

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

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 二眞 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との相互作用実験を相互に参照、比較、解析するためのデータベースを開発し、それに基づき3次元構造活性相関の基礎となる研究を行う。本年度はインターネットからデータベースにアクセスできるインターフェースを開発し、研究班内で利用を公開した。3次元構造活性相関については、エストロゲン受容体と甲状腺ホルモン結合タンパク質に焦点を絞って、分子動力学計算による結合定数の予測を進めている。

1. 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。

2. 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の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)、ロシアの N. Kolchakov らの転写領域についてのデータベース (TRRD) 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手法（フラグメント分子軌道法）も用いる。

3. 年次計画

平成 10 年

- (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。

平成 11 年

- (1) 相互作用データベースのデータ内容と機能を充実する。また、スタンドアロンシステムである現在のデータベースを、インターネットで利用可能なようにして公開する。

- (2) エストロゲン受容体とダイオキシン類に関するモデリングを進めるとともに、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を行う。

平成 12 年

- (1) 相互作用データベースの内容を充実する。
(2) 内分泌かく乱化学物質と生体分子との結合の 3 次元モデリング研究を続ける。

4. 結果

4.1. 現在までの進捗状況

われわれはこの研究に着手する前に、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、このリストをもとに、これに化合物の識別情報、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たパラダイム化合物のデータベース(EDSD)を開発している。これらのリストを参照しながら、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)によりパラダイム化合物の精密な 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)との結合計算モデルを作成した。

4.2. Binding Affinity データベースの開発

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)と標的生体分子(受容体)との結合実験データを整理、格納して、検索に供することを目的としている。

昨年度は、データベース構造のデザインを行い、ACCESS 上に小規模のデータベースを開発した。本年度は格納データ数を大幅に更新した。同時に、異なる実験から得られた測定値を相互に比較可能とするために、相対的な結合値(Relative Binding Affinity:RBA 値)を導入した。更にインターネットから検索できるよう

に、Web インターフェースを開発した。

来年度は、RBA 値を構造活性相関研究に応用する予定である。

[データ数の更新]

昨年度は 13 の論文を情報源として、151 の実験レコードを格納した。本年は更に 20 の文献を調査して 967 レコードを追加した。この結果、現在は 1,118 レコードが格納されている。このうち結合阻害実験は 742 件、酵素誘導実験は 376 件である。文献検索では、PubMed を用いた。

[データ構造の更新]

本データベースは、異なる文献で報告された実験結果について、化合物名をキーワードとして横断的に検索できることが特徴である。このような機能は、内分泌かく乱作用が疑われる化合物の性質を一覧する為に、たいへん便利に利用できる。しかし、異なる文献で報告された実験結果については、実験系が異なるために、各々の測定値を直接比較できないという問題があった。この問題に関して、Bolger ら(Bolger et al., 1998)は相対的結合値(Relative Binding Affinity:RBA 値)の利用を提唱している。そこで我々も RBA 値を導入することにした。

RBA 値とは、対象とする受容体の生体内リガンドの IC50 値を 100 とした時の、それ以外の化合物の相対的な IC50 値であり、下記の式で計算される。

$$RBA = (IC_{50}/IC_{50} \text{ of E2}) \times 100$$

受容体が estrogen receptor の場合は、基準となる化合物はエストラジオールとした。受容体が Ah receptor の場合は、生体内リガンドが未知であるので、その実験でコントロールとして用いられている化合物(2378-TCDD)を基準とした。Aromatase の場合は androstenedione を基準とした。このようにして全体で約 120 個の RBA 値を追加した。

[システム構成の変更]

昨年度開発したシステムは、ネットワーク対応でなかったため、本年はインターネットを介

してデータベースにアクセスできるように、Web インターフェースを開発した。インターフェースは Microsoft Active Server Page を用いた。本データベースは、結合値の他に、生物種、反応系、観測系といった、さまざまな実験条件についても格納しており、これらの情報をキーワードとしても検索できることが特徴である。現時点で検索可能な情報は、Mode of Action (結合阻害実験か酵素誘導実験か)、化合物名、受容体名、生物種、反応系、実験方法、測定方法、観測方法である。全てのエントリーは、それが参照している文献名を介して、米国の文献データベース PubMed にハイパーテキストリンクされており、その場で文献のアブストラクトが参照できる。

[結果]

Binding Affinity Database はすでに試験的に公開されており、下記の URL からアクセスできる。

<http://hse.nihs.go.jp/eddb/afdb/>

ただし利用については、登録者制度を取っている。これは将来ユーザとの間で意見交換を行い、システムの発展に役立てるためである。インターネットからの利用の検索画面と検索結果を図 1 と図 2 に示す。これは“e”で始める受容体と“ta”で始まる化合物との間の結合阻害実験で、ヒトにおける実験結果であり、EC50 値を測定している実験のみを検索した結果である。結果は表として表示される。現在、このデータベースを我々が別に開発している受容体のデータベースと連携することを試みている。(参考文献: Bolger, R. et al., Environ Health Perspect. (1998) 106, 551-7.)

4.4. 3次元構造活性相関

4.4.1. 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に基礎をおく伝統的な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。昨年度はこれらについて、並行してモデリングを進めたが、本年は特に(2)と(3)に焦点を絞って研究を行った。

4.4.2. 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 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、計算方法としては 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ー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、リガンドとの複合体の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。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、現在開発中のフラグメント分子軌道法プログラム ABINIT-MP 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。

4.4.3. 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。

5. 業績目録

(学会発表)

- Kotoko Nakata, Tatsuya Nakano and Tsuguchika Kaminuma: Application of the Receptor Database (RDB) to the Endocrine Disruptor Problem. The 2nd International Workshop on Advanced Genomics. Chiba, 27-28, April 1999
- Tsuguchika Kaminuma, Takako Takai-Igarashi, Tatsuya Nakano, and Kotoko Nakata: Information and Computing Infrastructure for Endocrine Disruptors, Current Status and Strategy on Endocrine Disruptors, 1999, Korea Food and Drug Administration, Korea, 17 June 1999
- Tsuguchika Kaminuma, Takako Takai-Igarashi, Tatsuya Nakano, and Kotoko Nakata: Modeling of Signaling Pathways for Endocrine Disruptors, Indianapolis, U.S.A., August 1999
- Kotoko Nakata, Tatsuya Nakano and Tsuguchika Kaminuma: Hormone Receptors in the Receptor Database (RDB), XIII International Biophysics Congress. New Delhi, India, 19-24 September 1999
- Kotoko Nakata, Takako Takai and Tsuguchika Kaminuma: Receptor Database (RDB) in 1999, Genome Informatics 1999, Tokyo, 14-15, December 1999
- 神沼二真、中野達也、高井貴子、大竹千代子、瀧明子、山本美智子、山本都、長谷川式子、小峰 啓、中田 琴子、内分泌かく乱物質のデータ知識ベース、第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム (1999.10-21-22、

名古屋)

- 神沼二真、中田琴子、中野達也、高井貴子、山本都、大竹千代子、瀧明子、山本美智子、長谷川式子、小峰啓、内分泌かく乱物質研究の情報計算基盤の構築、日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会)、(1999.12.9-10 神戸)
- 中田琴子、中野達也、高井貴子、神沼二真：内分泌攪乱化学物質と受容体データベース、日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会)、(1999.12.9-10 神戸)
- 神沼二真、ゲノム研究の医薬品適正使用へのインパクト、日本薬学会 1120 年会シンポジウム (2000.3.28 岐阜)
- 中野達也、神沼二真、上林正巳、佐藤智之、秋山泰、北浦和夫：Ab initio ペア近似法による分子計算プログラムの開発、1999 計算化学討論会 (1999.5 東京)
- 中野達也、神沼二真、上林正巳、佐藤智之、秋山泰、北浦和夫：Ab initio ペア近似法による巨大分子計算プログラムの開発、分子構造総合討論会 (1999.9 大阪)
- 中野達也、神沼二真、上林正巳、佐藤智之、秋山泰、北浦和夫、Ab initio ペア近似法による巨大分子計算プログラムの開発、第 22 回情報化学討論会 (1999.11.10-12 米沢)

(論文発表)

- Kotoko Nakata, Takako Takai and Tsuguchika Kaminuma: Development of A Receptor Database: Application to the Endocrine Disruptor Problem. Bioinformatics, vol.15, pp.544-552 (1999)
- Tsuguchika Kaminuma, Takako Takai-Igarashi, Tatsuya Nakano, and Kotoko Nakata, Modeling of Signaling Pathways for Endocrine Disruptors, BioSystems, (2000), in press.
- K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, and M. Uebayasi: Pair Interaction Molecular Orbital Method: An Approximate Computational Method for Molecular Interactions, Chem. Phys. Letters, vol. 312, pp.319 (1999)
- K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, and M. Uebayasi: Fragment Molecular Orbital Method:

- An Approximation Computational Method for Large Molecules, Chem. Phys. Letters, vol.313, pp.701 (1999)
- ・ T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayasi, and K. Kitaura: Fragment Molecular Orbital: Application to polypeptides Chem. Phys. Letters, in press.
 - ・ 神沼二眞：内分泌かく乱化学物質リストの波紋、食品衛生学雑誌 Vol. 40, No.5, pp-374-377 (1999)
 - ・ 神沼二眞、国際協力による化学物質安全性情報提供事業、化学物質と環境 (1999)
 - ・ 神沼二眞：内分泌攪乱化学物質問題へのコンピュータの役割、資源環境対策 Vol135, No.11, pp.16-21 (1999)

Binding - Microsoft Internet Explorer

Mode of Action

☒ Competitive Binding ☐ Enzyme Induction

Ligand and Receptor

Type in a box or click HELP to find out proper words.

Biological Molecule; Receptor or Induced Enzyme

Ex HELP

Xenobiotic Chemical

IC₅₀ HELP

Species (Default is all species)

☐ All ☒ Human ☐ Mouse ☐ Rat

Experimental Conditions

Type in a box or click HELP to find out proper words.

Reaction Mixture HELP

Method HELP

Measurement EC50 HELP

Detection HELP

図 1. インターネットからアクセスした Binding Affinity Database の検索画面。

http://pcml.nhs.co.uk/bdb/chan3a.p - Microsoft Internet Explorer

Binding Affinity Database Query Results

This database is developed by bioinformatics group of NHS. Any comments should be sent to taka@nhs.co.jp.

[Explanation](#) for Database Fields Names. [New Search](#)

Competitive Binding Experiments

RECEPTOR	CHEMICAL	SPECIES	CELL	REACTION	METHOD	ENDMOL	MEASUREMENT	UN
ER alpha	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM
ER alpha	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM
ER alpha	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM
ER alpha	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM
ER beta	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM
ER beta	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM
ER beta	tamoxifen	human	293 kidney epithelial cell (transfected)	ERalpha and ERbeta extract	competitive receptor binding assay	E2	EC50	nM

図 2. インターネットを介したデータベースの検索結果の例。