

別添2

厚生労働科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

研究課題名(課題番号)内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てたハイ・ス
ルー・プットスクリーニング法による内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究
(H14-食品・化学-007)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成16(2004)年 4月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てたハイ・スルー・プットスクリーニング法による内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究の総括、及びヒト由来培養細胞系及び表面プラズモン共鳴を用いた超高速分析法の検証に関する調査研究・*in vivo*データとの比較検討

.....1

菅野 純

II. 分担研究報告書

1. 超高速選別法の検証の評価に関する調査研究

.....134

井上 達

2. 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

.....138

小野 敦

3. 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価

.....110

板井 昭子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....143

IV. 研究成果の刊行物・別刷

.....153

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた
新しいハイ・スルー・プットスクリーニング法の開発

主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

本研究では、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」に沿って本研究に要求される順位付けにおける化学物質スクリーニングを目的として(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価、(2)培養細胞系ハイスループットスクリーニング(HTPS)による超高速分析法、及び、(3)表面プラズモン共鳴を応用した新規高速分析法の3手法を用いた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、すなわち、核内受容体-リガンド結合性、受容体と応答 DNA 配列及び共役因子の相互作用と化学物質がその相互作用に及ぼす影響等に関する基礎的研究を進め、内分泌かく乱のメカニズムやリスクアセスメントへの有効応用を目指している。本年度は、(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価ではエストロゲン受容体 β (ER β)ドッキングモデルを構築し、これまで進めてきた ER α モデル計算結果との比較より ER 分子種特異性についての *in silico* 解析を行った。HTPS系のうち、(2)培養細胞系 HTPS を利用した超高速分析系においては、新たに構築した ER β 一過性発現系により、これまで ER α 活性の認められた化合物について測定を行った。また、本年度は新たに、CHO 細胞を用いたレポーター遺伝子発現系による甲状腺ホルモン受容体(TR)、アンドロゲン受容体(AR)レポーターアッセイ系を構築し、各 50 化合物について測定を行った。一方、(3)表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)研究においては、これまで検討を進めてきた化学物質による ER α 受容体の応答配列 DNA に対する結合・解離過程への影響の計測とあわせて、共役因子結合配列 LxxLL に対する受容体結合性の計測を約 100 化合物について行い、新たに構築した ER β 受容体測定系を用いて SPR 系における化合物の ER α 、ER β 選択性について検討を行った。

A. 研究目的

ホルモン様作用を有する多くの化学物質がヒト及び野生生物の内分泌系をかく乱し、その健康に重大な影響を及ぼすことが明らかにされてきている。一方、我々の現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質の内分泌かく乱性を緊急に再評価する必要がある。これまでに、米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行うための研究を平成 10 年度に立ち上げ、エストロゲ

ン受容体反応レポーター遺伝子導入細胞を用いた HTPS 系を構築し、63 物質(350 測定)について試験を行った。その後の 3 年間の研究において、更に約 300 の化学物質に対する測定を行い、評価系の検証を進めてきた。また一方で、ホルモン受容体の作用機構に基づく新規評価系として表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)による上記ホルモン受容体と生体分子との相互作用の高速取得技術の開発を行い、無細胞系における化学物質の受容体への影響をリアルタイムで数値化(グ

ラフ化)することにより、化学物質の受容体作用をその結合と解離の状況から明らかにしてきた。これらの情報は、受容体アゴニスト効果(作動)/アンタゴニスト効果(阻害)の予測に有効であることが示された。さらに、共役因子等を系に加えることにより、詳細な機能の測定が可能であることも示された。一方内分泌かく乱化学物質の標的受容体と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解析法を確立し、これを用いた超高速スクリーニング法を開発した。これまでの研究成果は、内分泌かく乱作用の有無を確認するための優先順位付けの為の試験スキーム(内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会・中間報告追補、平成 13 年)の完成に寄与しており、内分泌かく乱化学物質問題の早期解決のためのさらなる評価系の検証とスクリーニングにあわせ、内分泌かく乱メカニズムの解明が必要とされている。

本研究班の目的は、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」に沿って本研究に要求される順位付けの為のスクリーニング、すなわち(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価、(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイスループットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析法、及び(3)表面プラズモン共鳴を応用した新規高速分析法、の 3 手法を用いた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、すなわち、受容体-リガンド結合性、受容体と応答 DNA 配列との相互作用、転写に関わる共役因子と受容体の相互作用、等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有効応用を目指すものである。

本年度は、(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価ではエストロゲン受容体 β (ER β) ドッキングモデルを構築し、これまで進めてきた ER α モデル計算結果との比較により ER 分子種特異性についての *in silico* 解析を行った。HTPS 系のうち、(2)培養細胞系 HTPS を利用した超高速分析系においては、新たに構築した ER β 一過性発現系により、これまで ER α 活性の認められた化合物について測定を行った。あわせて本年度は新たに、CHO 細胞を用いたレポーター遺伝子発現系による TR、AR

測定系を構築し、本年度は系の検証をかねて各 50 化合物について測定を行った。一方、(3)表面プラズモン共鳴高速分析研究においては、これまで検討を進めてきた化学物質による ER α 受容体の応答配列 DNA に対する結合・解離過程への影響の計測とあわせて、共役因子結合配列 LxxLL に対する受容体結合性の計測を約 100 化合物について行った。また、新たに構築した ER β 受容体測定系を用いて SPR 系における化合物の ER α 、ER β 選択性について検討を行った。

B. 研究方法及び研究結果

(1) 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)

研究目的:女性ホルモン受容体等核内受容体のリガンド結合ドメインは結晶構造解析されており、標的受容体の立体構造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の方法論を確立してきた。また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、あらかじ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応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良く探索することを目的とする。

研究方法:

1. 複合体エネルギー解析結果から ER α への結合

活性を予測する方法の確立

平成 14 年度において、文献記載の既知活性化化合物の RBA (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 (17 β エストラジオールを 100 とした場合の相対結合活性値)) の対数値と比較的相関の高い重回帰式を得た (相関係数: 0.73)。この重回帰式の傾きは 0.588、切片は 0.287 であったことから、今回直接 RBA 対数値が算出できるよう各独立変数の係数を算出し直した。本式を用いて、ER α に対する結合活性未知の化合物の RBA 推算を行った。尚、ドッキングには、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 を用いて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等を割り振った。また、ドッキングを行う低分子化合物に関しては板井らの開発した低分子化合物三次元化プログラム Key3D を用いて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。Adam & Eve を用いて 3ert.pdb から準備した蛋白構造と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を行った結果、蛋白質-低分子化合物間のぶつかりや静電的な反発のない、一定の安定条件を満たした化合物の結合コンフォメーションを得た。

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の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い、ひとつひとつの活性化化合物について複合体安定 (最適化) 構造

を得た。最後に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て、重回帰分析に使用する各独立変数の値を得た。

2. ER α のリガンド結合ドメインと ER β のリガンド結合ドメインの比較

ER α と ER β 各々のリガンド結合ドメインの構造比較を行った。最初に clustalW を用いて、双方のアミノ酸配列を配列アラインメントし、その類似度を確認した。また、結晶解析されている各々のリガンド結合ドメインをそのアルファ炭素で重ね合わせして、ドッキングスタディに特に重要なリガンド結合キャビティの形状比較・性質比較を行った。

3. ER β の結晶構造の選択及び結合活性を予測する方法の確立

これまでに報告されているすべてのアンタゴニスト結合型 ER β リガンド結合ドメインの結晶構造と文献記載の既知活性化化合物のドッキングスタディを行い、昨年度報告した ER α の重回帰式を使って RBA (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 β に対する RBA 値 (17 β エストラジオールを 100 とした場合の相対結合活性値)) の対数値と計算値 (スコア) との相関係数を比較した。検討に使用した ER β 結晶構造のうちで RBA 実験値と計算値の対数値の相関が最も良好だった結晶構造を選び、ER α と同様、直接 RBA 対数値が算出できるよう係数を算出し直し活性予測式とした。本式を用いて、ER β に対する活性未知の 100 化合物の RBA 推算を行った。尚、ER β に関しても、ER α と同様、最適化及び情報の付加を行い、自動ドッキング、リガンド-受容体複合体での構造最適化を行った後エネルギー解析を実施し計算に使用した。

研究結果:

1. 複合体エネルギー解析結果から ER α への結合活性を予測する方法の確立

昨年度得た重回帰分析で得られた重回帰式を元に、直接 RBA 対数値が見積もられるよう各独立変数の係数を算出し直した。得られた式を (1) に示した。

$$\log RBA(ER\alpha) = -1.668GBelc - 0.448GBrep - 0.229GBcnf - 0.148Desolv - 4.749 \quad (1)$$

尚、各独立変数は以下のとおりである。

- (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) 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

2. ER α のリガンド結合ドメインと ER β のリガンド結合ドメインの比較

ER β に対する予測計算の前に、ER α の場合に相関の高かった重回帰式の各独立変数が、ER β においても意味を持つことを確認するため、ER α と ER β の構造比較を行った。まず ER α と ER β のリガンド結合ドメインの構成アミノ酸配列比較を行った。ClustalW を用いて双方のアミノ酸配列をアラインメントし、その類似性を調べた。その結果、同一アミノ酸の割合は 58% であり非常にホモロジーが高かった。次にリガンド結合ドメインの中でも、ドッキングに直接関与するリガンド結合キャビティ周辺のアミノ酸残基の比較を行った。PDB に登録されているすべての ER α 及び β の結晶構造のうち、蛋白構造への結合リガンドの影響が少ない 1ere.pdb(ER α と 17 β -エストラジオールの共結晶構造)と 1qkm.pdb(ER β とゲニステインの共結晶構造)を選び、両者をアルファ炭素で重ね合わせてキャビティを構成する残基の直接比較を行った。その結果、両者のリガンド結合キャビティ周辺には、2 箇所のアミノ酸置換があり、ER α での Leu384 及び Met421 が、ER β では Met336 及び Ile373 に変化していたが、全体構造としての変化は極わずかでキャビティの形状及びキャビティの静電的・疎水的環境に大きな変化は見られなかった。このことから ER β のリガンド結合キャビティを利用したドッキングスタディによる結合活性の予測には、ER α で使用した独立変数、並びにその重み付け(係数比)をそのまま適用しても問題ないと判断した。

3. ER β の結晶構造の選択及び結合活性を予測する方法の確立

最初に、使用する結晶構造の選択を行った。ER β の結晶構造としては、現在までに 5 種類の構造が解析・報告されている。このうち、アンタゴニストが結合することによってヘリックス 12 の結合位置が大きく変化している結晶構造は 1qkn.pdb(ラロキシフェンとの共結晶構造)、1nde.pdb(トリアジン系化合物との共結晶構造)、1hj1.pdb(IC1164384 との共結晶構造)の 3 種類である。今回はできるだけ ER α と β の差異だけが結果に反映されるように、3ert と類似のアンタゴニスト結合タイプであるこれら 3 種の結晶構造を用いて検討を開始した。まずこれらの結晶構造各々に対し、文献に記載されている ER β に対する活性既知化合物の自動ドッキングを行った結果、算出されたスコア値と文献上の RBA 対数値の相関が最も高かった結晶構造は、フルアンタゴニストである IC1164384 が結合している結晶構造である 1hj1.pdb であった(相関係数:0.66)ことからこの結晶構造を今回の計算に使用することとした。得られた重回帰式から、直接 RBA 対数値を算出できるよう、ER α の場合と同様の係数調整を行い、式(2)を得た。

$$\log RBA(ER\beta) = -1.495GBelc - 0.401GBrep - 0.205GBcnf - 0.132Desolv - 4.049 \quad (2)$$

(2)-1.レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究 (主任研究者:(財)化学物質評価研究機構委託業務)

研究目的:近年、化学物質の持つ有害作用の中で動物の生殖機能に影響を与えることが懸念される毒性影響、いわゆる内分泌かく乱化学物質(EDs)問題が注目を集めている。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 EDs 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攪乱

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 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や 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。

これまでに、Firefly Luciferase 遺伝子の 5' 上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER beta を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に一過性に導入されたヒト由来の細胞 (HeLa cell) を使用し、化学物質のホルモン様活性の高速スクリーニング試験法の開発、及びその検証を目的として 100 物質の測定を実施した。

研究方法:

2.1 供試化学物質

Table1 に示した。これまでに本委託事業で実施した ER α 陽性化学物質が大半を占める。

2.2 試薬の調製

1) 化合物原液の調製

各化合物を秤量した後、10mM となるように Dimethyl sulfoxide (DMSO、ナカライテスク) を加えて溶解した。10mM に調製した化合物は DMSO にて 1/10 希釈を行い 1mM、100 μ M、10 μ M、1 μ M、100nM、10nM 及び 1nM とした。化合物は終濃度が 10 μ M、1 μ M、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM 及び 1pM となるように EMEM-10%FBS 培地に添加した。

2) 細胞

ヒト子宮頸ガン由来細胞株 HeLa (ATCC No. CCL-2.1) を ATCC より購入し使用した。

3) プラスミド

i) 女性ホルモンレセプター (ER) 発現プラスミド
当機構にてクローニングしたヒト ER β (hER β) coding cDNA 全長 (Genbank Accession No. AB006590) を哺乳動物細胞用発現ベクタ

ー pcDNA3.1 (Invitrogen) に導入し作製した hER β /pcDNA3.1 (図 1-1) を使用した。

ii) レポータープラスミド

同機構にてクローニングした Rat α_{2u} -globulin (AUG) 遺伝子のプロモーター配列の一部を pGL3 basic vector (Promega) のマルチクローニングサイトに導入し、更にアフリカツメガエル Vitellogenin 由来のエストロゲン応答配列 (ERE) の 3 回連続繰り返しからなる合成オリゴヌクレオチドをプロモーター配列の上流に組み込み作製した ERE-AUG-Luc+ (図 1-2) を使用した。

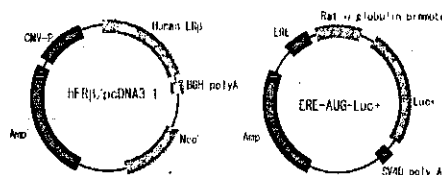


図 1-1 ERbeta 発現用ベクター

図 1-2 レポーターベクター

3) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地 (イーグル MEM ニュスイ) 4.7g、10% 炭酸水素ナトリウム (10g \rightarrow 100mL) 9mL 及び 3% L-グルタミン (3g \rightarrow 100mL) 6mL に精製水を加えて 500mL とした (EMEM 基礎培地) 後、Dextran coated charcoal (DCC) 処理した牛胎児血清 (FBS) 56mL を加え、ろ過滅菌した。

4) 細胞溶解剤

5x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR、プロメガ株式会社) 10mL に精製水を加えて 45mL とした。

5) Luciferase Assay Reagent の調製

Luciferase Assay Substrate (プロメガ株式会社) の容器に Luciferase Assay buffer 105 mL 全量を直接加えて溶解した。

2.3 ER beta agonist 検出系

2.3.1 Assay プレート上のサンプル配列

以下の plate format に従い、自動試薬分注装置 (Biomek 2000、Beckmann-Coulter 株式会社) を用いて化学物質の添加を行った。

* 被験物質及び陽性対照物質は、下図の配置例に従って Microplate の各 well に添加する。

	化合物1			化合物2			化合物3			化合物4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	100 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	10 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	100 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	10 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	NC	-	-	-	-	-	PC	-	-	-	-	-

NC: Negative control (DMSO), PC: Positive control (E2)

2.3.2 測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

↓ 細胞を測定用の 96well プレートに播種 (10⁴/50 μ L/well)

↓ 培養一晚(12 時間以上)

↓ Transfection 液調製

FuGENE 6 transfection reagent

(Roche Applied Science) 20 μ L

発現 Plasmid 2 μ g, レポーター Plasmid 8 μ g

無血清培地 580 μ L

↓ 15 分間静置

↓ total 1 mL になるよう無血清培地添加

↓ 各 well に 50 μ L ずつ添加

↓ インキュベータ内 2 時間静置

↓ 化合物の添加(終濃度 1 μ M,100nM,10nM, 1nM,100pM,10pM,1pM 及び DMSO 各 n=3 又は n=6)*

↓ CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓ 培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L \times 2 回)

↓ 細胞溶解剤の添加(15 μ L/well)

↓ 10 分間室温で静置

↓ ルミノメータによる発光測定

注入量 : 50 μ L/well

測定時間 : 注入 1 秒後~5 秒間(100 msec \times 50 interval)の積算

2.3.3 結果の解析:

被験物質及び陽性対照物質の全濃度区で得られた発光強度 (RLU) から陰性対照区の平均値で差し引いた後、陽性対照区の平均値(通常、誘導活性がプラトーに達する 1 nM E2 を使用)で除し、**相対転写活性化倍率 (Relative transcriptional activity)**を求めた。また、各濃度区で得られた発光強度 (RLU) を陰性対照区の平均値で除し、**転写活性化倍率 (Transcriptional activity, Fold induced)**を求めた後、図 2 で定義される陽性対照区の最大転写活性化倍率 (通常 1 nM E2) の 10% の値を与える濃度(PC10)及び 50% の値を与える濃度(PC50)を、2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

PC10 が算出されない化合物はエストロゲン活性陰性(-)と判定した。

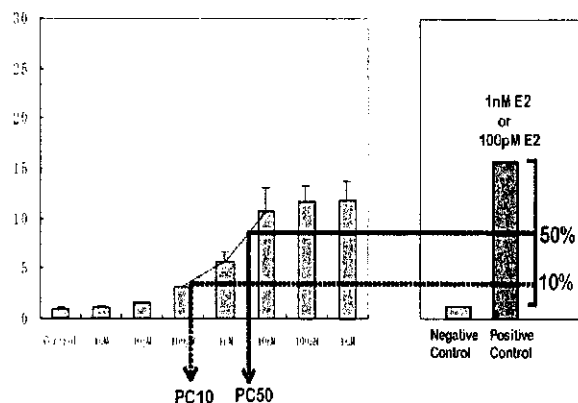


図 2 DATA 処理法模式図(PC10、50 の定義)

研究結果:

3.1 ER β agonist 検出系

結果は Table 2 に示した。

100 物質について本実験系にて ER β アゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果、以下の 43 物質について PC50 が算出され、比較的強いアゴニスト活性を有するものと推察された。

HTS No.	Chemical Name	CAS No.	PCSO(pM)
HTS00020	Estradiol, ethanyl	57-63-6	1.00E+01
HTS00140	6,4'-dihydroxyflavone	63046-09-3	1.00E+01
HTS00021	Estradiol, 17b	50-28-2	3.82E+01
HTS00029	Zearanol	26538-44-3	5.08E+01
HTS00024	4',5,7-Trihydroxyisoflavone	446-72-0	6.96E+02
HTS00141	3,6,4'-trihydroxyflavone	253195-19-6	7.08E+02
HTS00019	Estradiol, 17a	57-91-0	1.02E+03
HTS01136	3,4-Bis(4-Hydroxyphenyl)-3,4-Hexanediol	7507-01-9	2.47E+03
HTS00093	Equol	531-95-3	3.55E+03
HTS00094	Coumestrol	479-13-0	9.45E+03
HTS00460	4,4'-(HEXAFLUOROISOPROPYLIDENE)DIPHENOL	1478-61-1	1.03E+04
HTS00148	7,4'-dihydroxyflavone	2196-14-7	1.71E+04
HTS00143	5,7-dihydroxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one	-	1.78E+04
HTS00002	Testosterone, dihydro	521-18-6	2.05E+04
HTS00218	Diazepam	486-66-8	2.41E+04
HTS00181	4-Octylphenol(tert)	140-66-9	4.16E+04
HTS00093	Bisphenol B	77-40-7	6.29E+04
HTS01138	3,3'-Dimethyl-4,4'-Biphenyl	59517-19-0	6.69E+04
HTS00174	4-Dodecylphenol	104-43-8	7.98E+04
HTS00023	Bisphenol A	80-05-7	1.05E+05
HTS00142	7-hydroxy-3-phenyl-4H-chromen-4-one	-	1.14E+05
HTS01133	4,4'-Diaminooctafluorobiphenyl	1038-66-0	1.17E+05
HTS00096	Phenol, p-cumyl	599-64-4	1.25E+05
HTS01135	4-(1-Indanyl)phenol	5402-37-9	1.63E+05
HTS00084	Norethindrone	68-22-4	2.26E+05
HTS01132	p-(trans-4-Propylcyclohexyl)phenol	81936-33-6	2.38E+05
HTS00459	2-[Bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzylalcohol =Phenolphthalol	81-92-5	2.70E+05
HTS00642	3-Phenylumbelliferone	6468-96-8	2.75E+05
HTS01137	3,4-Dihydro-4-(4-Hydroxyphenyl)2,2,4-Trimethyl-2H-1-Benzopyran	472-41-3	3.76E+05
HTS00456	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	6807-17-6	3.80E+05
HTS00506	BENZYL 4-HYDROXYPHENYL KETONE	2491-32-9	4.18E+05
HTS00147	5,4'-dihydroxyflavone	6665-67-4	4.86E+05
HTS00526	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	5.06E+05
HTS00521	2,4-Dihydroxybenzophenone	131-56-6	6.24E+05
HTS00601	6-BENZOYL-2-NAPHTHOL	52222-87-4	6.60E+05
HTS01131	2,2'-Bis(Trifluoromethyl)benzidine	341-58-2	8.80E+05
HTS01130	N-Heptyl-4-Hydroxybenzoate	1085-12-7	9.35E+05
HTS00168	Bisphenol F	620-92-8	1.18E+06
HTS01129	2,4-Dihydroxyphenyl 1-Naphthyl Ketone	-	1.73E+06
HTS01243	Salicylic Acid 4-tert-Butylphenyl Ester	87-18-3	3.68E+06
HTS01154	SULFONFLUORESCHEIN	4424-03-7	7.40E+06

(2)-2.レポーター遺伝子導入培養細胞株を用いた TR, AR 作用物質超高速分析法に関する試験研究 (主任研究者:大塚製薬ライフサイエンス事業部EDC分析センター委託業務)

研究目的:近年、生体中のホルモンに類似した作用を持つ汚染物質(内分泌かく乱化学物質)に関心が高まってきている。現在比較的大量に世に回っている化合物中に、潜在的に内分泌をかく乱させる物質が存在していると考えられる。しかしながら調べられている物質はほんの一部に過ぎず、化学物質の作用メカニズムに基づいたスクリーニング法の開発が急務となっている。本研究では性ホルモン受容体の一つであるアンドロゲン受容体(AR)と甲状腺ホルモン受容体(TR)についてルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしたレポーター遺伝子アッセイ法を開発し、この実証研究の一環として、AR 及び TR に対するアゴニスト及びアンタゴニスト活性を各々 50 物質について測定した。AR レポーター遺伝子アッセイ法は、ヒト AR と蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミド、及び細胞毒性評価の指標と

なるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞“AR-EcoScreen™”を用いた。TR レポーター遺伝子アッセイ法は、ホルモンレセプターとして TR-β を RXR と共発現させ、DR-4 のレスポンスエレメントを持つレポータープラスミド及び細胞毒性の指標としてのウミシイタケルシフェラーゼを恒常発現するプラスミドを組み合わせた一過性発現系を用いた。試験の結果、本測定法は感度、精度に高い性能を保っていることがわかり、レポーターアッセイ用の細胞としては実用レベルに達し、低コストながら信頼性の高い試験法となるものと考えられる。さらには内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響を解明する研究の一助となるものと期待する。

研究方法:

1、受容体発現ベクターの構築

AR はそれぞれヒト胎盤cDNAライブラリー及びヒト前立腺cDNAライブラリーよりRT-PCR法にて増幅し、クローニングベクターにサブクローニングすることのより塩基配列を確認した後、pZeoSV2 (Invitrogen)にクローニングしてAR発現ベクター(pZeoSV2AR)とした。RXR 発現ベクターは、ヒト RXR α が組み込まれている pVgRXR (Invitrogen) から CMV プロモータ制御下の VgEcR (エクジソン受容体)部分を除去し、ヒト TR β 1 の遺伝子を組み込み、TR β と RXR の 2 種類の受容体を共発現するベクター(pRXR-TR β)を構築した(Figure2)。

2、ルシフェラーゼレポータージーン構築

ARレポータージーンは、pIND-hygro(Invitrogen) からホルモンレスポンスエレメントを切り出し、マルチクローニングサイトに蛍ルシフェラーゼ遺伝子を組みこんだ pIND MCS-LUC(1)に AR 応答エレメント C3gene: AGTACGNNNTGTTCT(1)4つを同じ向きに導入し、マルチクローニングサイトにルシフェラーゼ遺伝子を導入して pIND ARE B-10 を作製し実験に供した。TR レポータージーンに用いる甲状腺ホルモン受容体応答性エレメント(TREs)は RXR とヘテロダイマーを形成して作用すると考えられている DR-4 を用いた(Figure3)。AR レポータージーンと同様に pIND MCS-LUC に DR-4 エレメントを 4 個導入し、pIND-TRE-DR-4 を作製した。

3、細胞毒性評価用ルシフェラーゼ恒常発現ベクター

被検化学物質が及ぼす細胞毒性評価のための指標としてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター pRL-TK (Invitrogen)を用いた。

4、アンドロゲンレスポンシブルなレポーター遺伝子アッセイ機能を持つ安定細胞系の構築

6ウエルのプレートに培養した 50%コンフルエントな CHO-K1 細胞に 0.04 μ g の pZeoSV2AR、1.0mg pINDAREB-10、1.0 μ g pRL-TK (1:25:25 の比率)でトランスフェクションする。24 時間後、細胞をトリプシン処理し 10cmのシャーレに播種する。200 μ g/mL の Zeocin と Hygromycin を加えた Medium でコロニーが成長するまで培養する(約 10 日間)。その後 10^{-8} M の 5α -ジヒドロテストステロン (5α -Dehydrotestosterone; DHT)とルシフェリンを加えルシフェラーゼ陽性クローンを CCD カメラで選択する。細胞を増やした後、さらに 96 ウエルプレートに 1cell/well の割合で播種し、同様にクローニングを行う。これらの操作で選び出されたクローンの内ウミシイタケルシフェラーゼを安定に発現し、さらに蛍光ルシフェラーゼ誘導活性の高さと安定性に優れた1つのクローン (AR-EcoScreen™)を選抜し実験に供した。

5、アンドロゲン受容体アゴニスト測定の手順

AR-EcoScreen 細胞を 1×10^5 cell/mL の濃度に調製し、96 ウエルプレートに 90 μ L/well で播種する。このときの培養メEDIUMは Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL)、5%Charcoal Dextran treated FCS (Hyclone)を用いる。翌日(約 20 時間後)、 10^{-5} M から 10 倍希釈したサンプル調整液、及び標準物質をプレートフォーマット(Figure 3-a)に従って各ウエルに 10 μ L 加え CO₂ インキュベーターでさらに培養する(約 20 時間)。翌日、ルシフェリン溶液 (Steady-Glo™: Promega)を加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ誘導活性を以て発光強度として測定した。蛍光及び発光測定は ARVO.sx multilabelcounter(Wallac Berthold)を用いた。

6、アンドロゲン受容体アンタゴニスト測定の手順

アゴニスト測定と同様に AR-EcoScreen 細胞を播種する。約 20 時間後、サンプル及び標準物質をプレートフォーマット(Figure 3-b参照)にしたがって調製する。このとき、最終希釈メEDIUMに終濃度が 5×10^{-10} M となるように 5α -dihydrotestosterone (Wako) (DHT)を加えておく。 10^{-5} M から 10 倍希釈したサンプル調整液を AR-EcoScreen 細胞に 10 μ L 加え CO₂ インキュベーターでさらに培養する(約 20 時間)。蛍光ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (Dual-Glo™: Promega) をマニュアルにしたがって加えて各ステップで約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。

7、一過性発現系を用いる TR レポータージーンアッセイ

CHO-K1 細胞を 1×10^5 cell/mL の濃度に調製し、96 ウエルプレートに 84 μ L/well で播種する。このときの培養メEDIUMは Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL)、5%Charcoal Dextran treated FCS(Hyclone)を用いる。翌日、TRアゴニストアッセイにはプレート 1 枚あたり、pTR- β -RXR 3.1mg/pIND-TRE-DR4 3.1mg、pUC-18(トランスフェクション量の調整に用いるためのベクター) 6.2mg を希釈トランスフェクション試薬 (FuGene(ロッシュ))18.6mL を Medium(血清無添加) 620mL で希釈したものに加え 96 ウエルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6mL ずつ添加し、CO₂ インキュベーターで培養する。TR アンタゴニストアッセイには pTR- β -RXR 3.1mg、pIND-TRE-DR4 3.1mg、pRL-TK 6.2mg pUC-18 3.0mg のプラスミド Mix を同様に用いる。培養 3 時間後にサンプルと標準物質及び各コントロール物質をプレートフォーマット(Figure 4 a, b)に従って各ウエル 10 μ Lを加え CO₂ インキュベーターでさらに培養する(TR アンタゴニストアッセイの場合、すべてのサンプルに終濃度が 5×10^{-8} M となるように T3 を加えておく。この濃度はルシフェラーゼを最大に誘導する活性の約 70%に相当する)。蛍光ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液(アゴニストアッセイは Steady-Glo™ アンタゴニストアッセイは Dual-Glo™: Promega)をマニュアルにしたがって加え約 10 分間振とう混和して細胞

を溶解し、各ルンフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。蛍光及び発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

研究結果

1、アッセイの性能(測定感度 再現性)

AR アゴニスト及びアンタゴニストアッセイの3重測定 CV 平均 5%程度であった。

転写活性の検出閾値は結果を Table 1 に示す。この結果は各化合物の最も低いレスポンスを示す測定点と、バックグラウンドのコントロールとの有意差を t-Test を用いて検定した。バックグラウンドにおける転写活性の約 1.2 倍を超える測定値については、全て $p < 0.01$ 以下で有意差が認められた。(財)化学物質評価研究機構の武吉らの提唱する PC50 (50% of positive control) の定義に従えば、これらは約 PC2~PC3 に相当する。またバックグラウンドからの 2 から 3 標準偏差(SD)離れている測定ポイントはすべて $p < 0.01$ 以下で有意差が認められた。安全域を見越しても PC10 (10% of positive control; PC10 付近はバックグラウンドコントロールから約 10SD 離れている) が算出できるサンプルは AR アゴニストとして有意な転写活性があると結論してよいと考える。

AR アンタゴニストアッセイのアンタゴニスト活性検出については Table 2 及び Figure 1 に示した。DHT 添加コントロールの 89% 以下の転写活性以上の活性低下について、統計学的にすべて $p < 0.01$ 以下で有意差が認められた。安全域を考慮しても全く細胞毒性が見られない場合、転写活性の 20% 低下は有意に AR に対する転写活性を抑えているものと判断できる。

TR レポーターアッセイは一過性発現系であるのでシグナルは強く誘導活性も 15 倍以上になる。アンタゴニストアッセイは Table 3-a の結果より誘導活性がコントロールの 1.2 倍を超えたものは全て $p < 0.01$ でバックグラウンドと比べ有意差がとれ、これら測定の PC10 に相当する誘導活性は 2.5 から 2.6 倍であることから PC10 が算出できる誘導活性は有意な転写活性の上昇と考えて良いと結論できる。また、アンタゴニストアッセイにおける検出限界は Table 3-b より約 90% 以下の活性(10%の低下)

から、全ての測定点で $p < 0.01$ の有意差が見られた。Table 3-c より細胞毒性の指標である Renilla Luciferase の活性低下は 89% 以下から全ての測定点で $p < 0.01$ の有意差が見られた。

以上の結果より IC20 が算出できれば有意なアンタゴニスト活性が検出されたと判断できるが、細胞毒性が 15% から 20% 以上検出された場合は、その被検物質をレセプターアンタゴニストとしての判断するのは注意が必要である。

2、被検物質の解析データ

AR アゴニスト及びアンタゴニストアッセイの結果を Table 4a, 4b に示す。AR アゴニストアッセイにおいては、9 物質が PC10 を超えた。測定結果は PC50 が求められたものはなかったが、検出感度において陽性であるものはこのほかに数物質存在する。アンタゴニストアッセイでは 5×10^{-9} MDHT を加えたコントロールの 20% 阻害を示すものを IC20、以下 30% 阻害は IC30 陽性、40% 阻害; IC40、50% 阻害; IC50 で表した。IC50 が算出できたものについては IC40 以下は算出せず、以下同様に算出できたものより下位の IC は算出しなかった。IC20 以上の阻害を示したものは 18 物質、このうち IC50 を算出出来たのは 10 物質であった。

TR AR アゴニスト及びアンタゴニストアッセイの結果を Table 5a, 5b に示す。TR AR アゴニスト活性を検出できたのは 6 物質 IC50 を算出できたのは 5 物質であった。そのうち TR25 の活性は非常に強かった。TR アンタゴニスト活性が検出できたものは 1 物質であった。

(2)-3.超高速選別法(HTPS)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・安全性生物試験研究センター長)

研究目的: グローバルアセスメントの出版以降、この1年半で、人々の内分泌かく乱化学物質(EDCs)に対する理解が日本でも大きく進んだ。ことに野生生物に関しては、限定的ながら、グローバルアセスメントでもまとめているように、環境中のホルモン類似作用をもつ化学物質の曝露によって、明確な傷

害を受けている事実を確認するに至った。実験動物でも、哺乳綱動物の体内には絶えず大量の内在性ホルモンがあり、これらの動物はその体内をそうしたホルモンにさらされて生きていながら、そして本来そうした内在性ホルモンに対して生体には防御作用が備わっているが、この内在性のホルモン自身が制御からはずれて障害を引き起こすことがあることも知られるようになり(思春期早発、経口避妊薬、閉経後のホルモン補充療法など)、ヒトへの影響の蓋然性が取り上げられるに至っている。尚、ヒトでの発がん性に予防効果が期待されているいわゆる植物ホルモン(phytoestrogens)については、そうした予防効果の反面、日常用量との乖離は大きいものの、可能性の問題として機構上はエピジェネティックな発がん性を示唆する指摘がなされている。これが植物ホルモンの dual な作用機構を意味するものか、投与時期などの生体の側の要素に起因するものか、その乖離の原因は明らかでない。

本研究では、そうした事柄を念頭に置いて、解決すべき課題として残されているものは何で、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは何かについて WHO/IPCS 東京フォローアップ会議でのまとめを中心に、今後のリスクアセスメントの問題とも合わせて調査を行った。

研究方法:これまでに得られている知見から化学物質の内分泌かく乱性についてリスクアセスメントを行うに際して、今日、解決すべき課題として残されているものは何で、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは何かについては、大きくは二つあり、第1に、引き続き低用量問題を巡る高感受性問題、第2にマイクロアレイゲノム解析による今後の内分泌攪乱のメカニズムの解明を挙げることが出来る。そこで本研究ではそれらに包含される重要な問題を整理したうえで、今後の課題について考察した。

研究結果:

【高感受性期-胎生期・新生児期・思春期問題】内分泌かく乱化学物質は、グローバルアセスメントで

もまとめているように、ホメオスタシスの安定した成獣での影響は、現在の試験系では、ヒトの受精を人為的に抑制するような"高用量"の"adverse effect"でさえもならぬ検出できないので、試験法開発の問題が重点として取り上げられていることは上述の通りである。しかしそれはさておいて、成獣での長期試験で眼に見えた影響が見出されないという点で、成獣についてはさしあたり眼に見えた障害性の焦点とはならないであろう、とも考えられ、そのように結論した。これに対して、形態形成期の機能的安定性の成立する前の胎生期の影響には、無視できないものがある。また、性に関するホメオスタシスの不安定な思春期についても、特別な研究上の注目が成されるべきである。

【高感受性期と低用量問題】この胎生期・新生児期・思春期問題には、低用量問題がリンクしていることを示す数多くのデータが見出されている。すなわちそれらは、核内もしくは膜の受容体を介しての生体影響であり、コ・ファクターなどによるシグナルクロストークの修飾と、それらによる受容体機能のリグナンシーなど、相互にリンクした影響を及ぼしあっている。①閾値問題、②非線形の用量相関、あるいは、③相加反応などの問題もこれらとリンクした問題であることが明らかになってきた。厳密な意味での閾値の有無はともかくとして、無処置の成獣で検出できない用量オーダーにおける、"新しい概念の影響(毒性)"であることが認識されるに至り、そこでは、米国 FDA や、同じく米国 EPA の研究者らによって非線形反応性が確認されるとともに、英国の研究者らは低用量域に限局的ながら相加反応についても一端の実験的事象を報告している。これが胎生期形態形成期に特発的に影響する胎生期ウィンドウ現象とリンクすることは、井口らによって早くから示されているが、これについても追加報告が進んでいる。そうした中でグローバルアセスメントの記載において、研究的に訂正されなくてはならないことは、EDCs の影響が胎児・新生児期に限局的と記載されているのに対して、思春期(pubertal stage)での影響が無視できない点である。これについては、東京会議の総意として、報告書に記載されるであろう

う。

【生体影響の焦点-高次生命系】ホルモンの概念は以前より生物学的には細胞によって血中に放出されるサイトカインを含むすべての細胞機能に拡張されているが、これに伴って、EDCs が高次生命系に与える影響が焦点になってきた。なぜ高次生命系か、それに明確な解答はないが、高次系が総じて記憶の仕組みを含む近似した情報伝達システムを保持していることが窺われることは、一つの理由になるかもしれない。こうした立場から考えるとEDCsによる免疫系の影響が殆ど見られないなどとする点は奇異に映る。実際、Jeff Vos によって起草されたグローバルアセスメントにおける免疫系の記載は明らかに不十分であり、改稿される必要がある。併せて、各種受容体結合域上流のスズやヒ素などによる xenobiotic element を介した免疫系シグナルへの修飾が見出されていて、むしろその機構には新しい科学としての高い注目が集中している。高次生命系の中で、神経系については、行動 (neurobehavioral) に関する研究成果が始めている。EDCs の生体影響の最もコアにあったステロイドホルモン系についても、リガンドを結合したダイオキシン受容体の転写因子としてのエストロゲン受容体との相互作用が発見され、また、性決定遺伝子のクローニングが進み性決定のメカニズム解明が進んでいる。高次生命系への影響には、それぞれの入り口から入力された影響に、シグナル構造の類似性、シグナル相互のリンクがあることが認識されつつあり、EDCs の今後の研究のひとつの焦点となつてゆくものと考えられる。

【ゲノミクス手法による EDC 研究】マイクロアレイを用いた内分泌かく乱の研究は、飛躍的に多くの人々によって取り上げられるようになり、バイオマーカーとなる遺伝子プロファイルの抽出の試みが進んでいる。これにもとづいて、想定される内分泌かく乱で引き起こされ得る生体障害マーカーに特化したチップの構築と、表現型抜ききの専ら遺伝子発現の面からリバーシ・サイエンス手法で絞り込む方法との双方からの取り組みが試みられており、それぞれに有効性があると考えられる。それぞれでの解決す

べき課題としては、①初期変化による長期変化の予測性や、②用量相関に対する方法論、③複合効果の予測性などをはじめ、④動物種間外挿性や⑤試験管内細胞・組織と個体レベルでの遺伝子発現の相互外挿性などが取り上げられるが、それは、とりまおさず先の低用量問題であげた課題と重なり合う部分が少なくない。こうした中で他のオミクス、とりわけインフォマティクスの果たす今後の役割の重要性も指摘されている。ゲノミクス手法の導入については、WHO/IPCS がすでにベルリンにてワークショップを開催し、留意すべき諸点などをまとめており、これらを参照することも重要である。

(3) 表面プラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析 (表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening、SPR-HTPS) の開発研究

(3)-1. 表面プラズモン共鳴高速分析によるデータの高速取得技術及び HTPS に特化するための試験研究 (主任研究者: ピアコア株式会社委託業務)

研究目的: 本研究では、化学物質のホルモン作用を迅速に評価する高速一次スクリーニング法の開発研究を行っている。表面プラズモン共鳴センサーを用いて、ホルモンレセプターの作用メカニズムに焦点をあてた無細胞系のスクリーニング用アッセイ法を開発している。これまでに、表面プラズモン共鳴センサーBiacore®を用いて、エストロゲンレセプターを組み込んだ内分泌かく乱候補化学物質のアッセイ系を2種類開発した。アッセイに用いるレセプターとしてはリガンドが既知の α 型エストロゲンレセプター(ER)を用いた。国立医薬品食品衛生研究所の小野が開発した方法をもとに、表面プラズモン共鳴センサーを用いて α 型エストロゲンレセプターとエストロゲンレセプターホルモン応答 DNA 配列(ERE)との相互作用を測定する系を構築し、これをハイ・スループット・スクリーニング向けに測定条件を至適化した(EREアッセイ)。次にERの遺伝子発現調節の共役因子(コファクター)であるTIF2のER結合サイトLxxLLモチーフを用いたアッセイを構築した(TIFアッセイ)(図1)。化学物質とレセプ

ターを予めインキュベートした同一試料を用いて 2 つのアッセイを同時に実施した。89 種類の化学物質について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の高速スクリーニング法を実施し、このスクリーニング法の有用性を検証した。表面プラズモン共鳴センサーの特徴として分子間の相互作用の反応速度論的解析が可能である。この観点からスクリーニングデータを解析し、エストロゲンレセプターに対するアゴニストとアンタゴニストの判定の可能性についても検証した。

研究方法

1) 化学品の調整

- ① 化学物質を 0.1M となるように 100% DMSO に溶解する。
- ② ①のストック溶液を 10 倍ずつ 4 段階の濃度に 100% DMSO で希釈する。
- ③ 4 段階の希釈サンプルを 4mL ガラスバイアルに入れ、-30℃で保存。

2) 表面プラズモン共鳴高速分析法

使用機器: Biacore® 3000 (Biacore 社)

センサーチップ: スレプトアビジンを固定化したセンサーチップ SA (製品コード番号 BR-1000-32、Biacore 社) を使用。

ランニングバッファー: 25mM Tricine, 160mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Tween20 (pH 7.8)

再生溶液 1: 100mM NaOH, 再生溶液 2: 25mM HCl

エストロゲンレセプター (ER α): Estrogen Receptor-alpha human recombinant (P2187, PANVERA 社)

- ① 化学物質を含む DMSO 溶液 1 μ L を 500 μ L のランニングバッファーで希釈する。
- ② ER を 40nM となるようにランニングバッファーで希釈する
- ③ ①、②の溶液を 40 μ L ずつサンプルチューブに取り、37℃、5 分間加温後、4℃に冷却した Biacore 3000 のサンプルラックに乗せる。
- ④ ③のサンプルを SA センサーチップにインジェクトする。流速: 20 μ L/min. 結合 2 分間、解離 2 分間の kinject mode を使用。
- ⑤ 再生溶液 1 を 13 秒間インジェクト、次に再生溶

液 2 を 5 秒間インジェクトしてセンサーチップを再生する。

3) ERE アッセイ

センサーチップに固定化するリガンドにはビテロジェニンの ERE 配列を含む 5' 末端をビオチン化した 34 mer の合成オリゴマーを用いた。このオリゴマーをセンサーチップのフローセル 2 番に固定化しそこにアンチセンス ERE をハイブリダイズさせた。

biotin-sense ERE:

5'-biotin-tcgagcaagtcaggcagtcacagtgacctgatcaat-3'

antisense ERE:

5'-attgatcaggtcactgtgacctgactttgctcga-3'

ビオチン化 ERE を固定化するために、まずスレプトアビジン(SA)が既に固定化されているセンサーチップ SA を Biacore3000 本体にセットして、測定用緩衝液を用いてシステム全体の平衡化を行った。約 7 分の平衡化後、ベースラインの安定性を得るために実際の測定で用いる 2 種類の再生溶液である 100mM NaOH、25mM HCl をそれぞれ 30 秒間、5 回ずつ添加してベースラインが安定したことを確認した後にビオチン化 ERE の固定を行った。まず、1mg/mL のビオチン化 ERE を測定用緩衝液で 10,000 倍に希釈して、その 100 μ L を 105℃で 5 分間加熱した後、急冷し直鎖化を行った。これをサンプルラックにセットし、結合量を観察しながら、センサーチップに約 200 レゾナンスユニット(RU)固定した。その後、ビオチン化 ERE が結合していないスレプトアビジンをブロックキングするために 1 μ g/mL のビオチンを 30 秒間、2 回添加した後に再度 100mM NaOH、25mM HCl をそれぞれ 30 秒間、5 回ずつ添加して相補鎖 ERE を解離させて、センサー表面のコンディショニングを行った。アッセイの各サイクルの始めに相補鎖 DNA のアニーリング反応を行う。すなわち、1mg/mL のストック溶液を測定用緩衝液で 100 倍に希釈し、ビオチン化 ERE と同様に直鎖化処理を施した相補鎖 ERE を、ビオチン化 ERE を固定化したフローセル 2 に 2 分間添加し二本鎖 ERE を形成させる。この反応直後の結合シグナルを測定することにより二本鎖 DNA の形成量を確認する。ERE の二本鎖を形成したフローセル 2 に前項 2) に記述した手順で ER を添加し、ER の ERE への結合量を測定する。ER の結合、解離

をそれぞれ 2 分間観察した後、再生溶液 1、2 を順次添加して、相補鎖 DNA を解離させ、ビオチン化 ERE のみの状態に戻す。再生反応後のベースラインのシグナルを測定し、ER 及び相補鎖 DNA が完全に除かれているかどうか、さらにビオチン化 DNA が失われていないかどうかを確認する。

4) TIF アッセイ

ER の遺伝子発現コファクターとして機能することが知られている TIF2 の 3 つの LxxLL モチーフ (NRbox) のうち第 2 モチーフを含む合成ビオチン化ペプチド (KEKHKILHRLLD) を用いた。このペプチドをセンサーチップのフローセル 3 番に約 300RU 固定化した。ERE アッセイと TIF アッセイを同時に行えるよう、相互作用反応のすべての条件は ERE アッセイと同じ条件で設定した。

5) 化学物質の 2 アッセイ同時スクリーニング

化学物質毎に 4 段階の濃度で ERE アッセイ及び TIF アッセイを行い、ER の結合について濃度依存的活性化作用の有無を調べた。センサーチップのフローセル 1 番にはリガンド分子を何も固定化せずブランクコントロールとして用いた。2 番目のフローセルに ERE、3 番目のフローセルに TIF を固定化しあらかじめ化学物質とインキュベートした ER 溶液を各フローセルに 1→2→3 と連続的に添加し、それぞれのフローセルで相互作用を同時に測定した (図 2)。ERE アッセイについてはフローセル 2 のセンサーグラムからフローセル 1 のブランクコントロールのセンサーグラムを差し引いたセンサーグラムを用いてデータを解析した。同様に TIF アッセイについてはフローセル 3 からフローセル 1 を差し引いたセンサーグラムを用いた。

時間経過による ER の結合活性低下の影響を補正するために、化学物質毎に 1 セットのスクリーニングの最初と最後に、ER に 100nM 17β エストラジオール (E2) を加えたポジティブコントロール、DMSO (終濃度 0.1%) のみを加えたネガティブコントロールの試料を測定した。1 セットのスクリーニングは下記のような構成となる。

- サイクル 1 ポジティブコントロール
- サイクル 2 ネガティブコントロール

- サイクル 3 対象化学物質 100nM (10^{-7} M)
- サイクル 4 対象化学物質 1 μM (10^{-6} M)
- サイクル 5 対象化学物質 10 μM (10^{-5} M)
- サイクル 6 対象化学物質 100 μM (10^{-4} M)
- サイクル 7 ポジティブコントロール
- サイクル 8 ネガティブコントロール

1 回目と 2 回目のポジティブコントロール及びネガティブコントロールの結合量からサイクル毎の ER 結合活性の低下率を求め、これから各サイクルでのネガティブコントロール及びポジティブコントロールの推定結合量を算出し、この値をもとに以下の式で得られる相対活性化度 (% activation) を求め、化学物質の濃度との相関を解析した (図 3)。

$$\% \text{activation} = (\text{化学物質存在下の結合量} - \text{ネガティブコントロールの結合量}) / (\text{ポジティブコントロールの結合量} - \text{ネガティブコントロールの結合量}) \times 100$$
溶解性の低い化学物質については一桁低い濃度シリーズ (10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M) で測定を行った。

6) 競合試験

前述のスクリーニング法を改変して、化学物質と 100nM 17β エストラジオール (E2) の競合活性を測定するアッセイ系を構築した。100nM E2 存在下に 4 段階の濃度の化学物質を共存させて ERE、TIF アッセイを行い、E2 による活性化の阻害を測定した結果を、前述の解析法により、相対活性化度で示した。各化学物質のアッセイは下記のような構成となる。

- サイクル 1 100nM E2
- サイクル 2 ネガティブコントロール
- サイクル 3 100nM E2 + 対象化学物質 100nM (10^{-7} M)
- サイクル 4 100nM E2 + 対象化学物質 1 μM (10^{-6} M)
- サイクル 5 100nM E2 + 対象化学物質 10 μM (10^{-5} M)
- サイクル 6 100nM E2 + 対象化学物質 100 μM (10^{-4} M)
- サイクル 7 100nM E2 +
- サイクル 8 ネガティブコントロール

研究結果

1) 化学物質のスクリーニング

今年度国立医薬品食品衛生研究所から支給された化学物質は計 95 種類であり、そのうち ER556, ER557, ER558, ER568, ER584, ER595 の 6 種類の化学物質は 100% DMSO に全く溶解しなかったため、残る 89 種類の化学物質について ERE, TIF の両アッセイを 2 回ずつ行った。化学物質毎に化学物質の濃度と相対活性化度 (% activation) をプロットしたグラフを図 4 に、また、それぞれの値を表 1 に示す。昨年度までは相対活性化度により、化学物質を無反応性物質、低反応性物質、高反応性物質、低阻害物質、高阻害物質に大きく分類していた。今年度の測定結果については、この分類は行わず、化学物質の内分泌かく乱作用の有無の指標となりうる数値の解析を試みた。表 1 には全ての化合物で測定データが存在する 0.1、1.0、10 μ M の 3 つの濃度の相対活性化度の 2 回の測定結果を平均した値を表記した。89 種類の化学物質のうち、一番高い濃度 100 μ M (10^{-4} M) のみにおいて相対活性化度が低く出る化学物質がいくつか (ER653, ER666) 見受けられた。アッセイの際には各化学物質は DMSO 100% のストック溶液を 1000 倍希釈して用いている。アッセイ溶液中の DMSO の終濃度は 0.1% となり、この条件では溶解性の低い化学物質は 100 μ M の濃度では析出してしまい、アッセイ溶液中の化学物質濃度は所定の濃度より低くなってしまうことが原因と考えられる。

これとは異なり化学物質の濃度依存的に相対活性化度が下がっている物質がある。89 種類の化学物質のうち、ER654, ER655, ER660, ER679 の 4 種類はこのタイプであり、アンタゴニストと推察される。

2) カイネティクス解析

平成 14 年度に測定した 90 種類の化学物質のうち活性化を示した 15 種類の化学物質について ERE アッセイのカイネティクス試験を行った。ERE のセンサーチップへの固定化量を 20RU と最小限に抑えた条件下で ERE アッセイを行い、ER のインジェクト終了直後に測定した ER の結合量 (結合性) と、解離反応 90 秒後に測定した結合量 (結合安定性) とを求め、2 次元のグラフにプロットした (図 5)。

コントロールには 100nM E2 を用いた。ほとんどの化学物質は図 5 において赤の点線上に集まっており E2 と同じ結合・解離比を示したが ICI182.780, ER26(tamoxifen), EA118, EA205, EA308 はこの線の左側に点があり、E2 に比べて相対的に解離が遅いことが示された。

3) 競合試験

平成 14 年度の 90 種類の化学物質のうちアンタゴニストの可能性の高い EA 番号のついた 35 種類の化学物質について、E2 との競合試験を ERE, TIF の 2 種類のアッセイについて行った。100nM E2 存在下で化学物質の各濃度における ERE, TIF アッセイの相対活性化度を図 6 に示す。E2 による活性化を阻害する物質のうち、ERE, TIF いずれの活性も阻害する物質、ERE のみの物質があり、各々化学物質の作用メカニズムの違いが示唆された。

4) 構造活性相関

平成 14 年度に測定した 90 種類の化学物質のうち、ER607, ER608, ER609, ER610 は benzophenone 誘導体であるが、それぞれの化学物質の ERE, TIF の活性を比較すると、図 7 に示すように側鎖の官能基のわずかな違いが活性に大きな影響をもたらしていることが示された。化学物質の構造と ER の活性との相関を示すデータである。このアッセイは化学物質の構造のわずかな違いが ER に引き起こす反応を検出できることが示された。

(3)-2. 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、例えば内因性ホルモンの合成、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攪乱される可能性があるが、特に 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、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 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 及びコファクターの 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 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。

本年度は昨年度に最適化したエストロゲン受容体 β (ER β) 測定系を用いて、種々の化学物質が ER α 、ER β それぞれに及ぼす変化の測定を行い、化合物ごとの ER 分子種選択性の検討を行った。また、ER による遺伝子制御メカニズムの詳細を明らかにする目的のため、リガンド結合 ER への DNA の結合及びコファクターの結合による双方の相互作用へ及ぼすアロステリック効果について解析を進めた。

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。すなわちストレプトアビジンをあらかじめコーティングしたセンサーチップを用い、ビ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の検討については、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 ER α 及び 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 及び 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の解析に際して、化合物を 10⁻⁵~10⁻⁸M の濃度範囲で 10nM ER と混合し、ER の ERE 及び LxxLL ペプチドに対する結合解離過程を測定した。

4、解析

各化合物の存在下及び非存在における 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(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)及び JMP ver.3(SAS institute))を用いた。

研究結果:

1、ER α 、ER β -SPR 測定系の検証;

まず始めに前年度に最適化した ER α 、ER β 各測定系の検証のため、E2 濃度依存性について検討を行った結果、ER α 、ER β 共にほぼ同程度の EC₅₀ 値で濃度依存的に ER-ERE、ER-LxxLL 相互作用を増加させた。すでにそのエストロゲン様作用が知られている代表的な化合物について、同様に測定を行った結果、ゲニスタインでは、これまでの報告では受容体結合試験における ER β 特異性が約 10 倍程度高いことが知られているが、SPR 測定系においては、若干、ER β 特異性が高いもののそれほどの差は示されなかった。一方、ビスフェノールAでは、ER-ERE 反応における濃度依存性は ER α 、ER β ともに同程度であったが ER-LxxLL 相互作用においては ER α より ER β で強い結合活性が示された。

2、エストロゲン様作用物質の ER α 、ER β 反応性の比較

これまで本研究班における SPR-HTPS 系及び細胞系スクリーニングにより ER α 活性が認められている化合物(約 100 化合物)を対象として化合物濃度 10 μ M における ER α 、ER β 比活性値を上記と同様に測定を行い ER-ERE、ER-LxxLL 反応における ER α 、ER β 特異性について検討した結果、多くの化合物では、ER α 、ER β でほど同程度の反応性を示したが、一部の化合物では ER α もしくは ER β への特異性が明らかであった。いくつかの化合物では ER-ERE 反応性を強く示していても ER-LxxLL 反応をほとんど示さなかった。これまで我々が報告してきた結果との比較から、これらの化合物はアンタゴニストとして機能する可能性が示唆された。

3、DNA 及び共役因子結合による ER 構造へのアロステリック効果の検討

リガンド結合により活性化された受容体分子は DNA もしくは共役因子との結合により、さらにその構造が変化し、その相互作用においてアロステリックな変化をすることがこれまでにいくつかの報告から示唆されている。それらの変化はリガンド依存性核内受容体ファミリーによる遺伝子制御ステップメカニズムにおいて重要と考えられている。SPR 測定系は、リアルタイムな相互作用変化の解析が可能であることから、そのアロステリックな変化について検討を行った。すなわち、通常の測定条件で ER α を E2 とあらかじめインキュベートした後、ERE を含むオリゴヌクレオチドもしくは、LxxLL モチーフを含むペプチドを混合したサンプルをバイオセンサーにインジェクトして ERE、LxxLL センサーとの相互作用を測定した結果より、あらかじめ ERE と混合することにより、ER-ERE レスポンスは競合されて濃度依存的に低下するが、この時、ER-LxxLL レスポンスも同時に低下することが示された。一方、LxxLL ペプチドとの結合は、ER-ERE レスポンスに影響を与えなかったことから、活性化 ER は DNA と強く結合することでさらに構造が変化して TIF2 とのアフィニティーはむしろ弱まることを示唆された。

C. 結論

(1) 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価

今年度は、昨年報告した ER α の活性に関する重回帰式を元に、結合活性予測式を定義した。さらに ER β についても同様の理論を適応し、ER β に対する結合活性予測式を定義した。しかしながら ER α の場合に比べ、ER β の場合には、活性既知化合物での予測値と文献値の相関係数は低下した (ER α : 0.73, ER β : 0.66)。リガンド結合キャビティの性質や形状は ER α と ER β ではほとんど変化しておらず、結合の強弱を決定する要因が、リガンド結合キャビティとリガンド間の相互作用安定性以外にも存在することが示唆された。

(2) レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究

Firefly Luciferase 遺伝子上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER beta を常時発現するための Plasmid が同時に一過性に導入された細胞を使用し、100 種類の化学物質についてその ER beta アゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、PC10 値が 57 物質に算出され、PC50 値は 43 物質において算出された。本法により選出された物質の *in vivo* 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要はあるが、本法の簡便さ、短期間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点などから、有用な内分泌かく乱化学物質試験法の候補になるものと思われる。

今回新たに開発した AR に対するアンタゴニスト活性測定法は、細胞毒性によるルシフェラーゼ活性の低下を十分に捕らえることのできるように測定系を構築したものである。この指標を用いれば細胞毒性によるルシフェラーゼ活性の低下が簡単に判別できる。今回の報告では多くの化合物に AR アンタゴニスト活性が検出できた。AR に作用を及ぼす化合物については、アゴニスト活性は医薬品等のステロイドホルモン剤などにしか認められないのに対して、アンタゴニストは一般の化合物を含め比較的多く見られる。実際に内分泌かく乱化学物質のプレスクリーニングをする場合、アンドロゲン受容体

に作用する物質のスクリーニングにおいては、アンタゴニスト活性の検出は特に重要であると考えられる。一般にアンタゴニスト活性は受容体バインディングアッセイの結果と転写活性の結果のギャップから予想し得るものであるが、本測定法を用いれば受容体バインディングアッセイを行わなくともレポーター遺伝子アッセイの結果から、直接アンタゴニスト活性を検出することができる。また、本測定法は 96 ウエルプレートを用い、毒性の評価専用の細胞を開発し細胞毒性のコントロールを設けて細胞毒性の判定を厳密化した。また、細胞を播いてから 24 時間以内に結果を知ることができ、メディアウムの交換及びプレート洗浄等の操作が全くなく、サンプルを加え培養後ルシフェラーゼの基質を加え測定するという極めてシンプルな測定系で HTPS 化が容易である。さらに継代培養を続けても (40 継代、約 4 ヶ月間) 細胞の活性低下が見られず、再現性においても DHT を測定した同時再現性は CV 値で 5~6 % 程度である。バイオアッセイとしては卓越したものであると考える。これらより、AR の反応性レポーター遺伝子アッセイ用の細胞としては実用レベルに達していると結論するものである。一方、TR のアッセイは一過性発現系ではあるが、十分なシグナル強度 (Positive Control 等においては 100 万 count/sec 以上)、約 15 倍程度のルシフェラーゼ誘導倍率があり、検出能力及び再現性に優れ、今回の試験結果を遂行する十分な能力を有していると考えられる。

(3) 表面プラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析

内分泌かく乱化学物質の作用メカニズムに焦点を当てたスクリーニング法として構築したホルモンレセプターを用いた SPR アッセイ系を用いて 89 種類の化学物質のスクリーニングを行った。本研究では化学物質のホルモン作用を評価する一次スクリーニング法の開発のために、エストロゲンレセプターの作用メカニズムに焦点を当てた無細胞系のスクリーニング用アッセイを構築した。ER をあらかじめ様々な化学物質とインキュベートして測定を行うことにより ER と ERE の結合反応に変化を引き起こすことが示され、ER の結合量の変化を観察することにより化学物質のエストロゲン様作用の有無を判定可能

であることが示された。さらに ER の共役因子である TIF2 の ER 結合サイト LxxLL モチーフと ER との結合を測定する新たなアッセイ系により、ER 上の異なる二つの作用点に対する化学物質の影響を同時に観察可能である。スクリーニング結果の解析から、化学物質により、ER と ERE あるいは ER と TIF への相互作用への影響の違いが見られた。一般に細胞を用いた試験系では、対象物質のレセプター以外への作用を考慮する必要があるが、本アッセイ系は *in vitro* の再構成系であり、純粋なレセプター-シグナル伝達系への作用のみを検討することができる。ホルモンレセプターの作用メカニズムをもとにした本スクリーニング法により、多数の化学物質についてそのホルモン様作用を迅速にスクリーニングすることが可能である。本研究で開発した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の高速スクリーニング法は、従来の試験法と比較しても迅速かつ高精度に判定が可能で、しかもより多くの情報をもたらす手法であることが確かめられた。今後、数万種類にも及ぶ化学物質のホルモン作用をスクリーニングするための、HTPS 系の確立に向け、さらなるデータの蓄積を行う予定である。

D. 考察及び今後の展望

内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価では ER α と ER β のリガンド結合キャビティは非常に似通っており、各々のリガンド結合キャビティとリガンドとの相互作用の様式と強さには大きな差はないと推測された。にもかかわらず文献上の活性値が ER α と ER β で 10 倍以上異なる化合物が存在することは非常に興味深い。これまで報告してきたように、リガンド結合部位での直接の相互作用を解析することは、該化合物がキャビティにフィットするかどうかを直接見積もることができるため、受容体に結合するか否かを判断する重要な指標となることは明らかである。しかしながら同時に、結合予測にはそれだけでは十分ではないことを示唆している。リガンド結合キャビティを利用したドッキングスタディを行う上で従来から議論されてきた問題も残っており、また蛋白及びリガンド各々が、複合体構造を形成することで単独の場合より増加する分子内エネ

ルギーの効果や、より基本的な低分子化合物の原子電荷決定法の問題も完全に解決されておらず、今後さらに検討と改良が必要である。

レポーター遺伝子導入細胞による高速分析法では 100 物質について本実験系にて ER β アゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果、43 物質について PC50 が算出され、比較的強いアゴニスト活性を有するものと推察された。また、AR アゴニストアッセイにおいては、9 物質が PC10 を超えた。測定結果は PC50 が求められたものはなかったが、検出感度において陽性であるものはこのほかに数物質存在する。アンタゴニストアッセイでは 5x10⁻⁹MDHT を加えたコントロールの 20% 阻害を示すものを IC20、以下 30% 阻害は IC30 陽性、40% 阻害; IC40、50% 阻害; IC50 で表した。IC20 以上の阻害を示したものは 18 物質、このうち IC50 を算出出来たのは 10 物質であった。TR-RXR アゴニスト活性を検出できたのは 6 物質 IC50 を算出できたのは 5 物質であった。そのうち TR25 の活性は非常に強かった。TR アンタゴニスト活性が検出できたものは 1 物質であった。これらの物質については *in vivo* 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要があるが、本法の簡便さ、短期間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点などから内分泌かく乱化学物質試験法として、特に高次試験実施における優先順位設定のためのプレ・スクリーニング法として有用であると考察された。ホルモンレセプターを用いた SPR-HTPS 系において ER-ERE アッセイについては測定条件の改良を行うことにより、ハイスループットスクリーニング法として信頼性と再現性の向上を得た。また、新規に開発した ER β 系を用いて、エストロゲン受容体作用が知られている化合物もしくは、これまでの研究により受容体作用が示された化合物について測定を行い ER 分子選択性について解析を行った結果、本系により ER 分子種特異性が検討可能であること、また化合物の受容体への結合活性のみではなく、それぞれの分子構造に与える影響の差がその選択性に寄与しており、本系での解析によりそうした化合物特異性について簡便に情報を得られることが明らかとなった。一方、ER の DNA への結合が TIF2 由来の LxxLL モチーフと相互作用においてアロステリック