

データベースの構築と3次元構造活性相関に関する研究

分担研究者 神沼 二真 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部

研究要旨

内分泌かく乱に関わる化学物質と生体系分子との相互作用実験について参照、比較、解析するためのデータベースを開発した。われわれは、この開発過程で蓄積された知見を活用して3次元構造活性相関の研究を行い、（プレ）スクリーニング試験を補う理論予測法の開発を目指す。本年度はその基盤計算として、ダイオキシン類と内分泌かく乱候補物質の構造解析を行った。現在、候補物質とエストロゲン受容体、および Transthyretin との結合モデルについて検討している。

A. 研究目的

内分泌かく乱に関わる化学物質と生体系分子との相互作用（とくに結合）実験を相互に参照、比較、解析するための基盤となるデータベースを開発する。また、この開発過程で蓄積された知見を活用して、3次元構造活性相関の研究を行う。こうしたデータベースや理論手法の開発は実験研究とは相補的な関係にあり、実験研究の相互の比較や（プレ）スクリーニング試験を補う理論予測法開発の基盤となることが期待される。

B. 研究方法

我々はすでに、内分泌攪乱物質の候補物質、関連物質、参照物質に関するリストを、天然のホルモン、医薬品、植物エストロゲン、農薬、工業化学品、金属、環境中の汚染物質などカテゴリーに分けて作成してきた。

一方で生体外からの化学物質が生体にどのような作用を及ぼすかを分子レベルで解析、予測するために、一般的な受容体データベース、細胞信号伝達系データベース(CSNDB)

を開発し、これに共同研究者であるドイツの E.Wingender らの転写因子のデータベース (TRANSFAC)を連結し、これらをインターネット上で利用可能な各種の遺伝情報、生体分子情報、代謝データベースなどとリンクした複合システムを開発してきた。

これらの既開発の情報基盤をベースとして、内分泌かく乱作用に関係している生体内のリガンドと標的分子との結合に関する実験データを整理してデータベース化する。この際、各種の試験法の多様性に対応して、生物種差、系統株の違い、個体差（遺伝的多型）に配慮してデータを集める。さらに各種の分子モデリング手法を用いて、この結合の組み合わせごとの、分子の3次元相互作用モデルを検討する。ここで、計算法としては商品化されているパッケージソフトだけでなく、現在別プロジェクトとして開発中の精密な分子計算法 (ab initio ペア近似法) も用いる。

(1) 内分泌かく乱化学物質の作用ごとに、生体分子との結合実験のデータを収集し、データベース化する。

(2) 3次元構造活性相関研究に関しては、受容体構造が一部解析されているエストロゲンとリガンドとの結合モデルと、受容体の3次元構造が未知のダイオキシン類の構造と機能を検討する。

C. 研究結果および考察

1. 現在までの進捗状況

文献調査により、内分泌かく乱化学物質の候補物質（約150物質）をリストアップし、現在このリストをもとに、構造と機能を考慮したパラダイム化合物のデータベース(EDSD)を開発しており、ここには物質の識別情報、分子式、構造式、3次元座標、物理化学的性質、生物作用、暴露情報などを収録している。これらに基づき相互作用（結合）実験データベースのプロトタイプをACCESSを用いて開発した。また、分子軌道法（Gaussian94）によりダイオキシン類の精密な3次元構造を求めた。また、エストロゲン受容体の3次元構造を分子モデリングで吟味した。さらに、甲状腺ホルモン（T4）と血液中のタンパク質（Transthyretin）との結合のモデリングの準備を進めている。

2. 開発中のシステム全体の概念

本研究も含めて、開発している内分泌かく乱化学物質に関連した情報システムは、図1の如くである。このうち今年度は相互作用データベースの開発と、超高速コンピュータを用いた *ab initio* 分子軌道法による構成生成計算と、リガンド受容体結合解析を行った。

3. 相互作用データベースの開発

相互作用データベースは、内分泌かく乱化学物質が何らかの標的生体分子と相互作用し、その結果が信号伝達されるという、因果関係を基本に考えている。本データベースは、理論および実験家を含めた研究者のために、内分泌かく乱化学物質（リガンド）と生体分子（受容体）との相互作用に関し、とくに結

合の強さ（Binding Affinity）の詳細情報を提供することを目的とする。

[データの収集方法]

内分泌かく乱（候補）物質、ないし内分泌かく乱作用の最初の標的となる生体物質とくに受容体をキーワードとして PubMed 上で検索し、検索結果の中から、結合実験から得られた測定値を報告している文献を選出した。
[データ構造]

データベースは5つの主要なテーブルから構成されている。このうち2テーブルは2種の作用モード「競合阻害活性」、「転写活性」ごとに結合実験の条件と結合値を格納するために用いる。残りの3テーブルには「リガンド」、「受容体」、「文献」に関する情報が格納される。この他にこれらのテーブル間の関係を規定する8テーブルを定義し、全部で13テーブルを管理する。表1に「競争阻害活性」モードを表す結合実験テーブルの属性を例示する。

報告される実験データは、生物種、反応系、観測系が各々異なる。多数の実験結果を横断的に評価する為には、これらの条件の標準化が必要となるので、実験値を格納する際には、その値を導出した実験の条件を併せて格納することとした。

[システム構成]

データベース管理システムとしてACCESSを用いた。ユーザインターフェースはVisual Basicで作成した。ユーザインターフェースは「リガンド」、「受容体」、「文献」の3テーブルについてアクセスできるように設計した。

[結果]

ユーザは「リガンド」、「受容体」、「文献」テーブルに格納されたレコードについて、ワイルドカードを用いた問い合わせを行える。検索結果として得られたレコードのひとつを選択すると、そのレコードに関する実験データが表示される。更にユーザインターフェー

スからは、リガンドと受容体の組み合わせに基づく検索ができる。例えばリガンドが「e*」で始まる分子と、受容体が「er*」で始まる分子が結合するような結合実験の検索ができる。実験データの出力ウィンドでは、実験テーブルのタグを切り替えることで、同一のリガンドに関する2種の作用モードに対する実験結果をブラウズできる。個々の実験レコードが参照する文献は、ウィンドウ内の「Reference」ボタンにリンクしている。「リガンド」テーブルに格納されたEDSDレコードは、パラダイム化合物のデータベース(EDSD)にハイパーテキストリンクしているので、マウスでクリックすることにより、EDSDの該当するレコードへWWWを介して移動する。同様に「受容体」テーブルに格納されたRDBレコードは、受容体データベース(RDB)にハイパーテキストリンクしている。

現在13の論文により、151の実験レコードを格納している。

基本的なアプローチ

内分泌かく乱化学物質は、それ自身も、またその作用メカニズムも多様であるため、いわゆる統計解析手法を基礎として構造活性相関の手法を、内分泌かく乱化学物質(候補)全体に適用することはできない。そこで我々はまず、我々が作成した内分泌かく乱化学物質のリストと構造作用データベースと相互作用データベースを参照しながら、相互作用メカニズムが分子の3次元構造から解析できる3つのケースを研究の対象とした。この3つのケースとは、

(1) 受容体の3次元構造は未知であるが、リガンドとその作用データが比較的蓄積されている、Ahレセプターとダイオキシン類の構造と活性、

(2) 3次元構造の一部が解析されているエストロゲン受容体のモデリングとそのリ

ガンドとの結合、

(3) 3次元構造が決定されている、甲状腺ホルモン(T4)と結合する血液中のタンパク質(Transthyretin)である。これらについて、並行してモデリングを進めている。以下それぞれの研究について述べる。

ダイオキシン類の構造解析

ダイオキシン類の中で毒性が強いと考えられ、2,3,7,8-TCDDの毒性を1としたときの相対的な毒性の強さを表す毒性等価指数(Toxic Equivalency Factors, TEFs)が設定されている29化合物について、非経験的分子軌道法による構造最適化計算を行い、得られた波動関数から3次元静電ポテンシャルマップを作成し、検討を行った。構造最適化には、Gaussian 94プログラムを使用した。得られた構造のもとで、Gaussian 98 for Windowsを使用し、HF/3-21G計算で静電ポテンシャルを計算した。静電ポテンシャルマップの作成には、AVS Chemistry Viewerを使用した。構造最適化計算および静電ポテンシャルマップの作成には、科学技術振興事業団のJST複合スーパーコンピュータシステムを利用した。得られた静電ポテンシャルマップから、ダイオキシン類とAhレセプターとの相互作用には、塩素原子の位置の違いによる、疎水性相互作用の差が重要であることが示唆された。

エストロゲン受容体とその結合

エストロゲン受容体に結合する内分泌かく乱候補物質につき、パッケージソフトであるChem3D Proを用い、その中の分子力場MM2を用いた初期構造を生成し、これを非経験的分子軌道法計算のパッケージソフトであるGaussian 94によって最適化した。ここで、軌道関数としてはHF/6-31G*を用いた。さらに、この計算で生成された電子密度を用いてリガンド化合物分子の静電ポテンシャルを計算し、等電面を立体的に表現する図を作成した。現在、この図を用いてレセプタ

一側の認識部位を推定することを試みている

またエストロゲン受容体のリガンド結合部位については、 17β -エストラジオールとラロキシフェンとの複合体の X 線結晶解析構造が発表されており、これらの構造を用いて、内分泌かく乱候補物質とエストロゲン受容体との結合定数の計算を行っている。リガンド結合部位の実験構造には、ディスオーダーにより構造がわかっていない部分があるため、Insight II の Search/Loop, Splice/Loop 機能およびホモロジーモデリング機能を用いて推測を行っている。結合定数の計算には Insight II/ CHARMm を用い、分子動力学計算を行う予定である。さらに、現在開発中の ab initio ペア近似法プログラム ABINIT-*P* を用い、リガンド結合部位のファーマコフォアとリガンドとの相互作用の詳細な解析を予定している。

Transthyretin との結合モデル

現在甲状腺ホルモンと血中結合タンパク質について、Insight II/ CHARMm を用いた分子動力学計算を行い、結合定数の予測を行っている。今後はダイオキシン類と血中結合タンパク質について同様に計算を行い、ダイオキシン類の体内動態について検討を行なう予定である。

類似性の判定

我々が目標としているのは、未知な化合物が与えられたときその内分泌かく乱性のある程度判定することである。その方法としては、まず図 1 で示されているように、パラダイム化合物とのマッチングでどのカテゴリー（クラス）に属するかを判定し、つぎに相互作用データを利用して、既知の内分泌かく乱化学物質との類似性を判定するという、2 段階の方式である。この方式の検討は次年度以後行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takako Takai-Igarashi, Yoko Nadaoka, and Tsuguchika Kaminuma, A database for cell signaling networks, *Journal of computational biology*, 5, 747-754, 1998

Nakata K, Takai T and Kaminuma T: Development of The Receptor Database: Application to the Endocrine Disruptor Problem (BIOINFORMATICS in press).

2. 学会発表

- ・神沼二眞、中田琴子、中野達也、高井貴子：内分泌攪乱物質研究を支援する情報計算基盤の概念について、第 21 回情報化学討論会、第 26 回構造活性相関シンポジウム
- ・中田琴子、中野達也、神沼二眞：エストロジェン受容体のモデリング、タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ、1998 年 12 月 8, 9 日、早稲田国際会議場
- ・神沼二眞、中田琴子、中野達也、高井貴子、情報化学討論会内分泌攪乱物質（環境ホルモン）研究を支援する情報計算基盤の概念について
- ・神沼二眞、中田琴子、中野達也、高井貴子、山本 都、内分泌攪乱物質研究支援環境の構築、内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム、日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、国立京都国際会館、1998 年 12 月 11 日～12 日
- ・山本都、森田真理子、中野達也、神沼二眞、農薬の内分泌攪乱作用に関する文献調査と解析、内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム、日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、国立京都国際会館、1998 年 12 月 11 日～12 日

- ・ 中田琴子、高井貴子、神沼二真、受容体データベース：内分泌かく乱への応用、内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム、日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、国立京都国際会館、1998年12月11日～12日
- ・ 高井 貴子、長谷川 式子、神沼 二真、内分泌攪乱物質に関する生体作用データベース、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp58-61, 1998年11月10-11日、東京
- ・ 神沼二真、中田琴子、中野達也、高井貴子、内分泌攪乱物質（環境ホルモン）研究を支援する情報計算基盤の概念について、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp90-93, (1998.11 東京)
- ・ 中野達也、小谷野和郎、大竹千代子、山本 都、長谷川式子、瀧 明子、山本美智子、神沼二真、内分泌攪乱物質の構造データベースの開発、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp94-97, (1998.11 東京)
- ・ 中野達也、高井貴子、中田琴子、神沼二真、内分泌攪乱物質と生体との相互作用を記述するためのインターフェイスの開発、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp62-63, (1998.11 東京)
- ・ 小谷野和郎、中野達也、神沼二真、ダイオキシン類の毒性の分子計算による解析、第26回構造活性相関シンポジウム