Carafoli F, Kemp L, Butler PJ, Lyon M, Gherardi E: Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *J Mol Biol* **367**: 395–408, 2007.
 - 17) Sigurdardottir AG, Winter A, Sobkowicz A, Fragai M, Chirgadze D, Ascher DB, Blundell TL, Gherardi E: Exploring the chemical space of the lysine-binding pocket of the first kringle domain of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) yields a new class of inhibitors of HGF/SF-MET binding. *Chem Sci* **6**: 6147–6157, 2015.
 - 18) Niemann HH: Structural basis of MET receptor dimerization by the bacterial invasion protein InlB and the HGF/SF splice variant NK1. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* **1834**: 2195–2204, 2013.
 - 19) Ultsch M, Lokker NA, Godowski PJ, de Vos AM: Crystal structure of the NK1 fragment of human hepatocyte growth factor at 2.0 Å resolution. *Structure* **6**: 1383–1393, 1998.
 - 20) Chirgadze DY, Hepple JP, Zhou H, Byrd RA, Blundell TL, Gherardi E: Crystal structure of the NK1 fragment of HGF/SF suggests a novel mode for growth factor dimerization and receptor binding. *Nat Struct Biol* **6**: 72–79, 1999.
 - 21) Lietha D, Chirgadze DY, Mulloy B, Blundell TL, Gherardi E: Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor. *EMBO J* **20**: 5543–5555, 2001.
 - 22) Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, Kahn DW, Hillan KJ, Bauer KD, Zioncheck TF: Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* **133**: 709–718, 1996.
 - 23) Tolbert WD, Daugherty-Holtrop J, Gherardi E, Vande Woude G, Xu HE: Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 13264–13269, 2010.
 - 24) Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, Miguel RN, Blundell TL, Vande Woude GF, Skoglund U, Svergun DI: Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4046–4051, 2006.
 - 25) Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M, Huang A, Yang NY, Nishimura M, Greve J, Santell L, Zhang YW, Su Y, Kaufman DW, Billeci KL, Mai E, Moffat B, Lim A, Duenas ET, Phillips HS, Xiang H, Young JC, Vande Woude GF, Dennis MS, Reilly DE, Schwall RH, Starovasnik MA, Lazarus RA, Yansura DG: Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: E2987–2996, 2013.
 - 26) Basilico C, Arnesano A, Galluzzo M, Comoglio PM, Michieli P: A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *J Biol Chem* **283**: 21267–21277, 2008.
 - 27) Blaszczyk M, Harmer NJ, Chirgadze DY, Ascher DB, Blundell TL: Achieving high signal-to-noise in cell regulatory systems: Spatial organization of multiprotein transmembrane assemblies of FGFR and MET receptors. *Prog Biophys Mol Biol* **118**: 103–111, 2015.
 - 28) Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M: Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* **6**: 743–750, 2000.
 - 29) Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL: Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* **407**: 1029–1034, 2000.
 - 30) Chao KL, Gorlatova NV, Eisenstein E, Herzberg O: Structural basis for the binding specificity of human RON receptor tyrosine kinase to macrophage stimulating protein. *J Biol Chem* **289**: 29948–29960, 2014.