

Table 7. Body and relative organ weights at the end of the experiment

Group	Body Weight, g	Liver	Kidney(R)	Kidney(L)
Cont/M	390.4 ± 21.1	3.90 ± 0.26	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.02
AAP/M	320.6 ± 24.6 **	4.16 ± 0.12	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.03
EE0.5/M	396.6 ± 17.4	3.68 ± 0.10	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.03
EE5/M	406.5 ± 7.5	4.09 ± 0.26	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02
EE50/M	382.0 ± 33.2	4.10 ± 0.34	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.02
EE50/M-Cast	328.0 ± 7.7 **	4.03 ± 0.34	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Cont/F	233.7 ± 11.5	3.50 ± 0.30	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01
TP1/F	234.8 ± 12.8	3.61 ± 0.16	0.39 ± 0.01	0.37 ± 0.02
TP10/F	231.3 ± 15.8	3.47 ± 0.27	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.02
TP100/F	250.6 ± 4.1	3.53 ± 0.28	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04
TP100/F-Cast	265.5 ± 13.5 **	3.76 ± 0.30	0.28 ± 0.15	0.39 ± 0.10

Data represent mean values ± S.D.

\*\* Significantly different from the control group at p<0.01.

Table 8. Relative weights of reproductive organ at the end of the experiment

Male	Testis(R)	Testis(L)	Epididymis(R)	Epididymis(L)	Prostate, ventral lobe	Seminal gland + Coagulation gland + Prostate
Cont/M	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.38 ± 0.06
AAP/M	0.47 ± 0.06	0.42 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.35 ± 0.04
EE0.5/M	0.41 ± 0.06	0.41 ± 0.07	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.37 ± 0.06
EE5/M	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.38 ± 0.02
EE50/M	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.06	0.38 ± 0.04
EE50/M-Cast			0.03 ± 0.01**	0.02 ± 0.01**	0.01 ± 0.01**	0.07 ± 0.01**
Female	Ovary(R)	Ovary(L)	Uterus			
Cont/F	0.016 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.262 ± 0.080			
TP1/F	0.018 ± 0.004	0.018 ± 0.002	0.204 ± 0.024			
TP10/F	0.018 ± 0.003	0.017 ± 0.004	0.195 ± 0.041			
TP100/F	0.015 ± 0.005	0.014 ± 0.003	0.194 ± 0.039			
TP100/F-Cast			0.060 ± 0.007**			

Data represent mean values ± S.D.

\*\* Significantly different from the control group at p<0.01.

Table 9. Serum hormone levels at the end of the experiment

Group	Estradiol, pg/ml	Testosterone, ng/ml
Cont/M	4.5 ± 1.5	1.6 ± 0.5
AAP/M	3.9 ± 0.7	1.4 ± 1
EE0.5/M	4.5 ± 0.9	1.5 ± 0.9
EE5/M	3.7 ± 0.4	1.3 ± 0.4
EE50/M	3.8 ± 0.7	2.1 ± 2.7
EE50/M-Cast	4.0 ± 0.5	0.1 ± 0.1
Cont/F	19.8 ± 18.8	0.9 ± 1.6
TP1/F	3.6 ± 1.2*	0.1 ± 0
TP10/F	10.1 ± 9.8	0.1 ± 0
TP100/F	5.2 ± 2.1	5.7 ± 10.1
TP100/F-Cast	2.4 ± 0.4*	0.1 ± 0

Data represent mean values ± S.D.

\* Significantly different from the control group at  $p < 0.05$ .

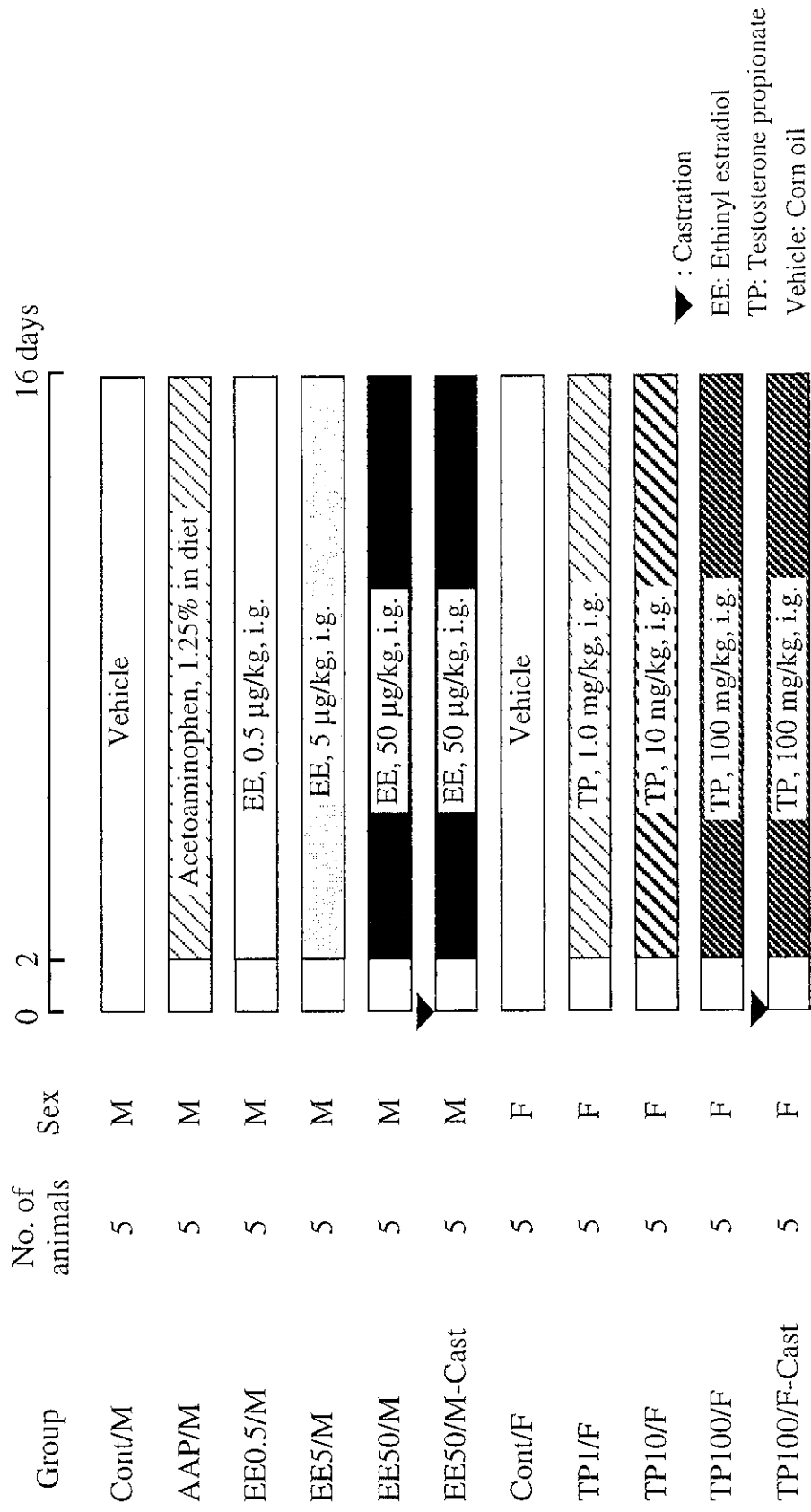


Fig.1. Experimental design

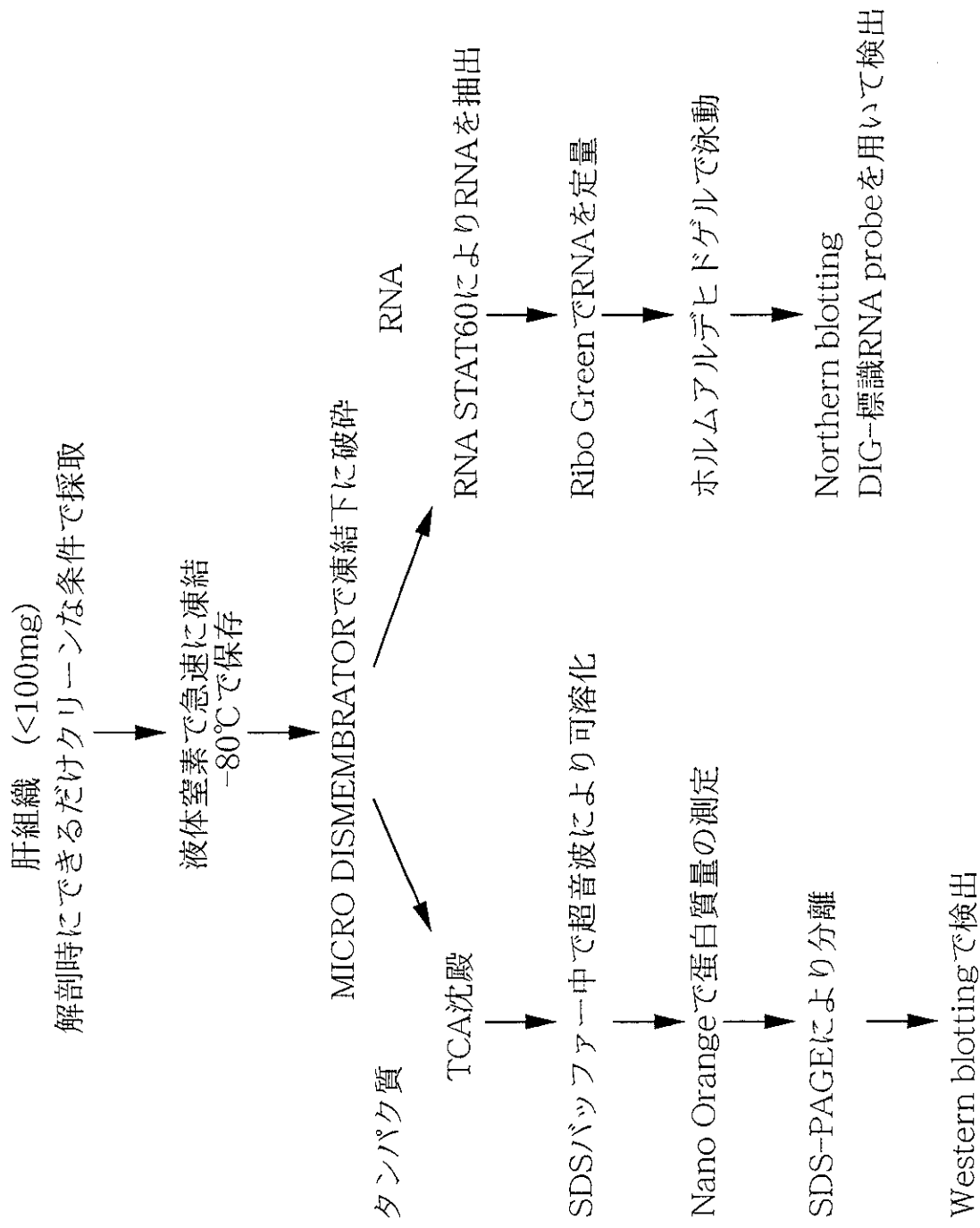
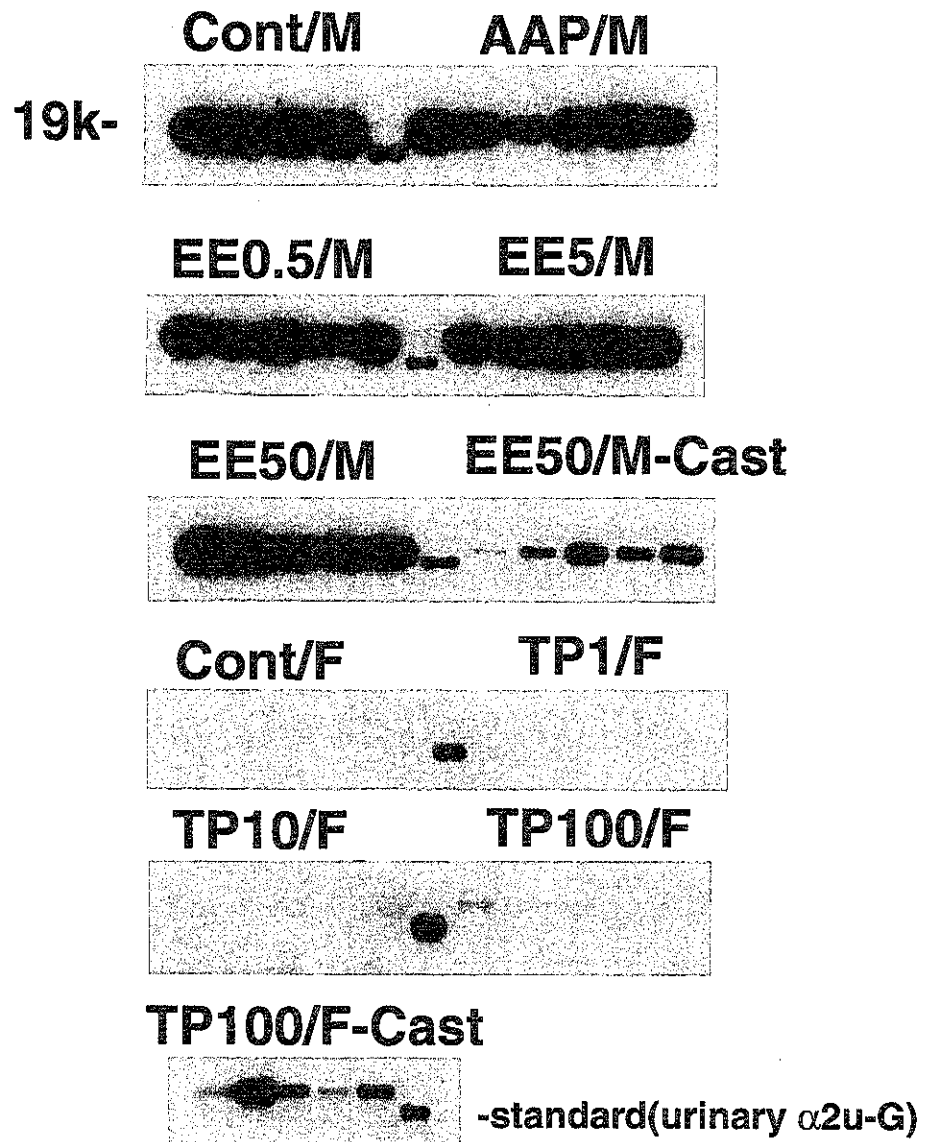


Fig.2 Schematic representation of the sample preparation for both Western and Northern blotting analyses



**Fig. 3** Expression levels of  $\alpha$ 2u-globulin in the livers

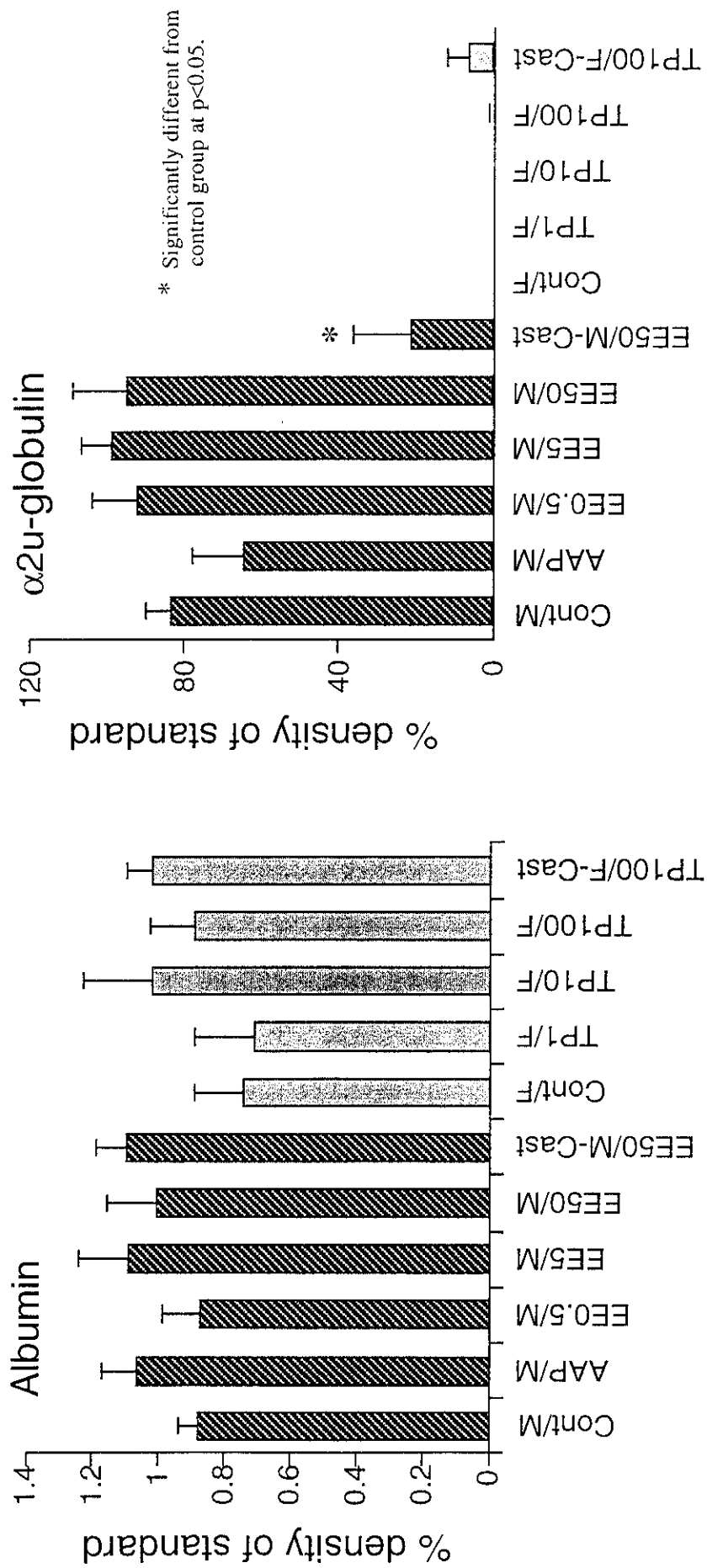
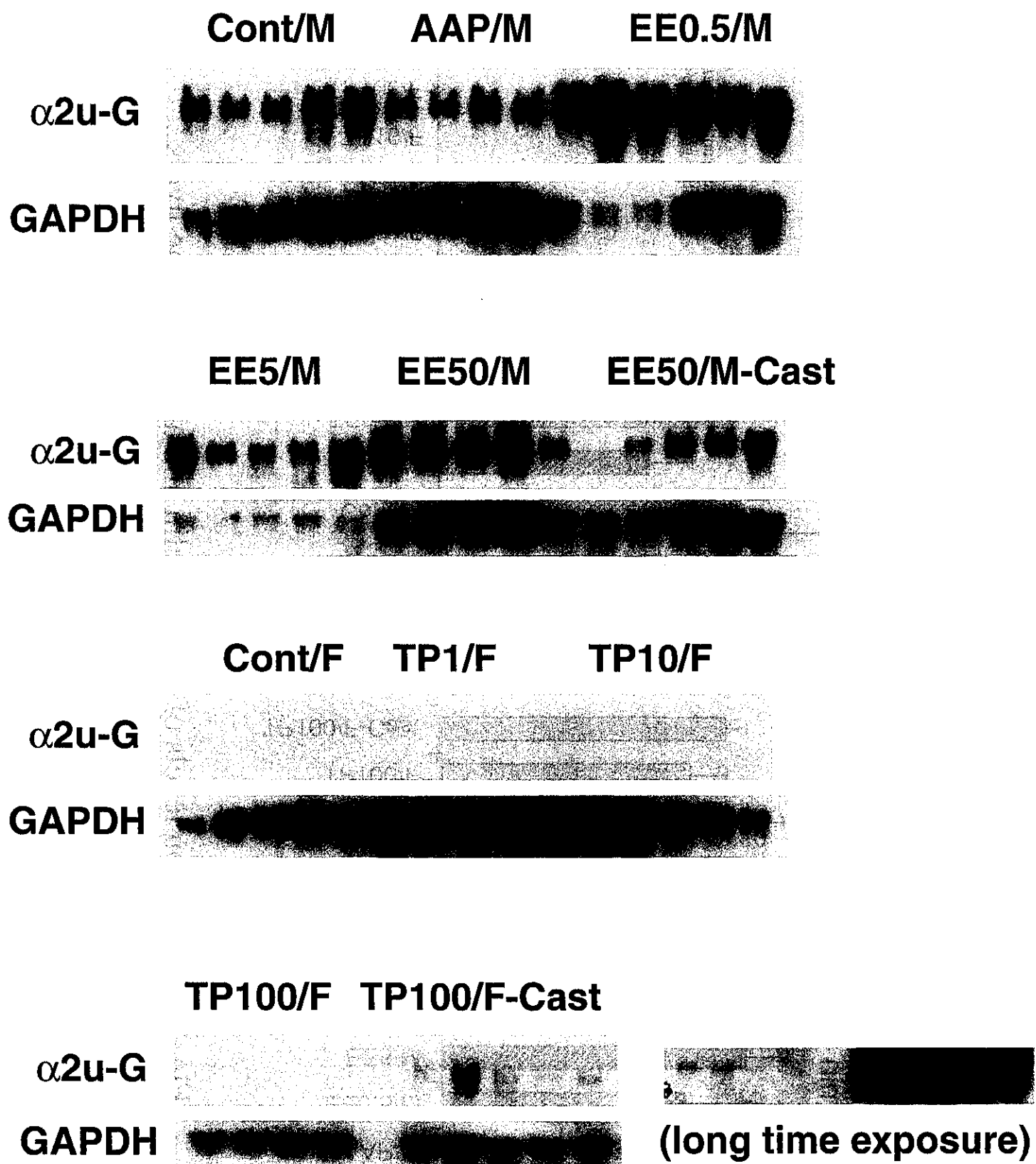


Fig.4. Expression levels of α2u-globulin and albumin in the livers.



**Fig. 5 Expression levels of  $\alpha$ 2u-globulin mRNA in the livers**



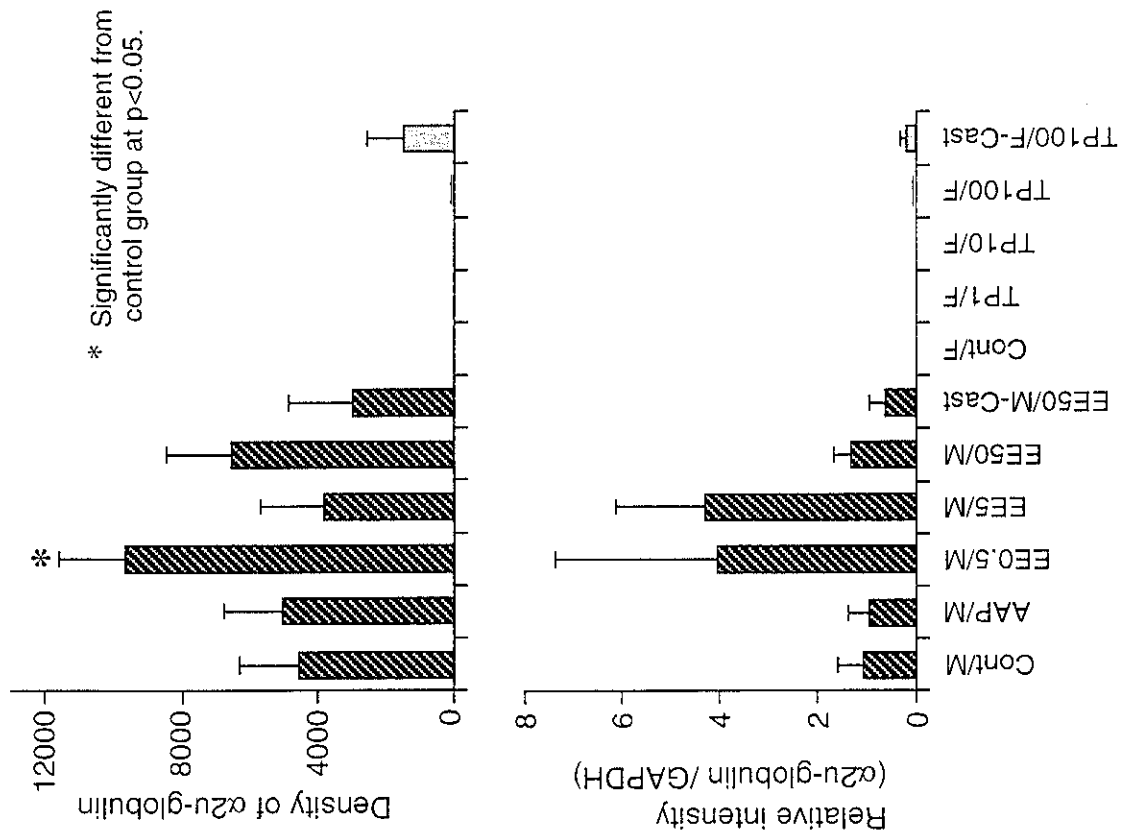


Fig. 6 Liver  $\alpha 2u$ -globulin mRNA level determined by Northern blotting

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質の電算検索と評価に関する研究

分担研究者 板井昭子 株式会社 医薬分子設計研究所所長

研究要旨

エストロゲン受容体（ER $\alpha$ ）を標的とする既知の内分泌かく乱物質について受容体と複合体を形成した場合の相互作用様式と強さの理論的解析をコンピュータ上で行なった。また、それらの化合物について ratER $\alpha$  遺伝子を導入した COS-1 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行ない転写活性を測定した。さらにフラボン・イソフラボン類に着目し、入手可能なこれらの化合物すべてに対して受容体と複合体を形成した場合の相互作用様式と強さを理論的に解析し、選び出した化合物について同様の方法で転写活性を測定したところ 11 化合物にナリングニンと同程度以上の活性がみられた。

A. 研究目的

近年、環境中に存在する多くの天然または化学合成された化学物質が内分泌かく乱作用を示して、生物体の健全な発育を阻害することが明らかになり、その科学的な確認と対策が急務となっている。これらの化学物質はたまたま女性ホルモン等の核内受容体に結合するためにそうした作用を発現することが推定されており、同定・検出・試験の方法についての研究と共に、個々の既知かく乱物質がどのように生物作用を発現するかを明らかにするための数多くの実験的研究がなされている。

一方、女性ホルモン等核内受容体のリガンド結合ドメインは結晶構造が解析されており、標的受容体の立体構造の情報に基

づきコンピュータを用いた理論的なアプローチが可能である。当研究者らは以前から、標的受容体の立体構造が利用できる場合に、任意の化合物が形成できる最安定な複合体の構造を予測し、原子レベルでの相互作用様式と結合の強さを推定する自動ドッキング法およびその方法に基づいて新規の活性化合物を探索する目的で、膨大な化合物群から標的受容体に安定に結合する可能性の高い少数の化合物を選別する三次元データベース検索法の開発を行ってきた。本研究は、これらの方法を利用して、既知内分泌かく乱物質について作用発現に必要な構造条件を明らかにし、さらに、三次元データベース検索法を利用して選別した少数の候補化合物を入手して

実験的に活性確認することにより未知のかく乱物質を効率よく探索することを目的とする。

今年度の研究としてはまず、受容体として精度の高い三次元座標が入手可能なエストロゲン受容体 $\alpha$ に着目し、既知の内分泌かく乱物質について受容体との相互作用を検討する。さらに、既に多くの内分泌かく乱物質が知られ、かつ多数の活性未知の類似構造をもつ化合物の存在が知られているイソフラボンおよびフラボン系の化合物群から新規の内分泌かく乱作用をもつ化学物質を探索することにした。対象とした化学物質については、ratER $\alpha$ 遺伝子を導入したCOS-1細胞のルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて正確な転写活性値を求め、エストロゲン受容体に作用する新規化学物質であることを確認することを行なう。

## B. 研究方法

今年度は、種々の内分泌かく乱物質のターゲット受容体のうち、受容体のリガンド結合ドメイン(LBD)とリガンド複合体の三次元構造が入手可能であるエストロゲン $\alpha$ 受容体(ER $\alpha$ )に着目し研究を行なった。現在までにER $\alpha$ のLBDは17 $\beta$ -エストラジオール(E2)以外に合成リガンドであるジエチルスチルベステロール(DES)、およびアンタゴニスト活性を有する合成リガンドであるラロキシフェン(RAL)、ヒドロキシタモキシフェン(OHT)との結晶構造が解析されており、いずれも無償で公開されている。これらの結晶構造の中で特にリガンド結合部位に着目し、結合しているリガンドの違いによ

る受容体側の立体構造の変化を解析した。

また、ER $\alpha$ を標的とする既知の内分泌かく乱物質についてはEPA(Environmental Protection Agency) Draft List of Candidate Chemical For High Throughput Screening Project中に掲載されている約60種類の化合物を対象とした(抗エストロゲン作用を有する物質も含む)。本リスト中で、ターゲット受容体未知となっている物質に関しても入手可能であるものについては転写活性を測定することとした。

複合体での受容体—リガンド間の相互作用を見積もるためにはあらかじめリガンドとなる化合物を三次元構造にし、原子電荷を与えておく必要がある。そのためドッキングに先立って、まず低分子化合物三次元化プログラム(Olive・当社開発品)によりリガンド構造の三次元化および電荷計算を行なった。ついで、受容体—リガンド間の水素結合の形成を手がかりに、リガンドの配座の自由度を考慮して網羅的に結合モデルを探索できる蛋白質受容体—リガンド自動ドッキングプログラム(Adam & Eve・当社開発品)を用いて受容体—リガンド間の結合状態を探索し、その相互作用エネルギーを見積もり、結合状態を推定した。水素結合可能な原子のない化合物に関しては、対話式ドッキング(Green・当社開発品)により複合体構造を予測した。相互作用エネルギーの見積もりには分子力場計算用プログラムであるAMBERのパラメタを用い、分子間のファンデルワールスポテンシャル項と静電ポテンシャル項を指標にした。また、受容体—リガンド間で形成される水素結合の本

数・距離・角度に関する目し、複合体構造推定の指標にした。

また、これらの既知エストロゲン様作用物質のうち、入手可能な化合物に関しては、購入して、その転写活性を測定した。転写活性は COS-1 細胞に ratER $\alpha$  遺伝子と、レポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子をコトランスフェクションしたルシフェラーゼアッセイ系で測定した。トランスフェクション効率補正のために内部標準として  $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた。

次に、これらの計算結果をふまえて、既知のエストロゲン様作用物質と構造が類似している活性未知の化合物群に対して、コンピュータによるスクリーニングを実施した。今年度は、すでに植物エストロゲンとしてクメステロール・ゲニステインなど数種類の活性物質が知られているフラボン・イソフラボン系の化合物を対象とした。これらの中で入手可能な化合物に対して蛋白質-リガンド自動ドッキングによるコンピュータスクリーニングを実行し、相互作用・結合様式を解析した。その中から、相互作用エネルギーの評価がよく、また水素結合等の相互作用様式がリーズナブルであるものを選択し、21 化合物を購入した。購入したサンプルに関しては、上述したルシフェラーゼアッセイを実行し、その転写活性を測定した。

### C. 研究結果

エストロゲン受容体の場合、アンタゴニスト作用をもつ RAL, OHT とが結合した場合に、LBD の Helix12 がドラスティックに動くことは周知の事実であるが、もっと一般的に、蛋白質受容体の構造は、結

合する化合物の構造に依存して側の立体構造も変化することが知られている (induced fit)。ER $\alpha$  のリガンド結合部位でも、E2 が結合した場合と DES が結合した場合ではその構造が若干変化しており、形成するキャビティの形状も異なっていることがわかった。

このことから、既知のエストロゲン様作用物質のドッキングは、まず、E2 結合受容体構造を使用して行ない、次に、DES 結合受容体構造を用いて行なった。さらに、抗エストロゲン作用を有する物質については RAL もしくは OHT 結合受容体構造を用いて行なった。その結果、今回扱ったほとんどすべてのエストロゲン様作用物質がこれらいずれかの ER $\alpha$  に安定に結合可能であり、それらのエストロゲン様作用の強さが反映されることがわかった。

一方、COS-1 細胞を用いた転写活性試験の結果、エチニルエストラジオール、17 $\alpha$ -エストラジオール、エクリン、DES の転写活性が E2 よりも高かった。また、今回測定した有機塩素系化合物およびアルキルフェノール誘導体 10 種類すべてに非常に弱い転写活性がみられた。フタル酸誘導体はその活性代謝物に ER を介さない内分泌かく乱作用があるといわれているが、ベンジル n-ブチルフタレートに弱い転写活性がみられた。

次に、入手可能なフラボンまたはイソフラボン骨格を有する化合物 (フラボン・イソフラボンを含む) であってエストロゲン様作用未知の 442 化合物について自動ドッキングを行なった。分子間相互作用エネルギー・ドッキング構造の整合性・水素結合様式の整合性などをもとに 21

化合物を選び出し、それらの活性試験を実施した結果、11化合物に既知の植物エストロゲンであるナリングニン以上の転写活性がみられ、残りの化合物にもフラボン以上の活性があった。

#### D. 考察

研究目的の項でも述べたように、内分泌かく乱作用を有する化合物を早期に見極める方法の確立が求められている。そのためには、簡便な実験法の確立が第一であるが、現存する膨大な量の化学物質すべてに対して活性確認試験を行なうことは非常に困難である。われわれは、今回、エストロゲン $\alpha$ 受容体を題材に、エストロゲン様作用既知の化合物群に対してコンピュータ上でバーチャルに受容体と結合させ、その相互作用を見積もることで活性の有無を判断できるかどうか検討した。その結果、活性のある化合物については、結合様式が非常に好ましく、分子間相互作用エネルギーも安定となることがわかった。さらに、活性未知の化合物群に対してコンピュータスクリーニングを行ない、実際の転写活性を測定したところ、その半数以上の化合物に中程度の転写活性がみられた。今回使用した活性未知化合物はフラボン・イソフラボン骨格を有する化合物群であり、構造上の多様性は乏しいが、それでも従来活性があることが明らかになっていなかった化合物を高効率で抽出できたことは本スクリーニング法の可能性を示しているものと考えられる。現在、これらの化合物につき、活性発現の構造要件を詳細に解析しているところである。

また、エストロゲン受容体には $\beta$ サブタ

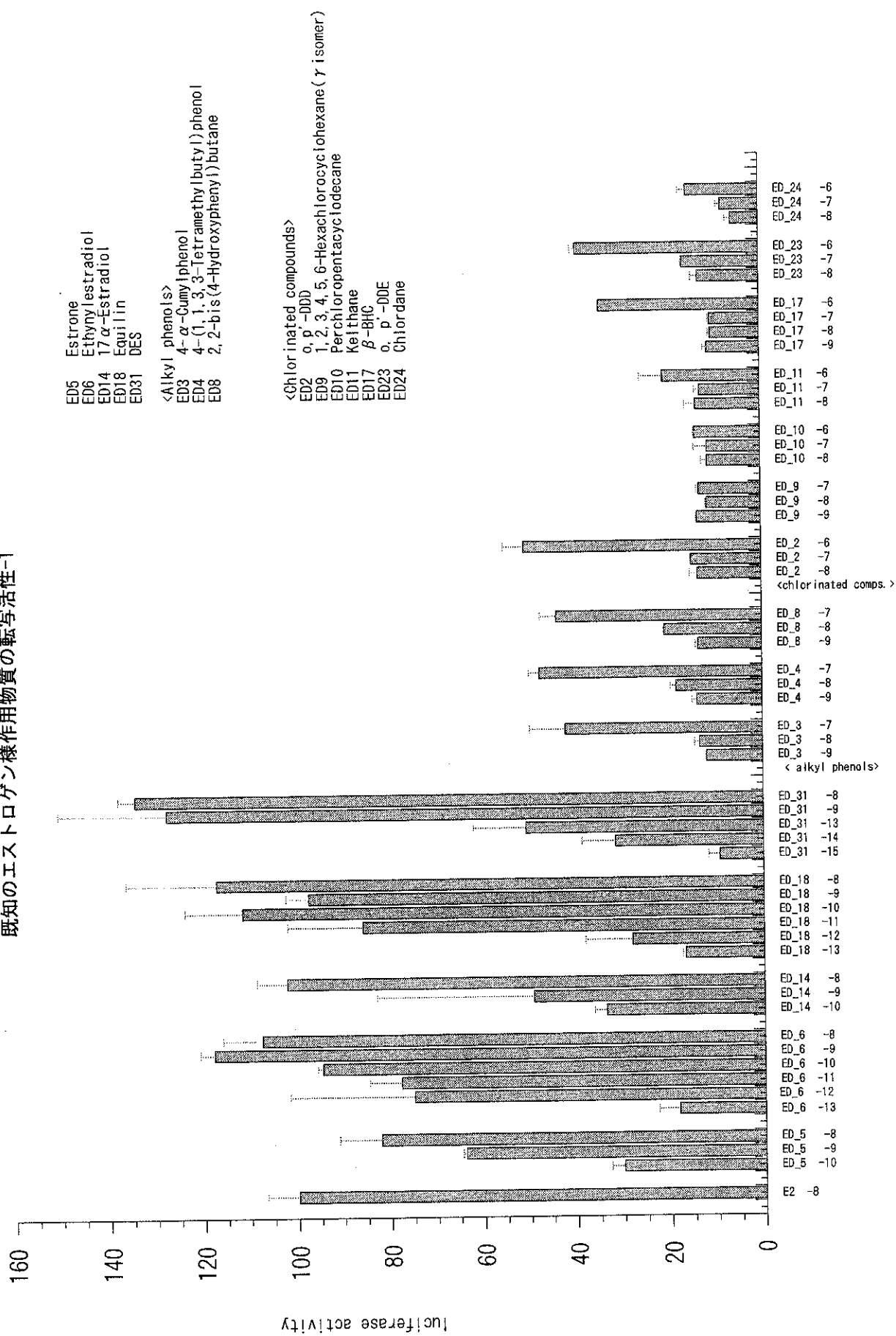
イプがあり、植物エストロゲンにはER $\beta$ に対する結合親和性が高いものも報告されている。 $\beta$ 受容体立体構造は現在のところ公開されていないが、モデリングソフトを利用することで、その立体構造を解析することは可能である。それとあわせて今回新たに見つけたフラボン・イソフラボン類のER $\beta$ での転写活性も興味深いところである。

#### E. 結論

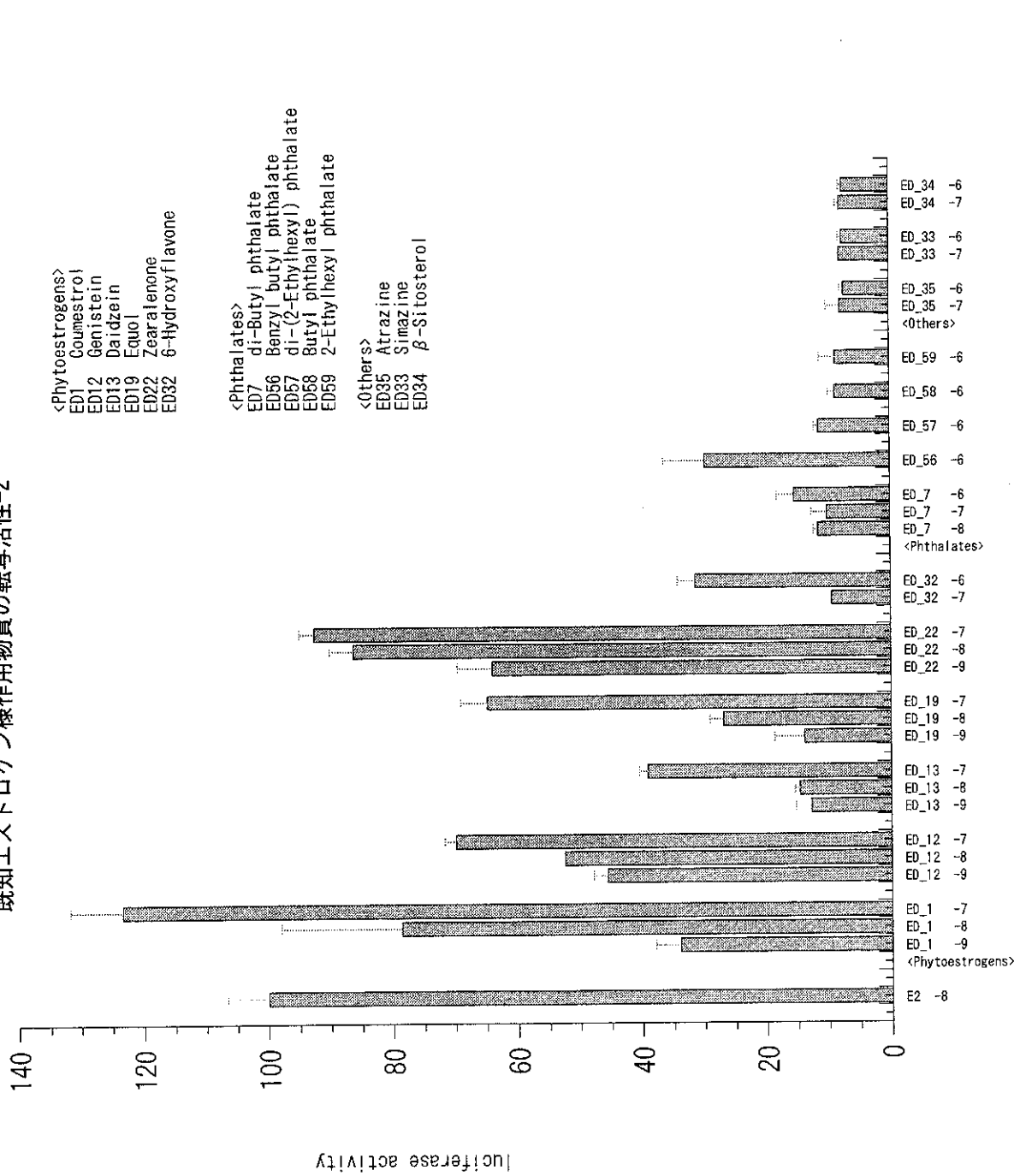
エストロゲン受容体 $\alpha$ を標的とする既知の内分泌かく乱物質について、複合体構造を推定し、複合体での相互作用の強さと相互作用様式を理論的に解析した。また、入手可能なフラボン・イソフラボン系の化合物442化合物について、既知化合物の結合解析で得られた知見をもとにコンピュータスクリーニングを行ない、選択した21化合物についてCOS-1細胞を使ったルシフェラーゼアッセイを実施したところ、11化合物に中程度のエストロゲン活性が見られた。このことは、コンピュータスクリーニング法の可能性を示す一例であり、今後、さらに多彩な構造を有する化合物群を対象にしたスクリーニングや、他の内分泌かく乱物質の標的受容体への適用も可能であると考えられる。

#### F. 研究発表

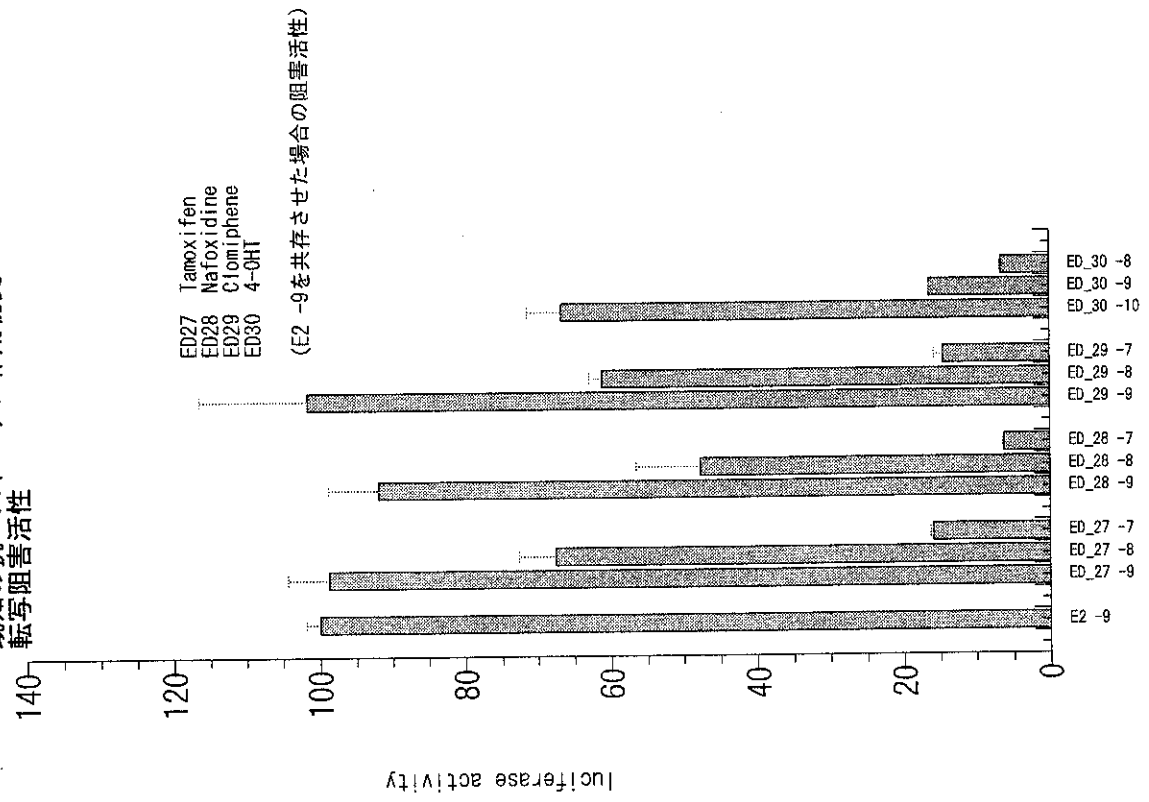
既知のエストロゲン様作用物質の転写活性-1



既知エストロゲン様作用物質の転写活性-2

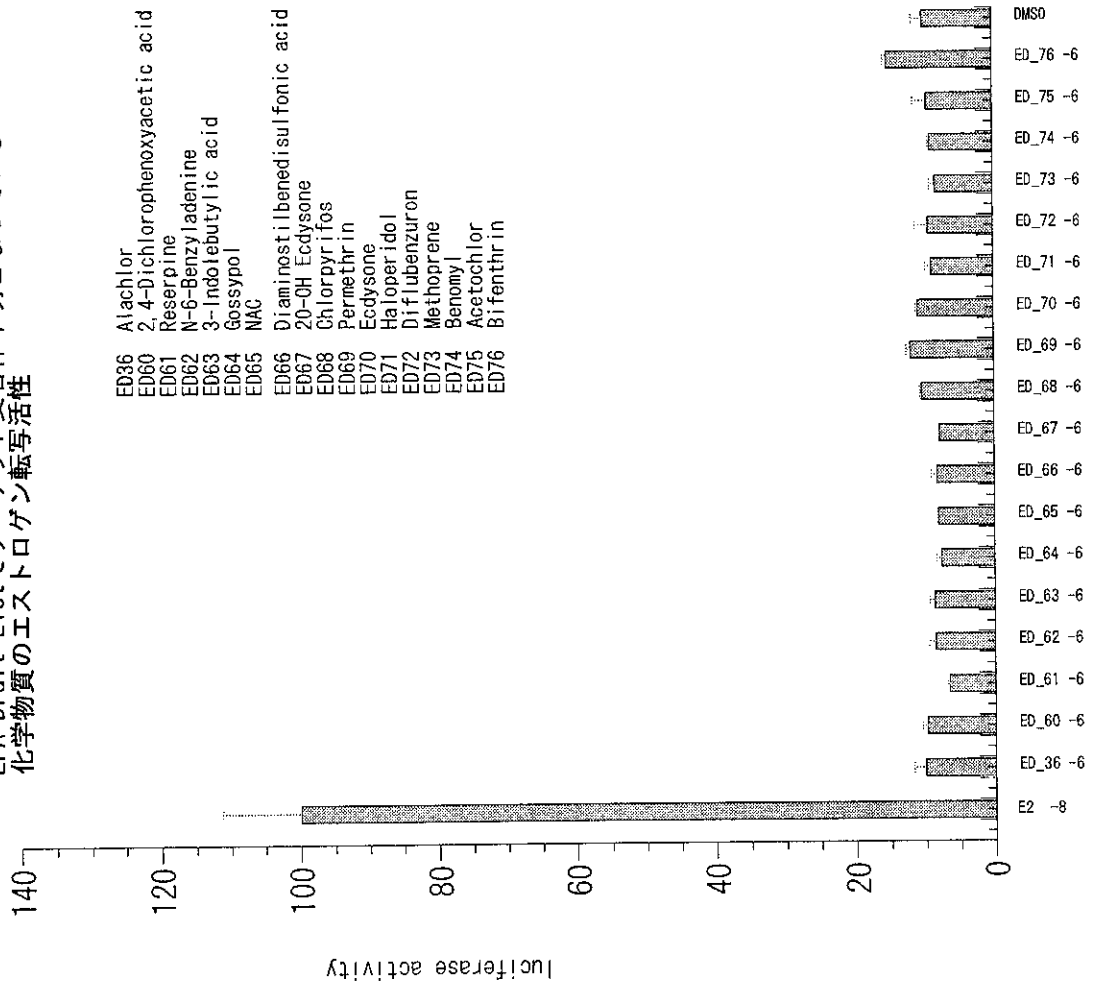


既知の抗エストロゲン作用物質の  
転写阻害活性

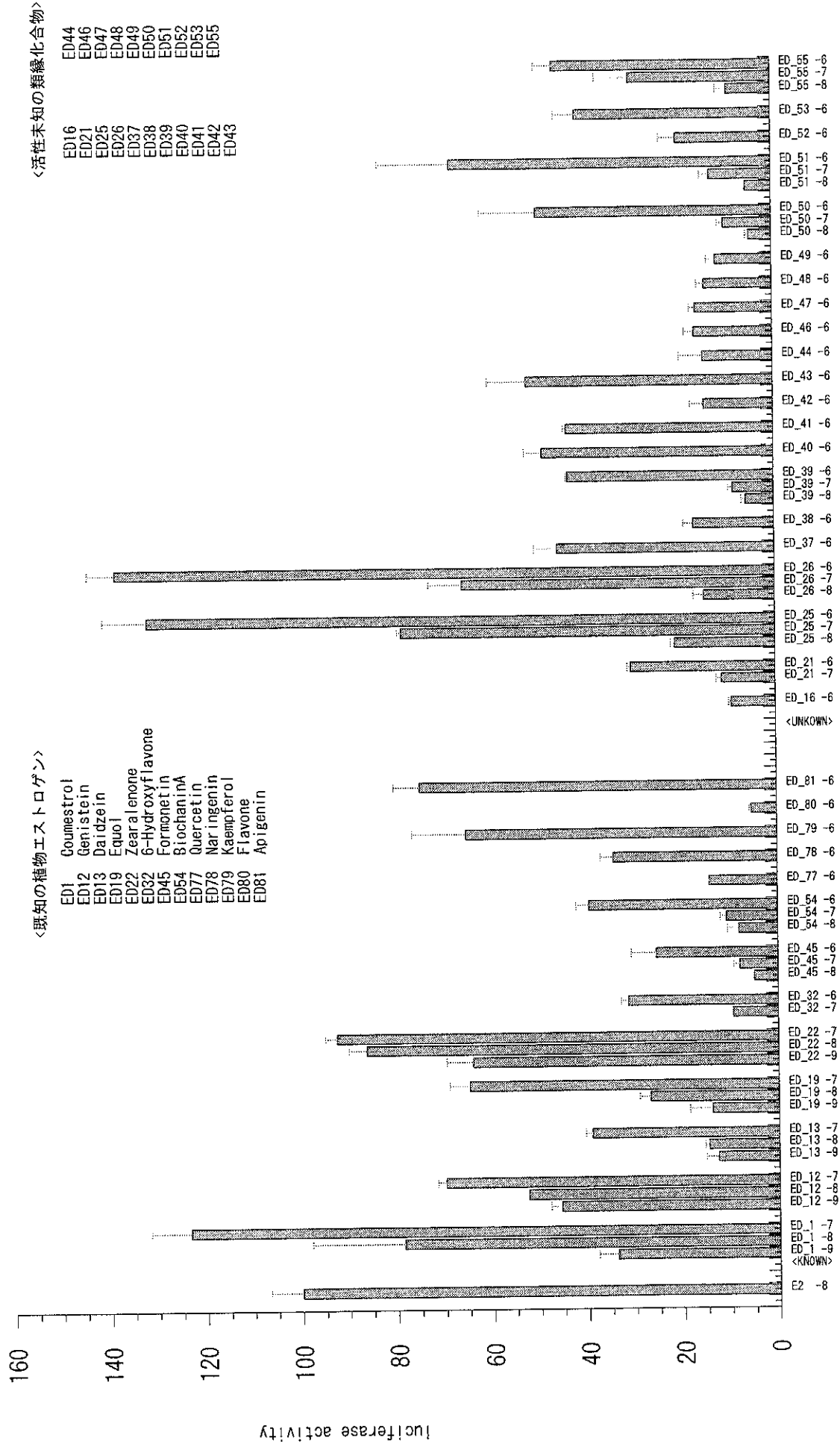




EPA Draft Listでターゲット受容体不明となっている  
化学物質のエストロゲン転写活性



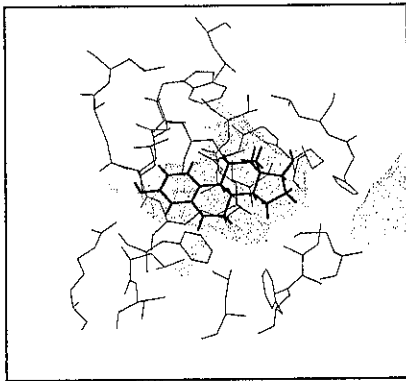
植物エストロゲン類縁化合物の転写活性



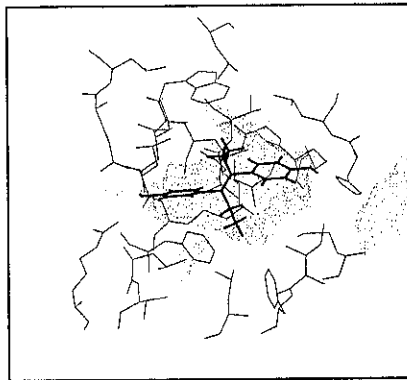
今回活性を測定した未知フラボン・イソフラボン類の構造

ED16	no active	ED21	weak active	ED25	strong active	ED26	strong active
ED37	active	ED38	weak active	ED39	active	ED40	active
ED41	active	ED42	weak active	ED43	active	ED44	weak active
ED46	weak active	ED47	weak active	ED48	weak active	ED49	weak active
ED50	active	ED51	active	ED52	weak active	ED53	active
ED55	active						

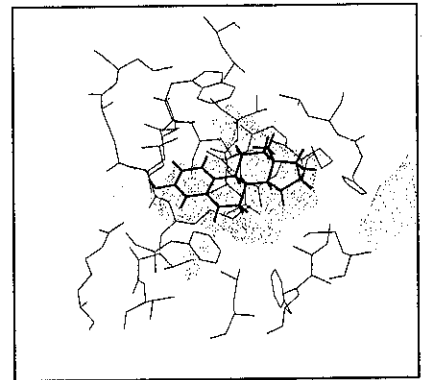
# Known Environmental Estrogens Docking Models



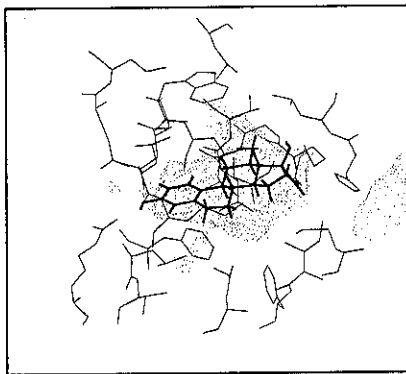
17beta-Estradiol



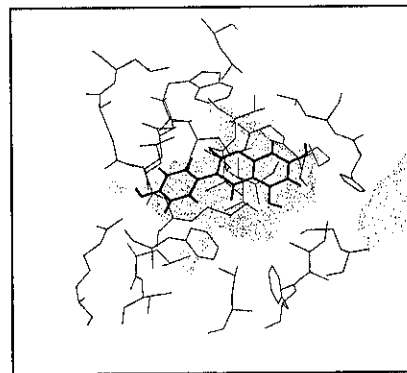
ED31 Diethylstilbestrol



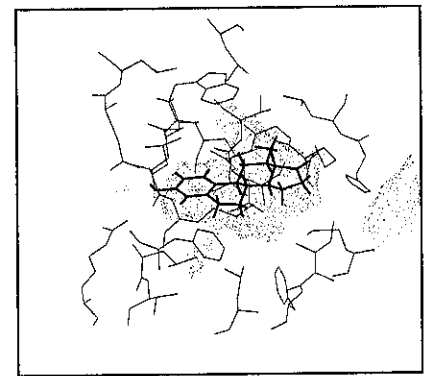
ED14 17alpha-Estradiol



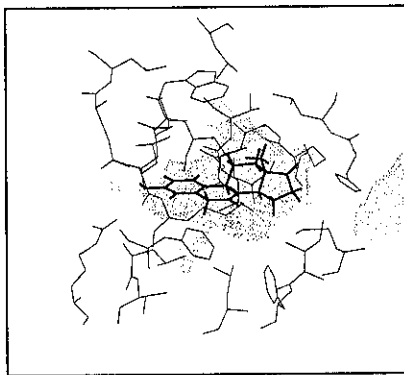
ED6 Ethynylestradiol



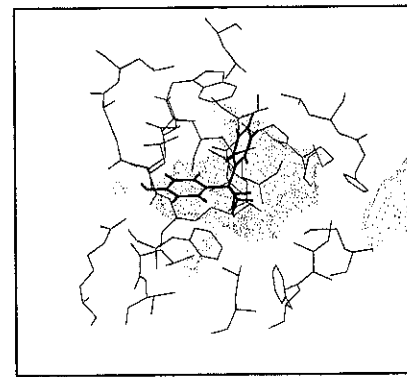
ED12 Genistein



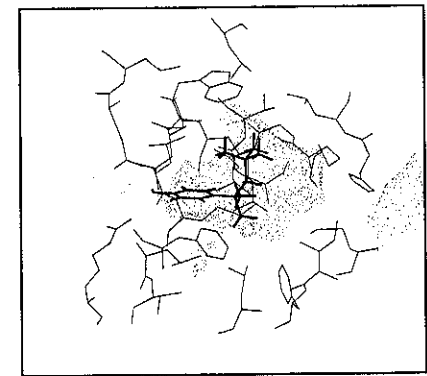
ED5 Estrone



ED18 Equilin



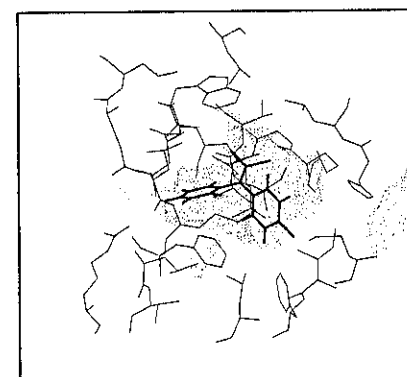
ED3 4alpha-Cumylphenol



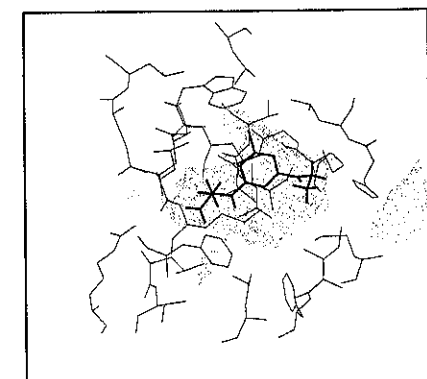
ED4 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol



ED2 o,p'-DDD



ED23 o,p'-DDE



ED35 Atrazine