

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 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, Biacore AB) 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 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。

C. 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 (図 1)。リガンドとして E2 を用いた場合、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。次に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 ER α 、ER β それぞれについて化合物濃度を変えて ER-ERE 及び ER-LxxLL 相互作用における SPR 解析を行った (図 2)。解析には、それぞれの化合物とインキュベートした ER との相互作用を結合・

解離各2分間の測定を行い、結合2分後における SPR レスポンスを同時に測定したポジティブコントロール (ER-E2 複合体) とネガティブコントロール (ER のみ) の値からの増加を 100 とした時の比率を比活性値として用いた。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、それほど差は示されなかった。一方、ビスフェノール A では、ER-E2 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うことにより、ER-E2、ER-LxxLL 反応における ER α 、ER β 特異性について検討した。得られた結果を図 3 に示した。多くの化合物では、ER α 、ER β でほぼ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。さらに、いくつかの化合物では ER-E2 反応性を強く示していても ER-LxxLL 反応性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る。現在、これらの化合物については濃度依存性を含む詳細な解析を行うと共に、E2 との競合について解析を進めている。さらにこれらの化合物については、他の測定系におけるデータとの比較を含め、生体作用との観点から今後の詳細な解析が必要と考えられた。

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することによりその互い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 (図 4, 5)。結果より、あらかじめ ERE と混合することにより、ER-E2 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-E2 レスポンスに影響を与えなかった。このことから活性化 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が示唆された。

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てエストロゲン受容体と ERE もしくは共役因子相互作用変化を指標とするエストロゲン受容体作用物質スクリーニング系を ER α 、ER β それぞれについて構築した。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。本年度は、ER α 、ER β 測定系それぞれの系における特異性の検証のため、これまでに ER α 系で作用が認められた化合物について測定を行い特異性について検討した。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。

エストロゲンそのものもしくは ER 作用が知られている化合物を用いて作用-濃度依存性の検討を行った結果、E2 では ER α 、ER β でほぼ同程度の作用と濃度依存性が示された。一方、今回の結果からビスフェノール A では ER-ERE 反応における濃度依存性に大きな違い認められないものの、同じ濃度での ER-LxxLL 反応は、むしろ ER β で大きいことが示された。このことは、化合物の受容体選択性には受容体とのアフィニティーのみではなく化合物との結合が ER α 、ER β それぞれの分子構造に与える影響の化合物ごとの違いにも起因しており単純な結合試験のみから判断できないことを示している。さらに、それぞれの化合物の生体における組織特異的な作用の差と関連すると考えられる。我々の系で用いている LxxLL モチーフは、生体に広く発現分布する TIF2 由来のものであるが、特定臓器・組織に発現する共役因子との相互作用においては、さらに異なる相互作用特異性を示す可能性もあり、スクリーニングレベルでエストロゲン様作用が認められる多くの化合物について、その生体レベルでの作用は、より複雑に発現するものと考えられる。実際の生体への作用は、今後、網羅的な遺伝子発現解析などにより検討されるべき課題であるが、それに先立ってより高速に多岐に亘る情報を得ることができ本系のスクリーニング系としての有用性は大きいと結論された。引き続き、これまでに ER α 系で活性が認められている化合物について行った測定結果からは、本系により化合物の ER 分子特異性が簡易に検討可能であると考察された。

今回得られた結果から ER の DNA もしくは共役因子との結合により、もう一方の相互作用へのアロステリックな変化が引き起こされることが明らかとなった。近年の研究から、核内受容体による遺伝子発現過程は数種類の共役因子複合体がプロモーター上で交換されること

で、数段のステップから構成されることが示されており、今回の結果は DNA 結合によるアロステリックな構造変化がその制御に関与していることを示すものと考察された。これまでの検討より、内分泌かく乱作用が想定される化学物質ではその ER 構造に及ぼす影響は E2 とは異なることが明らかであり、これらの受容体構造の制御においても、そうした化合物特異的な作用について検討が必要と考察され、本 SPR 測定系は、それらの検討においても有用であると結論付けられた。

E. 結論

新規ホルモン受容体作用内分泌かく乱化学物質 HTPS 系として、これまでに開発を進めてきた ER α 、ER β と ERE もしくは共役因子との相互作用を指標とする SPR-HTPS 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、本系により化合物の ER 分子種特異性について十分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な効果を示すことが明らかとなり、そうした受容体構造制御が引き続く遺伝子発現制御に関連するものであると考察された。本系により得られる個々の化合物についての情報は多岐に渡り、これらは引き続き詳細試験や遺伝子発現解析に先立って非常に有用に機能するものであり、化合物の内分泌かく乱作用スクリーニング系として有効であると結論付けられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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る内分泌攪乱化学物質スクリーニング法

小野 敦、浅野 和信、橋本 せつ子
実験医学 別冊(クローズアップ実験法 総集編) pp199-204 (2001) 表面プラズモン共鳴センサーを用いる内分泌攪乱化学物質スクリーニング法

学会発表

A. Ono, and J. Kanno, :
The analysis of dynamics of ER at ligand dependent gene transcription using bio-sensor.
Nuclear Receptors: Steroid Sisters (J8), 2004.2. Colorado, USA

浅野 和信、立木 里奈、小野 敦、橋本 せつ子、井上 達、菅野 純 第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会 2003.7 相模大野

橋本 せつ子、浅野 和信、立木 里奈、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迅速内分泌かく乱物質スクリーニング法 環境ホルモン学会 第 6 回研究発表会 2003.12 仙台

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 2002.6 名古屋

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(化学物質リスク研究事業)
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

平成 14 年度まで種々の化学物質についてエストロゲン受容体 α (ER α) との結合様式や結合の強さを推定することで ER α に対する結合活性の有無を予測し報告してきた。今年度は、これまでに ER α に結合する可能性があるとして予測された化合物群の中から任意に選び出された 100 化合物について、ER α に対する結合活性値を予測し直すとともに、ER α での検討から得られた知見を利用して新たにエストロゲン受容体 β (ER β) に対する結合活性値予測を行った。

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受容体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と推定されており、同定・検出のための試験方法についての研究と、個々の既知内分泌かく乱化学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研究が数多くなされている。

一方、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よく探索することを目的とする。

B. 研究方法

今年度は、昨年度まで検討を重ねてきた ER α に対する結合活性予測の結果、ER α に結合する可能性があるとして予測された化合物の中から任意に選び出した 100 化合物を対象に研究を行なった。結合能を見積もる受容体としてこれまで ER α のみを対象にしていたが、今回はこれまでの研究で確立されてきた理論と計算をもとに ER β に対する予測も行った。

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、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。なお、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我々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。自動ドッキングプログラム 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が行われた結果、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、双方のアミノ酸配列を clustalW を用いて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・性質比較を行なった。

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。なお、ER β についても、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。

C. 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。

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

なお、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

重回帰分析に使用した活性既知化合物リストとその活性文献値を表1. に示した。

式(1)を用いて、結合活性未知の 100 化合物についてその ER α に対する結合活性値予測を行なった。結果を表2. に示した。

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 β に対する予測計算をする前に、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なった。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なった。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 および 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。

ER α と ER β のリガンド結合ドメインを構成するアミノ酸の clustalW によるアラインメント結果を図1. に示した。

また、1ere.pdb と 1qkm.pdb のキャビティ形状を示した図を図2. 及び図3. に、双方を重ね合わせた図を図4. に示した。

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(ICI164384 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なった。その結果、算出されたスコア値と文献上の RBA 対数値の相関がも

つとも高かった結晶構造は、フルアンタゴニストであるICI164384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。

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

式(2)を用いて、結合活性未知の100化合物についてそのER β に対する結合活性の推算を行なった。結果を表3.に示した。

D. 考察

既に述べたとおり、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る。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。エストロゲンレセプターのリガンド結合キャビティが閉鎖的であることも考えあわせると、リガンドがキャビティに到達する以前のリガンドとリガンド結合ドメイン表面との相互作用や、リガンド結合ドメイン内のヘリックス間の相互作用、また補因子とリガンドおよび補因子とリガンド結合ドメインの相互作用等が結果的に結合活性に重要な影響を及ぼすと推測される。

もちろん、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なう上で従来から議論されてきた問題も残っている。例えば、対象蛋白構造が剛体であることである。これはドッキングの際の微視的な構造変化に対応できないだけでなく、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」となるはずのヘリックス12が常に開いた構造のままになっている。その結果、より多様な構造の低分子化合物が結合できる反面、アゴニストタイプの化合物についてはヘリックス12と化合物間の相互作用エネルギーへの安定化寄与がなくなりエネルギー値(特にGBrep)が過小評価されてしまうことになる。さらに微視的な構造変化に対応するために取り入れている複合体での構造最適化においても問題は生じている。つまり構造最適化により本来は蛋白とのぶつかりがあつて安定に結合できないはずの化合物でさえも過剰に安定化してしまう可能性が生じてくる。このほかにも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、もっと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。

E. 結論

今年度は、昨年度報告した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。

F. 健康危機情報

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 name | RBA | | compound name | RBA | |
|------------------------------------------|-------------|------------|--------------------|-------------|------------|
| | ER α | ER β | | ER α | ER β |
| Estradiol | 100 | 100 | OH-PCB-L | 3.4 | 7.2 |
| diethylstilbestrol | 236 | 221 | OH-PCB4 | 0.01 | < 0.01 |
| Progesterone | < 0.01 | < 0.01 | OH-PCB-K | 2.4 | 4.7 |
| 17 α -estradiol | 7 | 2 | OH-PCB1 | 0.03 | 0.02 |
| Testosterone | < 0.01 | < 0.01 | OH-PCB2 | 0.03 | 0.04 |
| bisphenolA | 0.01 | 0.01 | 4-tert-octylphenol | 0.01 | 0.03 |
| coumestrol | 20 | 140 | 4-octylphenol | 0.02 | 0.07 |
| tamoxifen | 4 | 3 | nonylphenol | 0.05 | 0.09 |
| 4-OH-tamoxifen | 257 | 232 | chlordecone | 0.06 | 0.1 |
| 5-androstenediol | 1 | 7 | daidzein | 0.1 | 0.5 |
| genistein | 4 | 87 | apigenin | 0.3 | 6 |
| 2-OH-estrone | 2 | 0.2 | kaempferol | 0.1 | 3 |
| 17-epiestriol | 29 | 80 | quercetin | 0.01 | 0.04 |
| 16-keto-17beta-estradiol | 1.3 | 0.9 | phloretin | 0.2 | 0.7 |
| 16 α -bromo-17 β -estradiol | 76 | 10 | formononetin | < 0.01 | < 0.01 |
| raloxifene | 69 | 16 | biochaninA | < 0.01 | < 0.01 |
| o,p'-DDT | 0.01 | 0.02 | ipriflavone | < 0.01 | < 0.01 |
| OH-PCB-A | 0.1 | 0.13 | chrysin | < 0.01 | < 0.01 |
| OH-PCB-B | 0.3 | 0.2 | flavone | < 0.01 | < 0.01 |
| OH-PCB-G | 0.06 | 0.04 | | | |

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

表2. ER α に対する結合活性値(エストラジオールに対する相対活性値の対数)の予測

| CAS 番号等 | 推算 logRBA | CAS 番号等 | 推算 logRBA | CAS 番号等 | 推算 logRBA |
|----------|-----------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 50-23-7 | 0.540 | 843-55-0 | 0.200 | 81936-33-6 | -0.077 |
| 50-28-2 | 0.928 | 927-67-3 | -2.624 | 108238-41-1 | -0.047 |
| 53-16-7 | 0.534 | 1038-66-0 | -1.317 | 114369-43-6 | -1.124 |
| 56-49-5 | -0.031 | 1085-12-7 | -0.954 | EA120 | -0.708 |
| 56-53-1 | 0.719 | 1139-46-4 | 0.251 | EA160 | 0.848 |
| 57-63-6 | 0.995 | 1478-61-1 | -0.785 | EA151 | -0.869 |
| 57-91-0 | 1.183 | 1847-63-8 | 1.568 | EA133 | -0.739 |
| 64-86-8 | 0.565 | 1943-97-1 | 1.141 | EA207 | 0.819 |
| 68-22-4 | -0.449 | 2440-22-4 | -1.571 | EA209 | 0.019 |
| 77-40-7 | -0.122 | 2467-02-9 | -1.662 | EA214 | 1.651 |
| 80-05-7 | -0.361 | 2491-32-9 | -0.683 | EA228 | 0.502 |
| 81-92-5 | -0.067 | 2589-73-3 | -0.704 | EA240 | 1.083 |
| 87-18-3 | -1.549 | 3228-03-3 | -1.870 | EA263 | -0.128 |
| 94-09-7 | -1.553 | 4424-03-7 | -0.032 | EA318 | 0.434 |
| 96-76-4 | -1.199 | 5153-25-3 | -0.602 | EA326 | -0.542 |
| 104-43-8 | -0.947 | 5232-99-5 | -0.180 | ED25 | -0.133 |
| 123-07-9 | -1.869 | 5402-37-9 | -0.357 | ED26 | -0.384 |
| 131-54-4 | -0.917 | 6197-30-4 | -0.416 | ED37 | -0.055 |
| 131-55-5 | -0.303 | 6468-96-8 | -0.711 | ED39 | -0.152 |
| 131-56-6 | -0.456 | 6665-83-4 | 0.168 | ED40 | 1.038 |
| 131-57-7 | -0.846 | 6948-88-5 | 0.531 | ED50 | -0.675 |
| 140-66-9 | -0.330 | 7297-86-1 | -0.399 | ED51 | -0.284 |
| 145-50-6 | 1.249 | 7507-01-9 | -0.158 | ED55 | 1.306 |
| 341-58-2 | -0.910 | 10540-29-1 | 0.995 | ER257 | -0.191 |
| 446-72-0 | -0.315 | 14392-69-9 | -0.709 | ER263 | -0.301 |
| 472-41-3 | 0.059 | 25973-55-1 | -1.469 | ER272 | -0.105 |
| 479-13-0 | 0.227 | 26538-44-3 | -0.071 | | |
| 486-66-8 | -0.209 | 27955-94-8 | -0.987 | | |
| 510-13-4 | 0.225 | 36861-47-9 | -0.323 | | |
| 521-18-6 | 0.490 | 41796-12-7 | -1.218 | | |
| 531-95-3 | -0.057 | 52222-87-4 | -0.134 | | |
| 596-01-0 | 0.129 | 59517-19-0 | -0.425 | | |
| 599-64-4 | -0.366 | 68047-06-3 | 1.506 | | |
| 797-63-7 | -0.001 | 71077-33-3 | -0.195 | | |

```

ERa_HUMAN  SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTTRPFSEASMGLLTNLADRELVHMINWAKRV
ERb_HUMAN  ---DALSPQLVLTLLLEAEPHVLISR-PSAPFTEASMMMSLTKLADKELVHMISWAKKI
           :*.:*:* :*:**** : . * :*:***** **:***:*****.***:;

ERa_HUMAN  PGFVDLTLHDQVHLLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRNQKCVEGMVEI
ERb_HUMAN  PGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKCVEGILEI
           ****.*:*.**:***.**.**:**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ERa_HUMAN  FDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITD
ERb_HUMAN  FDMLLATTSRFRRELKLQHKYLCVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKLALH-LINAVTD
           *****:***** :*** :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ERa_HUMAN  TLIHLMKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPLYDLLLEML
ERb_HUMAN  ALVWVIKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKCKNVVPLYDLLLEML
           :* :*:***:*:* :*** ***:**:*:*:*:* ** * :***** :*****:*****

ERa_HUMAN  DAH---
ERb_HUMAN  NAHVLR
           :**

```

```

identical      142  58.4%
similar tight  203  83.5%
similar loose  216  88.9%

```

図1. ER α とER β のリガンド結合ドメインのアミノ酸配列アラインメント

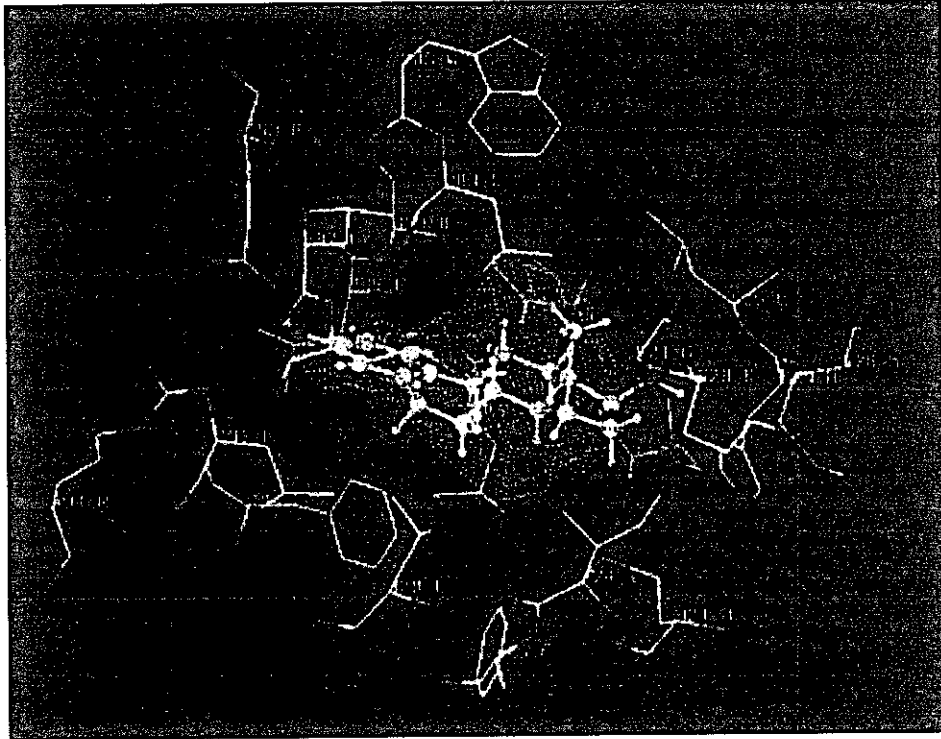


図2. 1ere.pdb (ER α) のリガンド結合キャビティ周辺の様子

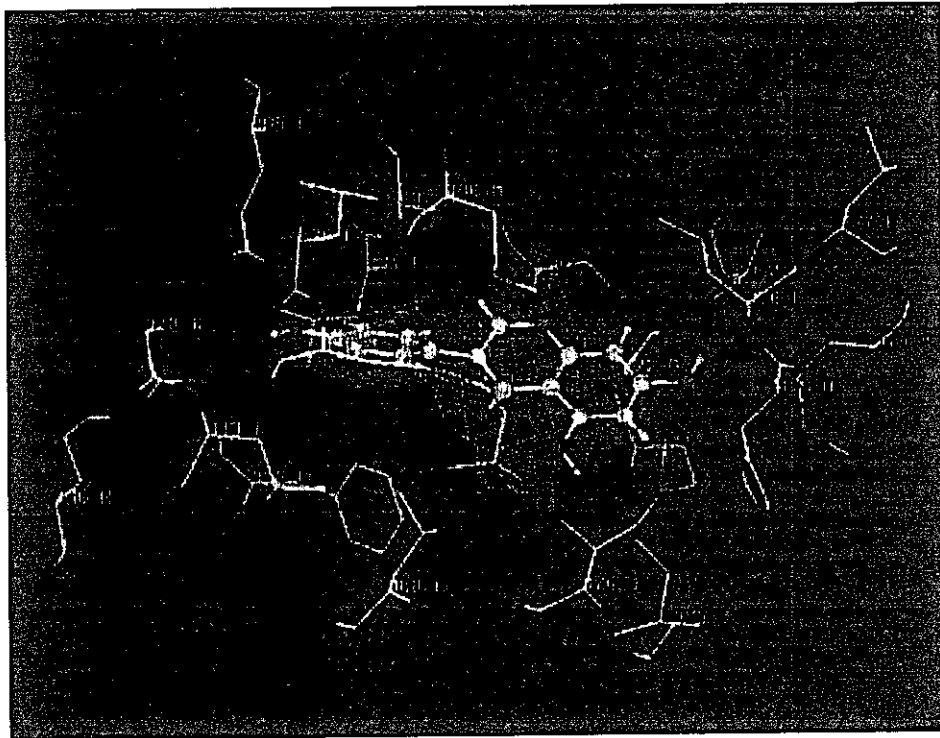
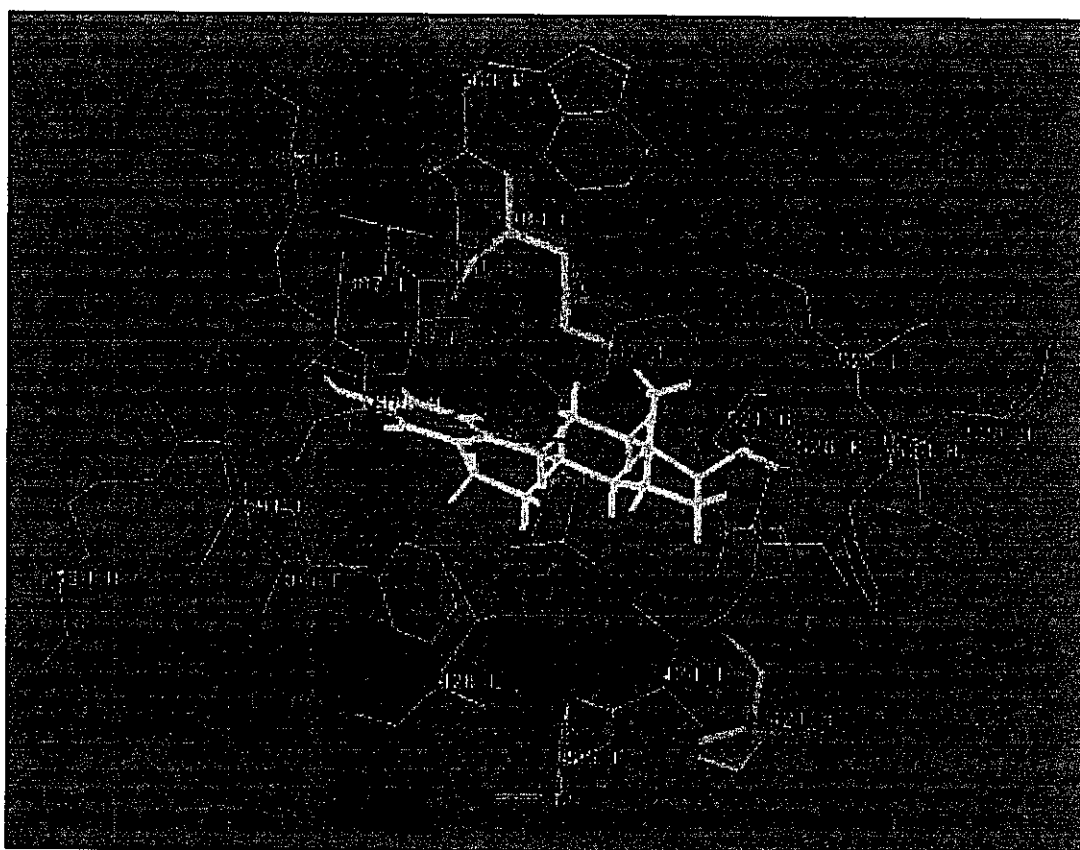


図3. 1qkm.pdb (ER β) のリガンド結合キャビティ周辺の様子



magenta : ERalpha green : ERbeta

図4. 1ere.pdb(ER α)と1qkm.pdb(ER β)の重ね合わせ

表3. ER β に対する結合活性値(エストラジオールに対する相対活性値の対数)の予測

| CAS 番号等 | 推算 logRBA | CAS 番号等 | 推算 logRBA | CAS 番号等 | 推算 logRBA |
|----------|-----------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 50-23-7 | 0.253 | 843-55-0 | 0.389 | 81936-33-6 | 0.126 |
| 50-28-2 | 1.225 | 927-67-3 | -2.136 | 108238-41-1 | 0.160 |
| 53-16-7 | 0.542 | 1038-66-0 | -1.064 | 114369-43-6 | -0.827 |
| 56-49-5 | 0.506 | 1085-12-7 | -0.624 | EA120 | -0.071 |
| 56-53-1 | 0.759 | 1139-46-4 | 0.010 | EA160 | 1.668 |
| 57-63-6 | 0.854 | 1478-61-1 | -0.560 | EA151 | -0.624 |
| 57-91-0 | 0.805 | 1847-63-8 | 0.472 | EA133 | -0.278 |
| 64-86-8 | 0.431 | 1943-97-1 | 1.388 | EA207 | 1.098 |
| 68-22-4 | 0.268 | 2440-22-4 | -0.895 | EA209 | 0.686 |
| 77-40-7 | -0.117 | 2467-02-9 | -1.184 | EA214 | 1.505 |
| 80-05-7 | -0.251 | 2491-32-9 | -0.351 | EA228 | 0.214 |
| 81-92-5 | 0.018 | 2589-73-3 | -0.377 | EA240 | 1.158 |
| 87-18-3 | -0.705 | 3228-03-3 | -0.900 | EA263 | 0.640 |
| 94-09-7 | -1.218 | 4424-03-7 | 0.559 | EA318 | 0.845 |
| 96-76-4 | -0.869 | 5153-25-3 | -0.615 | EA326 | -0.726 |
| 104-43-8 | -0.348 | 5232-99-5 | -0.239 | ED25 | 0.270 |
| 123-07-9 | -1.467 | 5402-37-9 | -0.067 | ED26 | 0.216 |
| 131-54-4 | -0.519 | 6197-30-4 | 0.095 | ED37 | 0.357 |
| 131-55-5 | -0.220 | 6468-96-8 | 0.022 | ED39 | 0.226 |
| 131-56-6 | -0.254 | 6665-83-4 | 0.338 | ED40 | 1.089 |
| 131-57-7 | -0.815 | 6948-88-5 | 1.181 | ED50 | -0.138 |
| 140-66-9 | -0.069 | 7297-86-1 | 0.614 | ED51 | -0.095 |
| 145-50-6 | 1.119 | 7507-01-9 | 0.348 | ED55 | 1.200 |
| 341-58-2 | -0.441 | 10540-29-1 | 0.702 | ER257 | 0.307 |
| 446-72-0 | 0.291 | 14392-69-9 | -0.557 | ER263 | 0.193 |
| 472-41-3 | 0.300 | 25973-55-1 | -0.061 | ER272 | 0.158 |
| 479-13-0 | 0.457 | 26538-44-3 | -0.098 | | |
| 486-66-8 | -0.135 | 27955-94-8 | -0.104 | | |
| 510-13-4 | 0.768 | 36861-47-9 | 0.057 | | |
| 521-18-6 | 0.601 | 41796-12-7 | -1.008 | | |
| 531-95-3 | -0.010 | 52222-87-4 | 0.006 | | |
| 596-01-0 | 1.148 | 59517-19-0 | -0.244 | | |
| 599-64-4 | -0.309 | 68047-06-3 | 1.313 | | |
| 797-63-7 | 0.112 | 71077-33-3 | 0.279 | | |

20031277

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-----------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------|-----------------------|-------|------|---------|
| Kanno J, | Reverse toxicology as a future predictive toxicology, | T. Inoue and W. D.Pennie (eds.), | Toxicogenomics | Springer-Verlag Tokyo | Tokyo | 2003 | 213-218 |
| Inoue, T. | Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology | T. Inoue and W. D.Pennie (eds.), | Toxicogenomics | Springer-Verlag Tokyo | Tokyo | 2003 | 3-11 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------|---------|-------------|
| Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willileeche K, Inoue T. | Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. | Toxicology. | 195 (1) | 19-29 | 2004 Jan 15 |
| Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y | Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. | Environ Health Perspect | 111 (11) | 1411-20 | 2003 Aug |
| Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Jun Kanno | Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. | Reproductive Toxicology | 18 | 109-120 | 2004 |
| Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. | The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies | Environ Health Perspect. | 111 (12) | 1550-8 | 2003 Sep |
| Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. | The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies 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. | Environ Health Perspect | 111 (12) | 1530-49 | 2003 Sep |
| Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I | A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment- Synergism in endocrine disruptor studies | Environmetrics | 14 (2) | 213-222 | 2003 |
| Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima | Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis | Blood | 102 | 3154-62 | 2003 |
| Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga | Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites | Development | 130 | 4259-68 | 2003 |