

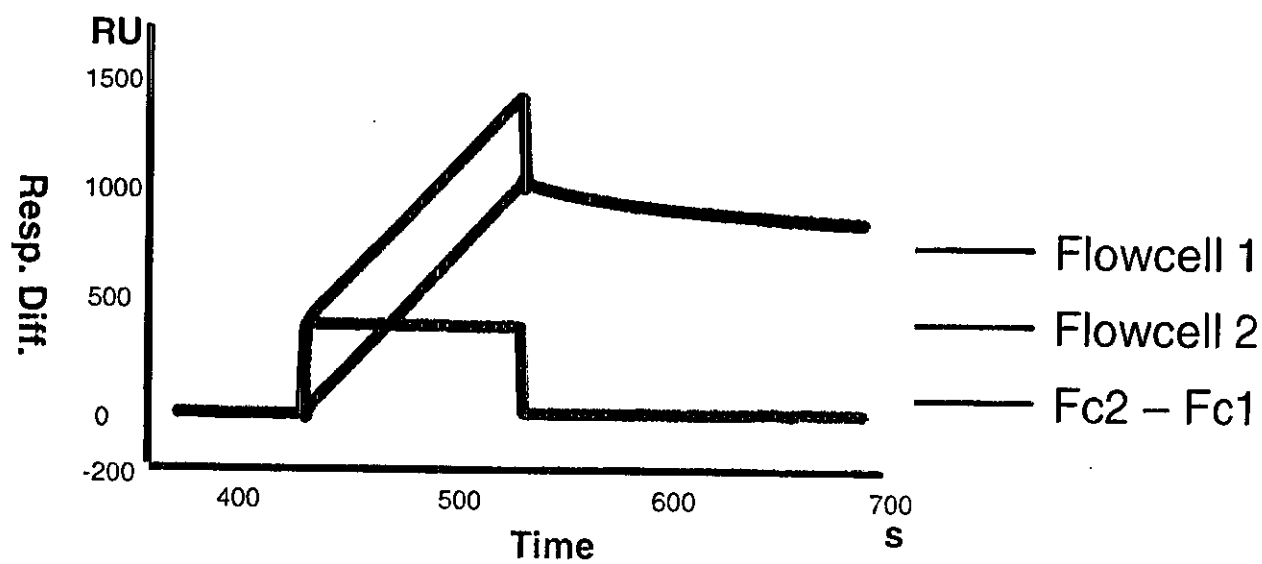
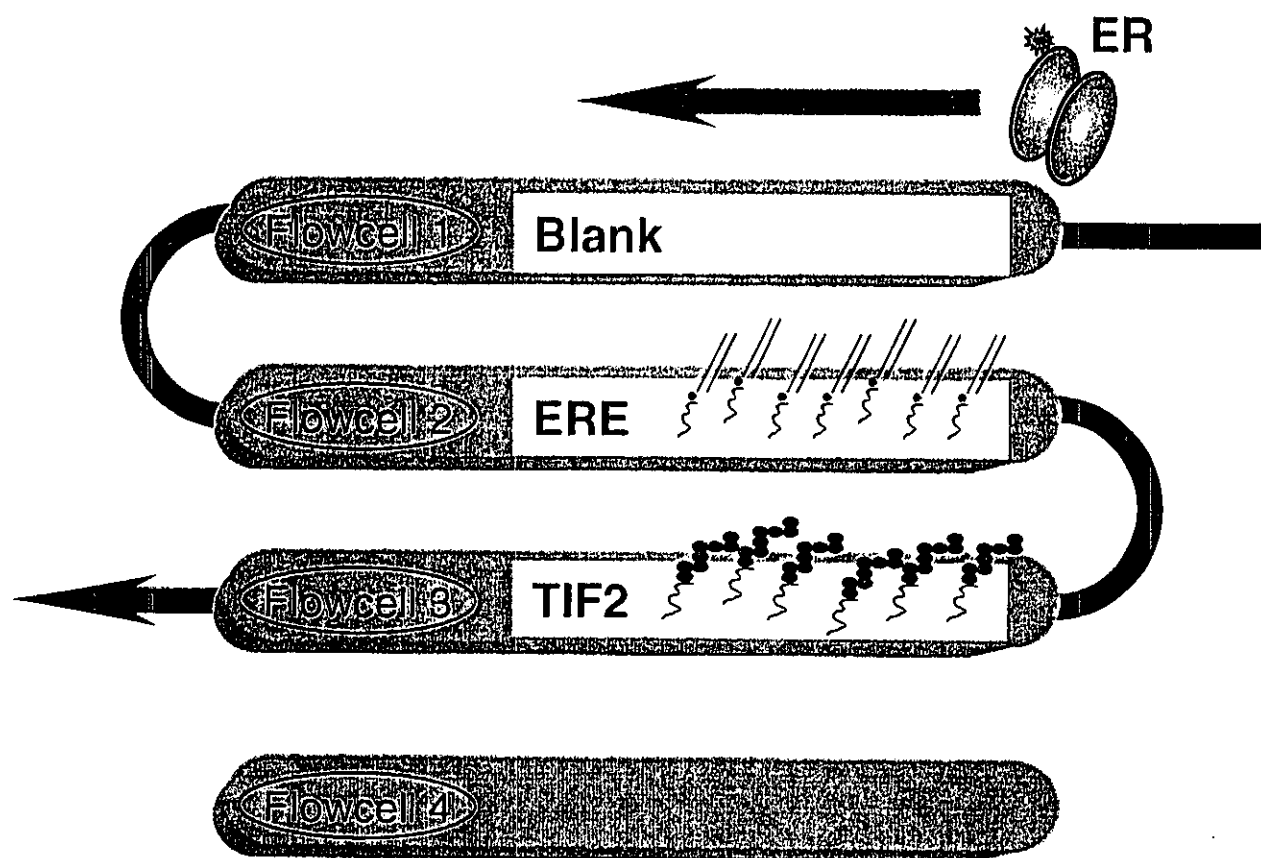
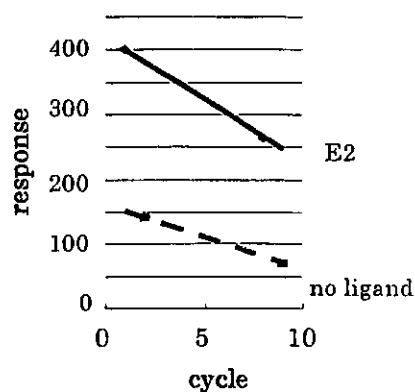
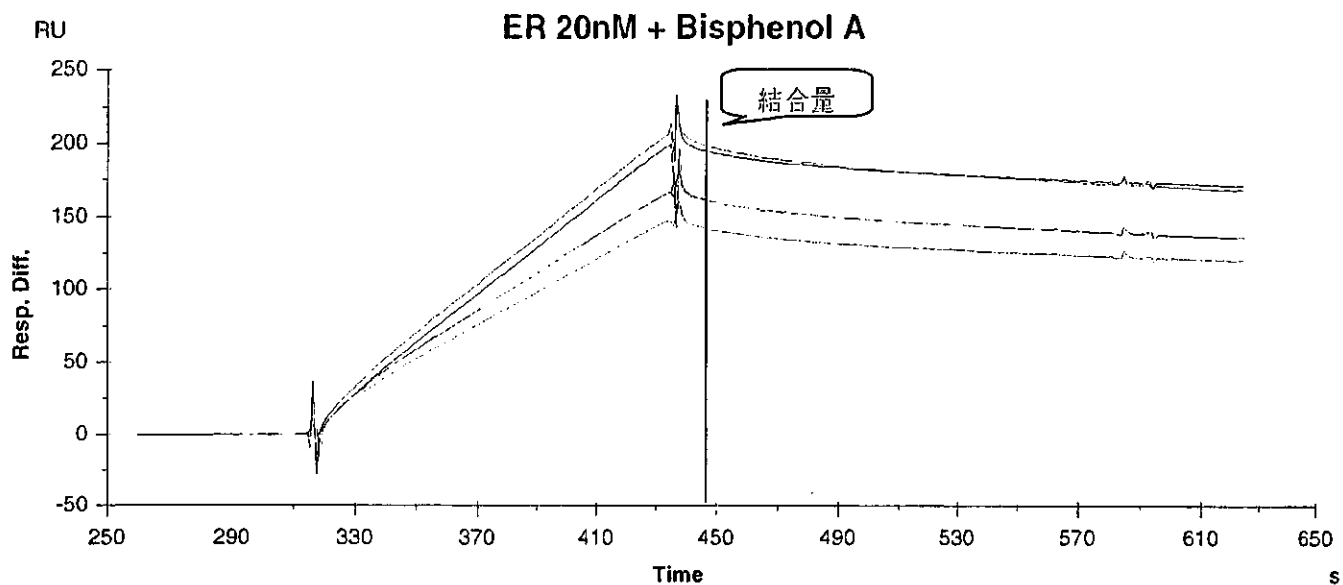
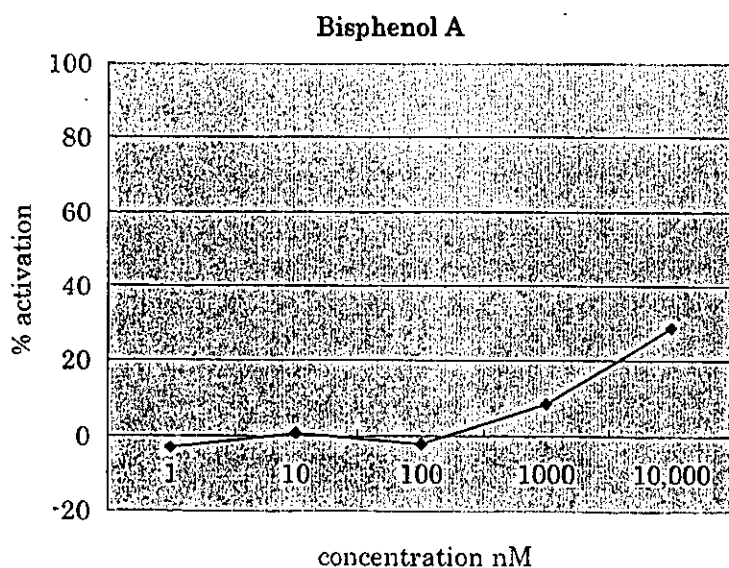


図1 表面プラズモン共鳴スクリーニング法の概要



bisphenol A		BIA9					
cycle	conc nM	RelRes	E2cal	nolig cal	drug activation	E2 activation	%activation
2	0	141.4	380.75	141.40	0.00	239.36	0.00
9	0	70.8	246.05	70.80	0.00	175.26	0.00
7	1	84.8	284.54	90.97	-6.17	193.67	81.02
6	10	92.1	284.54	90.97	1.13	193.67	81.02
5	100	97.2	303.78	101.05	-3.85	202.73	84.50
4	1000	129	323.03	111.14	17.86	211.89	88.35
3	10,000	185.5	342.27	121.23	64.27	221.04	92.05
1	100	400	400.00	151.48	248.52	248.51	100.00
8	100	265.3	265.30	80.88	184.42	184.41	100.00



$$\% \text{ activation} = \frac{(\text{化学物質存在下での結合量} - \text{ネガティブコントロールでの結合量})}{(100 \text{ nM E2存在下での結合量} - \text{ネガティブコントロールでの結合量})} \times 100$$

図2 活性計算法

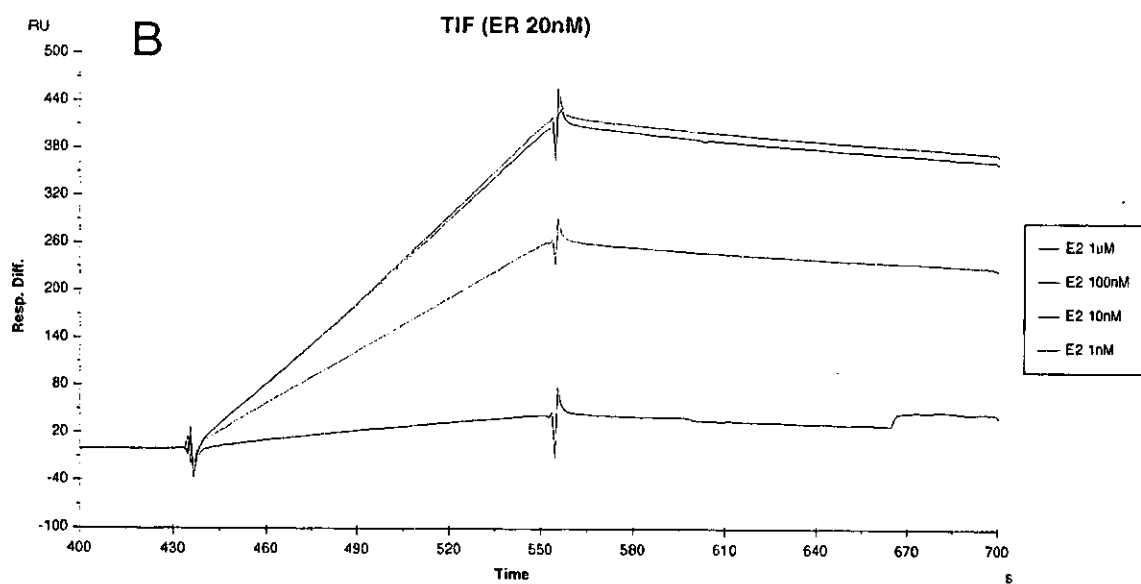
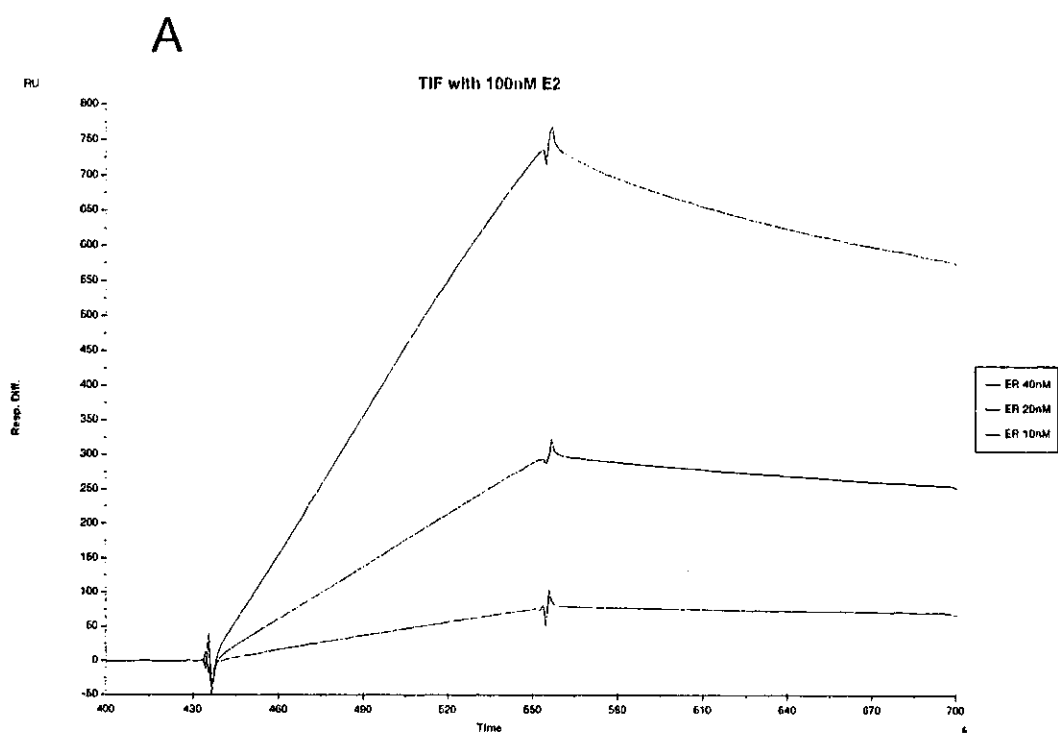


図3 TIF アッセイの条件検討

ER, E2の濃度を振ってEREアッセイとTIFアッセイの条件を検討した
 A: 100 nM E2 存在下でERの濃度を10-40 nM に変えて測定
 B: 20 nM ER存在下でE2 の濃度を1 nM -1μM に変えて測定

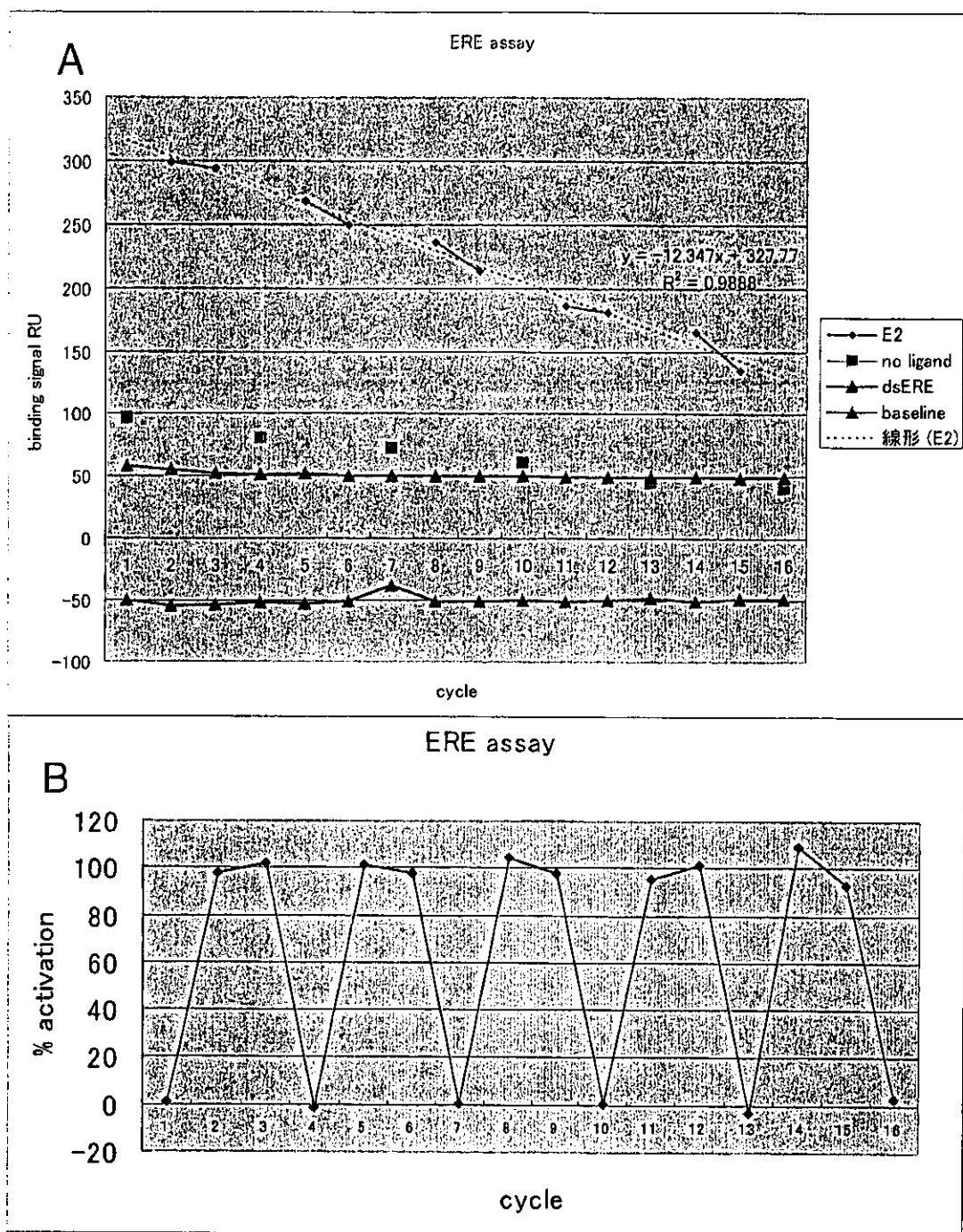


図4 アッセイの再現性 ERE アッセイ

アッセイの再現性を確認するためにポジティブコントロールとネガティブコントロールを繰り返し16サイクル測定した。

ポジティブコントロール: サイクル2,3,5,6,8,9,11,12,14,15

ネガティブコントロール: サイクル1,4,7,10,13,16

A: 各サイクルの結合量、ERE ハイブリダイズ量、アッセイ終了時のベースラインの値を示す。ハイブリダイズしたEREが再生後ほとんどすべてセンサーチップからはずれている。

B: ER活性の補正後、各サイクルの相対活性化度をプロットした。

ポジティブコントロール 平均値 99.98% 標準偏差 4.68%

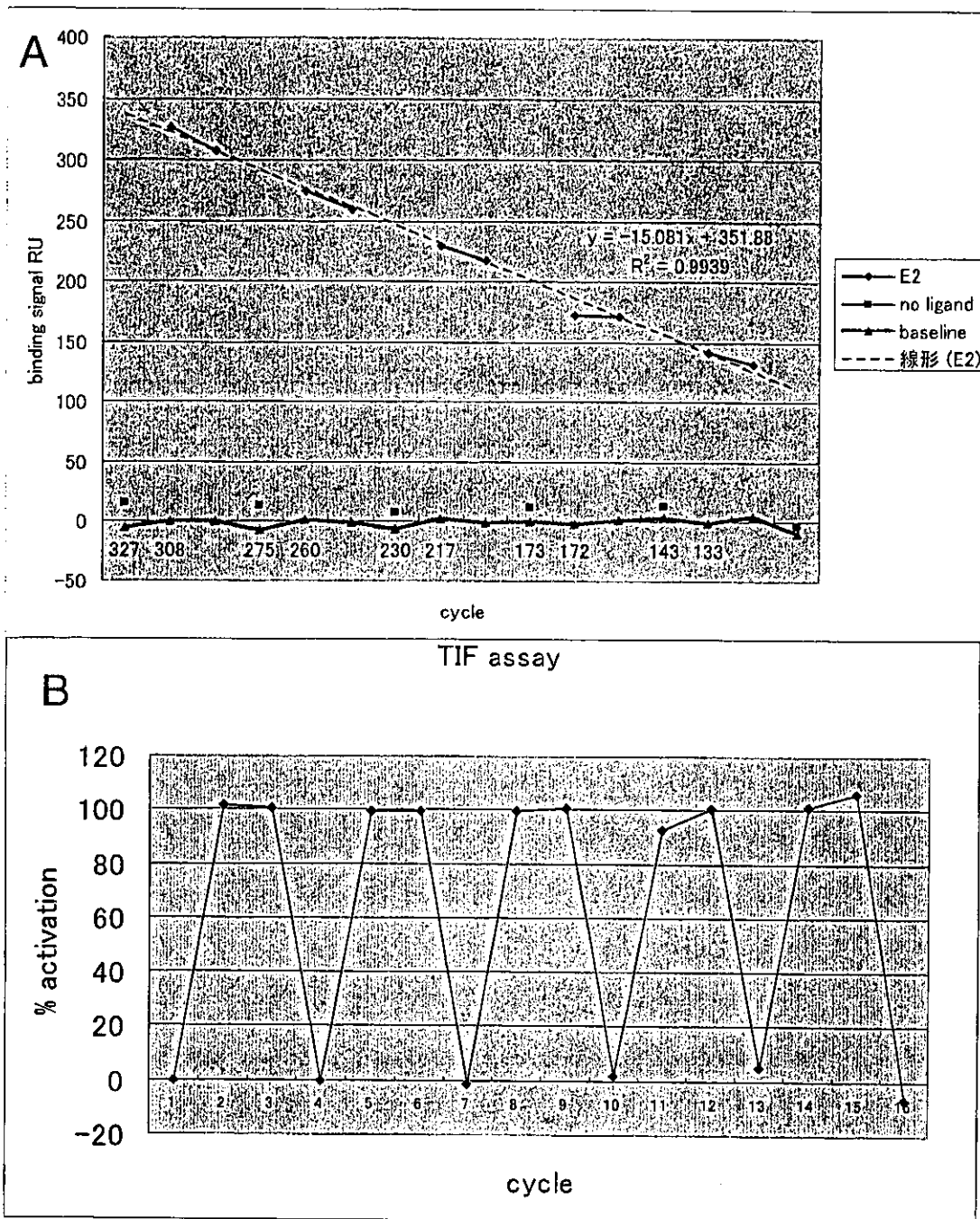


図5 アッセイの再現性 TIFアッセイ

アッセイの再現性を確認するためにポジティブコントロールとネガティブコントロールを繰り返し16サイクル測定した。

ポジティブコントロール: サイクル2,3,5,6,8,9,11,12,14,15

ネガティブコントロール: サイクル1,4,7,10,13,16

A: 各サイクルの結合量、アッセイ終了時のベースラインの値を示す。

B: ER活性の補正後、各サイクルの相対活性化度をプロットした。

ポジティブコントロール 平均値 100.14% 標準偏差 3.21%

ER-TIF result											
ID	TIF-1		100	1000	10000	TIF-2		100	1000	10000	
1			2.04	113.39	111.22	87.63		3.28	105.09	105.90	50.79
2	L		3.28	70.81	78.38	77.81	L	4.1	63.12	72.93	71.84
3	L?		2.18	16.44	45.37	47.08	L?	3.28	40.86	34.76	-0.08
4			2.18	92.41	103.25	112.56		3.28	109.03	102.21	102.43
5			2.18	76.68	104.80	113.78		3.28	102.11	116.91	108.74
6	L		2.18	16.49	50.26	71.54	L	3.28	0.70	15.83	58.68
7			2.18	52.92	23.01	4.45	L	3.28	0.18	17.17	55.03
8			2.18	-3.19	0.79	-0.91		3.28	-8.07	-8.92	-9.42
9			2.18	-2.20	3.94	1.09		4.1	1.39	-2.32	2.12
10			2.14	0.79	2.33	2.91		4.1	-0.21	-1.63	2.05
11			2.14	-0.30	4.99	14.77		3.29	2.38	11.59	20.86
12			2.14	-0.83	3.35	2.77		4.2	-0.51	1.20	-2.20
13			2.14	2.91	7.21	5.52		4.2	-6.11	-0.76	0.61
14			2.14	4.42	7.21	5.07		4.2	-0.07	0.54	-1.33
15			2.12	6.33	3.51	12.44		4.2	1.34	11.49	21.47
16			2.12	2.86	2.55	-1.26		4.2	1.23	-0.63	0.00
17			2.12	-2.52	2.50	2.72		4.2	0.54	-2.05	-1.23
18			2.12	1.46	9.33	6.56		4.2	0.18	-1.58	-2.45
19			2.08	-3.37	-11.63	2.26		4.2	-1.00	1.65	-0.47
20			2.08	-0.12	5.07	9.59		4.2	10.68	21.27	24.54
21	L		2.08	63.06	86.76	78.36		4.3	80.92	94.72	150.66
22	L		2.08	55.07	91.66	96.84		4.29	33.66	77.75	83.36
23	L		2.08	54.67	80.09	83.61		3.29	87.98	86.20	3.37
24			2.08	-7.47	1.32	-1.33		4.3	-4.26	-4.54	-6.40
25			2.07	2.21	5.00	9.74		4.3	0.96	3.05	7.14
26			2.07	8.97	5.42	9.28		4.3	0.00	-0.89	-0.29
27			2.07	-2.60	3.45	4.96		4.3	-0.96	-1.56	-0.64
28			2.07	-6.32	11.72	7.24		4.3	-0.50	-0.92	-0.21
29	L		2.04	-1.30	44.10	47.76	L	4.1	22.82	35.16	53.88
30			4.29	-0.73	-0.62	1.60		4.1	-1.67	0.19	1.23

表1 平成12年度の30化合物のTIFアッセイの結果

		ER-ERE			ERE 1			ERE 2		
ID	rd	10	100	1,000	th	10	100	1,000	th	
ER202	N	0.51	0.51	-11.88	4.2	3.37	4.93	-1.56		
ER206	L	-12.20	1.93	73.42	4.2	2.69	-10.34	5.05		
ER208	L	50.78	66.22	60.92	4.2	7.70	8.31	27.13		
ER210	L	-17.84	5.59	-28.16	4.2	-7.23	-5.79	-0.36		
ER277	L	18.47	22.09	43.52	4.2	14.15	44.35	16.48		
ER278	N	17.33	26.66	19.37	4.2	11.88	7.31	19.60		
ER286	N	1.26	9.98	21.27	4.2	11.91	1.73	-13.77		
ER303	L	40.77	50.85	35.35	4.3	-13.52	-3.31	3.13		
ER305	L	23.69	-0.62	55.10	4.3	-22.20	-33.05	56.78		
ER236	N	-0.30	0.49	17.96	4.3	-0.38	-16.07	-2.17		
ER271	N	26.14	27.60	24.84	4.3	12.95	22.35	14.82		
ER272	N	-13.97	-13.91	8.71	4.3	14.90	11.71	14.67		
ER340	N	1.07	-15.95	4.83	4.2	23.05	1.10	20.92		
ER345	N	-0.36	9.90	12.58	4.2	13.27	9.15	-7.43		
ER346	N	3.73	8.65	3.40	4.2	-6.38	-19.99	-1.06		
ER352	L	10.32	16.02	33.44	4.2	6.15	25.07	19.65		
ER360	N	-13.83	-43.74	7.05	4.3	-26.81	6.70	-2.42		
ER362	L	13.87	18.56	34.00	4.3	-11.89	-13.83	7.87		
ER237	N	-2.54	-9.18	2.26	4.3	20.01	21.63	-17.65		
ER249	N	5.61	16.59	11.77	4.3	0.45	18.53	-52.12		
ER257	N	18.19	9.41	12.38	4.3	18.62	22.22	25.01		
ER263	->4	26.17	35.95	17.36	4.3	4.59	23.55	16.25		
ER276	->4	28.42	23.04	3.03	4.3	7.79	50.11	23.19		
ER280	N	4.79	10.03	13.51	4.3	-0.93	-1.17	-1.09		
ER284	L	29.10	18.47	-16.12	4.3	0.41	6.98	5.82		
ER348	L	31.13	37.92	19.16	4.3	6.55	12.36	8.41		
ER366	N	13.44	15.85	10.27	4.3	19.35	8.33	-13.25		
ER370	L	31.84	22.45	34.10	4.3	4.45	11.50	1.30		
ER238	L	39.62	1.52	-1.05	4.3	18.95	18.17	6.62		
ER279	N	20.39	14.80	20.36	4.3	-10.10	-5.80	-7.96		
ER306	N	14.68	5.24	2.19	4.3	-30.22	-11.52	28.33		
ER349	N	-3.58	-4.91	1.96	4.3	-4.96	4.42	19.37		
ER353	N	-0.06	10.79	11.66	4.2	4.83	6.43	25.06		
ER364	L	37.58	26.99	16.42	4.2	1.16	6.02	-1.09		
ER371	N	17.52	8.65	3.03	4.2	-25.67	13.64	11.85		
ER372	N	17.10	23.92	4.07	4.2	6.10	2.36	-3.23		

表2 平成13年度の36化合物のEREアッセイの結果

		ER-TIF2N TIF 1			TIF 2			
ID	rd	10	100	1000	th	10	100	1000
ER202	#	-1.52	-1.73	-1.66	#	-1.24	-1.59	-0.98
ER206	#	-1.05	1.12	1.69	#	-0.83	-0.24	0.45
ER208	#	1.82	1.61	1.89	#	-0.11	-0.11	0.18
ER210	#	-1.72	0.43	10.78	#	-0.29	0.08	1.76
ER277	#	-0.64	0.96	5.97	#	-0.51	0.14	1.34
ER278	#	-0.11	1.16	4.50	#	0.19	0.16	1.14
ER286	#	-0.56	-1.10	0.06	#	-0.37	-0.84	-0.71
ER303	#	0.16	0.28	1.93	#	-2.86	-1.57	0.44
ER305	L	1.37	6.46	32.93	L	-0.68	4.46	28.09
ER236	#	1.08	1.01	1.84	#	-0.35	-0.75	-0.15
ER271	#	-0.51	-0.09	2.24	#	-1.28	-0.30	1.80
ER272	#	-0.80	-0.53	2.03	#	-2.36	-2.20	-0.87
ER340	#	-0.17	-0.47	1.28	#	1.29	-0.95	0.55
ER345	#	-0.67	-0.29	1.66	#	0.00	-1.02	-0.97
ER346	#	-0.52	-0.44	0.01	#	-1.11	-1.50	-0.49
ER352	#	0.07	1.81	13.31	#	-0.21	2.50	16.14
ER360	#	-0.32	0.31	-0.59	#	-0.53	0.05	0.78
ER362	#	-0.87	1.22	13.51	#	-0.07	1.00	8.83
ER237	#	2.63	-0.28	-0.13	#	-1.71	-0.32	-1.30
ER249	#	-0.32	0.82	10.72	#	0.49	-1.07	1.51
ER257	#	1.15	1.05	3.70	#	-1.73	-2.17	-1.97
ER263	4.	-1.85	0.71	-0.86	#	-1.65	-5.49	-2.20
ER276	4.	-0.08	-1.02	0.91	#	-0.86	-1.01	1.94
ER280	#	0.41	-0.39	0.65	#	-0.85	-0.79	-0.55
ER284	#	0.00	0.00	0.86	#	-0.79	-0.42	0.96
ER348	#	-0.06	-0.23	0.43	#	0.03	-0.03	1.90
ER366	#	-0.38	0.36	-0.52	#	-0.13	-0.40	-0.85
ER370	#	-0.68	-0.75	0.32	#	0.00	-0.78	-1.06
ER238	#	1.83	4.05	11.14	#	-1.21	0.09	0.65
ER279	#	-0.01	-0.18	0.53	#	0.22	0.84	0.15
ER306	#	-0.76	-0.31	2.41	#	-1.30	-2.87	-0.78
ER349	#	-0.20	0.07	2.10	#	-3.88	-3.94	0.21
ER353	#	-0.46	0.53	6.24	#	0.11	0.49	7.15
ER364	#	-0.16	-0.61	-0.29	#	-0.15	-0.21	-0.18
ER371	#	-0.66	-0.94	-0.60	#	0.27	0.13	-0.48
ER372	#	-0.30	-0.43	-0.55	#	-2.57	-3.93	-3.44

表3 平成13年度の36化合物のTIFアッセイの結果

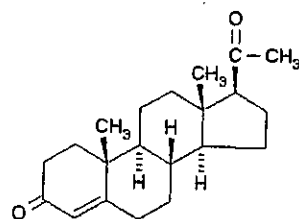
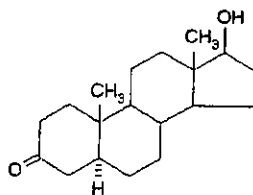
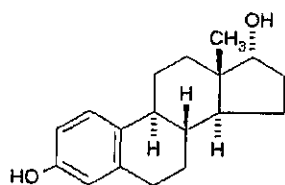
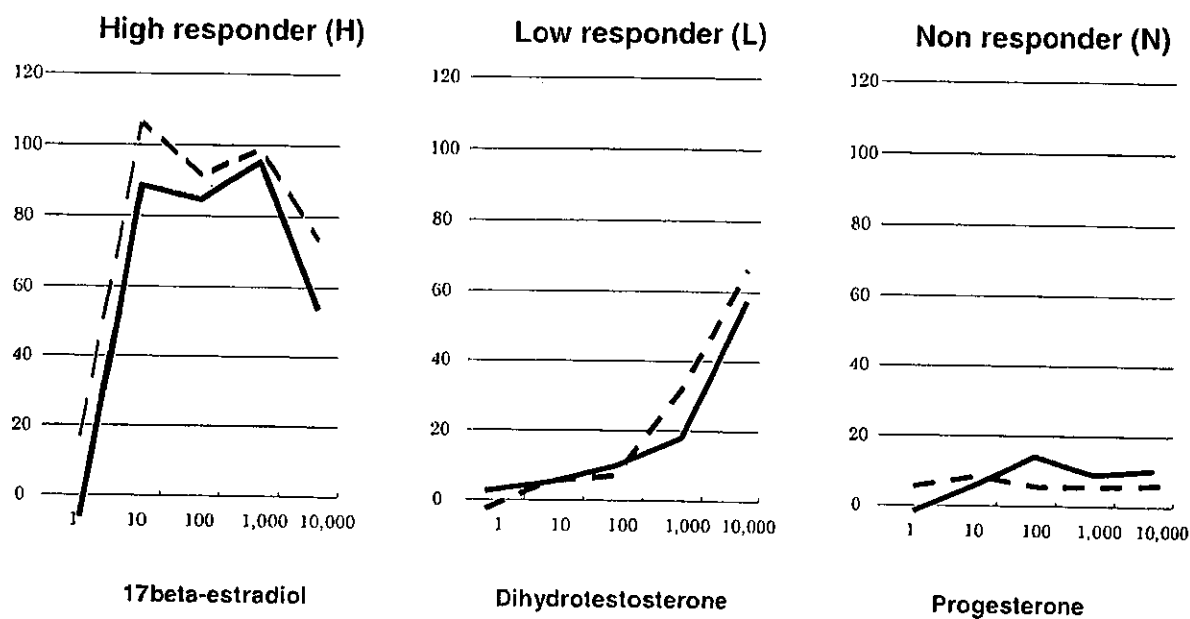


図6 エストロゲン様作用の判定

化学物質についてEREアッセイ、TIFアッセイを行ない相対活性化度を求めた。
相対活性化度の違いにより化学物質を分類した。
表1、2に化学物質のスクリーニングの結果を示す。

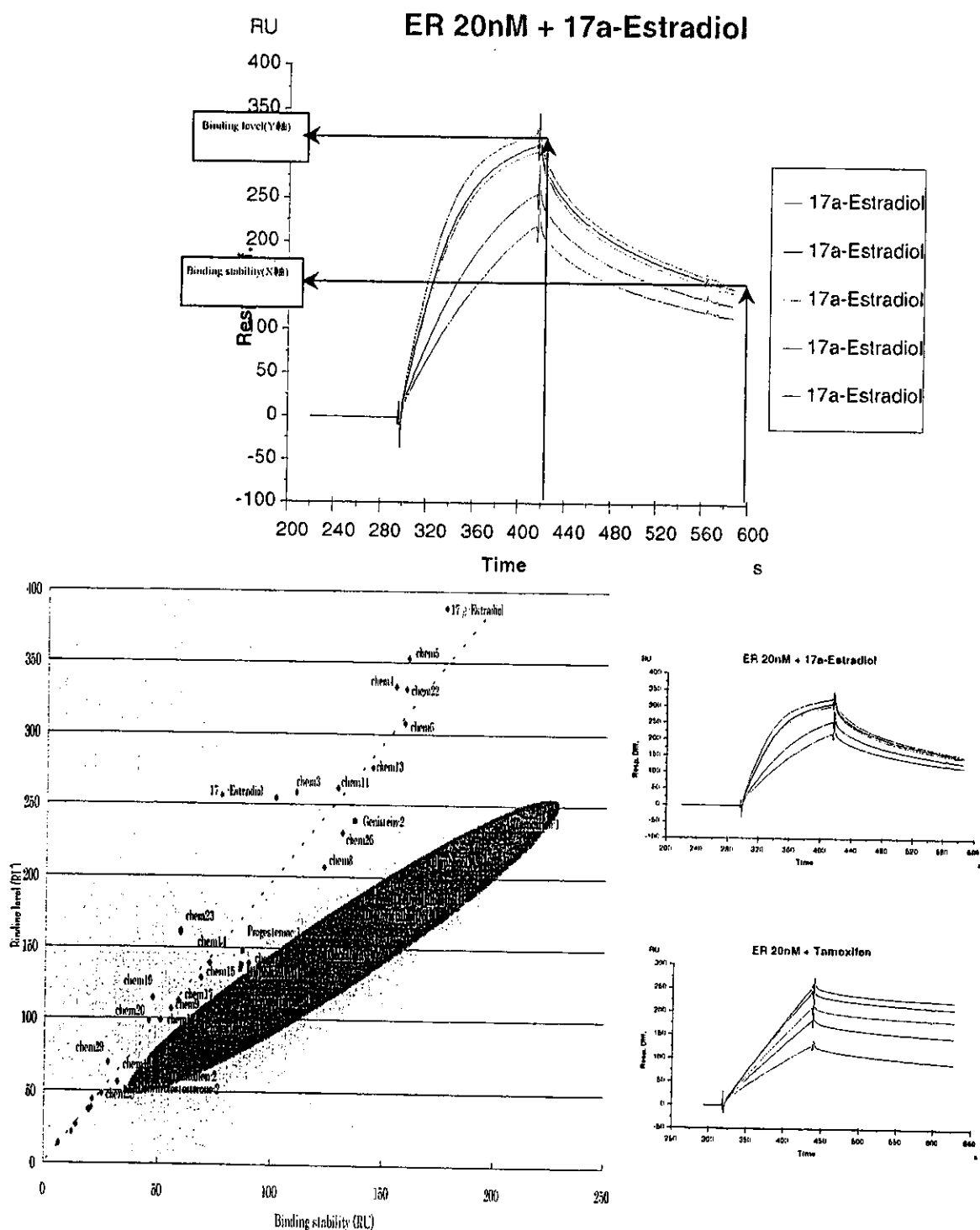


図7 アゴニスト、アンタゴニストの反応性の違い

種々の化学物質についてEREアッセイを3回繰り返しセンサーグラムを比較した。1 μ Mの化学物質のセンサーグラムからERの結合量と2分間解離反応をした後の結合量(結合安定性)をプロットした。アゴニスト、アンタゴニストで有意な差が見られた。アンタゴニストの場合にはERとEREの結合がより安定に保持されていることがわかる。

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

超高速選別法の検証の評価に関する調査研究

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs)問題に関しては、科学的に未解明な点が多く、人の健康や生態系への影響に対する取り組みにあたって、本研究班では従来の試験法の枠組みを越えた検討により、その作用メカニズムに関する科学的知見の収集等に努めることを基本としている。本研究では、得られた知見から内分泌かく乱作用が疑われる化学物質を効果的にスクリーニングするための手法を中心とした試験法の開発等に鋭意取り組むことを目的として、本問題に関する OECD などの国際機関との研究協力・連携体制によって、世界的協調およびデータ互換の立場から本研究の発展・遂行のための基礎データの集積を行った。

A. 研究目的

化学物質の内分泌かく乱作用を評価するための適切な試験法は未だ確立されておらず、米国では環境保護庁(EPA)の諮問機関として1996年に設置された Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC)において、現在使用されている化学物質の内分泌かく乱能力を評価するためのフロースキームを提案し、ポリマー及び年間生産量が10000ポンドを下回る化学物質を除く約15000種の化学物質について High Throughput Prescreening を行い、内分泌かく乱作用について優先順位を付けた上で齧歯類子宮肥大試験・Hershberger 試験等の高次 Screening 試験へ移行し、化学物質の持つ内分泌かく乱作用を明らかにしていく方針を示した。また、OECD に於いても *in vivo* 試験系の立ち上げが進むとともに、その前段階としての *in vitro* スクリーニング法の開発・評価プロジェクトの必要性が取り上

げられつつあるといった展開となっている。上述の HTPS は EDCs スクリーニング法の中でも迅速且つ高感度に多種類の化学物質の類ホルモン作用を検出する手法と位置付けられており、現在、我が国で継続的に実験手法の開発及び検証試験が進められている。

本年度は、OECD における化学物質のハザードアセスメントに関する新規及び改正試験法認証のバリデーションと規制のための会議に出席し、内分泌かく乱物質試験法の現時点での問題点等について WHO/IPCS、EPA/EDSTAC および OECD/EDTA 等の研究機関との情報交換を行い、国際的ガイドライン策定に向けた今後の方向性について検討した。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質試験法について、国際的動向および我が国の立場を把握するために、OECD におけるハザードアセスメントに関す

る新規及び改正試験法認証のバリデーションと規制のための会議に出席した。現時点での問題点の整理と、ピアレビュー及び関係各国研究機関のデータの検討を行い、ハザードアセスメントにおける国際協調にむけ、新規試験法の開発、評価、行政受諾について検討を行った。

C. 研究結果

会議では内分泌かく乱物質を含む化学物質のハザードアセスメントのための新規試験法のバリデーションと受諾プロセスの基本ガイダンスを策定し基本合意を得た。

化学物質の試験法は、科学の進歩に合わせてヒトを始めとした動物への危険性を評価するため科学的根拠に基づく新規試験法の開発が必要であり、新規試験法の信頼性と妥当性を評価するための基本方針として新規試験法の開発からプレバリデーション、バリデーションを経て最終承認されるまでの基本的道筋として“Data Interpretation Prediction”が提案され了承された。また新規試験法開発が動物愛護にもつながるよう、試験法の開発においては、これまで動物実験の代替、予測、改善を基本方針とすることが合意された。

新規試験法による結果の評価においては、科学的に妥当性のある他の試験データとの比較により試験法の妥当性が検討されるべきであるが、その比較対象となる従来法がない場合など、ヒトデータのあるものについては、その積極的な活用が提唱された。また、新しい試験法の妥当性を検討するためのバリデーション過程においては、その目的に適合するリフェレンスとなる化学物質の選択が重要であることが確認された。さらに、新しい手法をハザードアセスメントに用いることを促進するためには、試験法個別にその目的に応じた科学的評価がなされるべきで

あるものの、現時点では構造的で解りやすい評価手法がないため、詳細なガイダンスの策定に向け、上記の基本的道筋にあわせてヒトデータの活用なども含め、今後、ワークショップや専門家会議を開催して議論する必要があることが確認されるに至った。

一方、これまでに情報がほとんどない数多くの化学物質については、迅速な危険性評価のため3次元構造活性相関(QSAR)手法の積極的な活用が推奨された。そうした状況においてこれまでの本研究班における細胞系、無細胞系および3次元構造計算による内分泌かく乱候補化合物の選択に関する研究は、内分泌かく乱化学物質問題のみでなく、ハザードアセスメントにおける国際的ガイドライン策定においても重要であることが確認された。

D. 考察

内分泌かく乱物質を含む化学物質のハザードアセスメントにおいて、OECDで従来の毒性手法に合わせ、現時点での問題点を考慮した、科学の進歩に即応した新規試験法開発の重要性が確認された。今回、新規試験法の信頼性や妥当性の評価における基本的道程が国際的に了承されたことをうけ、今後は本研究班でこれまでに進めてきた内分泌かく乱化学物質の試験法を始め、個別の試験法についてより具体的な国際的合意に向けた動きが活発化するものと考察される。さらに今回、OECDでは多くの化合物に対する迅速な評価のためQSAR手法の積極的な活用についても推奨しており、内分泌かく乱化学物質については、これまで本研究班で検討を進めてきた、*in silico*（電算機内予測）に始まり、*in vitro*試験系（無細胞試験管内試験、培養細胞実験など）、*in vivo*スクリーニング系（子宮肥大試験など）、*in vivo*評価試験系（

開発検討中)、およびこれらを結合し、かつ将来的な評価の手段となりうる潜在能力を有する cDNA microarray 技術によるトキシコゲノミクスを戦略的に配置した戦略は、これに対応するものと考察された。今後は、さらにその信頼性および妥当性の向上が求められるであろう。

E. 結論

これらの状況に鑑み、この系から発信されるデータの有用性を含めて、今後の研究開発の方向性を見極める作業が必要である。今後、さらに核内レセプターによる遺伝子制御機構の研究が進み、レセプター構造と活性制御の関係や、作用物質と遺伝子発現プロファイルおよびその生体作用についての知見が蓄積し、個々の化合物の生体作用についてこれまでより多方面からの検討と知識の蓄積が可能となることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

誌上発表

1. Yoon, B.I., Hirabayashi Y., Kaneko T., Kodama Y., Kanno J., Yodoi J., Kim D.Y. and Inoue T. Transgene expression of thioredoxin (trx/adf) protects against 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd)-induced hematotoxicity. Arch Environ Contam Toxicol, 41, 232-6.2001
2. Yoon, B.I., Hirabayashi Y., Ogawa Y., Kanno J., Inoue T. and Kaneko T. Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection

of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. Chemosphere, 43, 819-22.2001

3. Haraguchi, S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y. Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. Mech Dev, 108, 59-69.2001
4. Yoon, B.I., Hirabayashi Y., Kawasaki Y., Kodama Y., Kaneko T., Kim D.Y. and Inoue T. Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). Exp Hematol, 29, 278-85.2001

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

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

内分泌かく乱物質の電算探索と評価

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

内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を原子レベルで理論的に解析する *in silico* におけるドッキングスタディを確立し、超高速スクリーニング法を開発することを目的として、内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価として、結晶構造が明らかにされているアンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体結晶構造に対して、数十万種の化学物質のバーチャルスクリーニングを実施した。これらにより、自動化のために必要な至適手法を引き続き検討しつつ、個々の化合物の生体作用をより詳細に検討できるスクリーニング法の開発を進めた。

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。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く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、受容体-リガンド間で形成され得る水素結合を足がかりとして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

探索法の開発を行ってきた。本研究は、この三次元データベース検索法を利用して内分泌かく乱化学物質の標的であるエストロゲン受容体の立体構造情報に基づき、コンピュータを用いた理論的な解析と検索を行うことを目的としている。今年度はリガンド結合ドメインの X 線結晶構造が明らかにされているアンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体に対して、数十万種の市販化学物質が登録されているデータベースのバーチャルスクリーニングを実施した。自動ドッキングプログラムにより各化学物質の結合様式を推定しその結合親和性を比較することにより、アンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体に安定に結合すると推定される化学物質を選び出した。

B. 研究方法:

(1)スクリーニングに使用する受容体立体構造の準備

ドッキングに使用する受容体立体構造は、Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型 ER α のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ラロキシフェン(RAL)が結合している1err.pdbを使用した。PDB中の蛋白質座標に水素を付加し、蛋白質分子力場計算プログラム AMBER で付加した水素の構造の最適化・AMBER 原子タイプ・原子電荷の割り振りを行った。さらに自動ドッキングプログラム Adam & Eve を実行する際に必要な水素結合情報を割り振り、以下のスクリーニングに使用した。

(2) 低分子化合物データベース

スクリーニングを行う化学物質群として、市販データベース ACD (Available Chemical Directory) 中の全化合物(約 20 万化合物)を使用した。これらの化合物は三次元化した後、自動ドッキングに必要な情報(水素結合情報とコンフォメーション探索時の結合回転情報)を付加した。なお、三次元化には単純なディスタンスジオメトリ法による構造立ち上げの後 MMFF 力場を用いた構造最適化と MOPAC-MNDO 法による原子電荷計算を行うプログラム Olive を使用し、自動ドッキングに必要な情報付加には、Adam & Eve の部分プログラムである Eve-make を使用した。

(3) バーチャルスクリーニング

Adam & Eve を用いてアンタゴニスト結合型 ER α のリガンド結合ドメインとデータベース中化合物の安定な複合体構造を推定した。このプログラムは、対象データベース中のすべての化合物についてそのコンフォメーションを系統的に変えながら結合キャビティへの

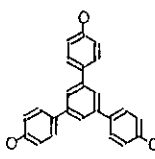
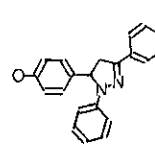
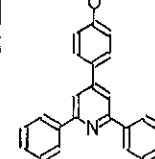
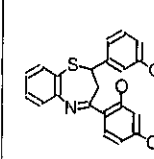
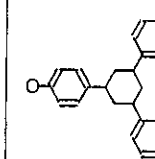
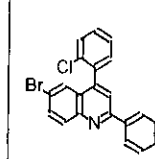
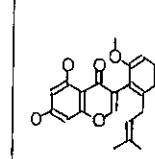
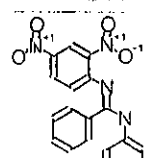
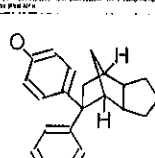
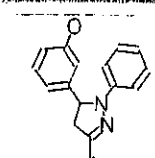
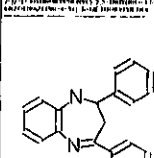
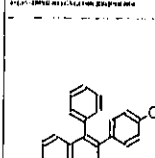
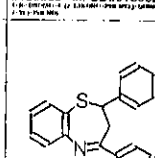
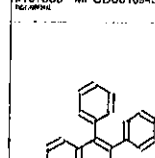
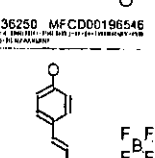
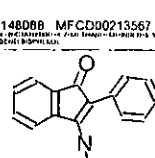
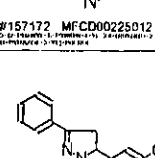
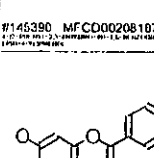
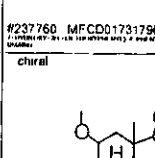
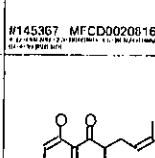
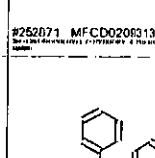
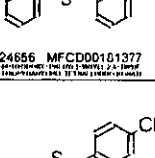
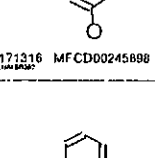
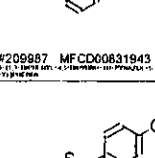
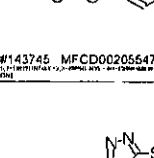
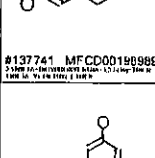
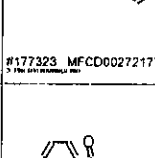
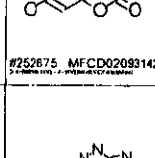
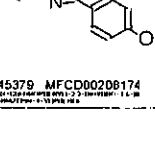
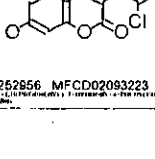
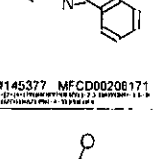
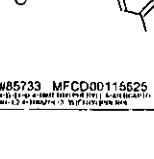
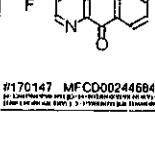
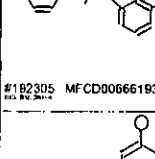
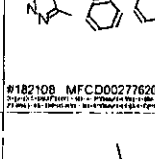
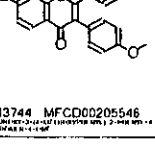
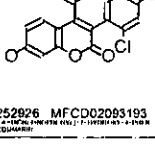
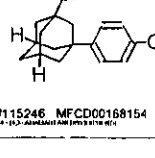
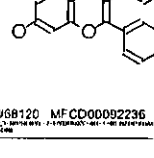
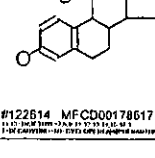
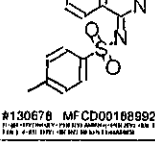
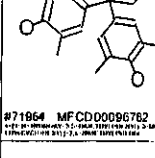
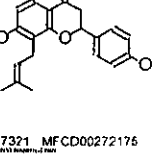
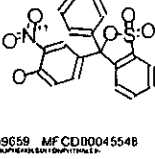
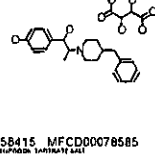
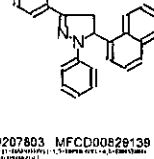
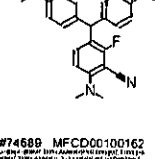
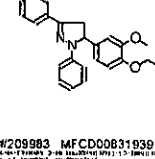
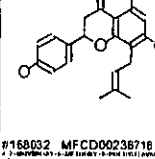
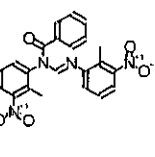
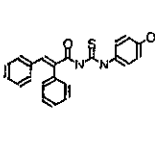
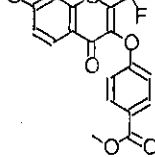
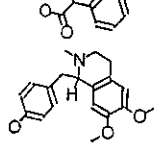
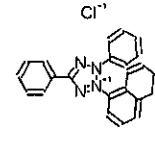
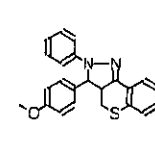
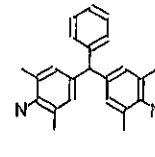
ドッキングを試行する。その結果、蛋白質-低分子化合物間の原子同士のぶつかりや静電的な反発のない安定な結合コンフォメーションを得ることができる。今回は、条件を満たす結合コンフォメーションが複数得られた場合には一化合物につき最大5つのコンフォマーを出力した。

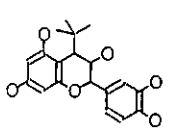
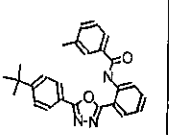
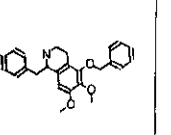
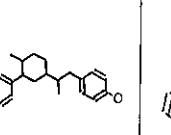
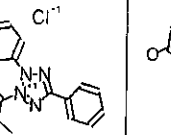
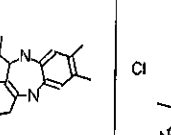
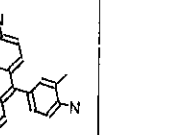
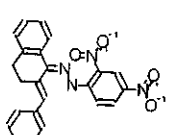
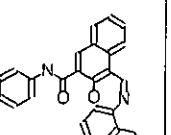
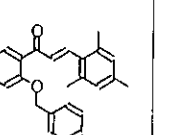
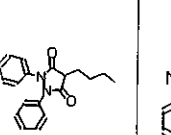
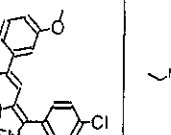
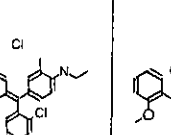
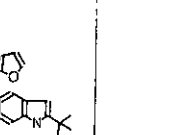
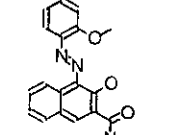
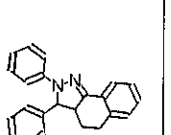
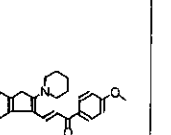
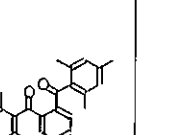
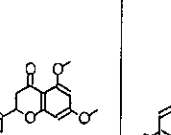
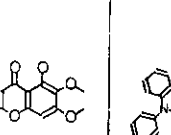
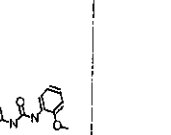
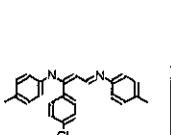
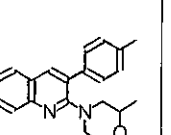
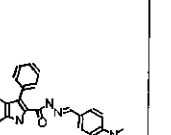
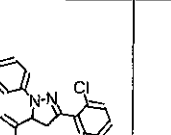
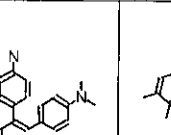
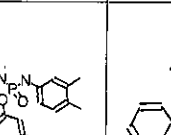
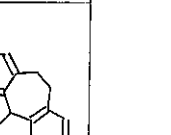
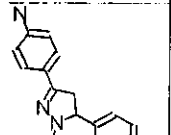
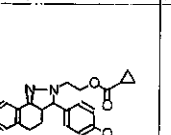
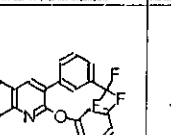
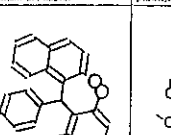
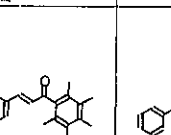
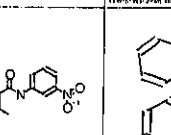
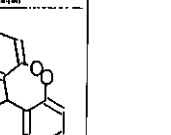
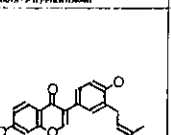
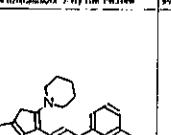
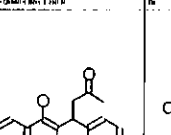
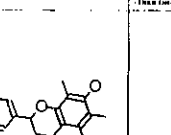
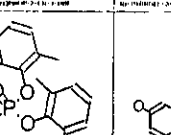
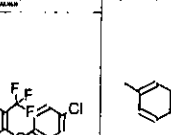
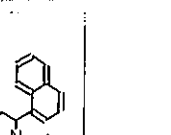
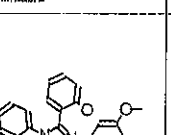
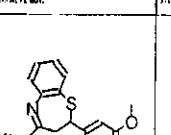
(4) 自由エネルギー値の推算

Adam & Eve のドッキング過程では低分子化合物側だけが構造最適化され受容体側はリジッドなまま扱われるため、自動ドッキングで使用するエネルギー値は非常に荒い見積もりとなっている。そこで、得られたすべての複合体構造について、低分子化合物と受容体のリガンド結合キャビティを構成しているアミノ酸残基全体の構造最適化を行った後、当研究所で開発した蛋白質-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 を利用して結合自由エネルギーを算出した。

C. 研究結果

ラロキシフェン(RAL)結合型 ER-LBD 立体構造(1err.pdb)を基に、自動ドッキングプログラムによる複合体構造の推定および蛋白質構造まで含めた複合体構造の最適化、蛋白質-リガンド間の結合自由エネルギー推算プログラムを実行した。さらに化合物の結合コンフォメーションでの結合自由エネルギー値、活性発現に有効である水素結合の有無、アンタゴニスト特有の開いたキャビティ上部の(リガンドによる)占有率等を考慮して化合物を絞込んだ。最終的に結合活性を有することが期待された 100 化合物を選び出した。

 #226997 MFCD001321326 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #183271 MFCD00292231 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #22935 MFCD00023475 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #145300 MFCD00208176 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #31051 MFCD00033141 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #128958 MFCD00186620 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #131005 MFCD00189436 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #136250 MFCD00196546 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #148088 MFCD00213567 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #157172 MFCD00225012 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #145390 MFCD00208107 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #237760 MFCD01731790 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #145367 MFCD00208160 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #252071 MFCD00208138 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #124656 MFCD00101377 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #171316 MFCD00245888 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #209887 MFCD00631943 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #143745 MFCD00205547 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #137741 MFCD00198989 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #177323 MFCD00272177 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #252675 MFCD002093142 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #145379 MFCD00208174 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #252856 MFCD002093223 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #145377 MFCD00208171 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #85733 MFCD00115625 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #170147 MFCD00244684 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #182305 MFCD00666183 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #182108 MFCD00277620 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #143744 MFCD00205546 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #252826 MFCD002093193 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #115246 MFCD00168154 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #68120 MFCD00092236 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #122614 MFCD00178617 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #130678 MFCD00188982 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #171964 MFCD00096762 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #177321 MFCD00272175 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #39658 MFCD00045548 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #58415 MFCD00078585 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #207803 MFCD00829138 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #74689 MFCD00100162 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #209983 MFCD00831939 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #158032 MFCD00238718 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #168516 MFCD00238296 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #201749 MFCD00095347 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #187482 MFCD00591449 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #193000 MFCD00666936 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #13150 MFCD00011875 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #251163 MFCD002090132 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #126509 MFCD00187206 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)
 #253852 MFCD002094225 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #70750 MFCD00005381 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #189814 MFCD00663607 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #203637 MFCD00079834 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #125005 MFCD00181828 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #154652 MFCD00222328 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)	 #229889 MFCD01457125 1,1'-[1,2-bis(4-chlorophenyl)ethane-2,2'-diyl]bis(4-chlorobenzene)

chiral  #242410 MFCD001860860	 #67396 MFCD00117576	 #162454 MFCD00230950	 #19472 MFCD00019304	 #96567 MFCD00135129	 #201007 MFCD00794503	 #13707 MFCD00012567
 #90347 MFCD00121712	 #155566 MFCD00223277	 #75894 MFCD00102459	 #114511 MFCD00167140	 #248229 MFCD02082306	 #43013 MFCD00050541	 #248191 MFCD01936556
 #114084 MFCD00161161	 #193095 MFCD00667035	 #218947 MFCD001241055	 #110654 MFCD00156851	 #38000 MFCD00044167	 #167875 MFCD00230561	 #66017 MFCD00090653
 #143249 MFCD00204882	 #191188 MFCD00665026	 #213256 MFCD00974230	 #92151 MFCD00124457	 #234947 MFCD01570745	 #135124 MFCD00194704	 #66516 MFCD00080292
 #156179 MFCD00223950	 #122684 MFCD00178720	 #191407 MFCD00665330	 #28158 MFCD00028393	 #86321 MFCD00118883	 #223019 MFCD01314492	 #28155 MFCD00029390
 #205784 MFCD00080660	 #216355 MFCD01103096	 #177696 MFCD00272658	 #17627 MFCD00017315	 #62219 MFCD00085627	 #163686 MFCD00362307	 #144695 MFCD00207088
 #154544 MFCD00222179	 #173397 MFCD00267851					

D. 結論

ラロキシフェン結合 ER モデルを標的としたアンタゴニスト選別計算法を用いた市販化合物データベースのバーチャルスクリーニングにより、これまで既知のアンタゴニストとは構造が大きく異なる多くの化合物が選別された。これまでに、アゴニストモデル計算においても、実際にアゴニスト作用を有する多様な構造の化合物の選別に成功しており、さらに実際に内分泌かく乱性が報告されている多くの化合物の構造は本来のリガンドであるエストロゲンと大きく異なることなどから、今回、計算で選別された化合物もまた、新規のエストロゲンアンタゴニストとして内分泌かく乱を有する可能性が示唆された。

E. 考察及び今後の展望

内分泌かく乱化学物質のスクリーニングにおいて計算による方法は、その対象化合物の数が多いため非常に有用な手段となりえる。本手法によれば、従来の QSAR 法に比較して、非常に高速に高精度の結果を得られ、さらに既知リガンドと構造が全く異なる化合物をも選別できることから、内分泌かく乱化学物質の初期スクリーニングに有用であることが示された。今後は、細胞系や無細胞系における ER 作用強度のデータを計算にフィードバックしつつ、さらには結合した化合物がレセプター構造に与えるエネルギー変化を計算することで ER への結合活性のみではなく化合物作用の計算的推定手法の検討を進める。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

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

内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による
検出系の開発

分担研究者 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

核内受容体による遺伝子転写メカニズムを応用した、内分泌攪乱物質の新規高速分析法構築のため、種々のエストロゲンレセプター作用物質がERにおよぼす影響を表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて解析した。本年度は、ヒトプロモーターにおける様々なERE配列について、化合物によるERの相互作用変化を検討した。あわせて、アフィニティーの低いEREとの相互作用を検討するため測定条件の再検討、および新しいプローブ固定化法を開発した。検討の結果、一部のEREでは化合物によるER構造の差がより明らかに示された。また、fosEREなどの対向配列でないER結合配列において、ERがモノマーで結合することが示唆された。またこれらのSPR-HTTPS系への応用により、生体作用に関連するより多くの情報が得られものと考察された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質についての対応は、特にその候補物質であるホルモン受容体作用を有する化合物が環境中や食品中に存在し、ヒトを始めとした様々な生物種が日常的に暴露される可能性のある化合物も含まれている事などから緊急性を有している。一方でホルモン様作用を示す化合物は天然にも多く存在することから、科学的に裏付けられた対応が求められている。しかし、これまでに内分泌系自体の機能やレギュレーションについて膨大な研究があるにも関わらず未だ不明の部分も多く、結果としてホルモン様作用を示し内分泌かく乱性が示唆される化合物について、その生体影響や危険性については依然不明のままである。

そのため、化合物の内分泌かく乱メカニズムに即した、新規アッセイ系の構築が必要である。想定される化学物質による内分泌かく乱のメカニズムは様々で、例えば内因性ホルモンの生合成、代謝系、フィードバックに影響を与えることによって内分泌系は攪乱される可能

性があるが、特にエストロゲンレセプター(ER)を始めとする核内レセプターを介した作用では低用量問題や非線形の用量反応性を示すとも指摘され、そのメカニズムについてより詳細な検討が必要である。また多くの化合物について、すでにERを始めとしたホルモン受容体との結合性が示されており、それらの化合物はレセプターを介してその作用を惹起すると考えられている。

エストロジェンを始めとする内分泌ホルモンは、その「特異的」レセプターと結合することでその作用を発現する。ERはエストロゲンとの結合により立体構造が変化して、ERにより制御される遺伝子のプロモーター領域に存在するレスポンスエレメント(ERE)にコファクターをリクルートして転写を制御しこれに続く生体反応を引き起こす。ERとEREやコファクターとの相互作用はリガンド結合による受容体立体構造変化により制御されており、これまでの研究から化合物のリガンドとしての生体作用と、その化合物が結合した受容体構造との関連が指摘されている。

本研究では、内分泌かく乱化学物質のレセプターを介した生体作用におけるレセプターシグナル伝達系の個々のステップへの影響を解析し、その結果をもとにした新規ハイスループット(HTPS)系への応用を目的として、これまで表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー(BIAcore™)を用い、化学物質のエストロゲンレセプター(ER)への結合がERとそのレスポンスエレメント(ERE)との相互作用やコファクターとの相互作用に及ぼす影響から、ERに結合した化合物の生体作用との関連について解析を進めてきた。

これまでに、我々はSPRアッセイにおけるEREプローブとしてビテロゲニンA2由来のEREシーケンス(VitA2ERE)を用いて検討を進めてきた。VitA2EREは、レポーター遺伝子アッセイなどにも用いられる完全EREシーケンスであるが、ヒトを始めとする哺乳動物プロモーターにおいてはこれと完全に一致するER結合シーケンスは見つかっておらず、報告されている配列はいずれも数塩基がVitA2とは異なるものである。エストロゲン様化合物の組織特異的作用には、臓器特異的に発現する転写共役因子の関与が示唆されている一方で、同一組織においてさえも遺伝子発現への影響が異なることは、EREシーケンスのバリエーションによるリガンド特異的なERによるERE認識の可能性を示唆している。すなわち、EREにより制御され、かつ化合物特異的に発現する遺伝子プロモーターでは、化合物特異的なER-ERE相互作用が示される可能性がある。そこで本年度は、ER-ERE相互作用のヒトにおける生理学的意義についてさらに解析するため、ER-EREによる制御が報告されているヒト遺伝子プロモーターERE配列を用いて、バイオセンサーによる相互作用解析を行った。また、アフィニティーの低いEREとの相互作用解析を解析するため測定条件や測定法の再検討を行った。

B. 研究方法

1、ERE固定センサーチップの作成

直接法:エストロゲン受容体のレスポンスエレ

メントを含む合成オリゴヌクレオチド(5'-tcgagcaaagtcAGGTCAcagTGACCTgatcat-3')のセンス鎖直接ビオチン化し、アンチセンス鎖とアニーリングさせた後、ストレプトアビジンでコートしたセンサーチップにインジェクトして固定化した。

アダプター法:ビオチン化アダプターオリゴヌクレオチドを固定化し、アダプターオリゴ相補配列を突出末端として付加したdsERE合成オリゴをインジェクトしてハイブリダイゼーションによりセンサーチップ上に固定化した。プローブ交換は、50mM NaOHでアダプターオリゴを1本鎖化して再びEREオリゴをflowして固定化した。

2、コファクター結合モチーフ固定化センサーチップの作成

ER-コファクター相互作用を検討するにあたっては、ERによる遺伝子発現においてコファクターとして機能することが示されているTIF2のER結合サイトをコードするオリゴペプチドを合成して用いた。すなわち、活性化ERはコファクターのLxxLLモチーフと相互作用することが知られている。そこで、TIF2のLxxLLモチーフを含む領域のペプチドをコファクタープローブとして用いた。TIF2は3つのLxxLLモチーフを有するが、実験では第2モチーフを用いた。

3、相互作用の測定

ERは、リコンビナントHuman ERalphaを使用した。予備検討の結果、E2結合ERは、ER-ERE相互作用解析における測定条件下で特異的結合を示すことが確かめられたため、ER-EREおよびER-LxxLL相互作用いずれも同じ条件下で測定を行った。ERをバッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.05% Tween 20)で希釈して、対象化合物と混合し、37℃で5分間インキュベートした後、サンプルをEREおよびLxxLLを固定化したセンサーチップにインジェクトしてSPR装置(Biacore 3000, BiacoreAB)を用