

タンパク質—化学物質相互作用解析システム 「ABINIT-MP BioStation」の開発

Development of Quantum Molecular Interaction Analysis System for Biomolecules “ABINIT-MP BioStation”

谷 森 奏 一 郎*・佐 藤 智 之*・中 田 琴 子**・福 澤 薫*・大 河 内 郁 雄*・
小 谷 野 和 郎*・北 浦 和 夫***・青 木 孝 造****・阿 部 行 伸*・
愛 澤 昌 宏****・甘 利 真 司****・小 野 寺 賢 司****・張 軍 衛****・
岩 澤 義 郎*・加 藤 昭 史*****・雨 宮 克 樹*・山 口 貴 史*・中 野 達 也**
Souichirou TANIMORI, Tomoyuki SATO, Kotoko NAKATA, Kaori FUKUZAWA, Ikuo OKOUCHI, Kazuo KOYANO,
Kazuo KITAURA, Kozo AOKI, Yukinobu ABE, Masahiro AIZAWA, Shinji AMARI, Kenji ONODERA, Junwei ZHANG,
Yoshiro IWASAWA, Akifumi KATOU, Katsuki AMEMIYA, Takashi YAMAGUCHI, Tatsuya NAKANO

1. はじめに

ゲノムの解析が急速に進展している現在、ゲノム情報を有効に活用し、医薬品の開発等に結びつけることは極めて重要な課題である。DNA や主要な遺伝子産物であるタンパク質は、いずれも巨大分子系であるが、その振る舞いは低分子の場合と同じく非相対論的量子力学で精度よく近似できる。これまでDNA やタンパク質といった生体高分子の機能を分子計算で解析するには、分子を構成する原子の間に働く力を古典的なポテンシャル関数（力場）で近似した、分子力場法や分子動力学法が用いられてきた。しかしながら分子間の相互作用は古典的力場関数では精度よく記述できない場合が多く、第一原理（量子力学）に基づいた巨大分子計算手法の実現が待たれていた。

本プロジェクトの目的は、タンパク質—化学物質間の相互作用エネルギーを高精度で予測することにより、医薬品等の効率的な分子設計を可能にすることである。そのために量子論に基づいた、タンパク質（受容体タンパク質等）と化学物質（リガンド分子）との分子間相互作用を *in silico* で解析するシステムを開発している。

2. 開発システム「ABINIT-MP BioStation」の概要

開発中のタンパク質—化学物質相互作用解析システム ABINIT-MP BioStation（略称 BioStation）は図1に示すように次の4つのサブシステムから構成される。

*アドバンスソフト（株）

**国立医薬品食品衛生研究所

***独立行政法人産業技術総合研究所

****東京大学生産技術研究所 計算科学技術連携研究センター

*****（株）富士総合研究所

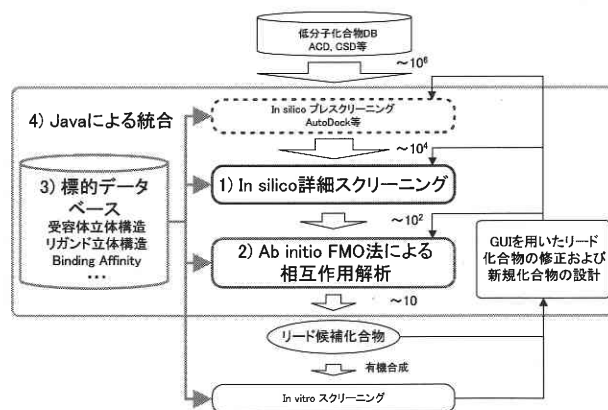


図1 タンパク質—化学物質相互作用解析システム概念図。

- 1) *In silico* 詳細スクリーニング（BioStation Dock）
分子間相互作用解析用力場およびレプリカ交換法を用いた *in silico* スクリーニング
- 2) 非経験的フラグメント分子軌道法による相互作用解析（ABINIT-MP）
量子論に基づいた受容体—リガンド分子間の結合エネルギーの予測および相互作用解析
- 3) 標的データベース（Target Database）
医薬品を中心としたリガンド分子、およびリガンド分子の標的となる生体分子（受容体タンパク質等）の情報に関する統合データベース
- 4) Java による可視化と統合（BioStation Viewer および BioStation）
Java および Java 3D を用いた、入力データの作成、計算結果の可視化および解析のための統合環境

3. サブシステム

3.1 In silico 詳細スクリーニング BioStation Dock

3.1.1 スクリーニングプログラムの開発

In silico 詳細スクリーニングシステムは、非経験的フラグメント分子軌道法による受容体-リガンド分子間相互作用解析システムの初期解析構造を与えることを目的として、詳細な結合様式の決定に重点を置いた開発を行う。力場計算に、後述する修正電荷平衡法¹⁾を用いることにより、既存のシステムと比較して結合状態の構造を高精度で得ることを可能とする。平成 14 年度は以下の三つのプログラムのプロトタイプを開発した。

1) 結合探索プログラム

探索アルゴリズムにレプリカ交換法²⁾を適用し、交換パラメータとしてシミュレーション温度とともに低分子化合物の回転可能な結合の回転角度を用いる。温度と回転角度の 2 変数レプリカ交換法を実装し、パラメータの交換方法を結合状態探索に特化させることによって、信頼性の高いスクリーニングを行う。

2) 水素原子付加プログラム

数千~数万個の低分子化合物に対してスクリーニングを行うため、バッチ処理で低分子化合物の初期状態の自動設定を行う機能を開発している。通常、化合物データには、重原子の座標のみが与えられており、水素原子の情報は含まれていない。そこで重原子の座標から水素原子の結合状態を決定し、必要な水素原子の付加を行う。さらに、低分子化合物の全原子に対して原子電荷を割り当てる。低分子化合物の原子電荷、結合情報、プロトンの解離状態等について考慮した水素原子を付加した分子構造を与えるプログラムを開発する。

3) 初期状態設定プログラム

タンパク質の結合サイト内で低分子化合物の配置や配向の初期値を与えるプログラムを開発している。細長い活性サイトや平たい活性サイト等、低分子化合物の形状によっては、一度配置されてしまうと他の配向に移るにはエネルギー障壁が大き過ぎ、結合探索が困難となるケースが考えられる。また、活性サイトが低分子化合物に対して非常に大きい場合、最適な結合部位に移動するまでに多くの計算が必要である。これらの問題を事前に解決するために、低分子化合物の活性サイトにおける可能な初期配向や配置について複数探索し、結合探索システムに初期値として与えるプログラムの開発を行う。

今後、タンパク質と低分子化合物の結合サイト予測プログラムを作成する予定である。

3.1.2 分子間相互作用力場の開発

In silico スクリーニングにおいて、受容体-リガンド分子間の相互作用を高精度で見積もることは、スクリーニン

グの有用性を高めるために極めて重要である。分子間相互作用は経験的に静電相互作用と van der Waals 相互作用の二つに分割される。Amber や CHARMM といった既存の力場は、分子間相互作用に重要な役割を果たしている静電相互作用を、原子電荷を固定するという非常に粗い近似を用いて計算している。

今回提案する分子間相互作用解析用力場 (eXtended Universal Force Field, XUFF) は、静電相互作用エネルギーの計算に中野らが開発した原子電荷を分子の 3 次元立体構造に基づいて計算する修正電荷平衡 (Modified QEq; MQEq) 法¹⁾を採用することで、従来の力場よりも分子間相互作用を高精度で予測することを可能にする。分子の 3 次元立体構造に基づいた原子電荷の計算方法としては、Goddard らの QEq 法³⁾があるが、MQEq 法で得られる原子電荷の方が QEq 法で得られる原子電荷よりも HF/6-31 G(d,p) 計算から得られる静電ポテンシャルを再現するように決められた原子電荷に近いこと、連立一次方程式を反復して解く必要がないことから、精度および計算速度の面で優れていると考えられる。

また、XUFF では 2 原子間の van der Waals 相互作用エネルギーには Buckingham ポテンシャル⁴⁾を、分子内ポテンシャル関数には UFF⁴⁾の関数を使用する。

3.2 相互作用解析プログラム ABINIT-MP

ABINIT-MP は非経験的フラグメント分子軌道 (ab initio Fragment Molecular Orbital; 以下 ab initio FMO) 法⁵⁻¹⁰⁾に基づいた分子間相互作用解析プログラムである。Ab initio FMO 法は、分子や分子集合体を適当なサイズのフラグメントに分割し、フラグメント (モノマー) とフラグメントペア (ダイマー) について MO 計算を行うだけで、分子全体のエネルギーや電子密度を計算する方法である。この方法には、

1. フラグメント間の相互作用エネルギーを計算可能
2. モノマーおよびダイマーの計算は独立して行うことが可能であるため、並列処理による大幅な高速化が可能
3. モノマーおよびダイマーと周囲のモノマー間の静電相互作用に近似を導入することで高速化可能
4. 離れたフラグメントペアから構成されるダイマーを、静電的に相互作用するモノマーの和として近似することで更に高速化可能

といった特徴がある。Ab initio FMO 法を用いることで、低分子化合物で成功を収めた ab initio MO 法を、精度を落とさずにタンパク質のような巨大分子へ適用することが可能になる。特に、最初に挙げた特徴により、従来不可能であった残基-リガンド分子間の相互作用等を定量的に解析することが可能になり、医薬品などの分子設計に大きく役立つことが期待される。

プログラム開発言語には Fortran90、並列化には MPI を

採用しているため、PC クラスタから並列スーパーコンピュータまで幅広い計算機で使用できる。

現在までに、500 残基のタンパクであるプロゲステロン受容体リガンド結合部位のホモダイマー (PDB ID : 1A28, 8237 原子) を計算した実績がある。

● 3-21 G, 4-31 G, 6-31 G 基底関数への対応

FMO 計算を行う場合、基底関数には STO-3G だけでなく 3-21 G, 4-31 G, 6-31 G といった split valence 基底関数も使用できる。平成 15 年度中に、6-31 G(d), 6-31 G(d,p) のような分極関数を含む基底関数も使用できるようにする予定である。

● フラグメント自動分割機能

分子のフラグメントへの分割方法は、FMO 法の計算精

度に大きく影響する。一般論としてフラグメントサイズを大きくすることで計算精度は向上するが、計算時間も増大するため、バランスのとれた分割方法が必要となる。ポリペプチドの場合、ABINIT-MP はデフォルトでは図 2(a) に示すように 2 残基単位で分割する。残基数が奇数の場合は、C 末端の残基を 1 フラグメントとする。フラグメント間相互作用解析を行う場合は、1 残基で分割すると解析結果が見やすくなる。ジスルフィド結合したシステイン残基は図 2(b), DNA は図 2(c) に示すように分割する。

● 高速化積分ルーチン

FMO 計算を行うには、以下の四種類の積分を計算する必要がある。

(a) 重なり積分

$$S_{\mu\nu} = \int \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}_1) \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \dots \dots \dots (1)$$

(b) 運動エネルギー積分

$$T_{\mu\nu} = \int \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}_1) \left[-\frac{1}{2} \nabla^2 \right] \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \dots \dots \dots (2)$$

(c) 核引力積分

$$V_{\mu\nu}^C = \int \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}_1) \frac{1}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{C}|} \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \dots \dots \dots (3)$$

(d) 電子反発積分

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \int \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}_1) \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) \frac{1}{r_{12}} \phi_{\lambda}^*(\mathbf{r}_2) \phi_{\sigma}(\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \dots (4)$$

特に、電子反発積分は計算量が多い(基底関数の数が N のとき $O(N^4)$) ため、FMO 法の計算時間を短縮するためには、これらの積分計算の高速化が重要である。このために、直交型 Gauss 関数と漸化式を用いて計算する小原-斎賀の方法¹¹⁻¹³⁾を採用している。この方法は現在最も効率の良い方法の一つと考えられる。電子反発積分については、漸化式から無駄な演算を削除したコードを自動生成するプログラムを開発することで高速化を行っている。

● エネルギー勾配計算の高速化アルゴリズムの定式化

構造最適化を行うために、高速にエネルギー勾配を計算するアルゴリズムを開発している。また、truncated Newton 法を用いた最適化アルゴリズムの組み込みを行っている。

3.3 標的データベース Target Database

医薬品の標的は膜受容体、核内受容体、酵素、トランスポーターなど様々である。この中でも核内受容体は、生体の恒常性の維持や身体の発達に関与するホルモンの標的であり生体内で重要な役割を演じているものが多い。

本プロジェクトで作成する標的データベースは、国立医

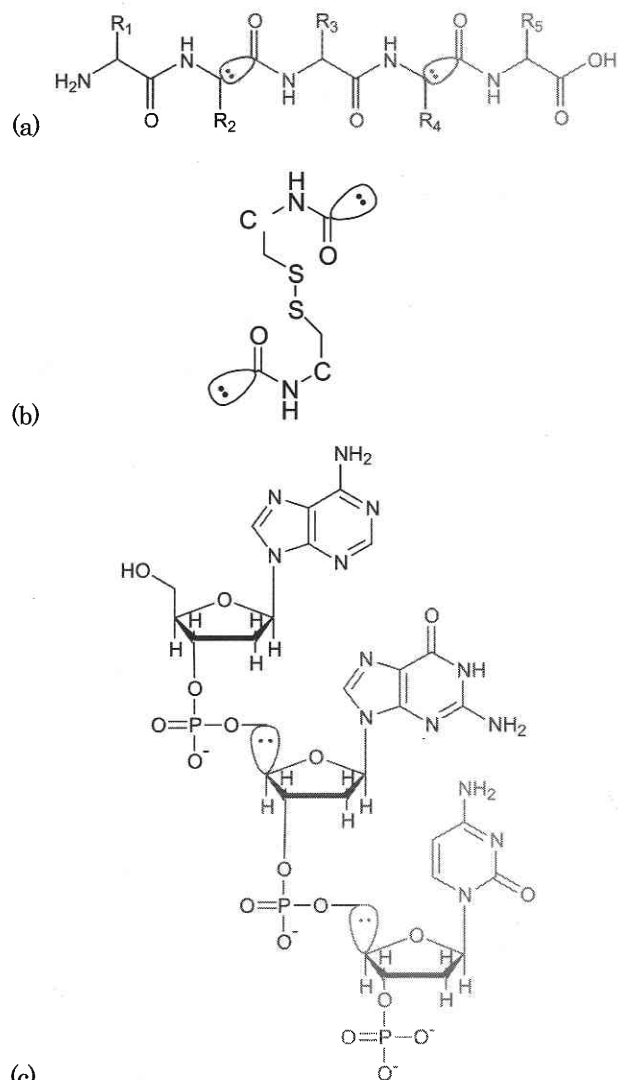


図2 フラグメントの分割. (a) ポリペプチドの分割, (b) ジスルフィド結合したシステイン残基の分割, (c) DNA の分割

薬品食品衛生研究所の中田らが開発・公開している受容体データベース (Receptor Database)¹⁴⁾ および内分泌かく乱物質のための受容体への結合親和性データベース (Binding Affinity Database)¹⁵⁾ のデータ内容を再検討した上で整理統合・拡張するものである。標的データベースは相互作用解析をする上でベースとなるタンパク質や低分子化合物の構造情報を提供するもので、これは Web データベースとしてインターネットで公開する予定である。

標的データベースは、「医薬品や内分泌かく乱物質など非生体内化合物に関する情報 (低分子化合物データ)」と「受容体など生体内の標的タンパク質に関する情報 (標的データ)」の二つの大きなデータに分けられ、これらは受容体、酵素、トランスポーターなどの結合・反応実験データによって結ばれている。これらのデータは次の7つのグループに分類されて、リレーショナルデータベースに登録される。

医薬品や内分泌かく乱物質などの非生体内化合物情報 (低分子化合物データ, Chemical)

一般名称, 分子式 (組成式), 分子量 (式量), CAS 登録番号, 構造式, 三次元構造情報, 使用国名 (日米英), 薬効分類, 使用用途などを含む。

分類情報 (Classification)

低分子化合物やタンパク質を分類するためのもので、低分子化合物は薬効および構造により分類し、タンパク質は機能による分類を行う。

受容体などの生体内の標的に関する情報 (標的データ, Protein Information)

アミノ酸配列, 二次構造, 三次構造, 機能部位, 結合親和性情報, 配列類似性情報, 一遺伝子多型 (SNP) 情報, 転写因子情報等を含む。

受容体分類情報 (受容体データ, Receptor DB)

受容体の分類は、受容体, サブタイプ, サブユニットおよび種による違いを含めた四層構造とする。これにより、種を超えた僅かな構造の違いまで含めた、もっとも細かい受容体の分類となる。そして、ここでの各受容体の塩基配列, アミノ酸配列などの情報が標的データとなる。

受容体結合実験情報 (結合親和性データ, Binding Assay)

結合親和性データは、核内および膜受容体と低分子化合物の結合親和性に関するもので、主として受容体結合実験阻害試験データより構成される。

参考文献情報 (文献データ Reference)

結合親和性データに使用した文献を管理し、著者名, 論文タイトル, 雑誌名, 巻, ページ, 発行年, アブストラクト, PubMed 登録番号を保持する。

リンク情報 (Link)

PIR や PDB など, 標的タンパク質の情報を発信している外部データベースへのリンクのための URL を管理する。

データベースの開発は核内受容体から行い、膜受容体、酵素、トランスポーターといった他の機能を持つ標的タンパク質へと順次広げていく。現在、標的データベースに登録する標的タンパク質 100 種類について選定作業を行っている。また、データベース管理システムとして PostgreSQL, Middleware として Tomcat, 開発言語として Java 2 を採用し、データ管理ツールの開発を進めている。

3.4 可視化システム BioStation Viewer

BioStation Viewer は ABINIT-MP で計算した結果の可視化および解析を行うプログラムで、1) 生体高分子の分子構造の表示, 2) 電子密度, 静電ポテンシャル等値面表示, 3) フラグメント間の相互作用エネルギー表示 (口絵参照), 4) 電子密度等値面上の静電ポテンシャルマップ表示 (図3参照), 5) 分子構造の編集などの機能がある。Java 2 および Java 3D で開発しているため、MS-Windows, UNIX などの幅広い環境上で使用できる。特に、フラグメント間の相互作用エネルギー表示機能は、他の分子構造表示システムにはない本プログラムに固有の機能であり、リガンド分子-アミノ酸残基間の相互作用を解析する上で有用である。

3.5 統合環境システム BioStation

3.1 ~ 3.4 で説明したサブシステムを統合的に活用できる環境を開発し、標的データベースの検索, 計算条件の入力, スクリーニング中に生成される大量データ管理, スクリーニングの自動処理, などの機能を実現する。Viewer と同様に、開発言語として Java 2 を使用しており、幅広いシステムで使用できることを目指している。

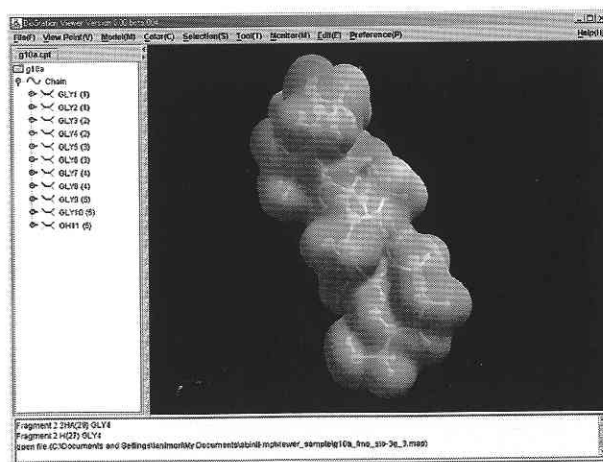


図3 BioStation Viewer で描いた等電子密度面上の静電ポテンシャルマップの例。半透明の等電子面を通して、分子のモデル構造が見える。

4. 計算例：エストロゲン受容体とエストロゲン類似化合物の結合強度

エストロゲン受容体は核内受容体スーパーファミリーの1種であり，創薬ターゲットとして重要なタンパク質である．また，核内受容体はリガンド依存的に転写活性を制御することが知られており，リガンドとの相互作用の解析はその機能を理解するための第一歩としても興味深い．ここでは，エストロゲン受容体と種々のリガンド分子との結合エネルギーを理論的に計算することで，リガンド候補化合物のエストロゲン受容体への結合能を予測した．分子間の相互作用解析を精度良く行うためには，従来体系に用いられてきた経験的手法に加えて量子化学的なアプローチ

が不可欠である．ここでは *ab initio* FMO 法プログラム ABINIT-MP を用いて，リガンド分子の受容体タンパク質に対する結合性解析を量子化学的に行った．

計算対象としたのは，エストロゲン受容体 α と図4に示す11種のリガンド分子である．リガンド結合ドメイン全体を含む複合体（モデル1，241残基），およびリガンド周辺部位の約50残基からなる複合体（モデル2）の2種類の分子モデルを用いて計算した．エストロゲン受容体の3次元立体構造データは，Protein Data Bank (PDB)¹⁶⁾ に登録されているもの（PDB ID：1ERE, 1ERR, 3ERD, 3ERT）をダウンロードした．これらのデータに対し，MSI社のCHARMm, Insight II および Gaussian, Inc. の Gaussian98 等の商用ソフトを用いて分子モデリングを行った．さらに，

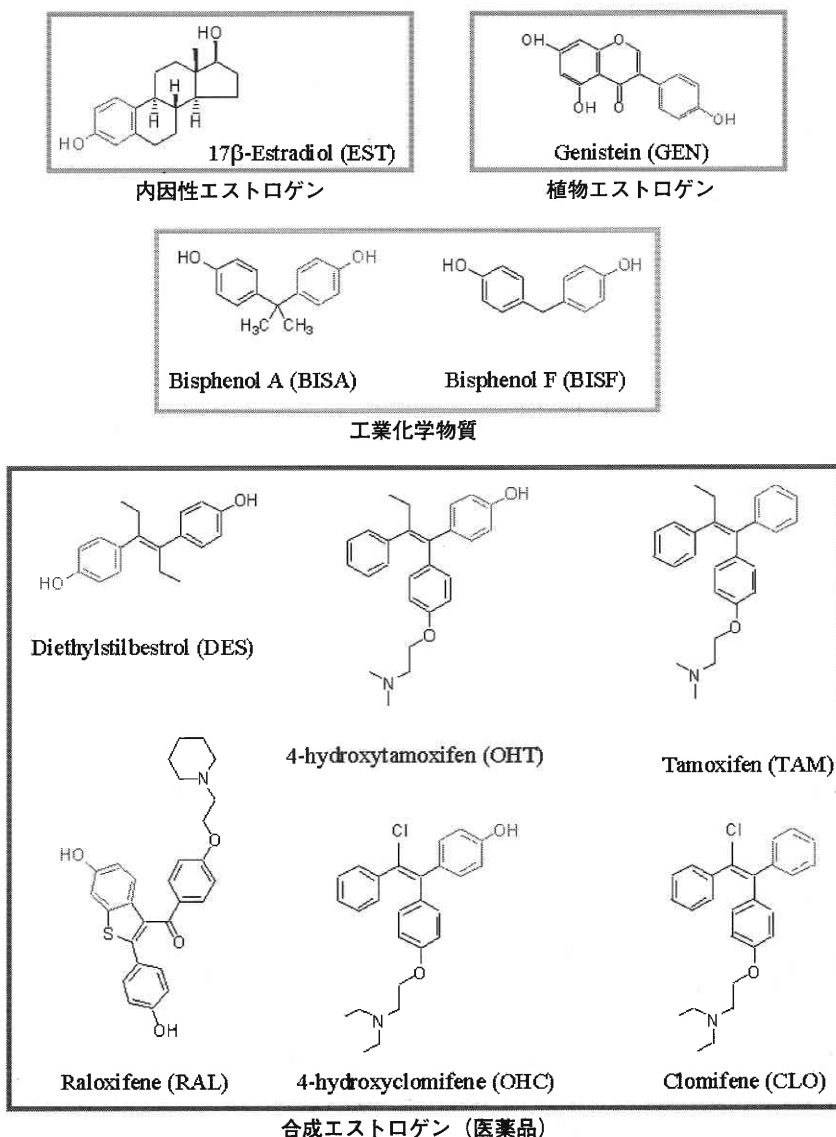


図4 エストロゲン受容体との結合エネルギー計算を行ったリガンド分子

ABINIT-MP を用いて HF/STO-3G レベルの結合エネルギーを計算した。得られたエネルギー値から、17 β -エストロジオール (EST) を基準とした相対結合エネルギー ($\Delta\Delta E$) を求め、実験的に知られている相対結合能¹⁷⁾ との比較を行った。モデル 2 では 11 種全てのリガンドに対して計算を行ったが、モデル 1 では EST, DES, OHT, RAL の 4 リガンドに対してのみ計算を行った。計算機には、二種類の PC クラスタを用いた。

分子間の結合エネルギー (ΔE_{ligand}) は、受容体のエネルギー (E_{receptor}) とリガンド分子のエネルギー (E_{ligand}) の和と複合体のエネルギー (E_{complex}) とのエネルギー差として表現できる。すなわち;

$$\Delta E_{\text{ligand}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{receptor}} - E_{\text{ligand}}$$

次に、実験的に知られている相対結合能 (RBA) と比較するために、EST が結合した複合体を基準とした相対結合エネルギー $\Delta\Delta E$ を以下のように定義した;

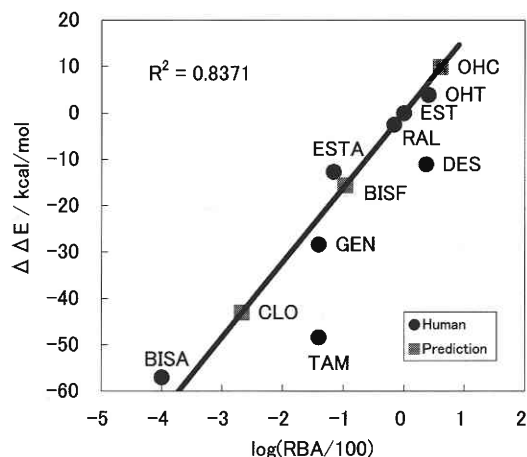


図5 モデル 2 (50 残基) を用いた ER α とリガンドとの結合性の比較。●は実験値から RBA が得られている化合物、■は RBA が不明の化合物に対する予測値を表す。

表1 モデル間の比較。計算には 2 種類の PC クラスタ (16 ノード Dual Pentium III (1 GHz), 8 ノード Dual Xeon (2.2 GHz), ネットワークは 100 Base-TX である) を用いた。表中の * は後者を用いた結果である。

リガンド	モデル 2 (50 残基)			モデル 1 (241 残基)		
	ΔE / kcal/mol	CPU time / s	NPU s	ΔE / kcal/mol	CPU time / s	NPU s
EST	-37.80	6285.7	32	-37.65	50995.3	32
RAL	-35.30	6956.5	32	-26.13	105551.1*	14*
OHT	-41.73	7661.4	32	-38.19	271543.4*	7*
DES	-26.70	5294.3	32	-28.33	51936.3	32

$$\Delta\Delta E_{\text{ligand}} = \Delta E_{\text{ligand}} - \Delta E_{\text{EST}}$$

FMO 計算によりモデル 2 に対して得られたエネルギー値を用いて、図 5 に相対結合能 ($\log(\text{RBA}/100)$) 対計算値 ($\Delta\Delta E$) の点をプロットした。●は実験値から RBA が得られている化合物を表し、図中の直線はこれらの分子に対する相関直線である。■は RBA が不明の化合物に対して相対結合エネルギーから得られる予測値を表す。

図 5 に示すように、モデル 2 に対して 8 化合物を用いて引いた相関直線は高い相関係数を示しており ($r^2 = 0.837$), 特に TAM 以外の 7 化合物においては、実験値と計算値が非常によく一致している。TAM がよく合わない理由の一つとして、モデリングする際に殆どの重原子の座標を固定しているためにひずみが生じている可能性がある。このことを回避するためには、リガンド周辺の構造を最適化し、最も安定なリガンドの位置を決定する必要がある。

次に、モデル 1 とモデル 2 の結果を比較する。表 1 は、結合エネルギー (ΔE), 計算時間 (CPU time), 使用した CPU 数 (NPU s) をまとめたものである。計算時間は、モデル 1 はモデル 2 の 7~10 倍程度の時間がかかっている。次に結合エネルギー (ΔE) を比較すると、2 つのモデルの間の差は EST, OHT, DES の 3 化合物に対して ~3 kcal/mol 程度であり、殆ど違いがないことがわかる。このことは、エストロゲン受容体とリガンドとの結合が、活性ポケット周辺の環境のみに依存する局所的なものであることを示している。エストロゲン受容体 (ER) のリガンド結合能について、相対結合能 RBA と相対結合エネルギー $\Delta\Delta E$ がほぼ比例関係を示した。これらにより実験に先駆けた定性的な理論予測が可能となった。このことは生体分子系に対する FMO 法の有用性を示しており、今後さらに高精度・大規模な計算を行うことによって定量的な予測が可能になると期待される。

5. 謝 辞

本研究は、文部科学省 IT プログラム「戦略的基盤ソフトウェアの開発」、科学技術振興事業団計算科学技術活用

型特定研究開発推進事業「DNA-ナノ領域ダイナミクスの第一原理解析」および医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構「タンパク質科学研究による疾病対策・創薬等推進事業「タンパク質科学による創薬研究」の支援を受けた。

(2003年3月24日受理)

参 考 文 献

- 1) T. Nakano, T. Kaminuma, M. Uebayasi and Y. Nakata; *Chem-Bio Info. J.* **1**, 35 (2001).
- 2) 小西健三, 瀧 和男, 木村宏一; *情報処理学会論文誌*, **36**, 797 (1995).
- 3) A. K. Rappé and W. A. Goddard III; *J. Phys. Chem.* **95**, 3358 (1991).
- 4) A.K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III and W. M. Skiff; *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10024 (1992).
- 5) K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano and M. Uebayasi; *Chem. Phys. Lett.*, **312**, 319 (1999).
- 6) K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano and M. Uebayasi; *Chem. Phys. Lett.*, **313**, 701 (1999).
- 7) T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayasi and K. Kitaura; *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 614 (2000).
- 8) K. Kitaura, S. Sugiki, T. Nakano, Y. Komeiji and M. Uebayasi; *Chem. Phys. Lett.*, **336**, 163 (2001).
- 9) T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayasi and K. Kitaura; *Chem. Phys. Lett.*, **351**, 475 (2002).
- 10) Y. Inadomi, T. Nakano, K. Kitaura and U. Nagashima; *Chem. Phys. Lett.* **364**, 139 (2002).
- 11) S. Obara and A. Saika; *J. Chem. Phys.* **84**, 3963 (1986).
- 12) S. Obara and A. Saika; *J. Chem. Phys.* **89**, 1540 (1988).
- 13) M. Honda, K. Sato and S. Obara; *J. Chem. Phys.* **94**, 3790 (1991).
- 14) <http://impact.nihs.go.jp/RDB.html>
- 15) <http://molddb.nihs.go.jp/eddb/afdb/>
- 16) <http://www.rcsb.org/pdb/>
- 17) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA; *Endocrinology* **139**, 4252 (1998).