

なくリガンドのみを動かすため、ドッキング後得られた各推定結合様式モデルについて、リガンドとリガンド結合キャビティ周辺のアミノ酸残基を含めた構造最適化を行なった。相互作用エネルギーの見積もりには分子力場計算プログラム AMBER を基に、分子間のファンデルワールスパラメタに改良を加えた独自の力場を使用し、分子間ファンデルワールスポテンシャル、静電ポテンシャル、リガンドの差の分子内エネルギー（蛋白質に結合した状態と水中での最安定状態とのエネルギー差）等を考慮したスコア値を算出した。さらに低分子化合物の疎水性指標である logP 値、蛋白質に結合することによる自由度の束縛度合い等を考慮して化合物を絞り込み、最後にグラフィックユーザインタフェースを用いて結合様式の好ましい化合物を選び出した。これらの化合物は入手して、ER α 競合剤スクリーニングキットにより結合活性値を測定し、活性の有無を確認した。

(4) 評価スコアの検討

昨年度同様、ER α を標的とする活性既知の内分泌かく乱化学物質候補群 (EPA Draft List of Candidate Chemical For High Throughput Screening Project 中からピックアップ) を対象にした。バーチャルスクリーニングの場合と同じく、推定結合様式を探索し、蛋白質-リガンド複合体での構造最適化を行なって、各種スコア値を算出した。さらにこれらの既知物質については蛋白質-リガンド間の結合自由エネルギーを見積もるプログラム GenB を使用した。GenB では結合自由エ

ネルギーをいくつかの項に分割して算出しており、各エネルギー項は経験的な関数で見積もられている。エネルギー項としては、(a)リガンドの並進・回転自由度消失の効果、(b)リガンドのコンフォメーション自由度束縛の効果、(c)リガンドおよび蛋白質の脱溶媒和の効果、(d)分子間静電相互作用と表面接触による有利な相互作用および立体反発の効果等を仮定しており、これらの総和を結合自由エネルギー (ΔG_{bind}) としている。以下に計算式を示す。

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{tr-rot}^{Ligand} + \Delta G_{conformation}^{Ligand} + \Delta G_{desolvation}^{Mol} + \Delta G_{interaction}^{Complex}$$

$\Delta G_{tr-rot}^{Ligand}$: リガンドの並進・回転自由度消失の効果

$\Delta G_{conformation}^{Ligand}$: リガンドコンフォメーション自由度束縛の効果

$\Delta G_{desolvation}^{Mol}$: リガンドおよび蛋白質の脱溶媒和の効果

$\Delta G_{interaction}^{Complex}$: 分子間静電相互作用および表面接触と立体反発の効果

$$\Delta G_{tr-rot}^{Ligand} = -1.408$$

$$\Delta G_{conformation}^{Ligand} = 0.453 [N_{rot}^i (\text{fixed on bonding})]$$

$$\Delta G_{desolvation}^{Mol} = c \cdot \sum_i^{Mol} scale(i) \cdot A13 \log P^i(i)$$

$$c = -1.723 (Mol = Ligand), c = -0.954 (Mol = Protein)$$

$$\Delta G_{interaction}^{Complex} = 1.592 \cdot \sum_i^{Ligand} \sum_j^{Protein} \frac{1}{\epsilon(i,j)} \frac{q_i q_j}{r_{i,j}} + 0.865 \cdot \sum_i^{Ligand} \sum_j^{Protein} e \left[\left(\frac{R_0}{r_{i,j}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_0}{r_{i,j}} \right)^6 \right]$$

$\epsilon(i, j)$: dielectric function depending on $i-j$.

e : universal vdW well - depth ($e = 0.015$)

本方法を用いて結合自由エネルギーの推算を行ない、活性値ランク (Draft List 中に記載) との相関を調べた。

(5) その他

US EPA (Environmental Protection

Agency) から入手した HTS 用データベース中の 5 万 8 千化合物についても結合自由エネルギーの推算を行なった。

C. 研究結果

(1) ACD 化合物のバーチャルスクリーニング

今回の計算条件での一化合物あたり平均計算所要時間は、Adam & Eve を用いた結合様式の推定に約 2 分、蛋白質構造まで含めた構造最適化に約 2 分であった。バーチャルスクリーニングから選び出し、入手した化合物について実施した結合活性値測定結果を図 2 に、結合活性のあった新規化合物の構造とその活性値 (IC50 値) を表 1 に示した。ER099, ER128, ER227, ER243, ER249, ER257, ER263, ER278, ER292, ER303, ER366, ER370, ER386, ER402, ER445 は、フェノール基を有していない新規活性化合物であった (表 1 および図 2 (a)-(f))。

(2) 評価スコアの検討・結合自由エネルギー推算法の導入

結合活性値と、自動ドッキング法から推算されるスコア値との相関を向上させる検討を行なった。対象とする ER α 結合活性化学物質としては、EPA Draft List of Candidate Chemical For High Throughput Screening Project から 20 化合物を選び出した。活性値は、同 Draft List に記載のランク (ランク 1 からランク 5 の 5 段階評価) を採用した。この場合、Adam&Eve による結合様式の推定計算に要した時間は一化学物質あたり約 3 分、

蛋白質構造まで含めた構造最適化および GenB による結合自由エネルギー推算に約 4 分であった。

これまで我々が使用してきた AMBER 力場計算を利用したスコア値と比較すると、相関係数 (R) には大きく差がないものの、スコアの最大誤差は大幅に向上した (AMBER 力場計算法 : 7.64kcal/mol、GenB による計算法 : 2.46kcal/mol) (図 1 (a)および(b))。

(3) HTS 用 5 万 8 千化合物の結合自由エネルギーの推算

(2) で良好な結果をおさめたスコア計算法を、HTS 用化合物のランキングにも利用した。上位はステロイド骨格を有する化合物が占め、キャビティにフィットする形状を認識できていることがわかった。

D. 考察

今回のバーチャルスクリーニングでは、フェノール系化合物およびアニリン系・ベンズアミド系化合物だけでなく、ER402, ER370, ER243, ER386, ER366 のような既知官能基を有しない新規の ER 結合活性化合物が見出された。これは本コンピュータスクリーニングの有用性を示しているといえる。また本計算に要する時間は、一化合物につき結合様式の推定に平均 2-3 分、蛋白質構造まで含めた構造最適化および結合自由エネルギー推算に 3-4 分 (いずれも計算条件に依存) と高速であり、化合物数が数十万あるデータベースであっても対応可能である。

評価スコアと活性値ランクの相関研究では、今回新たに導入した蛋白質ーリガンド間の結合自由エネルギー推算法により、相関係数 0.903, スコアの最大誤差は 2.46kcal/mol となった。特にこれまでの計算方法で、ずれの大きかった活性値ランク 3 の化合物群の最大誤差が 1.93kcal/mol と大幅に改良された（これまでは 7.64kcal/mol）。今回の方法では活性値ランク 5 の化合物に関してはあまり改善されていないが、これらは比較的自由度が大きい化合物であり、今後分子内エネルギー値等を考慮することにより更なる改善が期待される。さらにわれわれの用いたスコアは、既知エストロゲン活性化合物の活性値から逆算されるエネルギー値に合うように各項をフィッティングしたものではなく、蛋白質受容体にリガンドが結合するときのエネルギーをいくつかの項に分割し、定式化された計算式により、得られた数値である。このようにして求められたスコア値と活性値との間に高い相関があることは非常に意味のあることである。HTS 用 5 万 8 千化合物の結合自由エネルギー推算に関しては、まだ依然として擬陽性化合物をいかに除外するかという問題が残っているほか、今回使用したデータベースの化合物構造に不備もあるため、データベース整備も含めて改良の余地が残っている。

E. 結論

受容体立体構造を利用して化合物の結合様式を推定し、そのときの結合自由エネルギーを推算することで、活性未知化

合物の活性値の推定が可能となる。これに基づくコンピュータスクリーニングにより、市販データベース中の活性未知化合物群から、あらたに活性を有する化合物がみつかった。今後さらに擬陽性化合物を減らす必要はあるが、本法を利用することにより化合物を実際に入手する前に結合活性値予測を行なうことができる可能性が示された。必要とされる時間は一化合物につき数分であり、膨大な数の化合物のスクリーニングにも適している。

F. 研究発表

1. 論文発表

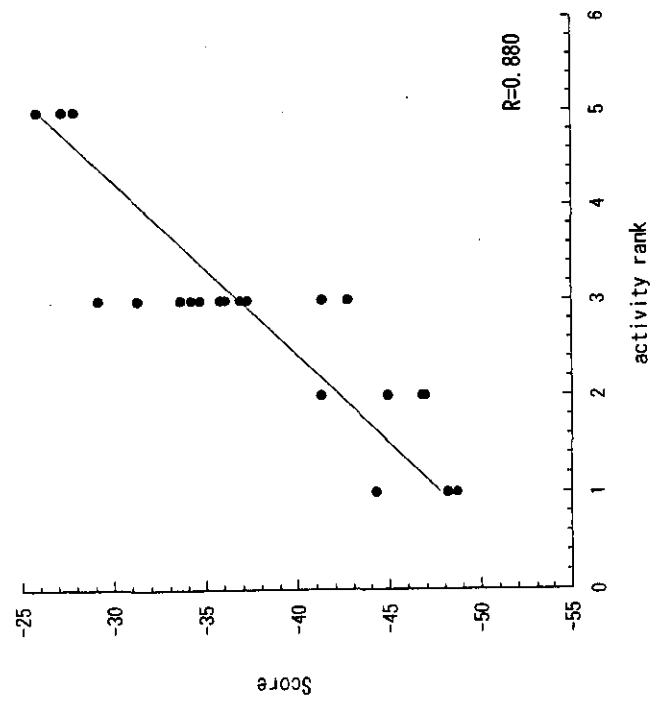
久保亜抄子、井上典子、板井昭子：
投稿準備中

2. 学会発表

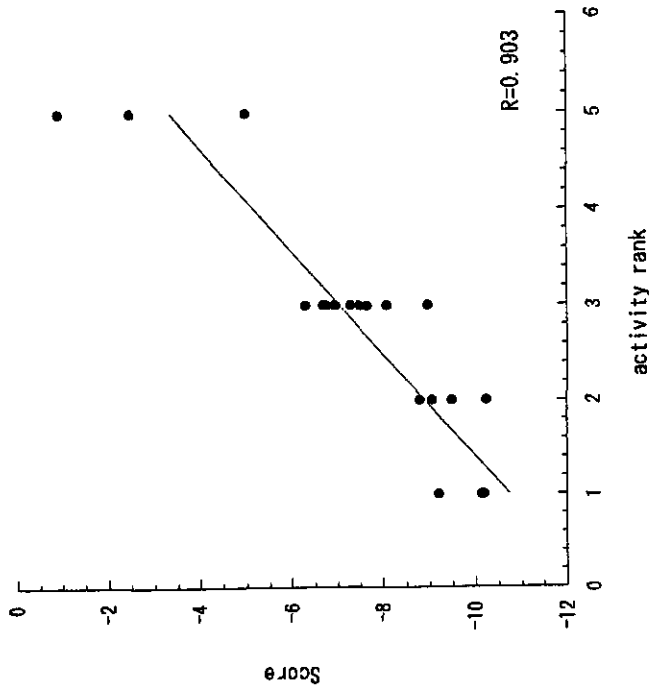
久保亜抄子、井上典子、水谷実穂、
富岡伸夫、板井昭子：内分泌かく乱
物質のバーチャルスクリーニング、
第 28 回構造活性相関シンポジウム
(2000. 10. 26-27 京都)

G. 知的所有権の取得状況

特になし



(a) AMBER 力場を利用した計算



(b) GenB (mod0.06)による結合自由エネルギー計算

図1. ドッキングスコア値と既知活性物質の活性値ランクの関係

図2(a). コンピュータスクリーニングした化合物のER α 結合活性

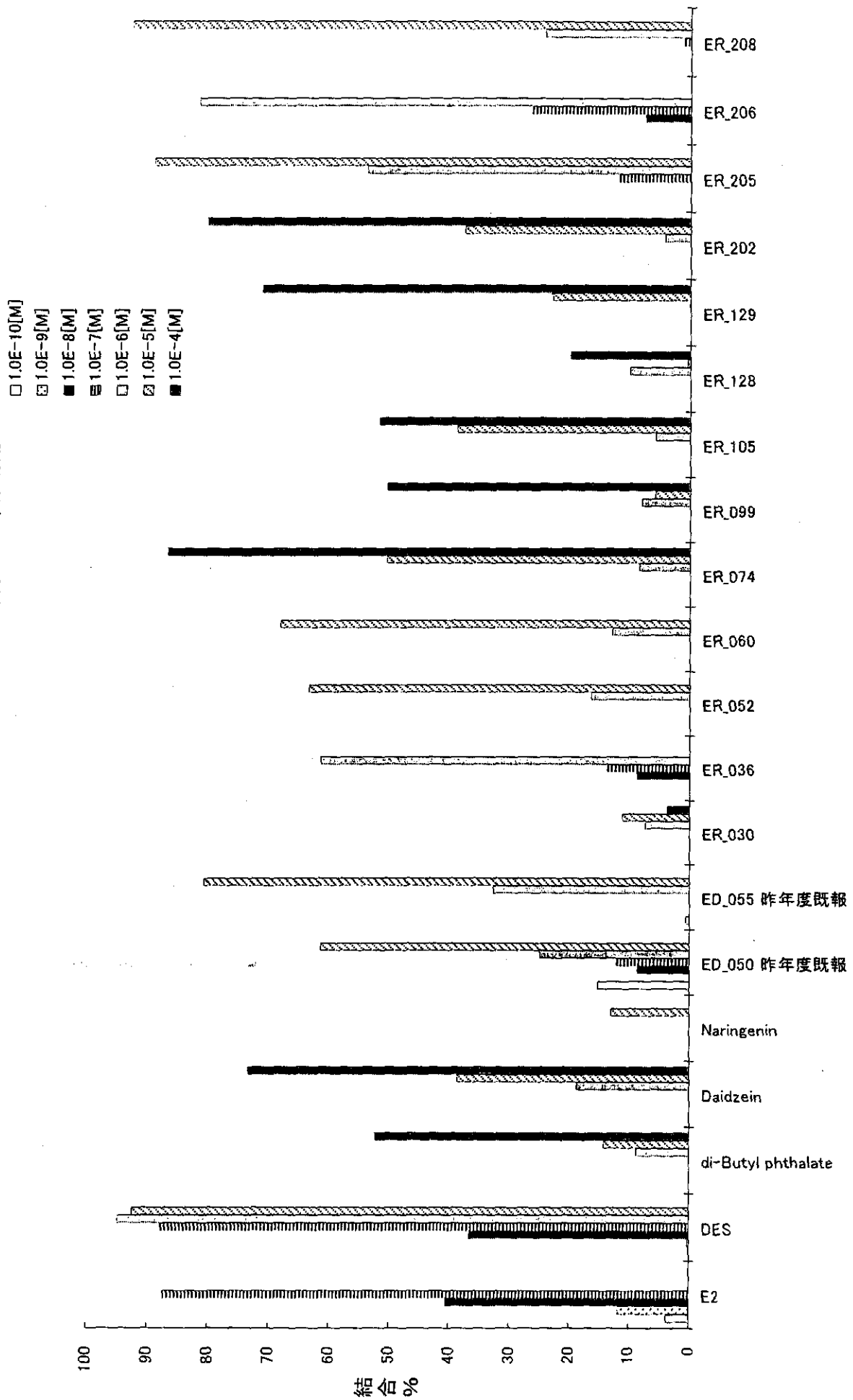


図2 (b). コンピュータスクリーニングした化合物のER α 結合活性

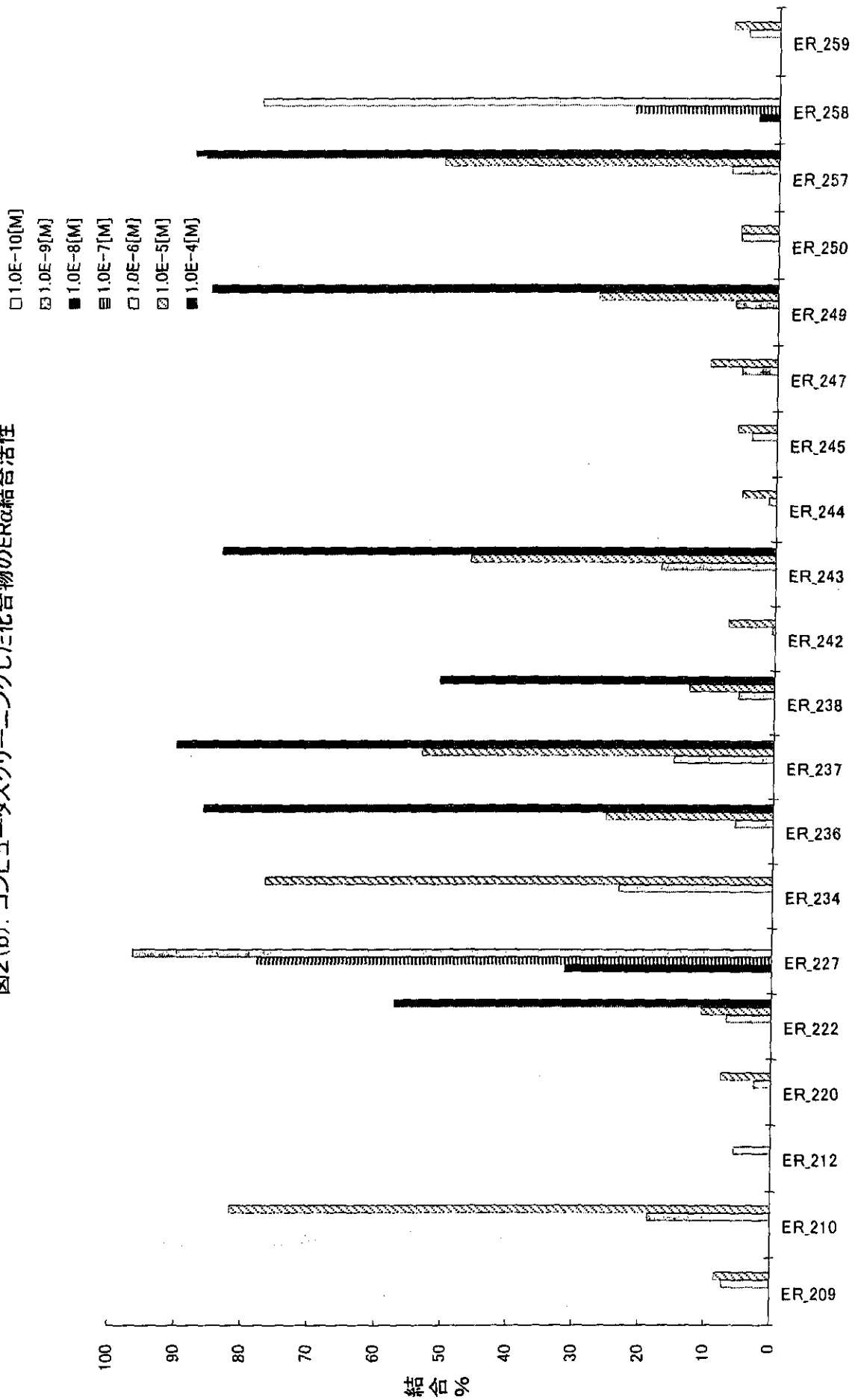


図2(c). コンピュータスクリーニングした化合物のER α 結合活性

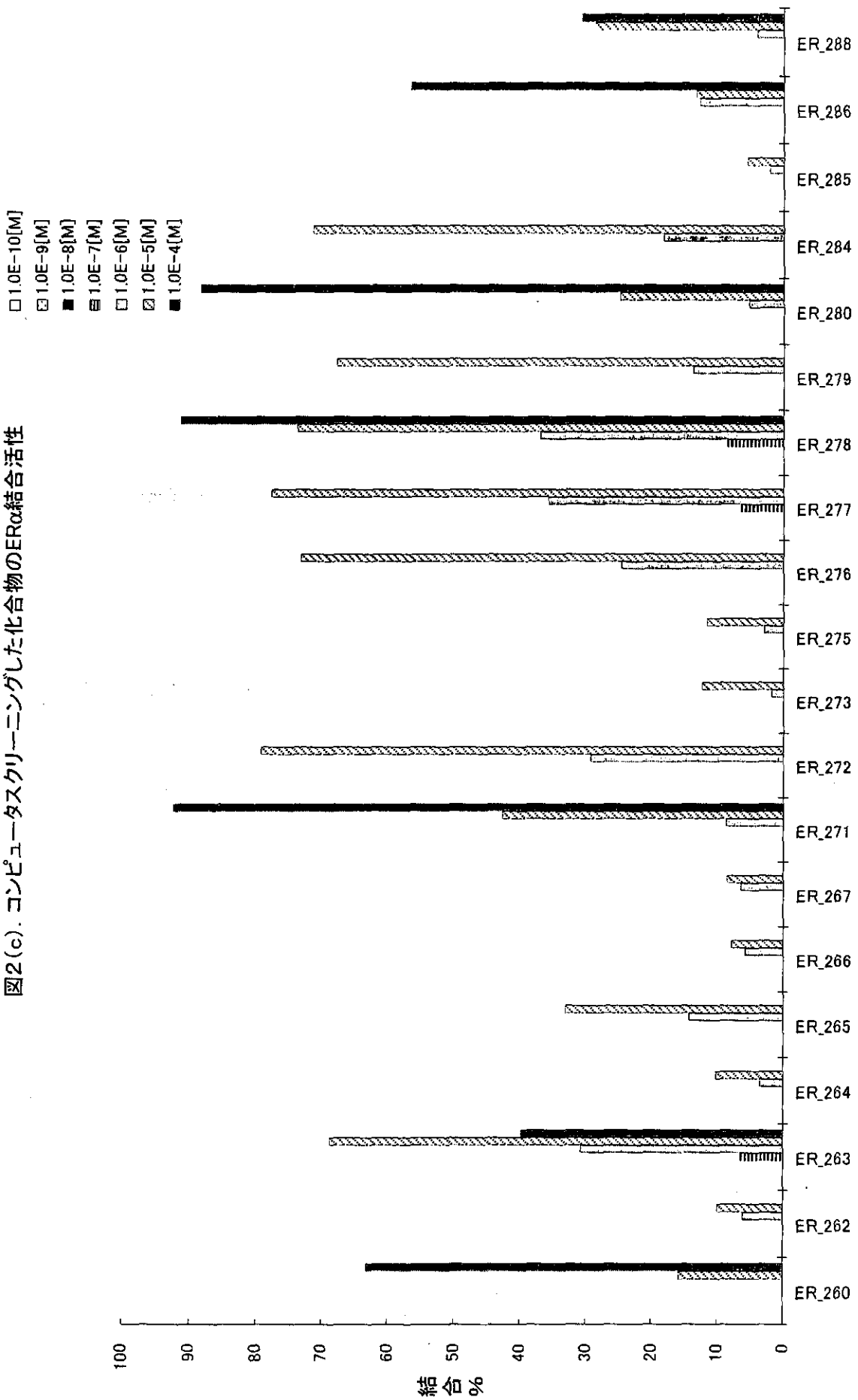


図2(d). コンピュータスクリーニングした化合物のER α 結合活性

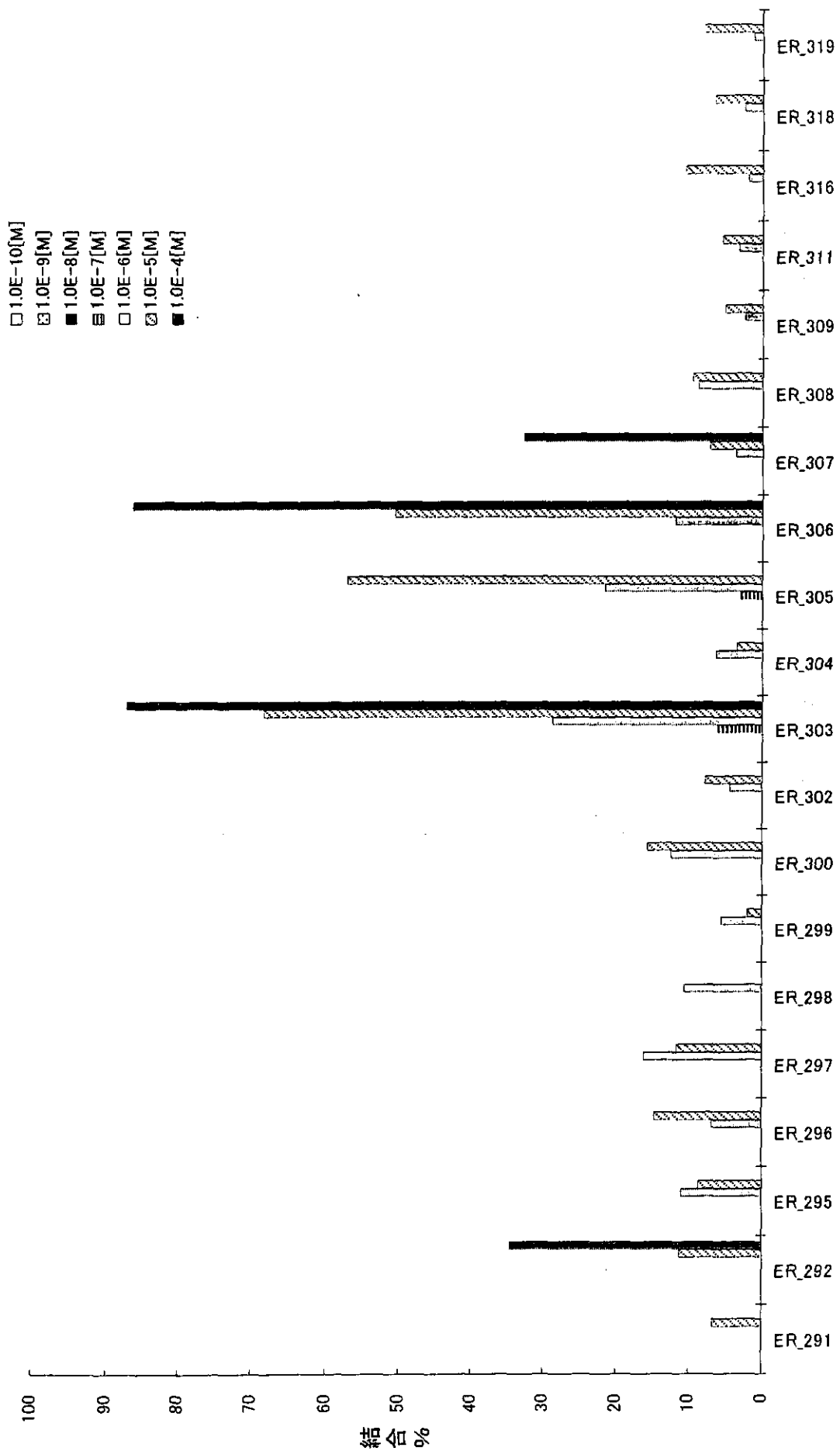


図2(e). コンピュータスクリーニングした化合物のER α 結合活性

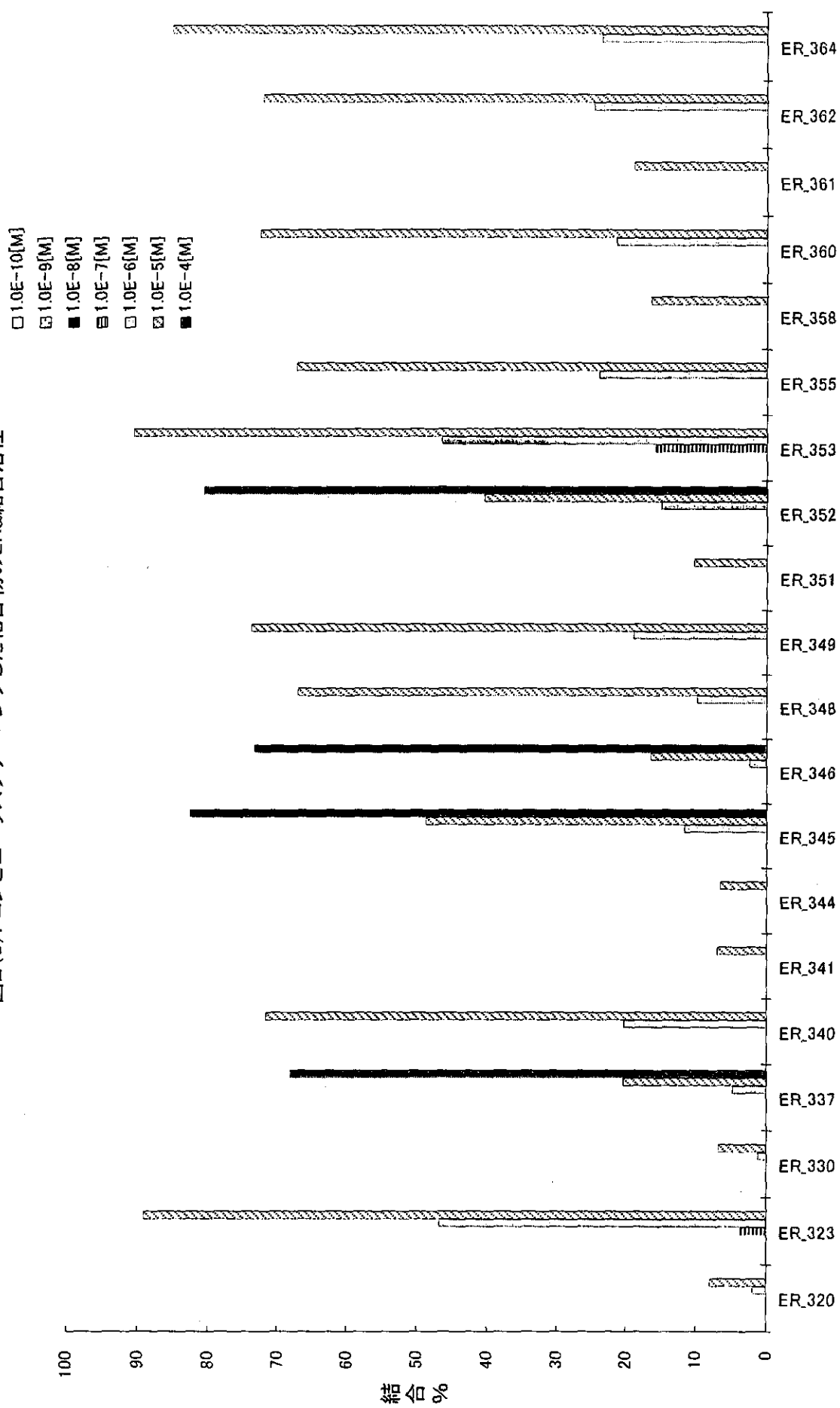


図2(f). コンピュータスクリーニングした化合物のER α 結合活性

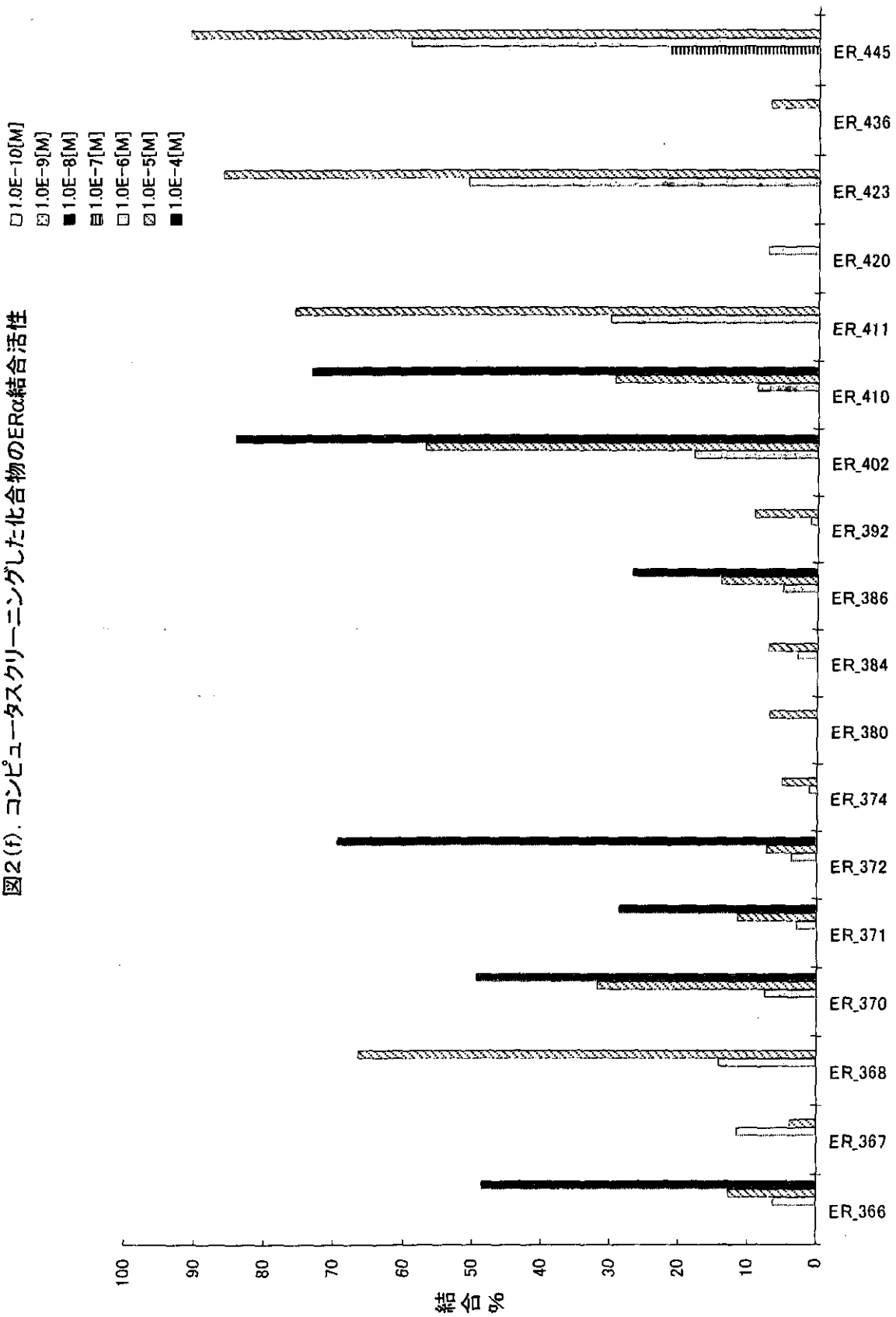


表1. コンピュータスクリーニングからみつかった活性物質の活性値

| サンプル ID | IC50(M) | サンプル ID | IC50(M) | サンプル ID | IC50(M) |
|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|
| ER074 | 9.9E-6 | ER272 | 2.6E-6 | ER360 | 3.7E-6 |
| ER099 | 9.9E-5 | ER276 | 3.4E-6 | ER362 | 3.5E-6 |
| ER105 | 7.9E-5 | ER277 | 2.2E-6 | ER364 | 2.7E-6 |
| ER128 | 19.6%(1.0E-4) | ER278 | 2.3E-6 | ER366 | 48.6%(1.0E-4) |
| ER129 | 3.7E-5 | ER279 | 4.8E-6 | ER368 | 4.9E-6 |
| ER202 | 2.0E-5 | ER280 | 2.5E-5 | ER370 | 49.3%(1.0E-4) |
| ER205 | 8.3E-7 | ER284 | 4.0E-6 | ER371 | 28.6%(1.0E-4) |
| ER206 | 2.7E-7 | ER286 | 7.2E-5 | ER372 | 4.9E-5 |
| ER208 | 2.4E-6 | ER288 | 30.4%(1.0E-4) | ER386 | 26.7%(1.0E-4) |
| ER210 | 3.1E-6 | ER292 | 34.6%(1.0E-4) | ER402 | 6.8E-6 |
| ER222 | 7.1E-5 | ER303 | 3.5E-6 | ER410 | 3.0E-5 |
| ER227 | 2.5E-8 | ER305 | 6.5E-6 | ER411 | 2.7E-6 |
| ER234 | 3.2E-6 | ER306 | 9.9E-6 | ER423 | 9.8E-7 |
| ER236 | 2.6E-5 | ER323 | 1.2E-6 | ER445 | 5.8E-7 |
| ER237 | 8.5E-6 | ER337 | 4.2E-5 | | |
| ER238 | 9.9E-5 | ER340 | 3.8E-6 | | |
| ER243 | 1.3E-5 | ER345 | 1.1E-5 | | |
| ER249 | 2.5E-5 | ER346 | 3.9E-5 | | |
| ER257 | 1.0E-5 | ER348 | 5.1E-6 | | |
| ER258 | 3.3E-7 | ER349 | 3.7E-6 | | |
| ER263 | 3.2E-6 | ER352 | 1.8E-5 | | |
| ER265 | 33.0%(1.0E-5) | ER353 | 1.2E-6 | | |
| ER271 | 1.4E-5 | ER355 | 4.0E-6 | | |

Table1. Selected Chemicals from ACD Database by Computational Screening

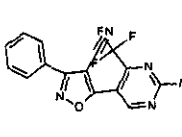
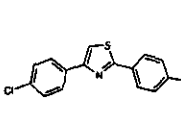
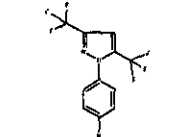
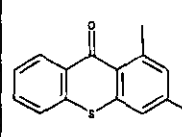
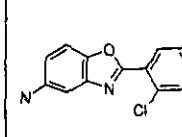
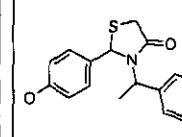
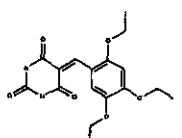
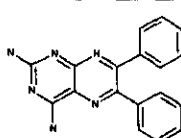
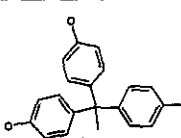
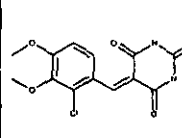
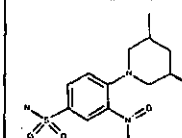
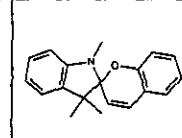
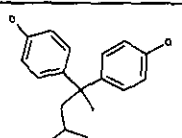
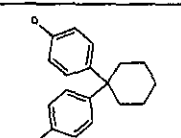
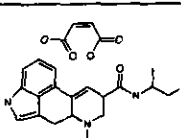
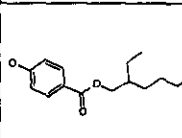
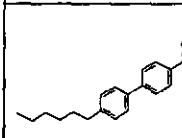
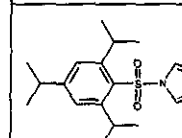
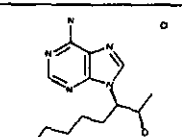
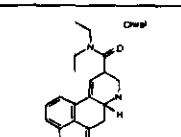
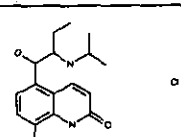
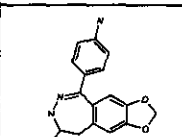
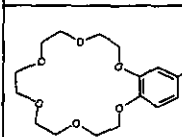
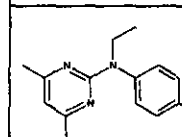
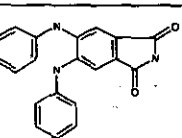
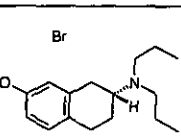
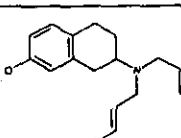
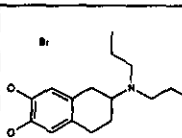
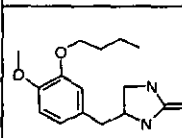
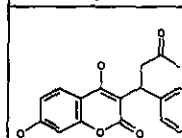
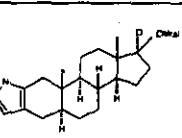
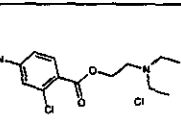
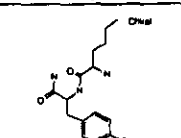
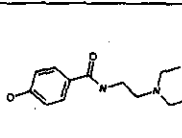
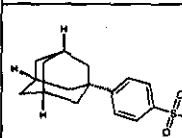
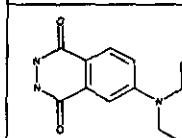
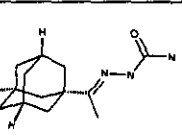
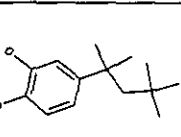
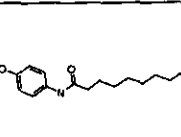
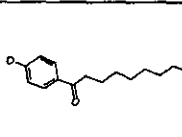
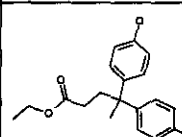
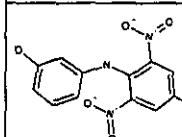
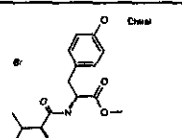
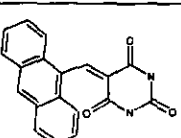
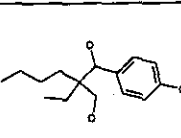
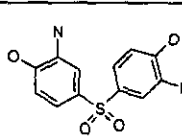
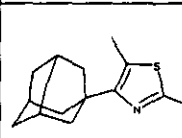
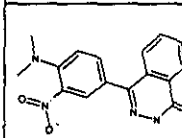
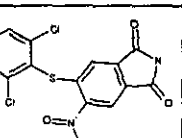
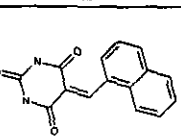
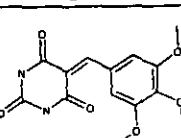
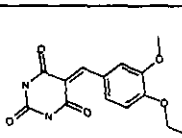
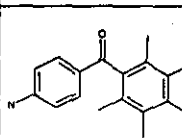
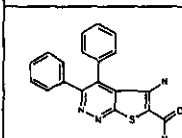
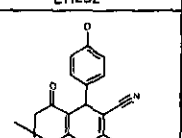
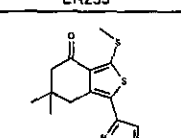
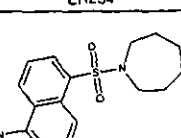
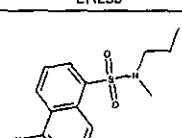
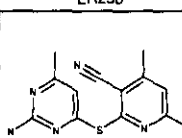
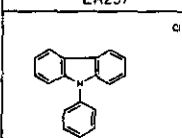
| | | | | | |
|---|---|---|--|---|---|
| ER030 | ER074 | ER099 | ER105 | ER128 | ER129 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER200 | ER201 | ER202 | ER203 | ER204 | ER205 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER206 | ER208 | ER209 | ER210 | ER211 | ER212 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER213 | ER215 | ER216 | ER217 | ER218 | ER219 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER220 | ER221 | ER222 | ER223 | ER224 | ER226 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER227 | ER228 | ER229 | ER230 | ER231 | ER232 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER233 | ER234 | ER235 | ER236 | ER237 | ER238 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER239 | ER240 | ER241 | ER242 | ER243 | ER244 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER245 | ER246 | ER247 | ER248 | ER249 | ER250 |
|  |  |  |  |  |  |
| ER252 | ER253 | ER254 | ER255 | ER256 | ER257 |
|  |  |  |  |  |  |

Table1. Selected Chemicals from ACD Database by Computational Screening

| | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ER258 | ER259 | ER260 | ER261 | ER262 | ER263 |
| ER264 | ER265 | ER266 | ER267 | ER268 | ER269 |
| ER270 | ER271 | ER272 | ER273 | ER274 | ER275 |
| ER276 | ER277 | ER278 | ER279 | ER280 | ER281 |
| ER282 | ER284 | ER285 | ER286 | ER287 | ER288 |
| ER289 | ER290 | ER291 | ER292 | ER293 | ER294 |
| ER295 | ER296 | ER297 | ER298 | ER299 | ER300 |
| ER301 | ER302 | ER303 | ER304 | ER305 | ER306 |
| ER307 | ER308 | ER309 | ER310 | ER311 | ER315 |
| ER316 | ER317 | ER318 | ER319 | ER320 | ER321 |

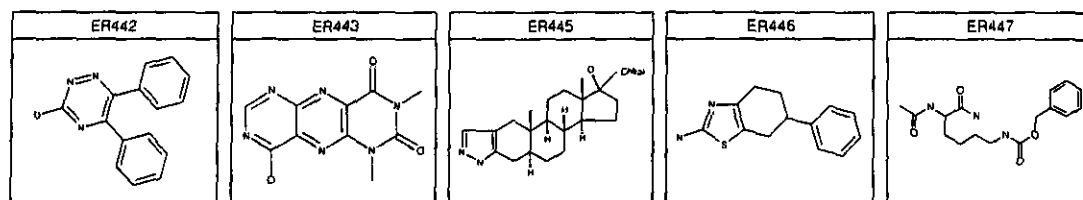
Table1. Selected Chemicals from ACD Database by Computational Screening

| | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ER322 | ER323 | ER324 | ER325 | ER326 | ER327 |
| | | | | | |
| ER328 | ER329 | ER330 | ER331 | ER332 | ER333 |
| | | | | | |
| ER334 | ER335 | ER336 | ER337 | ER338 | ER339 |
| | | | | | |
| ER340 | ER341 | ER342 | ER343 | ER344 | ER345 |
| | | | | | |
| ER346 | ER347 | ER348 | ER349 | ER350 | ER351 |
| | | | | | |
| ER352 | ER353 | ER354 | ER355 | ER356 | ER357 |
| | | | | | |
| ER358 | ER359 | ER360 | ER361 | ER362 | ER363 |
| | | | | | |
| ER364 | ER365 | ER366 | ER367 | ER368 | ER369 |
| | | | | | |
| ER370 | ER371 | ER372 | ER373 | ER374 | ER375 |
| | | | | | |
| ER376 | ER377 | ER378 | ER379 | ER380 | ER381 |
| | | | | | |

Table1. Selected Chemicals from ACD Database by Computational Screening

| | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ER382 | ER383 | ER384 | ER385 | ER386 | ER387 |
| ER388 | ER389 | ER390 | ER391 | ER392 | ER393 |
| ER394 | ER395 | ER396 | ER397 | ER398 | ER399 |
| ER400 | ER401 | ER402 | ER403 | ER404 | ER405 |
| ER406 | ER407 | ER408 | ER409 | ER410 | ER411 |
| ER412 | ER413 | ER414 | ER415 | ER416 | ER417 |
| ER418 | ER419 | ER420 | ER421 | ER422 | ER423 |
| ER424 | ER425 | ER426 | ER427 | ER428 | ER429 |
| ER430 | ER431 | ER432 | ER433 | ER434 | ER435 |
| ER436 | ER437 | ER438 | ER439 | ER440 | ER441 |

Table1. Selected Chemicals from ACD Database by Computational Screening



17. 3D-QSAR (三次元定量的構造活性相関)に関する実験解析的研究

分担研究者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所毒性部 室長

研究要旨 内分泌攪乱物質のターゲットとなるホルモン(エストロゲン、アンドロゲン、etc.)受容体は、リガンド依存的な構造変化を引き金にその転写因子機能を発現する。受容体構造の変化は、受容体とDNA上のレポンスエレメントやコファクター等との相互作用に影響を及ぼす。本研究では、バイオセンサーを用いてこれらの相互作用を測定することにより、リガンド(内分泌かく乱物質(EDCs))結合による受容体構造の変化を定量化し、得られた結果の3D-QSARへの適用を目的とする。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質(EDCs)の生体作用については、いまだ不明の部分が多くあるが、多くの化学物質が、エストロゲンをはじめとするホルモン受容体結合活性を有し、またレポーターアッセイ系などでホルモン様もしくは抗ホルモン様作用を示すことから、受容体を介した内分泌攪乱作用が懸念されている。特にエストロゲン受容体(ER)作用を有する化合物の内分泌攪乱性が懸念されており、多くの候補化合物についてその作用の有無を検出できるストラテジーの確立が急務である。

ERを始めとするホルモン受容体は、いずれも共通にリガンド結合部位(LBD)、DNA結合部位(DBD)、転写活性化部位から構成されている。リガンドの結合は、受容体の立体構造を変化させて様々な生体内作用の引き金となる。生体内におけるホルモンの作用は多岐に渡り、たとえばエストロゲンのみについてもその作用の全ては今だ明らかではない。また、生体本来の内分泌系自体のレギュレーション機構についても、*in vivo*での膨大な研究があるにも関わらず不明の部分も多く、単一の指標を基に内分泌

攪乱物質の生体作用を予測することは困難である。

一方、受容体を介した生体内作用は、化合物結合による受容体構造の変化が引き金となっており、これまでの研究より受容体構造との関連が示唆されている。すなわち、ERを介した作用を有する化合物について、その結合が受容体構造に与える変化より、生体内での作用をある程度予測することが可能である。立体構造変化の推定において、コンピューターによる3次元構造解析は、非常に有用なツールとなりうる。ERのリガンド結合部位(LBD)近傍の構造変化に関しては、結晶化構造解析による立体構造データをもとに、未知化合物の結合性およびLBDの構造変化の予測がある程度可能である。しかし、エストロゲン様作用を示す化合物は、その構造において非常にバラエティーに富んでおり、従来の方法ではその検出力は充分とは言えない。さらに、受容体全体の立体構造は解明されておらず、LBD以外の部位の構造変化は計算科学的に予測することは出来ない。一方、受容体の構造変化は、受容体とレスポンスエレメントやコファクター等との相互作用に変化を及ぼ

すことから、それら相互作用の変化より立体構造の変化を解析することが可能である。

本研究はバイオセンサーを用いて ER-ERE 相互作用を測定することより、リガンド（および内分泌かく乱物質(EDCs)）結合による受容体構造の変化を定量的に解析し、それらの化合物の生体内作用や他のアッセイ系により得られたデータとの比較より内分泌攪乱物質の生体内作用メカニズムを解明し、得られたデータより新規 3D-QSAR への応用を目的としている。我々は、これまでにバイオセンサーを用いて ER-ERE 相互作用の変化が化合物のエストロゲン様作用を反映すること、また速度論的解析よりリガンドとして結合した化合物の生体内作用の予測が可能であることを示してきた。本年度はコンピューター探索により ER への結合が推定されたフラボン化合物について、ER-ERE 相互作用の変化を解析し、コンピューター計算による活性スコアとの相関を検討した。また、COS-1 細胞を用いたレポーターアッセイの結果との比較を行い、ER-ERE 相互作用の変化のエストロゲン様作用評価指標としての有効性について検討を行った。

B. 研究方法

1、ERE 固定化センサーチップの作成

ストレプトアビジンをあらかじめコートしたセンサーチップにエストロゲンのレスポンスエレメントを含むビオチン標識合成オリゴヌクレオチド (5'- Biotin-tcgagcaaagtcAGGTCAcagT GACCTgatcaat-3')を固定化し、引き続き、相補配列のオリゴヌクレオチドをセンサーチップ上でアニーリングさせ、ERE センサーチップを作成した。

2、ER-ERE 相互作用の測定

ER を Flow バッファーで希釈して、17 β -Estradiol(E2)もしくは、測定対象の化合物を混合し、37°Cで 5 分間インキュベートしたのち、上述の ERE センサーチップにインジェクトして、SPR 装置(Biacore 3000, BiacoreAB)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ SPR 変化として測定した。ER は、リコンビナント Human ER α を使用した。

3、ER-ERE 相互作用変化の測定

化合物の結合による ER-ERE 相互作用への影響を定量的に解析するため、化合物を 10⁻⁵~10⁻⁸M の濃度範囲で 10nM ER と混合し、ER の ERE に対する結合解離過程を測定した。対象化合物として、これまでに他のアッセイ系においてエストロゲン様作用が示され内分泌攪乱作用が危惧されている化合物およびコンピューター探索によりエストロゲン様作用が推定された種々の化合物について測定を行った。

4、相互作用変化の解析とコンピューター探索との比較

各化合物の存在下および非存在における ER-ERE 相互作用の結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してその速度論的特長を比較した。また、2 分間のレスポンスの増加を、結合量として求め、濃度との関係を修正 Hill 式でフィッティングしてそれぞれの化合物の ER-ERE 相互作用に及ぼす EC₅₀ を求め、コンピューター計算による推定活性スコアおよび COS-1 細胞に CAT レポーターを組み込んだ系により得られた CAT アクティビティーと比較した。解析はコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)および JMP ver.3(SAS institute))を用い

て行った。

C. 研究結果

測定を行った化合物は、いずれも E2 同様に ER の ERE へのアフィニティーを増加させる (図 1) ことから、ER に作用し構造変化を引き起こすことが示された。図 2 にそれぞれの化合物の最大濃度におけるレスポンスカーブを示す。コンピューター検索により活性が推定された化合物はいずれも、他のアゴニスト様の反応プロパティを示すことからアゴニスティックな作用を有すると考察された (図 2C)。また、その結合解離過程は E2 に比べ解離が若干遅れる傾向にあるゲニスタイン様の速度論的特長を示した。測定を行った化合物はいずれもアゴニストと推定されたため、次に化合物濃度と ER-ERE 相互作用との関係および各化合物の活性比を検討するため結合開始 2 分後のレスポンス値を、各濃度下での活性値として求め、フィッティングにより ER-ERE 相互作用における EC50 (50%作用濃度) を求めた (図 3)。コンピューター探索により得られた各化合物のエストロゲン様活性は EC50 の値より、それぞれ E2 の 1/100~1/1000 程度と見積もられ、その強さは Bisphenol A と同程度もしくはそれ以上であった。求められた EC50 をコンピューターによる推定活性パラメーター比較したところ、一部のはずれ値を含むもののおおむね相関した (図 4)。また、CAT 遺伝子をレポーターとして組み込んだ COS-1 細胞での活性値と比較したところ非常によく相関し、未知化合物のエストロゲン様活性値の検出に本系が有用であることが示された (図 5)。

D. 考察

これまでに我々は、作用既知のリガンドを用いて生体内作用の異なる化合物では、ER-ERE 相互作用の変化における速度論的特徴が異なり、アンタゴニストでは、アゴニストと比較して ER の ERE からの解離が非常に遅くなることを示してきた。今回、さらに 3D-QSAR で探索された作用未知の化合物について同様に検討を行ったところ、いずれも、アゴニスト型の相互作用変化を引き起こすことが示された。また今回、測定対象とした化合物はいずれもフラボン類であるが、その結合解離過程もまた E2 に比べ解離が若干遅れる傾向を示し、やはりフラボン類のゲニスタイン様の速度論的特長を有することが示された。このことは、これらの化合物の *in vivo* での作用すなわち ER により制御される数多くの遺伝子発現に及ぼす影響もまた、ゲニスタイン類似であることを示唆している。この点については、今後、ゲノミックスなどによる包括的遺伝子発現解析などによる検討が重要と考えられる。測定を行った化合物は CAT 遺伝子をレポーターとして組み込んだ COS-1 細胞を用いたアッセイにおいてもやはりアゴニスト作用を示し、さらに ER-ERE 変化における EC50 値と COS-1 での CAT アクティビティーが非常に良く相関することから、ER-ERE 相互作用解析により作用未知の化合物についてエストロゲン様作用の定量的解析が可能であることが示された。またこれらの対象化合物は、3D-QSAR により探索されたものであることは、エストロゲン様物質の探索における 3D-QSAR の有用性を示唆している。しかし、今回対象とした化合物はいずれも類似構造を有する化合物であること、また報告されているエストロゲン様活性物質の構造は非常に多岐にわたることから、さらに多様な

構造を有する化合物についての検討が必要である。一方、測定を行った化合物についてコンピュータ解析により計算された活性スコアと ER-ERE 相互作用における EC50 値とを比較においては、おおむね良い相関を示すものの、大きくはずれ値を示す化合物もあり、これについても今回の結果および他の化合物についての解析結果を、計算にフィードバックしてことでさらに改善できるものと考察される。

本研究に用いたバイオセンサーでは、生体物質の相互作用を速度論的に解析する事により、これまでの結合度のみを対象とする他の系に比較してより詳細な検討を行えることを特徴としている。この方法によれば、単にエストロゲン様活性の検討にとどまらず、ホルモンレセプターを介したシグナル伝達系各ステップに対する、内分泌攪乱化学物質の mode of action を解析するが可能である。今後、EREのみでなく co-factor との相互作用などの検討をあわせ、受容体全体構造への影響から、化合物の生体への本質的影響の予測および最適な 3Q-QSAR の構築を可能にできるものと考察された。

E. 結論

化学物質による受容体を介した生体作用は、その受容体結合により惹起される。受容体の立体構造変化は、他の生体分子との相互作用に影響することから、ER-ERE 相互作用の変化は結合した化学物質の生体作用を反映することをこれまでに示してきた。今回の結果は、ER-ERE 相互作用変化の解析により作用未知の化合物による受容体作用の定量的予測が可能であることを示した。結果は 3D-QSAR によるリガンド探索の有用性を示したが、現在のところ、計算科学的手法による 3D-QSAR では、LBD のみを

対象に化合物の受容体結合の予測をある程度検討可能ではあるが、ER 全体の 3 次元構造が不明なことや、モデル情報の不足によりその信頼性は十分ではない。ER-ERE 相互作用変化の解析は 3 次元構造そのものではなく、実験解析的にレセプター構造に関するプロパティを求め、得られた各パラメーターと生体内作用とのリレーションを構築するにより、化合物のホルモンレセプターシグナル伝達系各ステップに対する修飾を定量的に検討することが可能であり、本系における結果をシュミレーションにフィードバックすることでさらにその精度をあげることが可能となる。すなわち本研究から得られる知見は、単に化学物質の内分泌攪乱作用を予測するものではなく、生体への本質的影響までを予測可能にし、またさらに動物試験などのデータと組み合わせ、得られた情報を計算科学的解析にフィードバックすることで、新規 3D-QSAR の発展に寄与すると結論づけられた。

F. 研究発表

学会発表

A.Ono, J. Kanno, and T. Inoue,; Conformational changes on ER α induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone Symposia; Nuclear Receptor 2000 (E3), 2000.3.

A. Ono, J. Kanno, and T. Inoue,; MOLECULAR ASPECTS OF FUNCTIONAL DIFFERENCES AMONG ESTROGEN RECEPTOR LIGANDS 11th International Congress of Endocrinology, 2000.10.

J. Kanno, K. Igarashi, A. Ono, M. Takeyoshi,