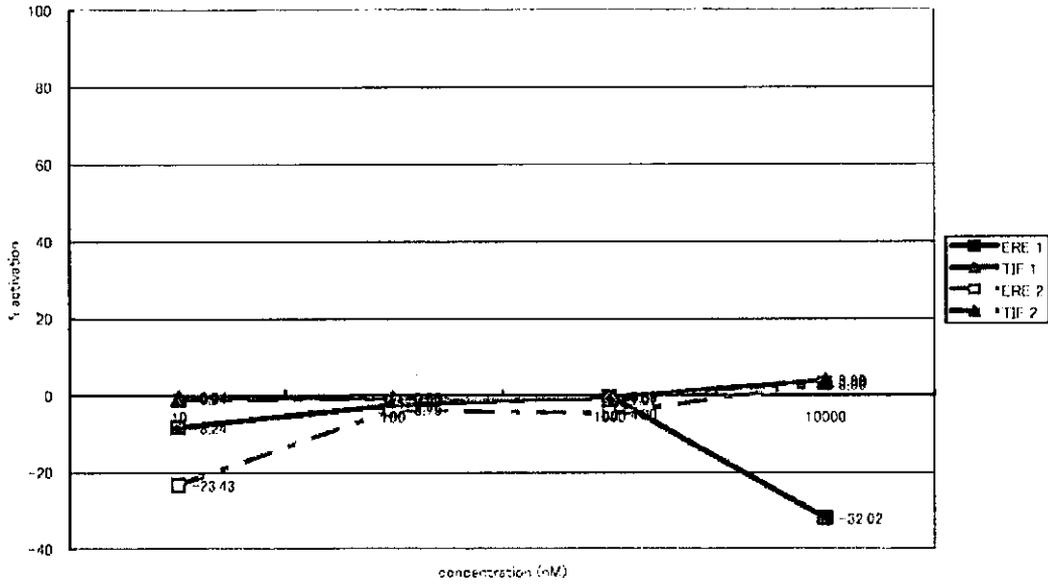
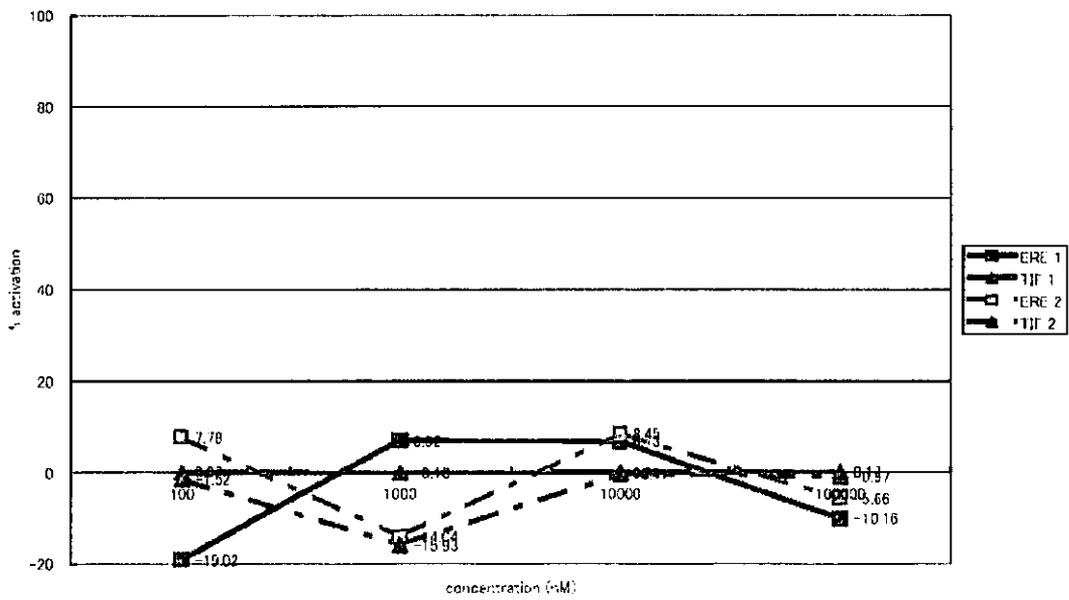


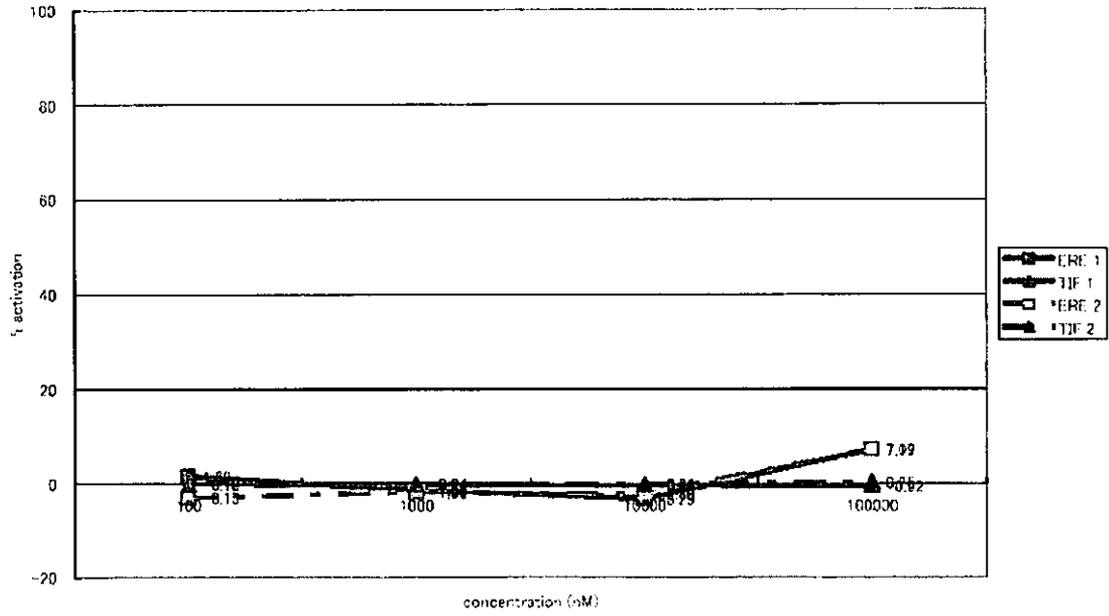
LR551



LR606



ER620



ER636

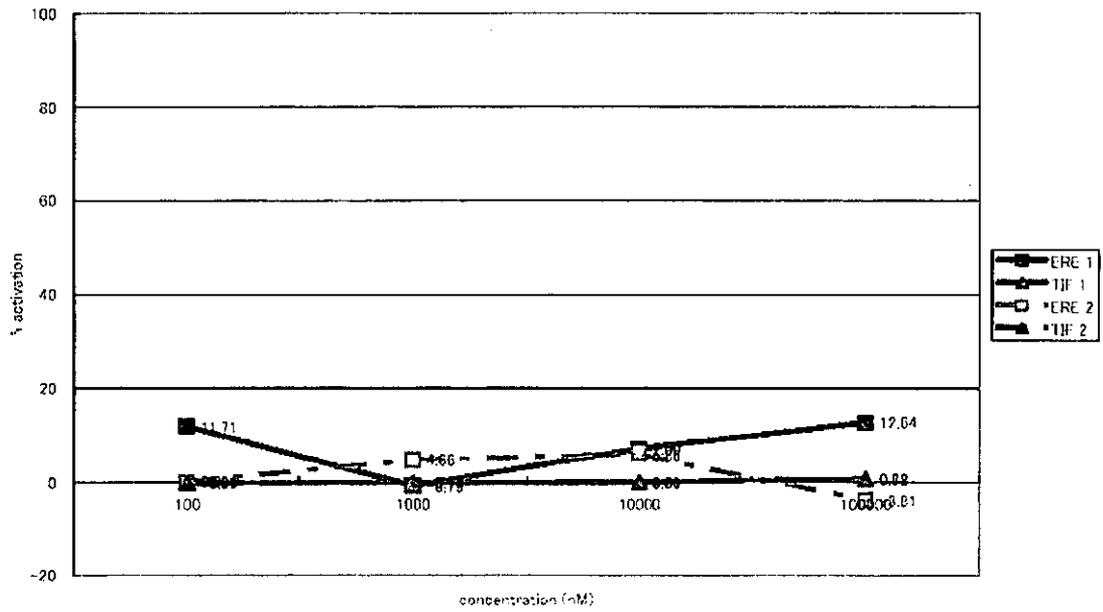


表1 化学物質リストおよびスクリーニングの判定結果

Assay NO	MDL CODE	CAS NO	NAME	MW	ERE	TIF
ER099	MFCDD0020969		4-[3,5-di(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]aniline	295.19	L	N
ER205	MFCDD00051350	23001-29-8	1,3,3'-Trimethyl-6-Hydroxy-2H-1-Benzopyran-2,2'-Indoline	293.37	H	L
ER258	MFCDD00123529		3-(2-Chloro-6-Fluorobenzyl)-7-Hydroxy-4-Propyl-2H-Chromen-2-one	346.79	H	L
ER292	MFCDD00218231		4-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenoxy)benzamide	326.23	N	N
ER323	MFCDD00117642		3-(2,4-Dichlorophenyl)-2-(4-Hydroxyphenyl)acrylonitrile	290.15	H	L
ER388	MFCDD00178029		3-[[2,6-Dinitro-4-(Trifluoromethyl)Phenyl]Thio]-1H-1,2,4-Triazole	336.22	H	N
ER402	MFCDD00180286		1-(4-Chlorophenyl)-2-(5-Piperidino-2H-1,2,3,4-Tetraazol-2-yl)Ethane-1-one Hydrazone	319.8	L	N
ER411	MFCDD00234780		4-((E)-2-(2-Nitrophenyl)Diazenyl)Phenol	243.22	L	L
EA101	MFCDD00000439	1476-61-1	2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)HEXAFLUOROPROPANE	336.23	H	N
EA104	MFCDD00005913	77-09-8	PHENOLPHTHALEIN	318.33	L	N
EA109	MFCDD00036202	596-01-0	ALPHA-NAPHTHOLPHTHALEIN	418.45	L	N
EA113	MFCDD00060012	104497-79-2	2,3-BIS(4-METHOXYPHENYL)-5-PHENYL TETRAZOLIUM CHLORIDE	394.86	N	N
EA116	MFCDD00070618	6424-03-7	SULFONFLUORESCCEIN	368.37	H	L
EA117	MFCDD00071335	36483-26-0	DIIYDROFETHIDIUM	315.42	L	N
EA118	MFCDD00078492	145-50-6	P-NAPHTHOLBENZEN	374.44	H	N
EA145	MFCDD00191313	2716-10-1	ALPHA,ALPHA-BIS(4-AMINOPHENYL)-1,4-DIISOPROPYLBENZENE	344.48	L	N
EA159	MFCDD00272585	71077-33-3	BUTYL 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)ACETATE	300.35	H	N
EA221	MFCDD00076565	23210-58-4	IFENPRODIL TARTRATE SALT	801	L	N
EA243	MFCDD00135129		3-(2,6-DIMETHYLPHENYL)-2,5-DIPHENYL TETRAZOLIUM CHLORIDE	362.86	N	N
EA246	MFCDD00012567	3248-91-7	NEW FUCHSIN	365.91	L	N
EA308	MFCDD00213567	1949-97-1	4,4-(OCTAHYDRO-4,7-METHANO-5H-INDEN-5-YLIDENE) BISPHENOL	320.42	H	N
EA120	MFCDD00097753		4-(4-CHLOROPHENYL)-5-(4-METHYLPHENYL)-1,3-THIAZOL-2-AMINE HYDROBROMIDE	381.724	N	N
EA121	MFCDD00097989		NI-[3-(4-PYRIDYL)-5-NITRO-2-(PHENYLTHIO)BENZAMIDE	351.385	N	N
EA133	MFCDD00138917		3-(4-CHLOROPHENYL)-4-[[4-CHLOROPHENYL]THIO]-1H-PYRAZOLE	321.23	L	N
EA148	MFCDD00206258		5-[2,5-DI(2,2-TRIFLUOROETHOXY)PHENYL]-1H-PYRAZOLE	340.222	L	N
EA151	MFCDD00218463		N3-(4-BROMOPHENYL)-4,5-DIOXO-2-PHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRROLE-3-CARBOXAMIDE	371.189	L	N
EA160	MFCDD00276211		3-(4-HYDROXY-3-METHOXYBENZYLIDENE)-2-PHENYLCHROMAN-4-ONE	358.391	L	N
EA161	MFCDD00331216		NI-[3-(4-HYDROXYANILINO)-2-QUINOXALINYL]-4-METHYL-1-BENZENESULFONAMIDE	406.464	N	N
EA184	MFCDD00062627		6-[(ETHYLTHIO)METHYL]-2-[4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]PYRIMIDIN-4-OL	314.33	N	N
EA185	MFCDD00630993		DIETHYL 2-[1H-1,2,3-BENZO TRIAZOL-6-YLAMINO]METHYLIDENE MALONATE	304.304	L	N
EA186	MFCDD00631938		5-(3,4-DIMETHOXYPHENYL)-1,3-DIPHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE	358.439	N	N
EA205	MFCDD00205547		5,7-DIHYDROXY-2,3-DIPHENYL-4H-CHROMEN-4-ONE	330.338	H	L
EA207	MFCDD00208174		4-[2-(4-CHLOROPHENYL)-2,3-DIHYDRO-1,5-BENZOTHAZEPIN-4-YL]PHENOL	365.882	N	N
EA209	MFCDD00208171		2-[2-(4-HYDROXYPHENYL)-2,3-DIHYDRO-1,5-BENZOTHAZEPIN-4-YL]PHENOL	347.436	N	N
EA210	MFCDD00115625		4-[2-[4-(2,4-DIMETHYLPHENYL)-5-MERCAPTO-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL]ETHYL]PHENOL	325.434	L	N
EA214	MFCDD00205546		7-HYDROXY-3-(4-METHOXYPHENYL)-2-PHENYL-4H-CHROMEN-4-ONE	344.364	L	N
EA222	MFCDD00829139		5-(1-NAPHTHYL)-1,3-DIPHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE	348.447	L	N
EA224	MFCDD00831832		5-(4-ETHOXY-3-METHOXYPHENYL)-1,3-DIPHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE	372.466	N	N
EA226	MFCDD00239299		NI-(2-METHYL-3-NITROPHENYL)-NI-[[2-METHYL-3-NITROPHENYL]IMINO]METHYL]BENZAMIDE	418.407	N	N
EA228	MFCDD00591449		METHYL 4-[[7-HYDROXY-4-OXO-2-(TRIFLUOROMETHYL)-4H-3-CHROMENYL]OXY]BENZOATE	380.273	H	L
EA240	MFCDD00117576		NI-[2-[3-[4-(TERT-BUTYL)PHENYL]-1,3,4-OXADIAZOL-2-YL]PHENYL]-3-METHYLBENZAMIDE	411.503	N	N
EA246	MFCDD00121712		2-BENZYLIDENE-1,2,3,4-TETRAHYDRONAPHTHALEN-1-ONE 1-(2,4-DINITROPHENYL)HYDRAZONE	414.419	N	N
EA258	MFCDD00204892		ZP	360.886	N	N
EA260	MFCDD00124457		3-(2-CHLOROPHENYL)-5-(4-METHYLPHENYL)-1-PHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE	346.859	N	N
EA283	MFCDD00178720		2-[3-(4-METHOXYPHENYL)-3,3A,4,5-TETRAHYDRO-2H-BENZO[G]INDAZOL-2-YL]ETHYL CYCLOPR	390.48	N	N
EA318	MFCDD002090132		3-(4-METHOXYPHENYL)-2-PHENYL-2,3,4,4-TETRAHYDRO[1]BENZOTHIOPYRANO[4,3-C]PYRAZOL	372.449	N	N
EA322	MFCDD01570745		4-(1-(4-AMINOPHENYL)-2-[4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]VINYL)ANILINE	329.445	N	N
EA326	MFCDD00382307		3-(4-CHLOROPHENOXY)-7,2,5-DIHYDRO-2-(TRIFLUOROMETHYL)-4H-CHROMEN-4-ONE	356.682	H	L
ER500		000077-40-7	Bisphenol B	242.31	L	N
ER503		000140-66-9	4-Octylphenol(tert)	206.32	L	L
ER506		000486-66-8	Diadzein(4',7-Dihydroxyisoflavone)	254.24	L	L
ER507		000521-18-6	Stanolone	280.44	L	L
ER509		000596-01-0	alpha-Naphtholphtalein	418.44	N	N
ER510		000599-64-4	4-alpha-Cumylphenol	212.29	L	L
ER512		000643-55-0	4,4'-CYCLOHEXYLIDENE BISPHENOL	268.35	L	N
ER513		001478-61-1	4,4'-(HEXAFLUOROISOPROPYLBENE)DIPHENOL	336.23	L	N
ER514		002491-32-9	BENZYL 4-FLUOROXYPHENYLKETONE	212.25	N	N
ER515		003780-50-5	4-n-Octyloxyphenol	222.32	N	N
ER500		000087-18-3	Salicylic Acid 4-tert-Butylphenyl Ester	270.32	N	N
ER501		000084-09-7	4-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester	165.19	L	N
ER503		000104-88-3	Imidazole-4-acrylic acid	138.12	N	N
ER504		000118-55-8	Salicylic acid, phenyl ester	214.22	N	N
ER507		000131-54-4	2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone	274.27	L	N
ER508		000131-55-5	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	246.22	H	H
ER509		000131-56-6	2,4-Dihydroxybenzophenone	214.22	H	L
ER510		000131-57-7	Benzophenone, 2-hydroxy-4-methoxy-	228.24	L	N
ER512		001843-05-6	Benzophenone, 2-hydroxy-4-(octyloxy)-	326.44	L	N
ER513		002440-22-4	2-(2-Benzotriazolyl)-p-cresol	225.25	N	N
ER517		003846-71-7	2-(2-Hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)benzotriazole	323.43	N	N
ER518		003864-99-1	2-(3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole	357.88	N	N
ER519		003896-11-5	2-(3-Chloro-2-benzotriazolyl)-6-tert-butyl-p-cresol	315.8	N	N
ER522		005232-89-5	2-Cyano-3,3-diphenylacrylic Acid Ethyl Ester	277.32	L	N
ER524		005466-77-3	4-Methoxycinnamic Acid 2-Ethylhexyl Ester	290.4	N	N
ER525		006197-30-4	2-Cyano-3,3-diphenylacrylic Acid 2-Ethylhexyl Ester	361.48	N	N
ER527		021245-02-3	4-Dimethylaminobenzoic Acid 2-Ethylhexyl Ester	277.4	N	N
ER528		025973-55-1	2-(2H-BENZO TRIAZOL-2-YL)-4,6-DI(T-PENTYL)PHENOL	351.49	N	N
ER530		070356-09-1	4-TERT-BUTYL-4'-METHOXYDIBENZOYL METHANE	310.392	L	L
ER511		000787-63-7	DC-Norgestrel (18,19-Dioxo-17-alpha-pregn-4-en-20-yn-3-one, 13-ethyl-17-hydroxy-(+))	312.5	N	N
ER529		081083-37-0	Pravastatin	446.51	N	N
ER530		000057-64-7	Physostigmine, salicylate (1:1)	413.5	N	N
ER531		000064-86-8	Colchicine	398.44	N	N
ER532		000500-38-9	NORDIHYDROGUAIARETIC ACID	302.37	L	N
ER533		000050-55-5	Reserpine	608.69	N	N
ER534		000596-27-0	o-Cresolphtalein	346.38	H	L
ER535		000074-31-7	p-Phenylenediamine, N,N-diphenyl-	260.34	N	N
ER536		000098-65-0	1,3-Dinitrobenzene	168.11	N	N
ER539		000303-45-7	gossypol	578.62	N	N
ER541		023513-14-6	6-gingerol	294.39	N	N
ER542		020283-82-5	7-Hydroxy-Pipat Maleate (rosemary acid)	360.3	N	L
ER543		000077-09-8	PHENOLPHTHALEIN	318.32	L	N
ER544		000510-13-4	MALACHITE GREEN BASE	346.48	N	N
ER546		003248-91-7	NEW FUCHSIN	365.9	N	L
ER548		001719-71-7	TETRAZOLIUM VIOLET	384.87	L	N
ER549		006948-88-5	ALPHA-NAPHTHOLBENZEN	377.44	L	N
ER550		001166-52-5	garlic acid dodecyl ester	338.44	N	N
ER551		002716-10-1	ALPHA,ALPHA-BIS(4-AMINOPHENYL)-1,4-DIISOPROPYLBENZENE	344.48	N	N
ER506		000118-60-5	Salicylic acid, 2-ethylhexyl ester	250.33	N	N
ER520		004065-45-6	2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic Acid	308.31	N	N
ER536		036861-47-9	Methylbenzylidene Camphor	254.37	L	N

H 高反応性物質
 L 低反応性物質
 N 無反応性物質
 IL 低阻害性物質
 HL 高阻害性物質
 不溶性物質

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
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・毒性部

研究要旨

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題の解明に向けた厚生労働省の「試験スキーム」に沿って要求される順位付けの為の大規模スクリーニングを進めるとともに、順位付けの科学的根拠に関わる諸要因に関する基礎的研究をさらに進め、内分泌かく乱の評価やメカニズム研究への応用を目指している。本研究では、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質をより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への応用を目的として、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毒性試験法は未だ確立されておらず、現在、OECD などの国際機関を中心に EDCs スクリーニング法の開発・評価プロジェクトが展開されている。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)では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 (HTPS)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増殖試験、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。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、アジア太平洋生理学主催の国際会議における内分泌かく乱化学物質のシンポ

ジウムに出席し、内分泌かく乱化学物質の低用量効果・複合効果を中心に現時点での試験法の問題点等について関係研究者と情報の交換を行い、さらに当方の研究成果を発表し、その内容に対する議論を行った。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質の試験法について、国際的動向および我が国の立場、現状での問題点を把握するため、アジア太平洋生理学主催の国際会議における内分泌かく乱化学物質のシンポジウムを中心として、受容体原生に伴う低用量効果・複合効果についての関係研究者と情報交換を行った。また、研究課題の今後の進展の参考とするため当方の研究成果を発表し、その内容に対する意見の交換を行った。

C. 研究結果

ホルモン受容体作用による内分泌かく乱作用は、従来の毒性学的手法では検出できない低用量域からの生体作用や、逆 U 字と呼ばれる複雑な用量-生体反応を示すことを示唆する結果が多く報告されているが、未だそのメカニズムの解明に至ってはいない。さらには、いくつもの化合物に同時に暴露された際の生体影響

やいくつもの受容体に作用を有する化合物による複雑な生体影響については、科学的に未解明の部分が多く、効果的に判断できるアッセイ手法はないと考察された。現在の内分泌かく乱化学物質スクリーニングにおける国際的な動向は、主に化合物データベースの *silico* 電算計算によるスクリーニング、*in vitro* 高速スクリーニング、*in vivo* スクリーニングの3つのコンポーネントから成る。最終決定を行うための試験は、これらのスクリーニングを得た後に行うべきである。すなわち前者は、内分泌かく乱の可能性のある化合物をもれなく抽出できなければならないと考えられる。*in silico* スクリーニングには、ドッキングモデルを含む様々な数学的なモデルによるものと、CoMFAのような従来型3D-QSARによるものがある。高速スクリーニングシステムとしては、酵母を用いたレポーター遺伝子アッセイや、ヒト細胞を含む種々の細胞系による遺伝子転写活性化を指標とするアッセイ系を始め、様々な受容体結合活性の測定法などが提唱されている。*In vivo* スクリーニング法としては子宮肥大試験や Hershberger 試験が提唱されており、これらを組み合わせて実施することで、より包括的なスクリーニングが可能となると考察された。しかし、現状ではいずれの手法も完璧とは言えず、EDCsの問題をカバーするためには、引き続き最新の知見に基づく新規試験法開発が必須であるといえる。

ホルモン受容体は、リガンド依存性転写因子であり、その生体作用は下流遺伝子発現制御により惹起される。すなわち、その遺伝子制御メカニズムに関する最新の知見に基づく手法や、マイクロアレイ技術などを用いた化学物質により変動する遺伝子の網羅的解析などの戦略は、これに対応するものと考察され、その応用により、今後さらに信頼性および妥当性の向上が図られると考察された。

D. 考察

受容体を介して内分泌かく乱作用を惹起する化学物質については、低用量問題や逆U字

反応などの複雑な生体反応メカニズムについて未だ未解明の部分も多く、従来の毒性学的手法では十分な評価をし得ない上、現状においては決定的な評価手法はない。内分泌かく乱化学物質問題の解決には、それらの問題点を考慮しつつ、現在利用可能な試験手法を組み合わせると共に、科学の進歩に即応した新規試験法開発が重要であると考察される。本研究班で検証を進めている受容体三次元構造をに基づくドッキングモデルを用いた *in silico* (電算機内予測)、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系および SPR ハイスループット試験系は、いずれも上記に即応するものであり、また、これらを組み合わせることにより効率的なスクリーニング戦略として確立を目指す本研究の方向性は、将来的に有効な評価手段となり得ると考察された。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

現在の国際的状況に鑑み、今後、本研究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され、個々の化合物の生体作用について、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. 研究発表

1. 誌上発表

Inoue, T., Igarashi, K., and Sekizawa, J. Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoints of their mechanisms of action. JMAJ (Japan Medical Association Journal), 46: 97-102, 2003.

Inoue, T. Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and

W. D. Pennie (eds.), Toxicogenomics, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.

T. Inoue. Toxicogenomics-applied genomics: a tool in toxicology. Proceedings of the Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology (Special Session on the Use of Genomics (Toxicogenomics, Proteomics) in Hazard and Risk Assessment), OECD. (2002.2, Paris)

2. 学会発表

T. Inoue: WS1-3 Risk Management in Drug & Food. International Conference of Risk Management for Preventive Medicine (2003.3.28)

T. Inoue: Introductory Note: Practical approaches for toxicogenomics. Toxicogenomics International Forum 2002 (2002.11.23)

T. Inoue: Workshop6: Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health. SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances (2002.11.21)

T. Inoue: Symposium 1: Current progress of endocrine disruptor research. 5th Scientific Congress Federation of Asian & Oceanian Physiological Societies (FAOPS) (2002.9.24)

T. Inoue: Low-dose effect in endocrine disruptors: Strategy for testing and assessment. Satellite Symposium on Endocrine Disruptors: Impact on Reproductive Health (2002.9.27)

T. Inoue: Practical approaches to testing

and validation for possible endocrine disruptors with respect to a mechanism of action. 4th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2002.8.11-15)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
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

核内受容体の遺伝子転写メカニズムを応用した、内分泌かく乱化学物質の新規高速分析法構築のため、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて化学物質が受容体に与える影響の解析を行った。本年度はこれまで測定が困難であったエストロゲン受容体 β (ER β)について測定条件を新たに最適化することで、ER α 、ER β 双方について同一条件下で測定を行うことを可能とした。種々の化学物質がER β と応答配列DNA (ERE)およびコファクター結合サイト(LxxLL)との相互作用に及ぼす影響について検討した結果、アゴニストの結合はER α と同様ER β におけるERE、LxxLL相互作用をいずれも増加させた。

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信頼性の高いスクリーニング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、たと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も内分泌

系はかく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生体作用では、低用量かつ非線形の用量反応性を示すことが示唆されており、より詳細な検討が必要である。これまでに多くの化合物について、ERを始めとしたホルモン受容体への結合性が示されており、それらの化合物については様々な内分泌かく乱作用が危惧されている。

エストロゲ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アッセイにおけるセンサープローブとしてEREを含む2本鎖DNAおよびコファクターのER結合サイトであるLxxLL配列を含むペプチド鎖をセンサーチップに固定化し、これにあらかじめ測定対象化合物とインキュベートしたER α を連続的に流すことで、それぞれのプローブとの結合・解離過程の変化から化合物の受容体作用を検出可能であることを示してきた。

ERには、 α と β の2分子が存在し、いずれも生体に広く発現分布している。これまで我々は、ER α を対象としてSPRアッセイ系の構築を行い化合物のER反応性について検討を進めてきたが、2種のER分子について個別に検討することは重要である。そこで本年度は、化合物のER β 作用を検討可能となるよう測定条件の最適化を行い、代表的リガンドについて相互作用の検討を行った。

B. 研究方法

1. ERE固定センサーチップの作成

EREオリゴヌクレオチドは、アダプター法にてセンサーチップに固定化した。すなわちピオチン化アダプター1本鎖オリゴヌクレオチドを固定化し、アダプター相補配列を突出末端

として付加したEREを含む2本鎖オリゴヌクレオチド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。プローブの交換には、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HumanER α および β を使用した。ERを測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.05% Tween 20%, BSA 5 μ g/ml, TCEP 5nM)で希釈して、対象化合物と混合し、30°C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)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。化合物の結合による相互作用への影響を解析するにあたっては、化合物を 10^{-5} ~ 10^{-8} Mの濃度範囲で10nM ERと混合し、ERのEREおよびLxxLLペプチドに対する結合解離過程を測定した。

4. 解析

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 分間測定してそのレスポンスの変化を比較した。また、2 分間のレスポンスの増加を、結合量として求めた。解析には市販のコンピューターソフト(BIAevaluation3.0(BIACORE AB) および JMP ver.3(SAS institute))を用いた。

C. 研究結果

1. ER β 受容体測定条件の最適化;

ER β 測定条件の検討にあたり、以前の検討より ER α -ERE, ER α -LxxLL 相互作用はバッファー中の塩濃度および pH の影響を受けやすいことが確かめられているが、ER β で十分な相互作用反応が認められず、測定が困難であるのは、主にタンパク立体構造の不安定性に起因することが示唆されたため、測定条件の最適化にあたり、まず始めにタンパクを安定化させることが知られる因子の効果について検討を行った。

検討の結果、BSA (Bovine Serum Albumine) および TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl) Phosphine, Hydrochloride) それぞれが ER β 構造安定化に有効であり、またこれらを組み合わせて添加することでより効果的に機能することが示された(図 1)。最適化された測定バッファー条件は、Tricine 25mM (pH7.8), KCl 150mM, MgCl₂ 0.5mM, Tween20 0.05%, BSA 5 μ g/ml, TCEP 5nM、また化合物と ER タンパクのインキュベーションは、30°C、5min とし、以下の検討を行った。

2. 17 β -Estradiol (E2) 濃度依存性の検討;

新たに最適化された測定条件下において、ER β と ERE および LxxLL 相互作用の E2 濃度依

存性について検討した(図 2)。ER-ERE 相互作用は、pS2 プロモーター由来の ERE を用いて検討を行った。ER β は ER α に比べ ERE からの解離が遅いことが示された。一方、ER β -LxxLL 相互作用の結合解離センサーグラムは ER α とほぼ同様、E2 結合により ER β もまたコファクターと強く相互作用することが示された。ER β -ERE、ER β -LxxLL 相互作用の見かけの EC50 値は、それぞれ 9.0nM、4.0nM と見積もられた。

3. エストロゲン受容体作用物質による ER β 相互作用の検討;

引き続き ER 作用が知られている、いくつかのアゴニスト・アンタゴニストについて ER β 相互作用の検討を行った(図 3)。測定を行ったいずれの ER α アゴニストでも ER β の ERE および LxxLL 相互作用アフィニティーの増加が認められた。また、アンタゴニストもまた、ERE 相互作用を増加させる一方で、ER α と同様 LxxLL 相互作用は示さなかった。ER-ERE 相互作用結合解離パターンにおいて、ER α では、アゴニスト結合型とアンタゴニスト結合型で大きな差が示されるが、ER β ではアゴニストとアンタゴニストとで相互作用パターンに明確な差は認められず、またさらに、E2 を含むすべての化合物で ER α アンタゴニスト結合型に近い相互作用パターンを示した。

いくつかの化合物について化合物濃度依存性の検討を行った結果、植物エストロゲンのゲニスタインは、ER α に比べて低い濃度範囲で ER β 活性化作用を示した(図 4)。

D. 考察

これまでに我々は、ホルモンレセプターの作用メカニズムに基づく、新規内分泌かく乱化学

物質高速スクリーニング法として、SPR バイオセンサーを用いた ER α 作用物質スクリーニング系を構築した。SPR 法は、再現性が高く、ロボットを用いた高速化が可能であることから、受容体作用メカニズムに基づく新規ハイスループット系として有用である。その有効性について現在検討を進めている。

一方 ER には、 α と β の 2 分子種が存在し、いずれも生体に広く発現分布している。ER α と ER β の生体における機能的役割分担については未だ不明な点も多いが、いくつかの報告は、これらが互いに別の遺伝子の制御に関わっていることを示しており、すなわちそれぞれが特異的な生体作用を担っていると考えられる。我々はこれまで ER α を対象として SPR-HTPS 系の開発を進めてきたが、同一の測定条件下では、ER β では十分な反応が得られず、測定が困難であった。ER α と ER β のリガンド結合部位の立体構造は非常に似ており、ER α リガンドは、ER β についても同様に結合活性を有するものと想定される。しかし、ゲニスタインを始めとした植物エストロゲンなど一部の化合物では ER 分子選択性が報告されており、化合物の生体作用を考察するうえで ER 分子種選択性について、個別に検討することは重要である。そこで本年度は、これまで進めてきた ER α 系にあわせ ER β 系の構築を行った。これまでの検討より ER α -ERE, ER α -LxxLL 相互作用そのものはバッファー中の塩濃度および pH の影響を受けやすいことが確かめられているが、ER α についての測定条件は、細胞内環境に近い条件に最適化されたこと、および ER β の相互作用測定が困難であるのは、主にタンパク立体構造の不安定性に起因することが示唆されたため、今回の検討ではタンパクを安定化させることが知られるいく

つかの因子を系に添加することで、ER β についても ER α 同様の測定を可能とした。さらに結果には示さないが新たな測定条件下で ER α は、これまでと同じ結果を与えることを確認した。

新規に最適化した条件下で、相互作用反応の E2 濃度依存性について検討した結果、ER β -ERE、ER β -LxxLL 相互作用の見かけの EC50 値は、それぞれ 9.0nM、4.0nM と ER α とほぼ同等に見積もられた。ただしいずれも ER 濃度 10nM 下での測定であることから、高く見積もられている可能性がある。一方、ER β により選択的であることが知られるゲニスタインでは ER β -ERE 相互作用 EC50 値は 0.49nM で ER α の約 1/100 を示した。結果は、過去の報告と一致しており、同様にエストロゲン作用物質でありながら、内分泌かく乱のみが危惧される BPA に対して、あわせて乳がん抑制作用などの有用性が指摘される植物エストロゲン特有の生体作用とも関連する可能性を示すものと考察された。さらにこの結果より、本系が化合物の ER α 、ER β 選択性検討において有効であることが示された。

さらに、ER 結合活性が明らかな数種のアゴニスト・アンタゴニストを用いて相互作用の検討を行ったところ、ER β では E2 を含むいずれのアゴニストでも ER α に比べ ERE からの解離が遅く、むしろアンタゴニスト結合型 ER α に近い構造変化を引き起こすことが示唆された。また、ER α での結果に比べアゴニストとアンタゴニストとの差は明確には示されなかった。2 種の ER を共に発現する臓器では、ER β は同じ下流遺伝子転写において、ER α に対してむしろ抑制的に働くとの報告もあり、相互作用パターンからの結果はそれと関連するとも考えられる。その一方で、ER-LxxLL 相互作用にお

ける変化は、アゴニスト結合型 ER β がコファクターを強くリクルートできることを示しており、生体内における ER α と ER β の機能的相互作用については、さらなる解析が待たれる。

E. 結論

新規ホルモン受容体作用内分泌かく乱化学物質 HTS 系構築のため、これまで検討を進めてきた ER α 測定系に加え、本年度の検討により、新たに化合物の ER β 作用の測定を可能とした。また、さらに新たな測定条件下で ER α は、これまでと同じ結果を与えることが確認された。数種の ER リガンドを用いて検討を行ったところ ER β では ER α とは異なる相互作用パターンを示し、本系により化合物の ER 分子種選択性について検討可能であることが示された。現在のところ ER β サンプルが安定な反応を示すのは、調整後約 1~2 時間程度であり、大規模スクリーニングへの適用にあたっては、未だ改良すべき点も多いが、ホルモン様物質スクリーニングにおいて、特に ER α と ER β それぞれへの影響について同一条件下で測定を可能とするもので、本系を用いることで個々の化合物についてより多面的に内分泌かく乱作用を検討可能になると結論づけられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

浅野和信、小野敦、橋本せつ子、井上達、菅野純 分析化学 Vol.51 No. 6 pp389-396 (2002) 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌攪乱化学物質スクリーニング法

表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法：実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編 pp.199-204 (羊土社、2002)

環境ホルモン検出センサー：環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発 pp.247-251 (シーエムシー出版、2003)

2. 学会発表

Kazunobu ASANO, Atsushi ONO, Setsuko HASHIMOTO, Tohru INOUE, Jun KANNO Rapid in vitro screening assay for estrogenic chemicals using Biacore. Biacore Symposium, May 5-8, 2002, Chicago, USA

小野 敦、浅野 和信、橋本 せつ子、井上達、菅野 純 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会 2002 年 6 月 18 日-20 日 名古屋

橋本 せつ子、浅野 和信、小野 敦、井上達、菅野 純 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法 第 75 回日本生化学会大会 2002 年 10 月 14 日-17 日 京都

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価
分担研究者 板井 昭子 (株)医薬分子設計研究所

研究要旨

エストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) と $ER\alpha$ に結合する可能性のある化学物質各々の立体構造情報に基づいた理論的な結合様式の推定および解析を行なった。活性未知な約 2 万種の化学物質の $ER\alpha$ に対する結合様式を推定した後、結合自由エネルギーの解析を行ない、その解析結果をもとにそれらの化学物質についてその活性予測を行なった。

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も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。すなわちこの方法によれば、予め設定した蛋白質結合キャビティ内の水素結合部位や芳香族環の相互作用部位と、対象データベース中の低分子化合物の水素結合部位や芳香族環とのマッチングを、低分子化合物のコンフォメーションを系統的に変えることで網羅的に実行することができる。本研究は、この三次元データベース検索法を利用して選び出した少数の候補化合物を入手し実験的に活性確認することにより、未知のかく乱作用を有する化学物質を効率よく探索することを目的とする。

B. 研究方法

今年度は、米国 EPA が環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物として提示している 5 万 8 千化学物質を対象とした。計算を実行する前に、以下の観点から予め対象とする化合物を絞り込んだ。我々の研究においては、化合物の立体構造情報や物理化学的情報だけが必要であり、その物質が実際には入手困難であっても問題はない。しかしながら本研究においては計算による活性予測後に結合能試験などの生化学的試験に供することで活性の

確認を行なう必要がある。さらに、EPA の化合物データには、我々の研究に使用するためには致命的な欠陥がある。すなわち、これらの候補化合物は ISIS/Base の形で供されていてその分子構造情報が利用しやすい形ではあるものの、多くの光学活性化合物についてはその分子結合情報のみの登録であり、立体構造情報まで入力されていないこと(例えば CAS 番号からは 17 β -エストラジオールと特定できるにも関わらず、立体構造情報が登録されていないため、17 β 体だと特定できない)、さらに CAS 番号や化合物名と、登録されている構造式が全く異なる場合がある(構造式が誤りである)など、分子の立体構造情報を元に行なう我々の研究にとっては非常に不備が多い。そこで、EPA リスト中の 5 万 8 千化学物質の中で市販化合物データベースである ACD にも登録されていて、且つ分子結合情報だけでなく立体構造情報まで得ることができる化学物質だけを今回の計算対象とすることとした。

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、ハイドロキシタモキシフェンが結合している 3ert.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なった。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った。

2. RBA 推算のためのスコア式の決定

独自に入手した約 250 化合物の RBA (17 β -エストラジオールに対する相対結合親和力) 実験データを用いて、結合様式の推定、複合体構造の最適化の後、蛋白質-リガンド間の結合自由エネルギーに寄与すると考えられる様々なエネルギー値を算出した。その各エネルギー項を独立変数、RBA の対数値を従属変数とした重回帰分析を行ない、RBA 実測値の対数値と、推算された RBA 対数値(スコア)との相関が最も良好となる各独立変数の係数を決定し、重回帰式を得た。

3. 重回帰式の評価

2. で得られた重回帰式の検証を行なった。検証用データとして、Endocrinology 1998, 139 (10), 4252-4263 中に記載されている 39 化合物とそれらの ER α に対する RBA 値を利用した。

4. スコア推算する低分子化合物データの準備1(計算対象化合物の選定)

RBA を予測する化学物質は次の要領で選出された。

- (1) EPA 化合物データベースから CAS 番号リストを作成
- (2) ACD 化合物データベースから CAS 番号リストと ACD 化合物番号を作成
- (3) (1)と(2)で CAS 番号のマッチングを実行
- (4) ひとつの CAS 番号について、ACD 番号が複数ある場合は ACD 番号の小さい化合物を採用して化合物を一意に決定

(2) - (4) の実施にあたっては随時 Perl を用いてスクリプトを作成し実行した。

最終的に得られた化合物リストを元に、ACD

データベースに登録されている該当化合物の分子構造を選び出した。

5. スコア計算する低分子化合物データの準備2(分子の物理化学的情報の付加)

4. で得られた化合物について、スコア計算に必要な情報の付加を行なった。分子構造を三次元化した後、自動ドッキングに必要な情報(原子電荷計算、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、芳香族性のポイント情報)を付加した。分子の三次元化にはプログラム Olive を使用した。

6. 低分子化合物の受容体結合様式の推定

自動ドッキングプログラム Adam & Eve を用いてアンタゴニスト結合型 ER α リガンド結合ドメインとデータベース中化合物の複合体構造を推定した。各々の化合物についてこの試行が行なわれた結果、蛋白質-低分子化合物間のぶつかり並びに静電的な反発がない、一定の安定条件を満たした化合物に関してその結合コンフォメーションを得た。

7. 蛋白質-低分子化合物複合体での構造最適化

Adam & Eve のドッキングにおいて受容体は剛体として扱われており、多様な骨格を有する低分子化合物が結合する際受容体蛋白質の微細な構造変化まで考慮されていない。また、自動ドッキングで用いるエネルギー値は格子点を利用して概算されている。そこで、ドッキング計算により得られたすべての複合体構造について、受容体のリガンド結合キャビティを構成しているすべてのアミノ酸残基と低分子化合物の構造最適化を行ない、ひとつひとつの複合体安定構造を得た。

8. 自由エネルギーの解析

構造最適化された複合体において詳細なエネルギー解析を実行した。エネルギー解析にはプログラム GenB および Desolv を利用した。得られた解析結果と2. で得られた重回帰式から各化合物の RBA 値を推算した。

C. 研究結果

1. 重回帰式の評価

アンタゴニスト型 ER α の結晶構造である 3etpdb の蛋白部分を受容体構造として、Endocrinology 1998, 139 (10), 4252-4263 中に RBA 測定結果が記載されている 38 化合物のドッキングスタディを実施した。次に得られた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ない、各低分子化合物に対する最適な安定複合体構造を得た。さらに、安定複合体におけるエネルギー解析を行ない、構造の安定に寄与すると考えられる以下の項を算出した。

(1)GBelc : GenB で計算される分子間静電相互作用エネルギー

(2)GBrep : GenB で計算される分子間立体相互作用エネルギー

(3)GBcnf : GenB で計算されるリガンドの結合に伴う回転結合自由度の束縛効果

(4)GBsol : GenB で計算される分子間接触面での溶媒和寄与

(5)dEpro : 複合体形成により、蛋白分子が単独での安定コンフォメーションから増加させた分子内エネルギーの差分値

(6)dElig : 複合体形成により、リガンド分子が単独での安定コンフォメーションから増加させた分子内エネルギーの差分値

(7) Desolv : Desolv で計算されるリガンド、蛋白双方の複合体形成に伴う脱溶媒和寄与

これらの解析結果から、スコアを算出した。その際、使用した重回帰式は式(1)のとおりである。

$$\text{score} = -2.837\text{GBelc} - 0.761\text{GBrep} - 0.389\text{GBcnf} - 0.251\text{Desolv} - 8.564 \quad (1)$$

算出されたスコア値と、文献上の RBA 実測値の対数値との相関を確認した結果、その相関係数は $R=0.73$ であった。計算対象とした化合物リストを表1. に示した。相関結果は図1. に示した。

2. EPA 化合物の RBA 推算

次に入手の可能性、分子構造の確実性を重視して、EPA リストの化合物中から、logRBA 推算を行なう化合物群を以下の流れで選び出した。

(1) EPA 化合物のデータから CAS 番号リストを作成

58,591 化合物

(2) ACD 化合物のデータから CAS 番号リストと ACD 化合物番号を作成

80,523 化合物

(3) (1)と(2)で CAS 番号のマッチングを実行

20,223 化合物

(4) ひとつの CAS 番号について、ACD 番号が複数ある化合物は ACD 番号の小さい化合物を採用して化合物を一意に決定

19,667 化合物

この 19,667 化合物は ACD データベース中に立体構造が明記されており、構造の不確実

さのために誤った計算結果がでることのない質の高い低分子構造が得られた。これらについて、結合様式の推定、複合体構造最適化、自由エネルギー解析を実行し、式(1)に従ってスコアを算出した。

スコアの高い上位 1000 化合物について、その CAS 番号とスコア値を表2. に示した。

D. 考察

図1. に示したように、式(1)を使って求めた logRBA 値と、実験的に求められた logRBA 値との相関係数は $R=0.73$ であり、一応の相関があると考えられる。しかしながら、文献上の検出限界以下の活性化合物(グラフ中では実験的な logRBA 値を便宜的に -5 として表示)の logRBA 計算値は -2.5 から 0.5 の範囲でばらついており、活性化合物との区別がつかなかった。これらの化合物は具体的には、progesterone、testosterone、formononetin、biochaninA、ipriflavone、chrysin、flavone であり、分子構造が活性のある化合物に類似していた。このことから、本来ならば複合体形成の障害となり得る局所的なぶつかりや電気的な不具合が複合体構造最適化によって消滅し、過剰に安定化してしまった可能性があり、今後さらに検討が必要であると考えられる。

また、今回使用した蛋白の結晶構造では、結合しているリガンドが 4-ヒドロキシタモキシフェンであり、本来アゴニスト型のリガンドが結合する際にリガンド結合ドメインを閉鎖する「蓋」となるヘリックス 12 が、開いた構造となっている。そのため計算に利用できるリガンド結合キヤビティが非常に広がっていて、より多様な構造の低分子化合物が結合できるリガンド結合構造となっている。このことは、結合し得る化合物の可能性を広げるという意味で偽陰性化

化合物は減少すると考えられるが、結合キャビティの広がりによって、偽陽性化合物が増加するのは明らかである。さらに 17 β -エストラジオールのようにヘリックス 12 がぴったりと閉じた形で結合できるアゴニストタイプの化合物について、ヘリックス 12 と化合物間の相互作用エネルギーの寄与が加味されないため、エネルギー評価が妥当ではない可能性も考えられる。

また前述のとおり複合体構造最適化はリガンド-蛋白間の不必要な原子どおしのぶつかりを解除するために有効であるがその反面、必要な原子同士のぶつかりまでも軽減してしまい、エネルギー的に有利にしてしまう危険がある。実際にはこれまで多くの実験事実から、17 β -エストラジオールの A 環と相互作用する部位を構成するアミノ酸残基は構造的に硬く、結合キャビティに制限を加えていることが推定されているが、今回の構造最適化では、キャビティを形成するすべての残基を含めているため、本来は蛋白とのぶつかりが生じて、安定に結合できないようなリガンドさえも過剰に安定に結合している可能性がある(ぶつかって入っているような大きなリガンドのぶつかりを緩和してやると、多くの場合エネルギー的にも有利になる)。

さらに、今回適用した重回帰式には、蛋白およびリガンドの単独での最安定コンフォメーションから増加した分子内エネルギーの差分値(dEpro, dElig)が含まれていない。この項は理論的に、複合体の安定化に寄与するはずであり、異なったリガンド間でのエネルギー比較に貢献するべき項である。

最後に、低分子化合物の静電的エネルギー評価にも問題がある。これは、原子電荷を点電荷として扱うことの限界と、その点電荷値自体の根本的な問題に加えて、アミン、スルホン

酸、カルボン酸等のイオン化可能な原子が複数ある化合物の場合にそのイオン化(プロトン化)状態を考慮しなければならない、ということである。実際に、現状では分子のイオン化状態は入力構造に依存しているため、不自然なイオン化状態となっていることが多い。今回の場合、異常に高い計算値となった化合物はプロトン化したアミンあるいはジアニオンとなったスルホン酸等であり原子電荷の算出が適切でないために静電的エネルギーが過大に評価された結果であると考えられる。

E. 結論

今回、EPA の HTS 候補化合物のうち、市販化合物データベースである ACD に記載されていて構造が一意に決定されかつ入手できる可能性のある化合物群に対してその RBA 値予測を行なった。最初に RBA 値既知の化合物群で RBA を予測したところ、予測値と実測値の相関は良好であった。活性未知化合物については、予測値が上位となった化合物は現状の計算法で扱うには不具合のある化合物が多く、さらに検討が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的所有権の取得状況

特になし

表1. スコアの検証に使用した活性既知の化合物とその活性値

compound	RBA	compound	RBA
Estradiol	100	OH-PCB-L	3.4
diethylstilbestrol	236	OH-PCB4	0.01
Progesterone	< 0.01	OH-PCB-K	2.4
17alpha-estradiol	7	OH-PCB1	0.03
Testosterone	< 0.01	OH-PCB2	0.03
bisphenolA	0.01	4-tert-octylphenol	0.01
coumestrol	20	4-octylphenol	0.02
tamoxifen	4	nonylphenol	0.05
4-OH-tamoxifen	257	chlordecone	0.06
5-androstenediol	1	daidzein	0.1
genistein	4	apigenin	0.3
2-OH-estrone	2	kaempferol	0.1
17-epiestriol	29	quercetin	0.01
16-keto-17beta-estradiol	1.3	phloretin	0.2
16alpha-bromo-17beta-estradiol	76	formononetin	< 0.01
raloxifene	69	biochaninA	< 0.01
o,p'-DDT	0.01	ipriflavone	< 0.01
OH-PCB-A	0.1	chrysin	< 0.01
OH-PCB-B	0.3	flavone	< 0.01
OH-PCB-G	0.06		

Endocrinology 1998, 139 (10), 4252-4263 より抜粋

図1. 活性既知化合物を用いたスコア検証結果

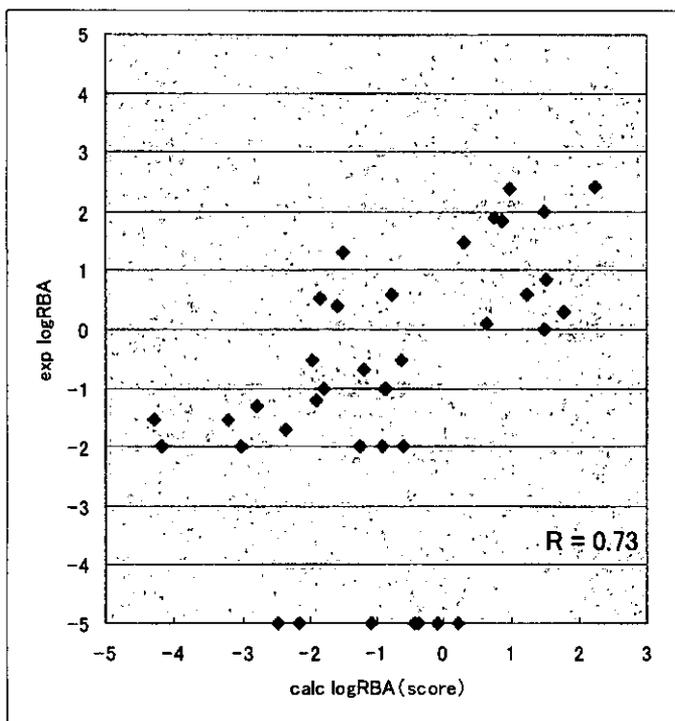


表2. 上位 1000 化合物の CAS 番号とスコア値一覧

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000050-02-2	-0.29	000056-53-1	0.86	000069-05-6	-1.18
000050-04-4	-0.06	000057-24-9	-0.46	000072-33-3	-0.68
000050-14-6	1.37	000057-63-6	0.99	000073-03-0	-1.10
000050-22-6	-0.56	000057-67-0	-0.13	000076-25-5	-0.62
000050-23-7	-0.53	000057-68-1	-1.30	000076-42-6	-0.58
000050-24-8	-0.77	000057-83-0	-0.64	000076-43-7	-0.80
000050-27-1	0.53	000057-85-2	-0.33	000076-57-3	-1.34
000050-28-2	1.48	000057-91-0	1.28	000077-08-7	0.87
000050-33-9	-0.98	000057-97-6	-0.90	000077-09-8	-0.52
000050-34-0	0.26	000058-18-4	-0.25	000077-40-7	-0.63
000050-37-3	-1.04	000058-22-0	0.03	000078-33-1	0.75
000050-41-9	0.63	000058-28-6	-1.24	000079-96-9	-0.67
000050-47-5	-1.24	000058-64-0	-1.16	000079-97-0	-0.59
000050-48-6	-1.19	000058-72-0	-0.19	000080-02-4	-0.85
000050-49-7	-0.93	000058-74-2	-0.76	000080-04-6	-0.63
000050-52-2	-1.33	000059-02-9	0.62	000080-05-7	-0.98
000051-30-9	-0.95	000059-30-3	-0.77	000080-43-3	-1.32
000052-21-1	-1.24	000060-02-6	0.22	000080-49-9	-1.13
000052-39-1	0.08	000060-81-1	-0.86	000080-75-1	-0.89
000052-76-6	0.29	000060-99-1	-1.32	000081-14-1	-0.78
000052-78-8	-0.70	000061-19-8	-1.04	000081-37-8	-0.15
000052-88-0	-0.85	000061-25-6	-0.36	000081-46-9	-1.16
000053-02-1	0.43	000061-73-4	0.06	000081-48-1	-1.29
000053-03-2	-0.36	000062-90-8	-0.69	000081-68-5	-1.08
000053-06-5	0.18	000063-01-4	-0.26	000081-92-5	-1.31
000053-16-7	0.53	000064-85-7	0.22	000081-95-8	0.58
000053-36-1	-0.85	000064-86-8	-0.53	000082-08-6	2.37
000053-41-8	0.31	000066-81-9	-0.57	000082-21-3	-0.66
000053-42-9	-0.48	000067-03-8	-1.24	000082-22-4	0.06
000053-43-0	-0.49	000067-97-0	0.92	000083-43-2	-0.22
000053-70-3	-0.83	000067-99-2	-0.99	000083-44-3	-0.98
000054-28-4	0.54	000068-22-4	-0.55	000083-63-6	-1.31
000056-47-3	-0.05	000068-26-8	1.50	000084-15-1	-1.17
000056-49-5	-0.56	000068-96-2	-1.02	000084-16-2	-0.16

表 2. (続き 1)

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000084-17-3	0.67	000100-93-6	-0.73	000125-73-5	-1.18
000084-19-5	0.33	000101-01-9	-0.31	000127-25-3	-0.34
000084-24-2	-0.91	000101-02-0	-1.25	000127-31-1	-0.32
000084-80-0	-0.12	000102-02-3	-0.28	000127-47-9	-0.22
000085-00-7	-0.01	000103-96-8	-0.88	000128-13-2	-0.41
000085-83-6	-0.36	000103-98-0	-0.90	000128-20-1	0.11
000085-86-9	-0.31	000104-73-4	-1.20	000128-62-1	-0.42
000085-98-3	-0.65	000104-74-5	-1.20	000128-70-1	-0.94
000086-16-8	-1.21	000113-38-2	-0.71	000128-80-3	-0.10
000087-03-6	-0.13	000113-52-0	-0.95	000128-87-0	-0.37
000088-24-4	-0.64	000115-40-2	-0.43	000129-73-7	0.01
000089-88-3	-0.38	000115-41-3	-1.12	000130-80-3	0.56
000090-18-6	0.80	000116-31-4	-0.56	000131-55-5	-1.08
000090-66-4	-0.08	000117-39-5	-1.25	000131-73-7	-1.27
000090-68-6	0.81	000117-92-0	1.41	000132-18-3	-1.07
000090-93-7	-1.27	000118-08-1	-0.01	000134-28-1	-0.93
000091-04-3	-1.12	000118-10-5	-1.34	000135-16-0	-1.01
000091-53-2	-1.35	000118-56-9	-1.13	000135-49-9	-1.30
000091-73-6	-1.13	000119-13-1	0.22	000135-61-5	-1.19
000092-05-7	-0.77	000119-15-3	-1.35	000135-91-1	-1.30
000092-06-8	-1.21	000119-90-4	-0.99	000138-52-3	-0.95
000092-21-7	-0.24	000119-93-7	-1.05	000139-07-1	-1.33
000092-29-5	-0.39	000120-11-6	-1.28	000139-60-6	-1.33
000092-31-9	0.21	000120-24-1	-1.35	000140-64-7	6.09
000092-32-0	-0.25	000121-06-2	0.01	000140-66-9	-1.03
000092-72-8	-1.32	000121-54-0	-0.12	000140-72-7	-0.70
000092-74-0	-1.22	000122-11-2	-0.33	000143-62-4	-0.20
000093-23-2	-0.51	000123-03-5	-0.70	000143-74-8	-0.56
000093-46-9	0.12	000124-94-7	-0.11	000145-13-1	0.96
000093-69-6	1.36	000125-02-0	1.45	000145-14-2	0.02
000094-62-2	-0.99	000125-28-0	-1.30	000145-15-3	-0.46
000096-66-2	-0.36	000125-31-5	0.56	000145-50-6	1.33
000096-69-5	0.15	000125-46-2	-1.00	000146-68-9	0.30
000097-56-3	-0.87	000125-71-3	-1.30	000150-86-7	-1.14