

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

トキシコプロテオミクス:ABCトランスポーターの  
遺伝子発現と薬物相互作用の解析に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 石川 智久

平成15(2003)年4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
トキシコプロテオミクス：ABCトランスポーターの遺伝子発現と薬物相互作用 の解析に関する研究	..... 1
石川 智久	
II. 分担研究報告	
1. ABCトランスポーターの医薬品、化学物質に対する 薬物相互作用スクリーニング	..... 6
石川 智久	
2. 薬物トランスポーターの遺伝子発現プロファイリング	..... 10
油谷 浩幸	
3. 医薬品・化学物質のデータベース化	..... 17
中田 琴子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 21

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進等研究事業）

総括研究報告書

トキシコプロテオミクス：ABCトランスポーターの遺伝子発現と薬物相互作用の解析に関する研究

主任研究者 石川智久 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授

研究要旨

ABCトランスポーターの基質特異性および薬物相互作用解析のハイスループット化をめざし、哺乳類および昆虫細胞発現系と、96ウェルプレートを用いたATPase活性測定の高速スクリーニング系を構築した。また、ヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行った。ヒト及びマウスのゲノム配列の探索により、データベース化を行い、ヒトの40種類以上の正常組織あるいは細胞、30種類の癌細胞株について40,000遺伝子の発現プロファイルをデータベース化した。さらに、医薬品や化学物質に対する体内標的（受容体、酵素、トランスポーター等）の特異性を究明する一方、トランスポーターに関するデータを収集/整理したデータベースの開発とSNPと疾患との関連情報の収集に着手した。

分担研究者

石川智久	東京工業大学 大学院生 教授 命理工学研究科
油谷浩幸	東京大学 国際産学共同 教授 研究センター
中田琴子	国立医薬品食品衛生研究 室長 所

の観点から薬物の副作用を予測する技術を開発することに目標をおく。具体的には：（1）ヒト組織に特異的に発現する薬物トランスポーターの定量的発現プロファイリングを行う。またヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行い、転写制御因子を予測する。（2）薬物輸送に関与するヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニングと発現プロファイリングに基づき、ヒト組織における薬物相互作用を予測する。（3）既存の医薬品および化学物質に対する薬物トランスポーターの基質特異性をデータベース化し、薬物相互作用の予測プログラムを開発する。

A. 研究目的

薬物代謝物を迅速に細胞外へ排泄することは、薬物の副作用を低下させる上で非常に重要である。またさらに薬物輸送過程での薬物相互作用や薬物による遺伝子発現誘導を回避する分子デザインも創薬戦略の1つであると考えられる。近年になって、数多くの薬物トランスポーターが小腸や腎臓の上皮細胞、肝細胞、脳血管内皮細胞に発現し、薬物の輸送に関与していることが明らかになってきた。薬物トランスポーターの基質特異性とその薬物動態上の意義を定量的に解析する事は、ポストゲノム時代における合理的な創薬分子設計戦略と副作用の低下（安全性の向上）に大きく貢献するものと考えられる。本研究プロジェクトは、薬物トランスポーター

B. 研究方法

薬物トランスポーターの基質スクリーニング  
(石川分担) ABCトランスポーター cDNAをBAC-TO-BACバキュロウイルス発現系を用いて、それぞれ昆虫細胞に発現させる。cDNAをpFASTBACに組み込み、DH10Bacへ導入して組み換えBacmid DNAを作成する。Sf9昆虫細胞にその

Bacmid DNAを導入して、それぞれのcDNAを含むバキュロウイルスを誘導し、Sf9細胞に感染させる。発現したSf9細胞の形質膜を用いて、基質スクリーニングを行う。また一方、pcDNA3.1ベクターを用いて、HEK293等の哺乳類細胞にもABCトランスポーター cDNAを発現させて、昆虫細胞で得られた結果と比較検討する。またヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行う。

薬物トランスポーター発現解析用マイクロアレイ (油谷分担) トランスポーター遺伝子の臓器特異的な発現プロファイルおよび薬剤投与時や種々の病態に際しての発現の変動をモニタリングするために、電極上にプローブを配置した高感度な三次元マイクロアレイシステムを用いてDNAチップの作成を行う。選択的スプライシング産物についても特異的なプローブ配列をデザインすることにより検出が可能である。アレイを用いて輸送蛋白遺伝子以外に代謝酵素などの薬物動態関連遺伝子についても解析する。

既存の医薬品および化学物質に対する基質特異性および薬物相互作用データベースの作成 (中田分担) 医薬品や毒性研究の情報基盤整備のために、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポーターに関する種々のデータを収集整理してデータベース化している。それをさらに発展させて、医薬品/化学物質と体内標的の構造データ、結合親和性、細胞内信号伝達情報、SNP情報等を含め、体内標的と薬物相互作用解析の基礎データを提供する。

### C. 研究結果

平成14年度、研究代表(石川)グループは、ABCトランスポーターの基質特異性解析のハイスループット化をめざし、昆虫細胞発現系と、96wellプレートを用いたATPase活性測定の高速スクリーニング系のプロトタイプを構築した。それはcell-freeの方法で、ヒトABCトランスポーターの基質特異性を短時間のうちに網羅的に解析するものである。その測定系を用いて、既存の医薬品約50種類(Caチャネル阻害剤、Kチャネル開口剤、ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤、抗癌剤、抗生物質、免疫抑制剤、神経伝達物質等)に関してABC1(P-糖蛋白質)の基質特異性のプロファイリングをおこなった。その結果、Caチャネル阻害剤に対し非常に高い活性が認められ、抗癌剤やステロイド剤に対して中程度の活性が認められた。一方、神経伝達物質に対しては活性が全く認められなかった。血

液脳関門を通してCaチャネル阻害剤の中枢神経系への移行と中枢神経系での副作用をABC1(P-糖蛋白質)が抑止しているものと考えられ、本スクリーニング系の副作用予測への有用性が確認された。また、ABCG2(BCRP)の遺伝子多型による基質特異性の変化を発見し、副作用の個人差に関して新しい知見が得られた。さらに、ヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行い、薬物によるトランスポーター遺伝子の発現誘導との関係を解析する計画である。

油谷グループは、ヒト及びマウスのゲノム配列の探索により、データベース化を行い、ヒトの40種類以上の正常組織あるいは細胞、30種類の癌細胞株について40,000遺伝子の発現プロファイルをデータベース化した。さらに、カンクイザルの肝臓における遺伝子発現プロファイルについて、マイクロアレイによる解析に着手した。

中田グループは医薬品や化学物質に対する体内標的(受容体、酵素、トランスポーター等)の特異性を究明する一方、トランスポーターに関するデータを収集/整理したデータベースの開発とSNPと疾患との関連情報の収集に着手した。

### D. 考察

本研究プロジェクトは、薬物トランスポーターの基質特異性解析、遺伝子発現プロファイリング、医薬品副作用情報とトランスポーター遺伝子データベースとのリンクというユニークなアプローチにより、薬物相互作用の予測プログラムを開発するものである。平成14年度は、その基盤になるテクノロジーの構築と情報収集を行った。

石川グループは薬物トランスポーターの基質特異性を解析する高速スクリーニング系のプロトタイプを構築した。これは、96wellプレートを用いたATPase活性測定の高速スクリーニング系である。ABCトランスポーターの基質特異性解析のハイスループット化をめざす上で、非常に重要な第一歩である。医薬品約50種類に関してABC1(P-糖蛋白質)の基質特異性のプロファイリングをおこなった。今後、試験する医薬品の種類を増やして、基質特異性に関する構造活性相関(SAR)の情報を獲得する計画である。ヒトABC1(P-糖蛋白質)とABCG2(BCRP)のcDNAをクローニングして、Sf9昆虫細胞に発現させた。ABCG2をHEK293細胞(ヒト胎児腎臓細胞)とSf9昆虫細胞に発現させて機能を比較した結果、機能上の

違いは認められなかった。したがって、昆虫細胞にABCトランスポーターを発現させて機能を解析することが妥当であるという確証を得た。昆虫細胞は増殖速度が大きいこと、機能解析するために細胞膜画分を大量に調製することが可能になった。

一方、油谷グループは、薬剤に反応して発現が変化する遺伝子の時系列情報をラットの遺伝子発現プロファイル情報からBL-SOMを用いて分類した。注目する遺伝子に類似する動きをする遺伝子群の抽出が可能であることが判明した。今後は、遺伝子の持つオントロジー情報を付加することと、薬剤の種類を増やすことによってより多くの遺伝子クラスターの抽出が可能と考えられた。しかし、薬剤の種類が増え、遺伝子、時間と多次元のデータを処理するには、新しいアルゴリズムの開発が必要とされる。それは、初期状態で配置される遺伝子クラスターが薬の種類で異なる位置に置かれるためである。このことから、新規アルゴリズム開発を引き続き行っていく。加えて、よりヒトに近縁であるカニクイザルアレイの開発を進める。アレイの信頼性確認の実証実験を行うほか、続いてカニクイザル由来の肝細胞に薬物を加えて時系列の遺伝子発現プロファイルを得る。上記データとラットのデータを比較し、トランスポーター遺伝子を含めた薬剤応答性に関連した遺伝子発現について、霊長類とげっ歯類の異同について検討を進める予定である。

中田研究グループでは、数年前から医薬品や毒性研究のための基盤を整備してきている。医薬品データベースのデジタル化 (Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals: <http://moldb.nihs.go.jp/jan/Default.htm>) や内分泌かく乱物質構造データベース開発、受容体データベース (RDB: <http://impact.nihs.go.jp/RDB.html>) や細胞内信号伝達データベース (CSNDB)、内分泌かく乱物質のための結合親和性データベース (BADB: <http://moldb.nihs.go.jp/eddb/afdb/>) の開発、また薬物代謝酵素チトクロームP450関連知識ベース (P450 Database for Drug Interactions: <http://moldb.nihs.go.jp/p450/p450db.html>) を開発し公開している。本研究ではチトクロームP450に加えてパラダイマティックな酵素について、代謝マップ、構造データ、信号伝達に関するデータを収集整理した。またトランスポーターデータベースとしては種々のABCトランスポーターについて、構造データやSNP情報、薬との相互作用デー

タを収集整理した。標的トリガンドの結合親和性についてはパラダイマティックな標的トリガンドを選択してデータ収集である。異なる論文中の生物実験データの比較においては実験条件等種々の条件の違いを考慮して相対結合値 (Relative Binding Affinity) や $K_i$ 値を用いた。コンピュータを用いたフラグメントMO法による計算値についても一部の核内受容体以外は、今後の結果が待たれるところである。ただし、現在トランスポータータンパク質の3次元構造データの不足等もあり、薬との相互作用解析は、機能解析データに基づいて今後大きく展開するものと期待される。

## E. 結論

本年度において、薬物トランスポーターの基質スクリーニング系の構築、薬物トランスポーターおよび薬物代謝酵素等の遺伝子発現解析用マイクロアレイの準備、既存の医薬品および化学物質に対する基質特異性および薬物相互作用データベースの作成準備が整った。次年度は、それらの基盤技術に基づいて、薬物相互作用の系統だった解析を行う予定である。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshikawa, M., Yabuuchi, H., Kuroiwa, A., Ikegami, Y., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Matsuda, Y., Yoshida, H., and **Ishikawa, T.** Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter *abcg4*. *Gene*, 293, 67-75, 2002
- 2) Yoshikawa, M., Kasamatsu, S., Yasunaga, M., Wang, G., Ikegami, Y., Yoshida, H., Tarui, S., Yabuuchi, H., **Ishikawa, T.** Dose ABCG2 need a heterodimer partner? Expression and functional evaluation of ABCG2 (Arg482). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17, 130-135, 2002
- 3) Yabuuchi, H., Takayanagi, S., Yoshinaga, K., Taniguchi, N., Aburatani, H., **Ishikawa, T.** ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 410-417, 2002
- 4) Deng, L., Tatebe, S., Lin-Lee, Y.-C., **Ishikawa, T.**, and Kuo, M.T. MDR and MRP Gene families as cellular determinant factors for resistance to

- clinical anticancer agents. In: "Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy" Anderson, B. and Murray, D. (Eds.) Kluwer Academic Publishers, Boston, pp.49-66, 2002
- 5) **Ishikawa, T.** and Yoshikawa, M. ABC transporters: A new approach to toxicogenomics. "Toxicogenomics" Inoue, T. and Pennie, W.D. (Eds.) Springer-Verlag, Tokyo, pp109-114, 2003
  - 6) **Ishikawa, T.** Multidrug Resistance: Genetics of ABC Transporters. In: "Encyclopedia of Human Genome", Nature Publishing Group, in press, 2003
  - 7) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, **Aburatani H.** Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. *Physiol Genomics*. 2003 Jan 7 [epub ahead of print]
  - 8) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, **Aburatani H,** Tsubota K. Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 506(Pt A):673-6
  - 9) Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsushashi N, **Aburatani H.** Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol*. 37 Suppl 14:62-6. 2002
  - 10) Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, **Aburatani H,** Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASES* 8: (5) 330-339. 2002
  - 11) Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, **Aburatani H,** Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol*. 193(3): 299-318. 2002
  - 12) Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, **Aburatani H,** Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, Makuuchi M. Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray1. *Transplantation*. 73(9): 1480-1486. 2002
  - 13) Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, **Aburatani H.** Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Research* 62(1): 233-240, 2002
  - 14) **Nakata, K.,** Takai-Igarashi, T., Nakano, T. and Kaminuma, T. (2002) An Integrated Receptor Database (IRDB). *Data Science Journal*, 1, 140-145.
  - 15) **Nakata, K.** (2002) Theoretical Approach to Endocrine Disruptors. *Frontiers in Bioscience* 7, c68-73
- 総説
- 1) 吉川恵美、池上洋二、藪内光、石川智久、ポストゲノム時代の挑戦；ABCトランスポーターに基づく創薬分子デザイン 化学工業、325-331, 2002
  - 2) 藪内光、石川智久 ヒトゲノム機能解析から創薬へ—ABCトランスポーターに基づく創薬分子デザイン—医学の歩み、201,868-873,2002
  - 3) 石川智久、堀江透 (編集) 創薬サイエンス入門:ポストゲノム時代へのパラダイムシフト 共立出版, 2002
  - 4) 油谷浩幸 DNAチップの医療への応用 *Medicina* 39(3): 444-448 2002
  - 5) 油谷浩幸 遺伝子発現プロファイリング解析による癌の個性診断 医学のあゆみ 201(9) 687-692, 2002
  - 6) 油谷浩幸 がんの機能ゲノミクス解析 埼玉医科大学雑誌 29(1):85-91, 2002
  - 7) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来について *MEDICAL CORNER* 111(3) : 4-7, 2002
  - 8) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来 *総合臨床* 51(10):2901-2, 2002
  - 9) **Aburatani H.** Understanding cancer through gene expression profiling. (review) *International Congress Series* 1246: 261-270, 2002
2. 学会発表
- 1) **Ishikawa, T.** AACR 93rd Annual Meeting "Substrate specificity of ABCG2 (BCRP) toward new CPT analogues" (2002.04.07-11 San Francisco, USA)

- 2) **Ishikawa, T.** The 1<sup>st</sup> JBS Bio-frontier symposium “Membrane Transporter: Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter- “ABC Transporters : A New Approach to Toxicogenomics” (2002.06.09-11湯布院)
- 3) **Ishikawa, T.** 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations “Human ABC Transporters:Pharmacogenomic and Toxicogenomic Aspects ” (2002.07.22-26 札幌)
- 4) **Ishikawa, T.** 15th Conference on Combinatorial Chemistry, Japan “A New Challenge in the Post-Genome Era: Transport Mechanism-Based Drug Design Strategy” (2002.09.18-19 川崎)
- 5) 石川智久 第29回日本トキシコロジー学会学術年会 “薬物代謝から見たトキシコゲノミクス:トランスポーターの役割” (2002.06.18-20 名古屋)
- 6) 石川智久 CBI学会第3回大会 “ヒトABCトランスポーター遺伝子のデータベース構築” (2002.09.18-20 東京)
- 7) 石川智久 第17回薬物動態学会年会 シンポジウム” ヒトABCトランスポーター:ゲノム解析からデータベース構築、機能解析スクリーニング、創薬分子デザインまで” (2002.11.20-22千葉)
- 8) 石川智久 第3回知識科学シンポジウム “ゲノム創薬の企業戦略とバイオインフォマティクス” (2002.11.27 東京)
- 9) 油谷浩幸 The 3rd Cherry blossom symposium. “Cancer Classification by Gene Expression Profiling.”
- 10) 油谷浩幸 第3回Sun Bioinformatics セミナー「トランスクリプトーム解析のための生命情報の統合 システム生物医学へ 」
- 11) 油谷浩幸 第34回日本臨床検査自動化学会特別企画講演「システム生物医学へのパラダイムシフト トランスクリプトームからの疾病解析 」
- 12) 油谷浩幸 第61回日本癌学会総会シンポジウム「ゲノム科学とがん研究」トランスクリプトーム解析からがんのシステム生物学へ
- 13) 油谷浩幸 Toxicogenomics International Forum 2002, “Understanding cancer through gene expression profiling”
- 14) 油谷浩幸 Rad-genomics 「発現プロファイル解析と疾病研究」
- 15) 油谷浩幸 学術創成研究第4回シンポジウム「高感度DNAマイクロアレイによる遺伝子機能解析」
- 16) **Nakata, K.,** Tokunaga, M., Nakano, T. and Kaminuma, T.: A Paradigmatic Drug Target Database. Biophysical Society 47<sup>th</sup> Annual Meeting (San Antonio, March 2003)
- 17) 中田琴子、徳永雅彦、愛澤昌宏、中野達也、中野達也、神沼真二:核内受容体に結合する薬の標的知識ベース、CBI学会第3回年会(東京、2002年9月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進等研究事業）

（分担研究報告書）

ABCトランスポーターの医薬品、化学物質に対する薬物相互作用スクリーニングに関する研究

分担研究者 石川智久 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授

## 研究要旨

ABCトランスポーターの基質特異性解析と薬物相互作用のハイスループット化をめざし、哺乳類および昆虫細胞発現系と、96ウェルプレートを用いたATPase活性測定の高速スクリーニング系のプロトタイプを構築した。また、アミノ酸変異をもつABCトランスポーターに関して、遺伝子多型と機能（基質特異性）との関係を解明することもできるようになった。さらに、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点5 kb上流のプロモーター解析を行い、薬物によるヒトABCトランスポーターの遺伝子発現調節を解明することに着手した。

## A. 研究目的

薬物代謝物を迅速に細胞外へ排泄することは、薬物の副作用を低下させる上で非常に重要である。またさらに薬物輸送過程での薬物相互作用や薬物による遺伝子発現誘導を回避する分子デザインも創薬戦略の1つであると考えられる。近年になって、数多くの薬物トランスポーターが小腸や腎臓の上皮細胞、肝細胞、脳血管内皮細胞に発現し、薬物の輸送に関与していることが明らかになってきた。薬物トランスポーターの基質特異性とその薬物動態上の意義を定量的に解析して、ポストゲノム時代における合理的な創薬分子設計戦略と副作用の低下（安全性の向上）に貢献するのが目標である。

本研究プロジェクトにおいて我々は、薬物トランスポーターの観点から薬物の副作用を予測する技術を開発する。具体的には、薬物輸送に関与するヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系を構築して、薬物相互作用を実験的に測定し、検証する。またヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行い、核内受容体を含む転写制御因子を予測する

## B. 研究方法

ヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系構築 薬物輸送に関与するヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング

系を構築するために、ABCトランスポーターcDNAをBAC-TO-BACバキュロウイルス発現系を用いて、それぞれ昆虫細胞に発現させる。cDNAをpFASTBACに組み込み、DH10Bacへ導入して組み換えBacmid DNAを作成する。Sf9昆虫細胞にそのBacmid DNAを導入して、それぞれのcDNAを含むバキュロウイルスを誘導し、Sf9細胞に感染させる。発現したSf9細胞の形質膜を用いて、基質スクリーニングを行う。また一方、pcDNA3.1ベクターをもちいて、HEK293等の哺乳類細胞にもABCトランスポーターcDNAを発現させて、昆虫細胞で得られた結果と比較検討する。

ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析 公開されたゲノム情報とTRABSFACプログラムを用いて、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点5 kb上流と1 kb下流にわたりプロモーター解析を行う。

## C. 研究結果

ヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系構築

平成14年度、我々はABCトランスポーターの基質特異性解析と薬物相互作用のハイスループット化をめざし、昆虫細胞発現系と、96wellプレートを用いたATPase活性測定の高速スクリーニング系のプロトタイプを構築した。それはcell-freeの方法で、大量の化合物ライブラリー



を使ってヒトABCトランスポーターの基質特異性を短時間のうちに網羅的に解析するものである。その方法と測定装置を用いて、既存の医薬品約50種類 (Caチャンネル阻害剤、Kチャンネル開口剤、ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤、抗癌剤、抗生物質、免疫抑制剤、神経伝達物質等) に関してABCB1 (P-糖蛋白質)の基質特異性のプロファイリングをおこなった (図1)。その結果、Caチャンネル阻害剤に対し非常に高い活性が認められ、抗癌剤やステロイド剤に対して中程度の活性が認められた。一方、神経伝達物質に対しては活性が全く認められなかった。血液脳関門を通してCaチャンネル阻害剤の中枢神経系への移行と中枢神経系での副作用をABCB1 (P-糖蛋白質)が抑止しているものと考えられ、本スクリーニング系の副作用予測への有用性が確認された。

また、アミノ酸変異をもつABCトランスポーターの機能解析がベシクル輸送方法により可能になり、遺伝子多型と機能 (基質特異性) との関係を実験で解明することもできるようになった。最近発見されたヒトABCトランスポーターABCG2 (BCRP)の多型 (Arg, Gly, Thr-482) と基質特異性との関係を解明し、Arg-482タイプがメトトレキサート (抗癌剤/抗リウマチ薬) を輸送する一方、Gly-482とThr-482タイプは輸送しないことを発見した。この結果は、ABCトランスポーターの遺伝子多型が薬効と副作用に関連することを強く示唆するものである。

#### ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析

薬物によるヒトABCトランスポーターの遺伝子発現調節を解明するために、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点5 kb上流と1 kb下流にわたりプロモーター解析を行った (図2)。富士通九州システムエンジニアリング (株) とともにヒトABCトランスポーターの遺伝子データベースを構築して、そのプロモーター解析結果を公開する予定である。

#### 新規ヒトABCトランスポーター遺伝子のクローニング

さらに、ヒトABCトランスポーターの機能解析と基質特異性解析を行う研究の中で、ヒト新規ABCトランスポーターABCC11、ABCC12、ABCC13のクローニングに成功した。石川及び油谷グループが共同で、ABCC11とABCC13の組織分布と局在の決定を行った。ABCC11とABCC12は、抗AIDS薬の輸送に関与するABCC4と類似しており、それと同様の機能を持つものと考えられた。

#### D. 考察

本研究プロジェクトにおいて我々は、薬物トランスポーターの基質特異性解析、遺伝子発現プロファイリング、トランスポーター遺伝子データベースの構築というユニークなアプローチにより、薬物相互作用の予測プログラムを開発するものである。平成14年度は、その基盤になるテクノロジーの構築と情報収集を行った。我々は薬物トランスポーターの基質特異性を解析する高速スクリーニング系のプロトタイプを構築した。ヒトABCB1 (P-糖蛋白質) とABCG2 (BCRP) のcDNAをクローニングして、Sf9昆虫細胞に発現させた。昆虫細胞は増殖速度が大きいいため、機能解析するために細胞膜画分を大量に調製することが可能である。さらに、96wellプレートを用いたATPase活性測定の高速スクリーニング系のプロトタイプを構築した。これはABCトランスポーターの基質特異性解析のハイスループト化をめざす上で、重要な第一歩である。医薬品約50種類に関してABCB1 (P-糖蛋白質) の基質特異性のプロファイリングをおこなった。今後、試験する医薬品の種類を増やして、基質特異性に関する構造活性相関 (SAR) の情報を獲得することが可能になるであろう。現在その研究も進行中である。

また、ヒトABCトランスポーターを昆虫細胞に発現させることによる機能への影響を検討するために、ABCG2をHEK293細胞 (ヒト胎児腎臓細胞) とSf9昆虫細胞に発現させて基質特異性を比較した。その結果、機能上の違いは認められなかった。したがって、昆虫細胞にABCトランスポーターを発現させて機能を解析することが妥当であるという確証を得た。今後、ABCトランスポーターを大量に発現させて機能解析と薬物相互作用を検討する上で、この事実は重要な意味を持つ。

さらに、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点5 kb上流と1 kb下流にわたりプロモーター解析を行った。今後中田グループと共同で、核内受容体の結合部位を解析して、より精密な遺伝子発現予測データベースを構築する計画である。

#### E. 結論

本年度において、薬物トランスポーターの基質スクリーニング系の構築、薬物トランスポーター遺伝子のプロモーター解析、既存の医薬品および化学物質に対する基質特異性および薬物

相互作用データベースの作成準備が整った。今後は、薬物トランスポーターの基質スクリーニング系を用いて、既存の医薬品の薬物相互作用を検討していく。また、ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析の結果は、近く公開する予定である。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yoshikawa, M., Yabuuchi, H., Kuroiwa, A., Ikegami, Y., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Matsuda, Y., Yoshida, H., and **Ishikawa, T.** Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter *abcg4*. *Gene*, 293, 67-75, 2002
- Yoshikawa, M., Kasamatsu, S., Yasunaga, M., Wang, G., Ikegami, Y., Yoshida, H., Tarui, S., Yabuuchi, H., **Ishikawa, T.** Dose ABCG2 need a heterodimer partner? Expression and functional evaluation of ABCG2 (Arg482). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17, 130-135, 2002
- Yabuuchi, H., Takayanagi, S., Yoshinaga, K., Taniguchi, N., Aburatani, H., **Ishikawa, T.** ABCG13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 410-417, 2002
- Deng, L., Tatebe, S., Lin-Lee, Y.-C., **Ishikawa, T.**, and Kuo, M.T. MDR and MRP Gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents. In: "Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy" Anderson, B. and Murray, D. (Eds.) Kluwer Academic Publishers, Boston, pp.49-66, 2002
- **Ishikawa, T.** and Yoshikawa, M. ABC transporters: A new approach to toxicogenomics. "Toxicogenomics" Inoue, T. and Pennie, W.D. (Eds) Springer-Verlag, Tokyo, pp109-114, 2003
- **Ishikawa, T.** Multidrug Resistance: Genetics of ABC Transporters. In: "Encyclopedia of Human Genome", Nature Publishing Group, in press, 2003

#### 総説

- 吉川恵美、池上洋二、藪内光、石川智久、ポストゲノム時代の挑戦; ABCトランスポーターに基づく創薬分子デザイン 化学工業、325-331, 2002
- 藪内光、石川智久 ヒトゲノム機能解析から創薬へ—ABCトランスポーターに基づく創薬分子デザイン—医学の歩み、201,868-873,2002
- 石川智久、堀江透 (編集) 創薬サイエンス入門: ポストゲノム時代へのパラダイムシフト 共立出版, 2002

##### 2. 学会発表

- AACR 93rd Annual Meeting "Substrate specificity of ABCG2 (BCRP) toward new CPT analogues" (2002.04.07-11 San Francisco, USA)
- The 1st JBS Bio-frontier symposium "Membrane Transporter: Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter-" "ABC Transporters : A New Approach to Toxicogenomics" (2002.06.09-11湯布院)
- 第29回日本トキシコロジー学会学術年会 "薬物代謝から見たトキシコゲノミクス: トランスポーターの役割" (2002.06.18-20名古屋)
- 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations "Human ABC Transporters: Pharmacogenomic and Toxicogenomic Aspects " (2002.07.22-26 札幌)
- 15th Conference on Combinatorial Chemistry, Japan (2002.09.18-19 川崎)
- CBI学会第3回大会 "ヒトABCトランスポーター遺伝子のデータベース構築" (2002.09.18-20 東京)
- 第17回薬物動態学会年会 "ヒトABCトランスポーター: ゲノム解析からデータベース構築、機能解析スクリーニング、創薬分子デザインまで" (2002.11.20-22 東京)
- 第3回知識科学シンポジウム ゲノム創薬の企業戦略とバイオインフォマティクス" (2002.11.27 東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項はない

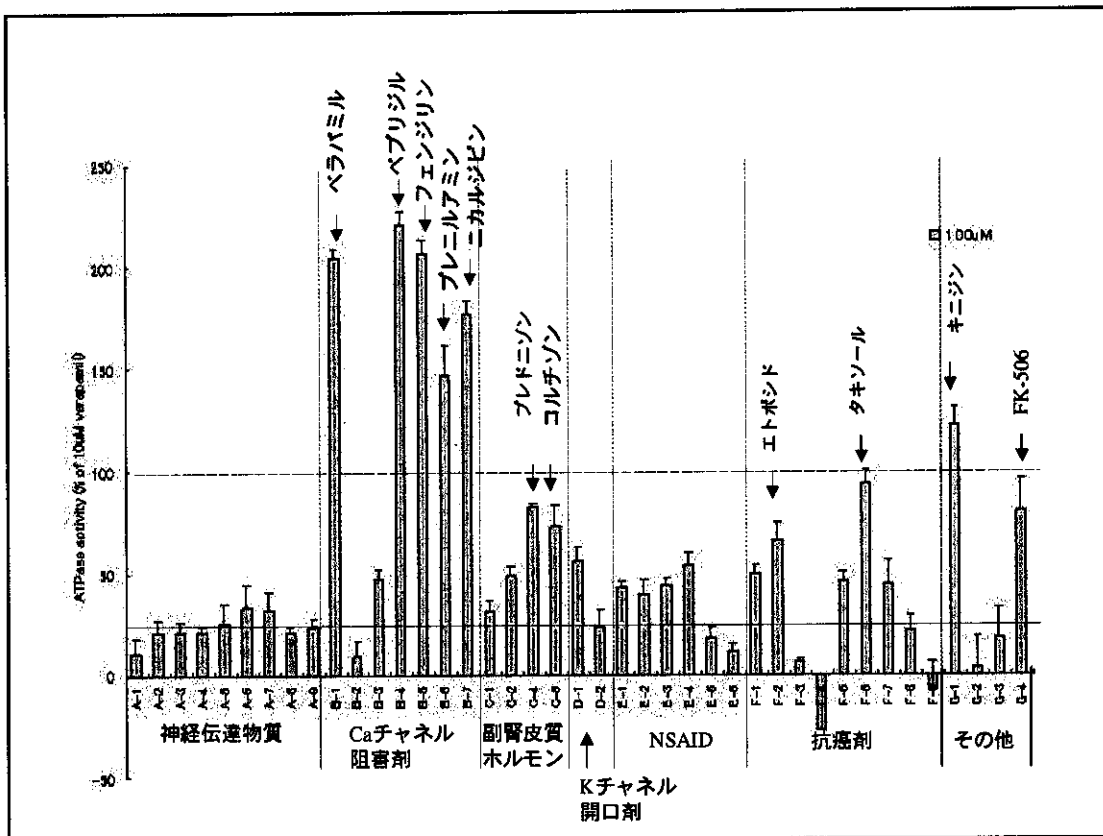
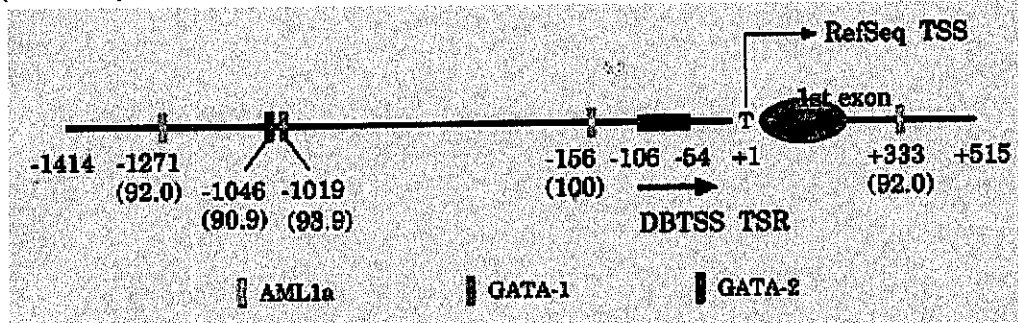


図1 ABCB1 (P-糖蛋白質)の基質特異性プロファイル。神経伝達物質 (9種)、Caチャンネル阻害剤 (7種)、副腎皮質ホルモン (5種)、Kチャンネル開口剤 (2種)、非ステロイド系抗炎症剤 NSAID (6種)、抗癌剤 (9種)、その他 (4種)を 100  $\mu$ M の濃度で、ABCB1 発現 Sf9 細胞膜と共に 37°C でインキュベートして、ATPase 活性を測定した。

**Human ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) Gene**  
 (Chr4q22.1: 89241528-89239129-12316258) strand (-)



**Mouse Abcg2 Gene**  
 (Chr6: 5910826-59108175) strand (+)

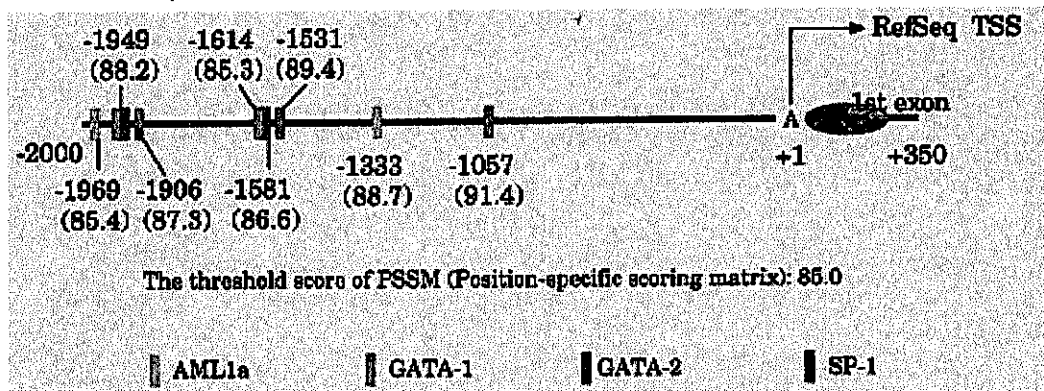


図2 ヒト ABCG2 遺伝子とマウス Abcg2 遺伝子のプロモーター領域の解析。

## 薬物ランスポーターの遺伝子発現プロファイリングに関する研究

分担研究者 油谷浩幸(東京大学国際・産学共同研究センター教授)

### 研究要旨

ラットに薬物を投与した肝からの遺伝子発現プロファイルの時系列で得ることを確立した。また自己組織化マップ法(SOM)の改良版を利用して、安定したクラスター解析の結果を得ることを確認した。加えて、解析アルゴリズムの開発に着手した。また、ヒトに近い薬物応答性のモニタリングシステムとしてカニクイザル由来の肝細胞の遺伝子発現プロファイルを測定するマイクロアレイの開発に着手した。

### A. 研究目的

薬物代謝物を迅速に細胞外へ排泄することは、薬物の副作用を低下させる上で非常に重要である。またさらに薬物トランスポート課程での薬物相互作用や薬物による遺伝子発現誘導を回避する分子デザインも創薬戦略の1つであると考えられる。近年になって、数多くの薬物ランスポーターが各組織で発現し、薬物の輸送に関与していることが明らかになってきた。本研究は、薬物ランスポーターの発現変動に注目し、薬物の副作用を予測する技術を開発することに目標をおく。

### B. 研究方法

#### 1. 薬物投与後時系列データの解析アルゴリズムの開発

遺伝子発現プロファイル解析にて、個々の遺伝子の発現情報が時系列で得られる。また薬物の種類や量の変化の情報も加えると多次元かつ膨大な情報の量となる。これらのデータ処理のために、コホネンが開発した SOM(Self Organizing Map)の改良を行った。本来、SOMは脳の記憶メカニズムを模倣して作られたものであるが、記憶と同じように新しい入力情報ほど影響が強くなるため、入力データの順番によって、出力結果が

異なることとなる。今回データ入力順に依存しないアルゴリズムの開発に着手した。

#### 2. ラット肝における薬物投与後の遺伝子発現プロファイル解析

ラットに薬物を連続経口投与後、1,3,7,14,28日目の肝臓での発現データを Affymetrix 社 GeneChip(RGU34A)を用いて測定した。

#### 3. カニクイザルを利用したアレイシステムの開発

薬物の輸送においては、ヒトの薬剤ランスポーター遺伝子の発現やその働きはラットやマウスと異なっていることが知られている。しかし、ヒトの正常細胞を実験に利用することは困難なことである。そこでヒトに近く、かつ比較的入手しやすいカニクイザルのマイクロアレイを開発することにより、ヒトに類似した薬剤反応性の予測が可能であると考えられた。本年度はカニクイザルの cDNA 配列の確定作業を開始した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究計画ではヒト検体は使用しない。

### C. 研究結果

#### 1. 薬物投与後時系列データの解析アルゴリズム

## の開発

今回は、SOMの中でデータの入力順によらない、BL-SOM(Batch Learning SOM)を使用することにして、データ処理の効率を検討した。

BL-SOMは初期状態にPCA(Principal Component Analysis)を用いて配置することと、データ入力における影響力を限定することを特徴としている。(図1)

## 2.ラット肝における薬物投与後の遺伝子発現プロファイル解析

GeneChip(Affymetrix社)を用いてラットに薬剤Aを投与した際の約8000個のラット遺伝子について発現プロファイルを1,3,7,14,28日目で得てBL-SOMにて解析した(図2)。結果は2次元に展開され、類似したパターンを示す遺伝子が近くに配されている。升目の中の数字は含まれている遺伝子数を表している。ここでは、丸で囲まれた部分にCytochrome P450が含まれた。また、類似した変動パターンを示す遺伝子6個(Cte1, Mte1, Cpt1b, Acaa, Hdc, Cytochrome P452)が認められた。(図2、表1参照)

## 3.カニクイザルを利用したアレイシステムの開発

東京大学医科学研究所、国立感染研究所との共同研究により、カニクイザルのcDNA配列を決定した。現在、カニクイザルのEST配列約2万個をクラスタリングし、約1800個の配列がヒトのRefSeqと相同性を有していることが判明した。

## D. 考察

薬剤に反応して発現の変化する遺伝子の時系列情報をラットの遺伝子発現プロファイル情報からBL-SOMを用いて分類した。注目する遺伝子に類似する動きをする遺伝子群を抽出することが可能であることが判明した。今後は、遺伝子の持つオントロジー情報を付加することと、薬剤の種類を増やすことによってより多くの遺伝子クラスターを抽出可能と考えられた。しかし、薬剤の種類が増え、遺伝子、時間と多次元のデータを処理するには、新しいアルゴリズムの開発が必要とされる。それは、初期状態で配置される遺伝子クラスターが薬の種類で異なる位置に置かれるためである。このことから、新規アルゴリズム開

発を引き続き行っていく。

加えて、よりヒトに近縁であるカニクイザルアレイの開発を進める。アレイの信頼性確認の実証実験を行うほか、続いてカニクイザル由来の肝細胞に薬物を加えて時系列の遺伝子発現プロファイルを得る。上記データとラットのデータを比較し、トランスポーター遺伝子を含めた薬剤応答性に関連した遺伝子発現について、霊長類とげっ歯類の異同について検討を進める予定である。

## E. 結論

ラットに薬物を投与した時系列の遺伝子発現プロファイルを解析し、類似発現パターンを示す遺伝子群を抽出した。また、入力順などによる結果の変動の少ないBL-SOMを用いたクラスタリングを応用した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. *Physiol Genomics*. 2003 Jan 7 [epub ahead of print]
- 2) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K. Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 506(Pt A):673-6
- 3) Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsushashi N, Aburatani H. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol*. 37 Suppl 14:62-6. 2002

- 4) Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASES* 8: (5) 330-339. 2002
- 5) Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol.* 193(3): 299-318. 2002
- 6) Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, Makuuchi M. Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray1. *Transplantation.* 73(9): 1480-1486. 2002
- 7) Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Research* 62(1): 233-240, 2002

総説

- 1) 油谷浩幸 DNA チップの医療への応用 *Medicina* 39(3): 444-448 2002
- 2) 油谷浩幸 遺伝子発現プロファイリング解析による癌の個性診断 *医学のあゆみ* 201(9) 687-692, 2002
- 3) 油谷浩幸 がんの機能ゲノミクス解析 *埼玉医科大学雑誌* 29(1):85-91, 2002
- 4) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来について *MEDICAL CORNER* 111(3): 4-7, 2002
- 5) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来

総合臨床 51(10):2901-2, 2002

- 6) Aburatani H. Understanding cancer through gene expression profiling. (review) *International Congress Series* 1246: 261-270, 2002

2.学会発表

- 1) The 3rd Cherry blossom symposium. "Cancer Classification by Gene Expression Profiling."
- 2) 第3回 Sun Bioinformatics セミナー「トランスクリプトーム解析のための生命情報の統合—システム生物学へ—」
- 3) 第34回日本臨床検査自動化学会特別企画講演「システム生物学へのパラダイムシフト—トランスクリプトームからの疾病解析—」
- 4) 第61回日本癌学会総会シンポジウム「ゲノム科学とがん研究」トランスクリプトーム解析からがんのシステム生物学へ
- 5) Toxicogenomics International Forum 2002, "Understanding cancer through gene expression profiling"
- 6) Rad-genomics「発現プロファイル解析と疾病研究」
- 7) 学術創成研究第4回シンポジウム「高感度DNA マイクロアレイによる遺伝子機能解析」

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

- 1.特許取得  
なし
- 2.実用新案登録  
なし
- 3.その他

図1. BL-SOMの概略。遺伝子発現パターン (Xk)の初期配置とその移動を示す。

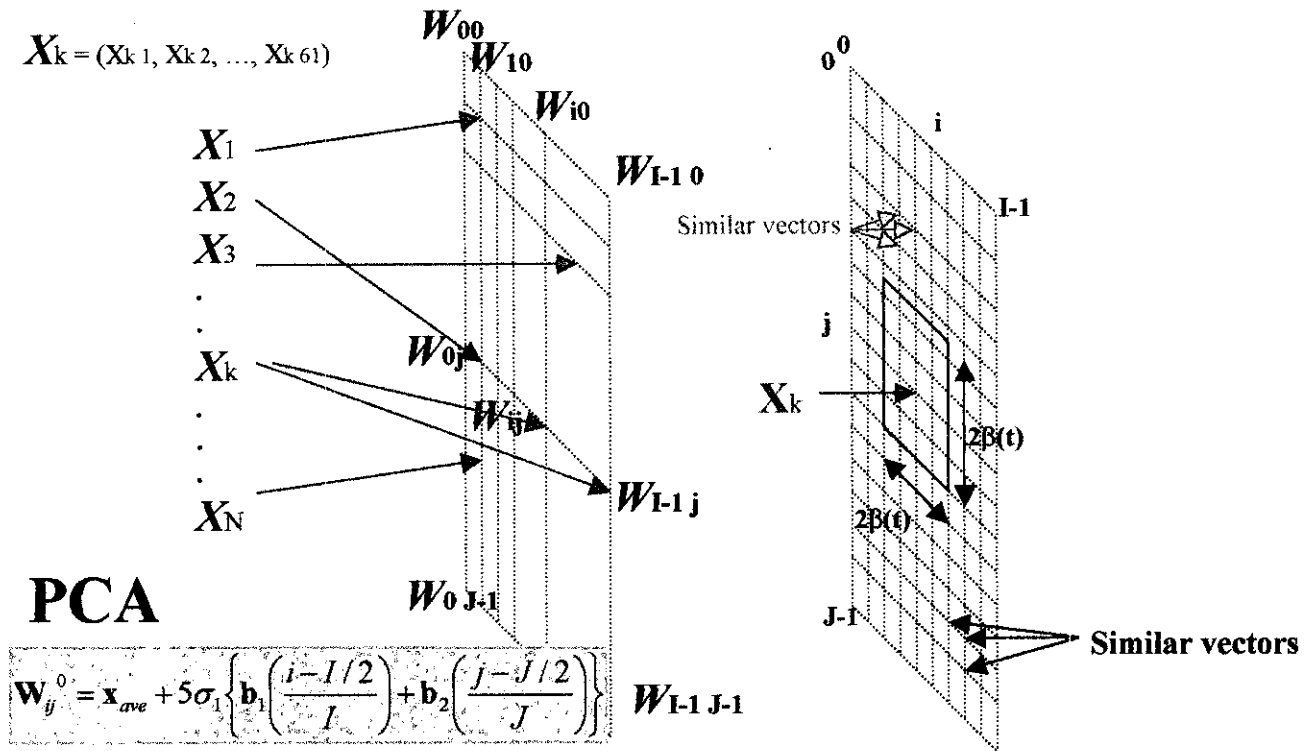




図2. 薬剤Aを投与したラットの遺伝子発現プロファイルのBL-SOM解析

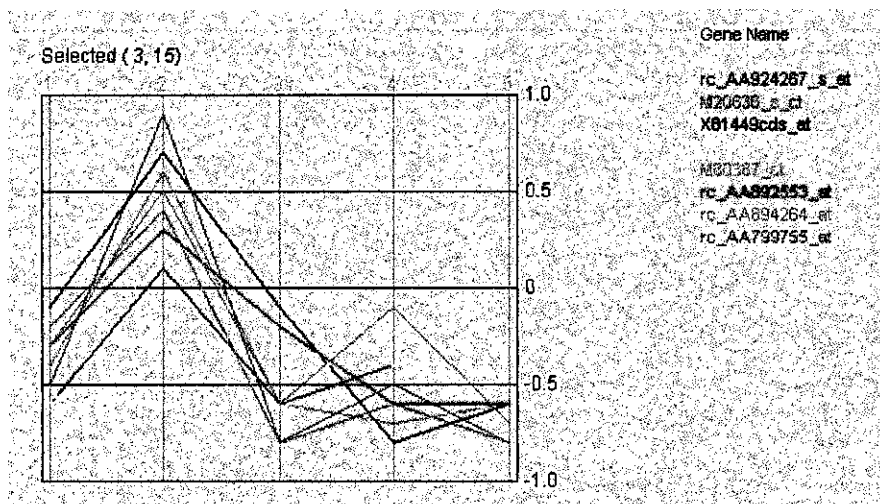
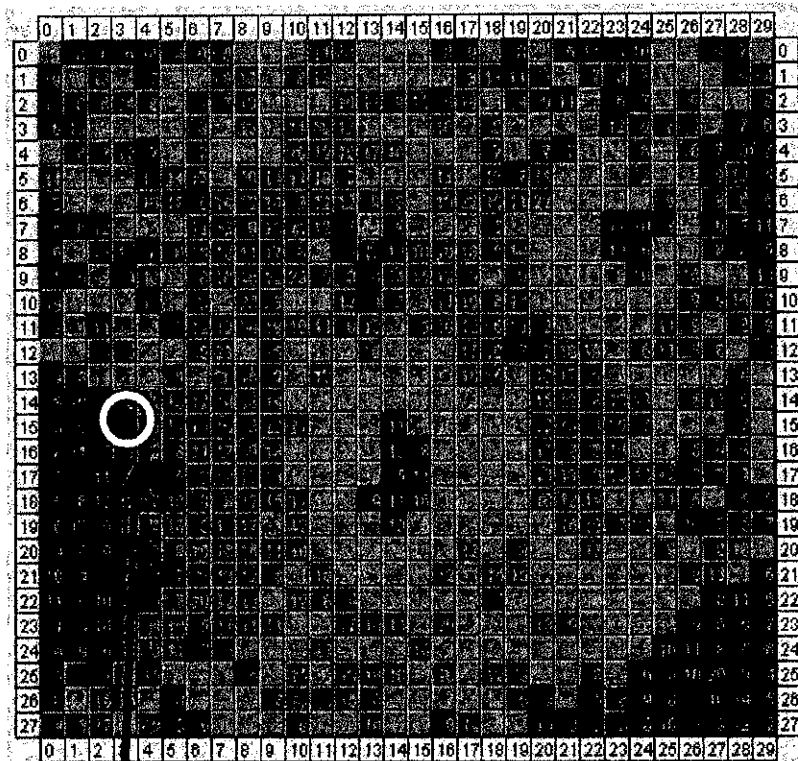


表1. Cytochrome P450と同じクラスターに含まれる遺伝子リスト

AB010428_s_at	cytosolic acyl-CoA thioesterase 1
D43623_g_at	carnitine palmitoyltransferase 1b
J02749_at	acetyl-CoA acyltransferase, 3-oxo acyl-CoA thiolase A
M38759_at	Histidine decarboxylase
X07259cgs_s_at	cytochrome P-452
Y09333_g_at	mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1
rc_AA924267_s_at	cytochrome P450, 4a10

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

平成 14 年度分担研究報告書

医薬品・化学物質のデータベース化に関する研究

分担研究者 中田 琴子 国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部

研究要旨

医薬品や毒性研究の情報基盤整備のために、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポータに関する種々のデータを収集整理してデータベース化した。医薬品/化学物質と体内標的の構造データ、結合親和性、細胞内信号伝達情報、SNP 情報等を含め、体内標的と薬物相互作用解析の基礎データを提供する。

A. 研究目的

医薬品や毒性研究の情報基盤整備のためにこれまで受容体データベース、内分泌かく乱物質のための結合親和性データベース、薬物代謝酵素チトクローム P450 関連知識ベース等を開発してきた。この情報基盤をさらに拡充するため、本研究では体内標的として酵素およびトランスポータについて分子レベル解析用のデータを収集整理してデータベースを構築する。

また核内受容体等パラダイマティックな標的トリガンドについての結合親和性について生物実験値および理論計算値の比較検討を含め、細胞内信号伝達から遺伝子発現までのパスウェイについて究明する。

B. 研究方法

我々が既に関係してきた受容体データベースに順じて酵素およびトランスポータデータベースを開発する。酵素やトランスポータ等体内標的について分子レベルで解析するために以下の関連情報を収集整理し、またシステム内に必要なデータ作成ツールを組込む。

酵素/トランスポータデータベース：

・酵素/トランスポータタンパク質のアミノ

酸配列 (PIR、SwissProt) や立体情報 (PDB)

- ・ 核酸情報 (GenBank)
  - ・ 遺伝子情報 (GDB)
  - ・ SNP 情報 (NCBI)
  - ・ 結合親和性情報 (BADB および文献)
  - ・ 細胞内信号伝達情報 (CSNDB および文献)
- 酵素データベースに関しては次の情報も含む。
- ・ 酵素番号 (EC 番号)
  - ・ 代謝マップ (KEGG)

基本となるデータベースからの直結データに加えて、3 次元イメージや類似配列情報等 (Off-line で作成して) をシステムに組込む。

一方、体内標的トリガンド (医薬品/化学物質) の結合親和性について生物実験値および理論計算値を比較し、かつ文献から細胞内信号伝達に関する情報を再検討しながら、医薬品の相互作用解析を試みる。計算値としては非経験的分子軌道法 (フラグメント MO 法等の精密計算) による結果を利用する。

C. 結果

C-1. 酵素データベース

Acetyl-CoA acetyltransferase、HMG-CoA reductase、Cytochrome P450、Protein Kinase、POL polyprotein 等について酵素番号 (EC 番号)、

代謝マップ情報、アミノ酸配列情報、3次元構造情報、遺伝子情報、細胞内信号伝達情報、SNP情報等を収集整理した (Fig.1 参照)。

#### C-2. トランスポータデータベース

ABCトランスポー(ABCA1-ABCA12、ABCB1-ABCB11、ABCC1-ABCC13、ABCD1-ABCD4、ABCE1、ABCF1-ABCF3、ABCG1-ABCG5、ABCG8) について、アミノ酸配列情報、立体構造情報、遺伝子情報、SNP情報等を収集整理した (Fig.2 参照)。

#### D. 考察

我々の研究室では数年前から医薬品や毒性研究のための基盤を整備してきた。医薬品データベースのデジタル化 (Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals: <http://moldb.nihs.go.jp/jan/Default.htm>) や内分泌かく乱物質構造データベース開発、受容体データベース (RDB: <http://impact.nihs.go.jp/RDB.html>) や細胞内信号伝達データベース (CSNDB)、内分泌かく乱物質のための結合親和性データベース (BADB: <http://moldb.nihs.go.jp/eddb/afdb/>) の開発、また薬物代謝酵素チトクローム P450 関連知識ベース (P450 Database for Drug Interactions: <http://moldb.nihs.go.jp/p450/p450db.html>) を開発し公開している。

本研究ではチトクローム P450 に加えてパラダイマティックな酵素について、代謝マップ、構造データ、信号伝達に関するデータを収集整理した。全体的には生物実験データの不足などもあり、薬との相互作用についても今後さらにデータ収集や調査が必要である。

またトランスポータデータベースとしては種々の ABC トランスポータについて、構造データや SNP 情報、薬との相互作用データを収集整理した。3次元構造データの不足等もあり、相互作用解析は今後期待される。

標的トリガンドの結合親和性についてはパ

ラダイマティックな標的トリガンドを選択してデータ収集中である。異なる論文中の生物実験データの比較においては実験条件等種々の条件の違いを考慮して相対結合値 (Relative Binding Affinity) や  $K_i$  値を用いた。コンピュータを用いたフラグメント MO 法による計算値についても一部の核内受容体以外は、今後の結果が待たれるところである。

#### E. 結論

プロトタイプとして内部限定で試験的に公開してチェック中である。

酵素データベース (URL)

<http://nihsweb.nihs.go.jp/~adin/enzyme.php3>

トランスポータデータベース (URL)

<http://nihsweb.nihs.go.jp/~adin/transporter.php3>

3次元構造データ (実験値) が無いものについて不足もあり、フラグメント MO 法等精密な計算による構造データを記載することが必要である。細胞内信号伝達データの不足については個別に細胞内信号に関するデータを収集整理して組入れる必要がある。

次年度の計画にデータの検索方法についての改良を検討する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

• Nakata, K., Takai-Igarashi, T., Nakano, T. and Kaminuma, T. (2002) An Integrated Receptor Database (IRDB). *Data Science Journal*, 1, 140-145.

• Nakata, K. (2002) Theoretical Approach to Endocrine Disruptors.

*Frontiers in Bioscience* 7, c68-73

##### 2. 学会発表

• Nakat, K., Tokunaga, M., Nakano, T. and Kaminuma, T.: A Paradigmatic Drug Target Database. *Biophysical Society 47<sup>th</sup> Annual Meeting (San Antonio, March 2003)*