

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、内分泌かく乱問題の解決に向けた、EU ならびに OECD を中心とした国際会議におけるガイドライン化を目指した検討の中で本邦および本研究班における取り組みの紹介とともに、厚生労働科学における内分泌かく乱研究の進行状況を紹介し、また、今後のリスクアセスメントを進めるにあたりスクリーニング系に求められる諸問題について合わせて調査を行った。

## B. 研究方法

世界保健機構化学物質安全計画 (WHO/IPCS)、経済協力開発機構 (OECD)、欧州連合内分泌かく乱化学物質委員会 (EU-EDC)、国際代替法研究センター (ECCVAM) などの国際組織や、米国トキシコロジー学会、韓国トキシコロジー学会、さらに国際トキシコロジー学会連盟などにおけるこの課題での研究の進展状況を国際会議への出席、関連研究機関への訪問などにより、関連情報の収集にあたる。

## C. 研究結果

欧州連合 (EU) 欧州委員会 (EC) 主催による内分泌かく乱に関する国際会議に参加し、本邦における取り組みの紹介とともに、厚生労働科学における内分泌かく乱研究の進行状況を紹介した。欧州連合は、内分泌かく乱化学物質問題が欧州連合科学技術委員会の取り上げる

べき重要な研究課題であるものとして、2000 年に欧州圏内外の研究者を招聘して、研究の方策についての検討を、スウェーデンのアーンスブルグにて開催した。今回の国際会議は、いわばその進行状況を EU として公式に発表し、また、各招待者はそれぞれの立場における研究の進行状況を紹介し、相互のこの問題への理解を深めることを目的として開催された。また、OECD 開催の Toxicogenomics に関する Workshop や内分泌かく乱試験及びアセスメントタスクフォース実務者会議などにおいても内分泌かく乱化学物質試験法の検討とその後の各国の情報交流により我国における内分泌かく乱化学物質研究の状況情報収集を行った。

その結果として内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験法開発について本研究班では階層構造的に (1) *in silico* の negative/positive selection を意図したデータベーススクリーニング、(2) 試験管内のハイスループットスクリーニングによる受容体原性 negative selection、(3) 受容体原性の positive selection としての生体内スクリーニング試験、及び (4) 内分泌かく乱性の判定を意図する positive selection としての決定試験法、などを総合的に進めることとして来たが、今後、適切な方法を構築して、スクリーニングスキーム確立に向けて OECD をはじめ各国の協力によるバリデーションを得て、試験法としての確立してゆく必要がある。

## D. 考察

内分泌かく乱化学物質については、方法的に異なったメカニズムに基づく対象を一括してスクリーニングすることの困難が明らかになっているだけに、可能な限りのバッテリー構成が必要となることがすでに明らかになっており、絶

えず新しいメカニズムに対応した試験法の開発が求められている点が、網羅性を要求されるこの課題にとって今後の解決すべき問題点となっている。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及びその生体作用についての知見が蓄積し、個々の化合物の生体作用についてこれまでより多方面からの検討と知識の蓄積が可能となることが期待される。また、胎児・新生児における臨界点ウインドウと用量問題や高次生命系と核内受容体に関連した内分泌かく乱表現型を検出するハイスループット化、内分泌かく乱化学物質と関連すると考えられる遺伝子の発現プロファイリングなどが今後、取り組むべき課題と考えられる。

#### E. 結論

現在、世界保健機構や欧州連合などの諸活動の国際的状況に鑑み、ハイスループット化における諸問題は、多国間での共同研究に求められている重要な課題となっており、今後とも国際会議や国際学会を通じて、そうした視点から積極的な情報発信と情報収集を続けていく必要性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 原著

Inoue T. Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health. *Pure Appl. Chem.*, 75: 2555-2561, 2003.

Inoue T, Igarashi K, Sekizawa J. *Health*

hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoint of their mechanism of action. *Japan Med Assoc J.*, 46: 97-102, 2003.

###### 2) 書籍

Hirabayashi Y, Inoue T: Chapter 24. *Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology*. In *Handbook of Toxicogenomics*. (Borlak J, ed), Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, 2005, pp. 583-608

Inoue T. Potential applications of toxicogenomics in risk assessment. In: *Evolving Genetics and Its Global Impact*. (The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress), Amarin Printing and Publishing Public Company Limited, Bangkok, Thailand, 2004, pp.255-257.

Inoue T. Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In *Toxicogenomics* (T. Inoue and W.D. Pennie, eds.), Springer-Verlag Tokyo, Tokyo, Japan, 2003, pp. 3-11.

井上 達. 化学物質と健康-低用量問題. 『環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発』井口泰泉監修. 株式会社シーエムシー出版. pp. 3-10, 2003.

###### 3) 雑文

井上 達. 巻頭言「WHO/IPCS のグローバルアセスメントの出版を終えて」 *Endocrine Disruptor News Letter*, 5: 1, 2002.

## 2. 学会発表

Inoue T: Views of the state-of-art in inter-ministries and international collaboration of Japanese endocrine disrupter research. Workshop Organized by the European Commission's Research Directorate-General (2005.1.26, Brussels, Belgium)

Inoue T, Matsushita T, Igarashi K, Kanno J, Hirabayashi Y: Toxicogenomics: A new paradigm in prediction and interpretation of global gene-expression, not to use gene-expression intensity but to focus on gene combination repertoire. 第27回日本分子生物学会年会 (2004.12.9, 神戸)

井上 達:「トキシコロジーの国際潮流"Animal Welfare Issue"」動物実験と科学 —討論の序にかえて—. 第27回日本学術会議 トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム (2004.11.25, 東京)

Inoue T, Matsushita T, Igarashi K, Kanno J, Hirabayashi Y: Toxicogenomics: A new risk assessment paradigm in prediction and interpretation of global gene-expression. Toxicogenomics International Forum 2004 (2004.11.12, Kyoto)

Inoue T: The Use of Toxicogenomics data in risk assessment- Potential applications of Toxicogenomics in risk assessment-. The 5th Princess Chulabhorn International Science Congress (2004.8.22, Bangkok, Thailand)

Inoue T: Toxicogenomics as a tool of predictive toxicology. 10th International Congress of Toxicology. (2004.7.13, Tampere, Finland)

Inoue T: Symposium 5. Pharmaco- & Toxicogenomics Symposium: S5-3. Strategy of predictive Toxicogenomics a reverse toxicogenomics. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology The 61st Annual Meeting 2004 (2004.5.27, Seoul, Korea)

Inoue T: Strategy of TOXICIGENOMICS - with respect to toxicologic endpoints, pathodiagnosics and risk assessment -2004 Spring Symposium and Slide Conference on Korean Society of Toxicologic (2004.5.14, Daegu, Korea)

## 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(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

本研究では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及び受容体と転写関連因子相互作用に与える影響の解析を行った。本年度は、新たに甲状腺受容体(TR)測定系について検討を行うとともに、エストロゲン受容体測定系については、新たにアポ型受容体の特異的に認識するペプチドを用いた受容体作用検出系を構築して代表的リガンドについて測定を行い、ハイスループットアッセイ系への適用について検討を行った。

#### 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は、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攪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り、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、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攪乱される可能性があるが、特にエストロゲン受容体(ER)を始めとする核内受容体を介した生体作用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、より詳細な検討が求められる。

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」受容体と結合することでその作用を発現する。核内受容体は、リガンドとの結合により立体構造が変化して、制御下にある遺伝子のプロモーター領域に存在する受容体レスポンスエレメントにコファクターをリクルートしてその転写を制御し、引き続く生体反応を惹起する。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受容体を介した生体作用における受容体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、化学物質の受容体への結合が、レスポンスエレメントやコファクターとの相互作用に及ぼす影響から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、エストロゲン受容体についてセンサープローブとしてエストロゲン受容体レスポンスエレメント(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、新たに甲状腺受容体(TR)についてこれまで構築したER $\alpha$ 、 $\beta$ 測定系と同様にレスポンスエレメント及び共役因子とのリガンド結合による相互作用変化について解析を行いスクリーニング系への応用について検討を行うとともに、ER系についてはアポ型ERを特異的に認識するペプチドをプローブとすることで、化合物の受容体作用についてこれまでと異なる観点から評価する測定系を構築しハイスループットアッセイとしての有用性について検討した。

## 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. ペプチド固定化センサーチップの作成

N末端をビオチン化したペプチドを合成し、測定用バッファーに希釈してストレプトアビジンセンサーチップにインジェクトして固定化して測定に用いた。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(LxxLLモチーフ)をコードするオリゴペプチドを合成して用いた。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。また、アポ型受容体を認識するペプチドとしては、文献情報をもとに合成した数種のシーケンスについて検討し、最適な結合の得られたapo1ペプチドを測定に用いた。

### 3. 相互作用の測定

ERは、リコンビナントHuman ER $\alpha$ 及び $\beta$ を使用した。ERを測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Tween 20%、BSA 5  $\mu$ 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を解析するにあたっては、化合物を  $10^{-5} \sim 10^{-8} \text{M}$  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. TR-DR4 及び TR-LxxLL 相互作用のリガンド結合による変化の検討

これまでに構築した ER $\alpha$ 、ER $\beta$  系と同様に TR について、その代表的なレスポンスエレメントである DR4 及び共役因子の受容体結合モチーフとして TIF2 の第2LxxLL モチーフをプローブとしてセンサーチップに固定化し、TR のリガンドである T3、T4 存在下、非存在下における相互作用について測定を行い、リガンド結合による相互作用変化について検討を行った。これまでの ER についての検討から、核内受容体及びその相互作用は測定条件により影響を受けることが示されていることから、まず始めに測定条件の検討を行い相互作用の検討を行える条件の最適化を行った。最適化した条件下で、それぞれのプローブとの相互作用について検討した結果、TR-DR4 相互作用

についてはリガンドの有無による変化は検出されなかった。一方、LxxLL 相互作用については、ER と同様、リガンド非存在下では反応は認められず、リガンドの存在により反応が認められた。

#### 2. RXR 共存による、TR 相互作用への影響についての検討

TR は、生体内では主には RXR とヘテロダイマーを形成して機能することが報告されていることから、RXR 共存による、TR-DR4、TR-LxxLL 相互作用への影響について検討を行った。DR4 との相互作用は、RXR 共存下において TR 単独もしくは RXR 単独に比べ大きく増加したが TR リガンドもしくは、RXR リガンドの共存による相互作用変化は認められなかった。一方、LxxLL 相互作用について、TR、RXR 共存下では、リガンド非存在下では反応は認められず、TR リガンドもしくは RXR リガンドのいずれかの存在により同程度の反応が認められた。また、TR、RXR 共存下における反応はいずれも、TR 単独における反応に比べ強く認められた。

#### 3. アポ型受容体相互作用ペプチドの受容体作用検出系への適用に関する検討

代表的なコリプレッサーである SMRT、NcoR の核内受容体相互作用モチーフ (CoRNR ボックス) を含むペプチド及び文献で報告されているアポ型受容体結合ペプチド数種について検討した結果、コリプレッサーより選択したペプチドには、活性型・非活性型 ER のいずれも反応を示さなかった。一方、検討したペプチドのうち apo1 は、非活性型 ER のみに反応を示し、

機知のリガンド存在下では反応を示さなかった。いくつかの化合物について濃度依存性を検討した結果、アゴニスト・アンタゴニストいずれにおいても化合物濃度依存的に反応は低下した。ER $\beta$ では ER $\alpha$ に比べ反応そのものは弱いと同様に濃度依存的な反応の低下が認められた。

#### D. 考察

これまでに我々は、ホルモン受容体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 $\alpha$ 、ER $\beta$  各々について構築した。SPR 法は、再現性が高く、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。

本研究においては、これまでに ER $\alpha$ 、ER $\beta$  それぞれについて ER 反応エレメント DNA 配列及び共役因子結合サイトをプローブとした相互作用測定系の最適化を行い、数十種類の化合物について測定を行った結果より ER 作用及びその ER 分子種選択性を高速かつ簡易に検討可能であることを示してきた。

本年度は、新たに甲状腺受容体(TR)についてこれまで構築した ER $\alpha$ 、 $\beta$  測定系と同様にレスポンスエレメント及び共役因子とのリガンド結合による相互作用変化について解析を行いスクリーニング系への応用について検討を行うとともに、ER 系についてはアポ型 ER を特異的に認識するペプチドをプローブとすることで、化合物の受容体作用についてこれまでと

異なる観点から評価する測定系を構築しハイスループットアッセイとしての有用性について検討を行った。

TR の反応エレメントについては、これまで数種が報告されているが、その代表的シーケンスである DR4 を用いて検討を行った結果、TR は単独で DR4 結合性を有し、リガンド存在下でもその反応過程に変化は認められなかった (Fig.2)。また、TR は生体内では主に RXR とヘテロダイマーを形成して作用することが報告されていることから、RXR 共存下での測定を行った結果、相互作用は増加するものの、ER と異なり、リガンド依存的な変化は認められなかった。ER は核内受容体クラス1に TR は核内受容体クラス2に分類される (Fig.1)。クラス2受容体については、これまでにリガンド結合による DNA とのアフィニティーは変化しないことが報告されており、今回の結果は、妥当であると考察された。結果より、TR を始めとしたクラス2受容体については、反応エレメントとの相互作用変化を指標にした作用物質検出系の構築は出来ないと考察された。一方、共役因子の結合部位である TIF2 の LxxLL モチーフへの相互作用は、ER 同様にリガンド特異的に認められた (Fig.3)。また、RXR の存在によりその強度が大きく増加した (Fig.4) ことから、TR $\cdot$ RXR ヘテロダイマーの形成が示唆されるとともに本測定系の TR 作用物質スクリーニング系としての有用性が示唆された。

ER 測定系については、これまでに構築した系 (ER-ERE、ER-LxxLL) はいずれも活性型 ER を検出するプローブを用いたものである。一部の核内受容体はそのアポ型構造においてコリプレッサーと呼ばれる因子と結合すると報告さ

れている。そこで、本年度はアポ型受容体と結合する因子との相互作用変化を指標とした ER 活性化測定系の構築を試みた。我々の検討でコリプレッサーの受容体結合配列は反応を示さなかった(Fig.5)。そこでさらにファージディスプレイ法により報告されているペプチド配列をもとに設計したペプチド数種について検討を行ったところ、ap01 は生体内で機能する因子由来ではないものの、アポ型 ER $\alpha$  を特異的に結合することが示された(Fig.6)。一方、ER $\beta$  についても ap01 との相互作用を検討したところ、結合そのものは弱いものの、ER $\alpha$  同様アポ型 ER 濃度依存的に結合が認められた(Fig.7)。これまでに構築した LxxLL ペプチドとともに用いて、本研究班においてスクリーニングを実施している化合物を用いて測定を行ったところ(Fig.8)、ER のリガンド占有率、受容体活性化率を同時に定量化できることが示され、ハイスループットアッセイへの有用性が示された。

#### E. 結論

核内受容体と DNA もしくは受容体と共役因子相互作用変化を指標とする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 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  測定系を構築し、その有用性を示してきた。本年度は、さらに TR について同様の測定を行い、ER と同様に共役因子相互作用のスクリーニング系への応用が可能であることが示された。一方、ER についてはファージディスプレイ法により報告されているペプチド配列をもとにした ap01 ペプチドは生体内で機能する因子由来ではないものの、アポ型 ER を特異的に結合することが

示された。これまでに構築した ERE 及び LxxLL ペプチドとともに用いることで、ER のリガンド占有率、受容体活性化率を同時に直接知ることが可能となり、ハイスループットアッセイに有用であることが示された。上記のごとく、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. 研究発表

##### 1. 誌上発表

Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S, Inoue, T, and Kanno, J(2004) Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor. Anal Sci. 2004 20, 611-616

##### 2. 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

#### 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



- Class I
  - cytoplasmic or nuclear
  - associated with HSPs when not bound to ligand
  - only bound to DNA when liganded
  - bind as homodimers to inverted repeat (palindromic) HREs
- Class II
  - nuclear
  - not associated with HSPs at any time
  - bound to DNA in both the unliganded and liganded state
  - bind as a heterodimer with RXR to direct repeat (DR or tandem) HREs

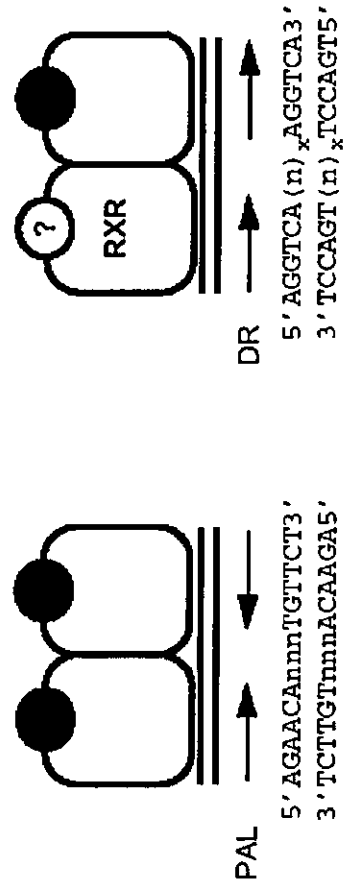


Fig.1 Sub-class of NRs

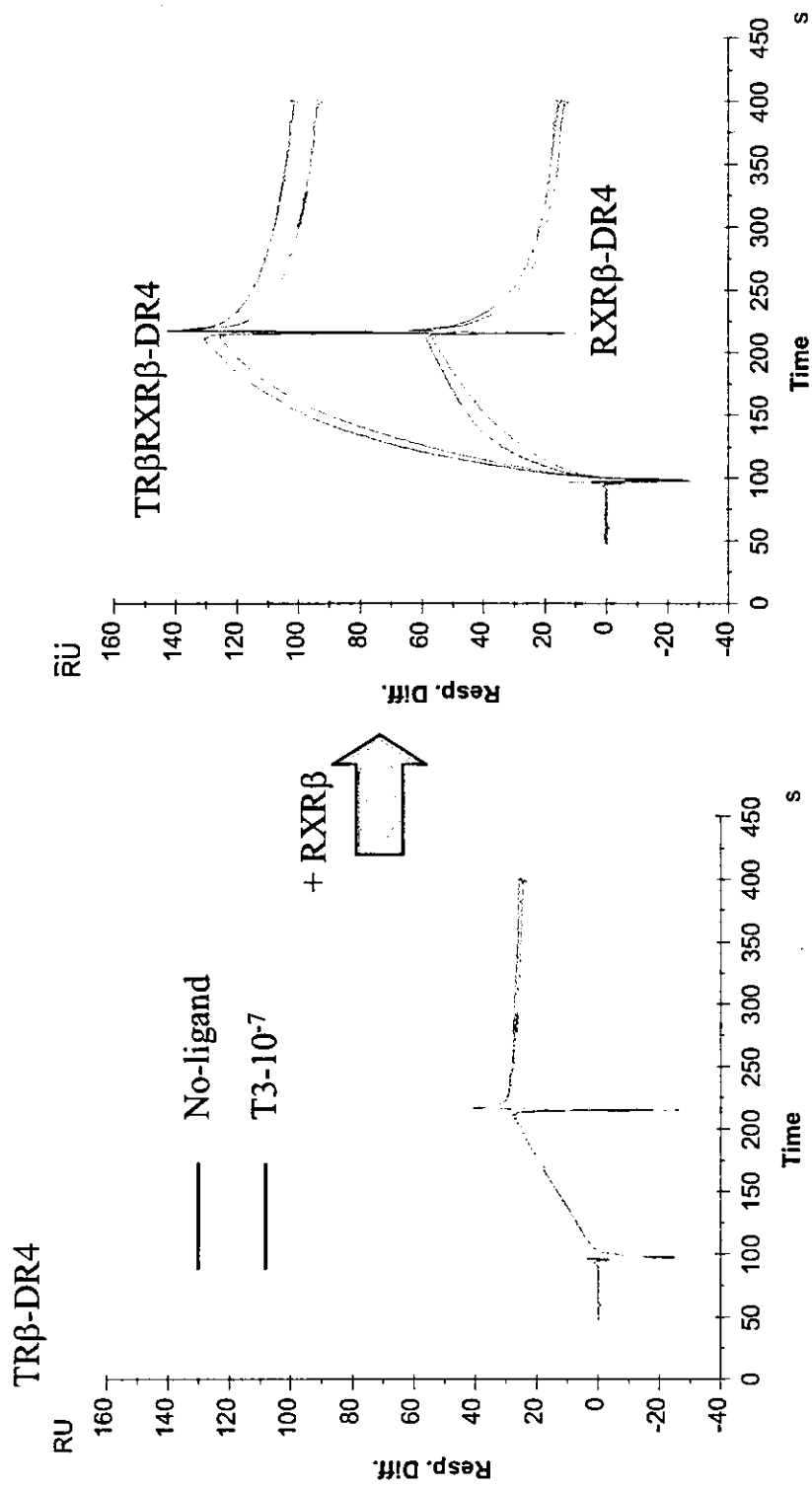


Fig.2 SPR analysis of Thyroid hormone receptor between DR4

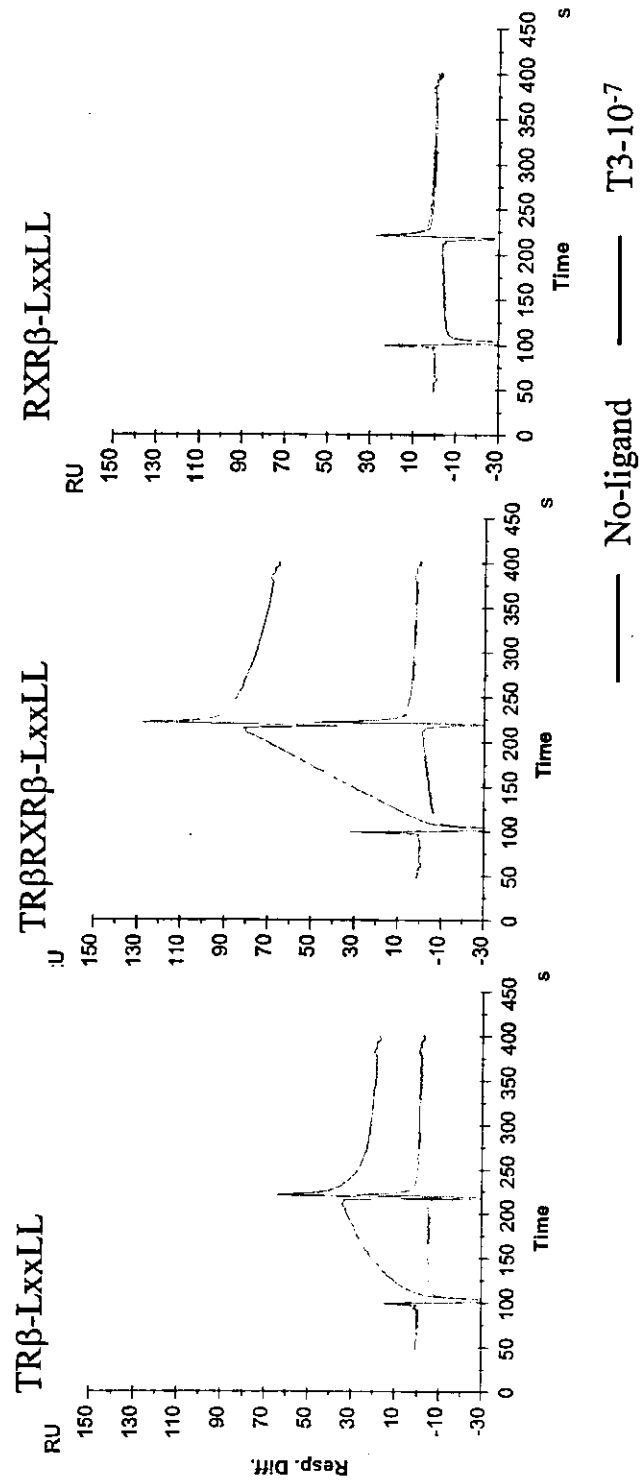


Fig.3 SPR analysis of Thyroid hormone receptor between LxxLL

SPR ER assay

		Ligand:		
		non	E2	OHT
NCOR ID-N	RTHRLITLADHICQIITQDFARN	x	x	x
SMRT ID-N	GHQRVVTLADHICQIITQDFARN	x	x	x
NCOR ID-C	DPASNLGLEDIIRKALMGSFDDK	x	x	x
SMRT ID-C	HASTNMGLEAIIRKALMGKYDQW	x	x	x
apo1	SGSGEYHEKRWLEGHIIHHRIKSLL	O	x	x

Fig.5 Amino acid sequence of CoRNR box and Apo1 peptide

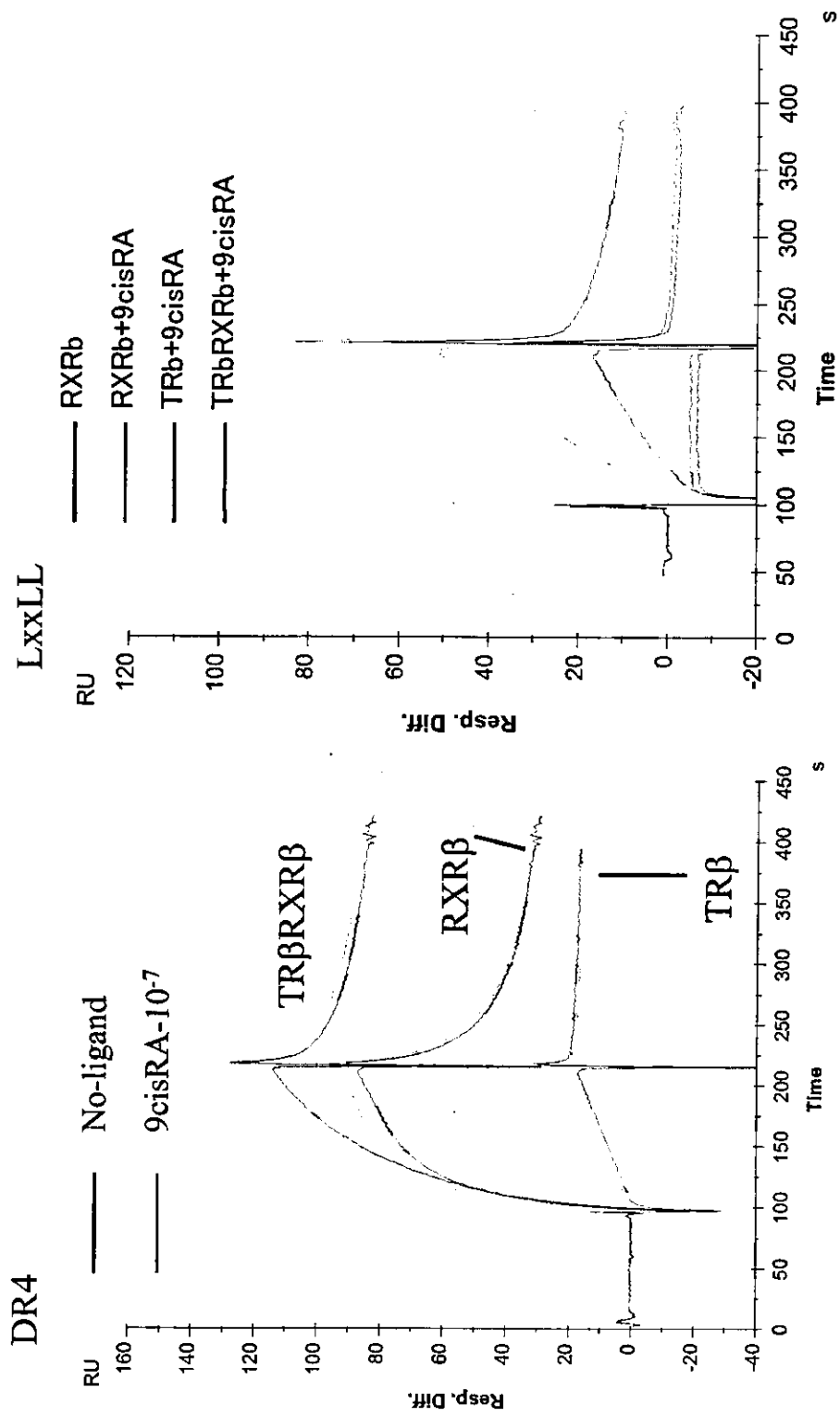


Fig.4 The impact of RXR ligand on the interaction

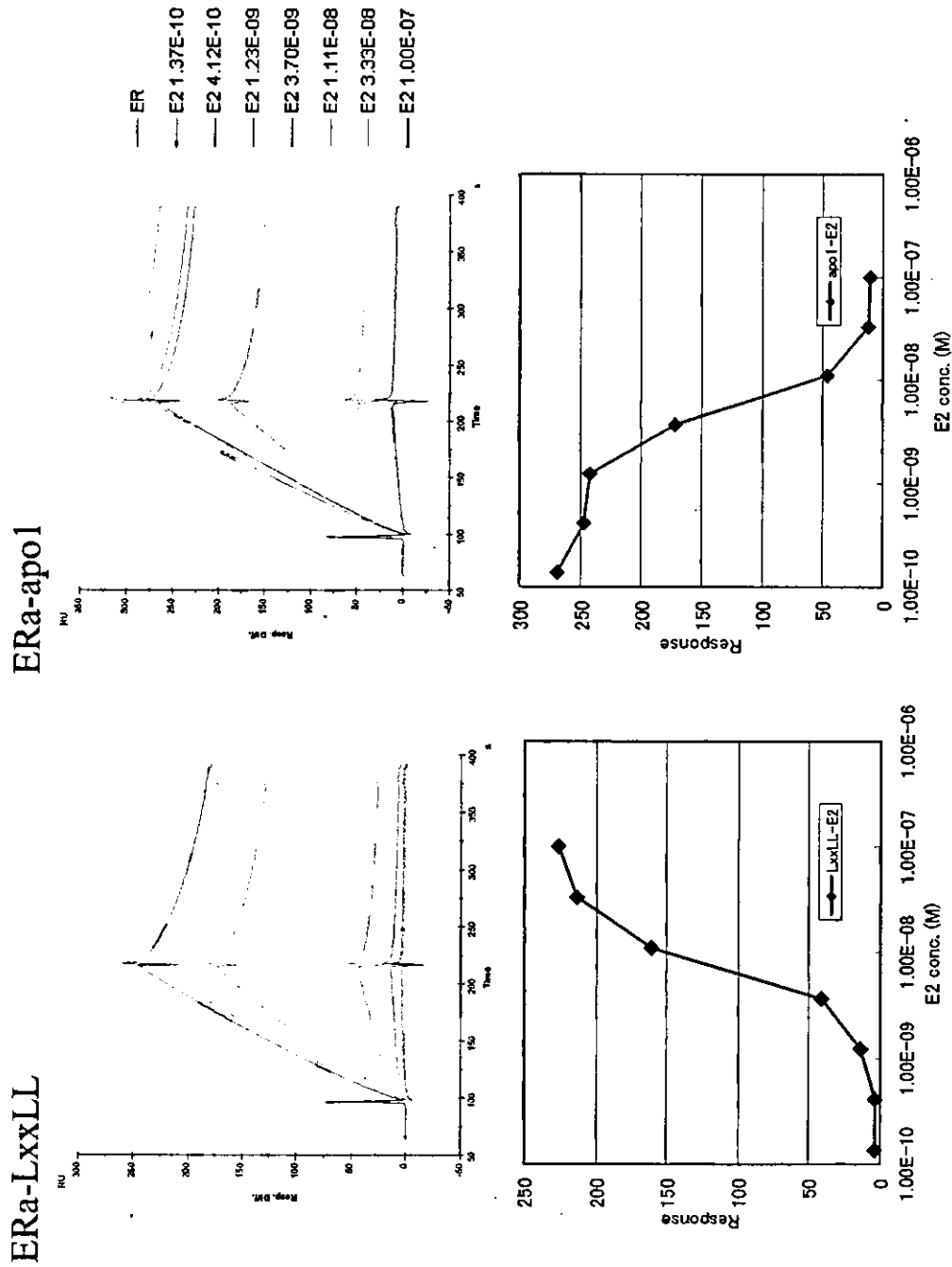


Fig.6 E2 concentration dependency of ER  $\alpha$  and ApoER recognition peptide interaction

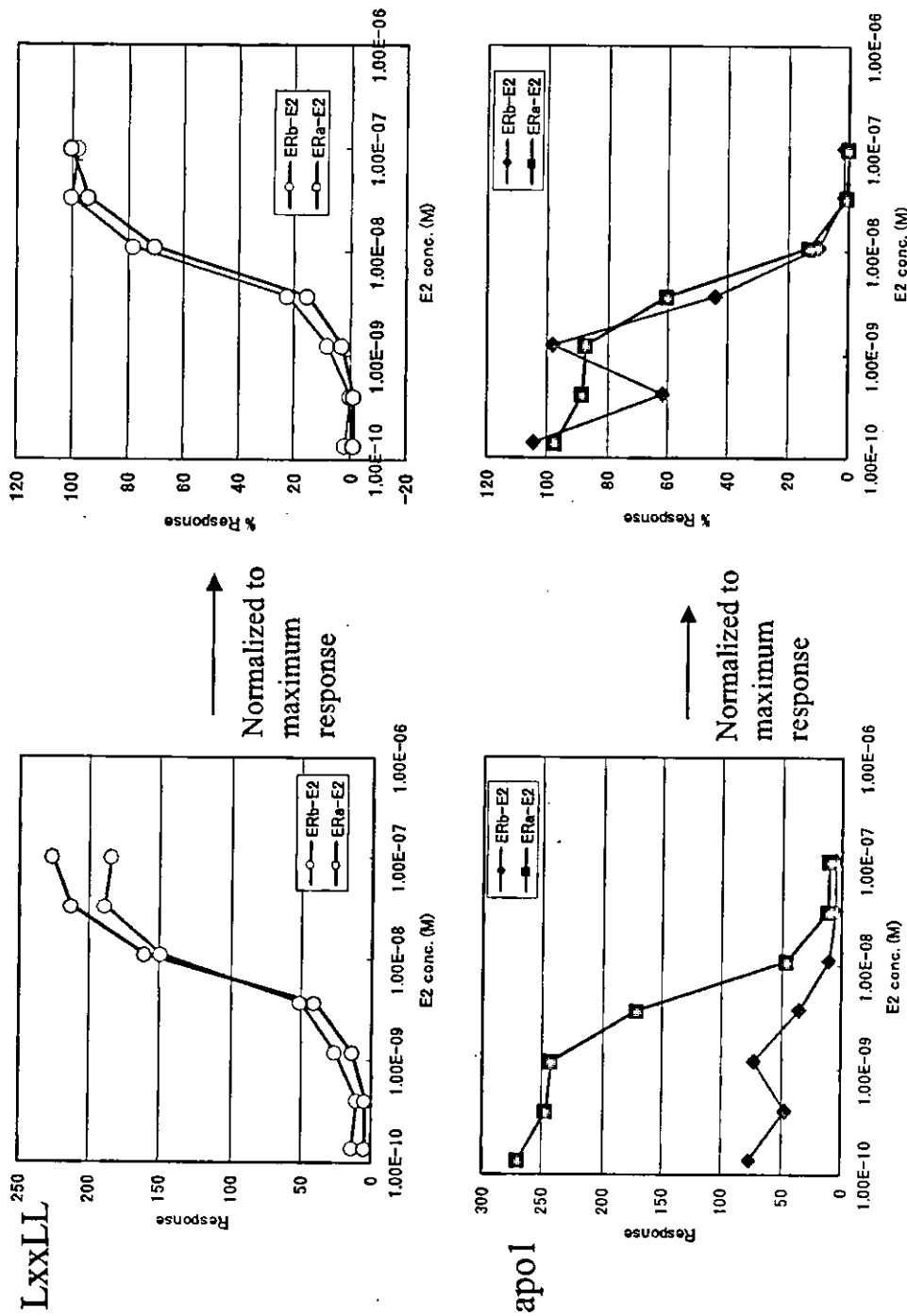


Fig.7 Comparison of ER $\alpha$  and ER $\beta$  interactions with ApoER recognition peptide

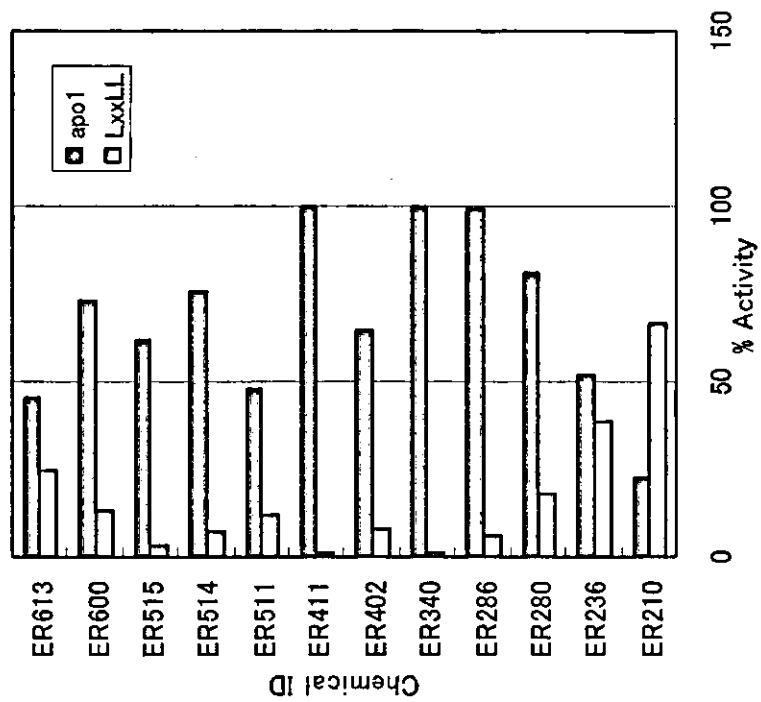


Fig.8 Application of apo1 peptide to high throughput screening  
 ER $\alpha$  (10nM)を、それぞれの化合物(10<sup>-5</sup>M)とインキュベートして測定した



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

昨年度は、エストロゲン受容体 $\beta$  (ER $\beta$ )とER $\beta$ に結合する化学物質の立体構造情報に基づいた理論的な結合様式の推定及び解析を行い、結合活性値を予測することを試みた。

今年度は、独自に入手した約 58,000 の化学物質リストの中から正確な立体構造情報が入手可能であった約 20,000 の化学物質についての化学物質の ER $\beta$  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、昨年得られた予測式を使用して活性予測を行った。また、本年度は、近年新たに蓄積されつつある遺伝子発現データの電算解析によるパスウェイスクリーニング系構築のため核内受容体リガンドにより変動する遺伝子のネットワーク解析から幾つかの特徴的に変動するネットワークパターンが抽出された。

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。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化合物を探索する目的で、膨大な数の化合物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などの相互作用部位と、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などとのマッチングを、低分子化合物内の回転可能な結合を系統的に回転させてコンフォメーションを変えることで網羅的に実行することができ、最良の蛋白質-低分子リガンド相互作用様式(結合様式)をみつけることができる。またこの三次元データベース検索法の開発に併せて、低分子化合物の二次元構造情報(化学構造式)から、原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造を得るためのモ

デリングツールの開発も進めてきた。さらに近年当研究者らは、蛋白質とリガンドの複合体構造が得られた場合に、分子力場を用いて受容体・低分子リガンド複合体のエネルギー極小化計算及びエネルギー解析(結合自由エネルギー計算)を行う方法を確立してきた。本研究では、化学物質の内分泌かく乱性について電算解析する手法の構築のため、これまで研究を進めてきた低分子化合物三次元化法ならびに三次元データベース検索法、さらに複合体エネルギー極小化計算法及び結合自由エネルギー解析法を応用して、内分泌かく乱作用未知の膨大な数の化学物質について、標的受容体に対する結合様式と、結合自由エネルギー値から導き出される相対結合能を推算することを目的とした。また本年度より新たに、近年データが蓄積されつつある遺伝子発現データをもとに作用未知または未確認の化学物質の内分泌かく乱による生体作用を簡易に予測するパスウェイスクリーニング系構築のため、ホルモン受容体リガンドである、Ethinyl estradiol, Testosterone propionate, Levothyroxine を各々経口投与したマウス肝臓のトランスクリプトーム解析データをもとに、各ホルモンに対するリセプターによる発現パスウェイと発現変動データによる各々のホルモン受容体に特異的ネットワークの抽出を行った。

## B. 研究方法

### (1) ER $\beta$ ドッキングモデルによる、*in silico* 大規模スクリーニング

今年度は、昨年度報告した ER $\beta$  との結合強度予測式を利用して、ER $\beta$  に対する活性未知の化学物質について結合強度の予測を行なった。独自に入手した約 58,000 化学物質リストの中から、正確な化学構造式が入手できかつ実際の活性確認のための生

化学的試験を実施し得る(すなわち入手可能な)約 20,000 化合物に絞り 17 $\beta$ -エストラジオールに対する相対結合強度(RBA 値)の予測を行った。

### 1. ドッキングに使用する受容体立体構造の準備

ドッキング計算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 $\beta$  のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ICI164384 が結合している結晶構造である 1hj1.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 で水素構造の最適化を行った後、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を実行する際に必要な水素結合情報を割り振った。

### 2. ドッキングに使用する低分子立体構造の準備

結合強度予測計算に使用する化学物質は、国立医薬品食品衛生研究所より提供された 58,591 の化学物質リストを対象とした。検討に先立って、化学構造式をチェックしたところ、明らかな構造式の誤りや立体構造の不備が目立った。我々の行うコンピュータスクリーニング計算においては化学物質の立体構造情報が非常に重要であり、間違った情報を使用した計算は全く意味を持たないことから、市販化合物データベース(Available Chemicals Directory)を利用してデータの補完を行った。その結果、19,667 化学物質について、市販化合物データベースから立体構造情報を含む化学構造式が入手可能であった。これらの構造を低分子化合物三次元化プログラム Key3D(旧称 Olive)により、原子電荷などの付加情報を

含む精度の高い三次元構造に変換した。さらに自動ドッキングプログラム Adam を実行するために必要な水素結合情報、コンフォメーション探索時の結合回転情報や芳香族環の位置情報を付加した。

### 3. ER $\beta$ と各低分子化合物のドッキング計算

蛋白質-リガンド自動ドッキングプログラム Adam を用いて各化学物質の複合体構造を推定した。続いて、複合体が得られた化学物質について蛋白質-リガンド複合体構造最適化プログラム Bluto を使用して、複合体における構造最適化を行った。最後に蛋白質-リガンド複合体における結合自由エネルギー解析プログラム GenB 並びに複合体形成に伴う脱溶媒和評価プログラム Desolv を用いて複合体安定化に寄与すると考えられる各種エネルギー項の計算を実行した。

### 4. 結合強度予測方法

logRBA の推算には昨年度検証した以下の式を使用した。

$$\log RBA(ER \beta) = -1.495GBelc - 0.401GBrep - 0.205GBcnf - 0.132Desolv - 4.049 \quad (1)$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Desolv: 結合自由エネルギー計算で算出される各エネルギー項  
GBelc: GenB で計算される分子間静電相互作用エネルギー

GBrep: GenB で計算される分子間立体相互作用エネルギー

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

Desolv: Desolv で計算されるリガンド、蛋白質双方の複合体形成に伴う脱溶媒和

(2) 遺伝子発現ネットワーク解析による、核

内受容体制御パスウェイの抽出

#### 1. ER, DHTR, TR 及びこれらに直接制御される分子群のパスウェイの抽出

解析ソフトとして KeyMolnet を用い“ER による発現調節”, “DHTR による発現調節”, “TR による発現調節”により、各々の転写因子と発現調節される分子の文献情報からの関連パスウェイを得た (KeyMolnet ではタンパク質を中心とするネットワークを生成でき、転写制御の関係においては基本転写因子群の系をスキップして表している)。次に、“ER による発現調節”, “DHTR による発現調節”, “TR による発現調節”の 3 つの転写因子とそれらに直接制御される分子群をマージさせて抽出し (図 1)、さらに既知または未知のホルモンに対して、これらの転写因子により直接発現制御を受ける遺伝子の発現量の変動の解析を行った。

#### 2. 発現データのトランスクリプトーム解析

マウスに Ethynyl estradiol; 1, 3, 10(mg/kg) Testosterone propionate; 1, 3, 10 (mg/kg), Levothyroxine; 1, 3, 10 (mg/kg) をそれぞれ経口投与し、2, 8, 24 時間後の肝臓における遺伝子発現データを入手し、ネットワークを生成した。その際のデータ処理は以下のとおり行った。

各発現データのうち、“Absent call”を除外する。データはすでに Scal 法により normalize されているため、そのまま log transformation のみ行った。N=3であることを考慮し、t-test は実施していない。p 値 0.05 未満のデータを有意差ありとして採用し、N=3 の発現量比 (fold change) の平均値を数値データとして用いた。このとき、各ホルモンの各時間に対して、投与量 0 をコントロールとした。後述するネットワーク生成および、既存のネットワーク上への発現データ

表示に用いたデータセットは以下に示す 27 種類である。(図 2 参照、h は時間、D は投与量を示す)

ER\_2h\_D1、ER\_2h\_D3、ER\_2h\_D10、ER\_8h\_D1、ER\_8h\_D3、ER\_8h\_D10、ER\_24h\_D1、ER\_24h\_D3、ER\_24h\_D10、TR\_2h\_D1、TR\_2h\_D3、TR\_2h\_D10、TR\_8h\_D1、TR\_8h\_D3、TR\_8h\_D10、TR\_24h\_D1、TR\_24h\_D3、TR\_24h\_D10、DHTR\_2h\_D1、DHTR\_2h\_D3、DHTR\_2h\_D10、DHTR\_8h\_D1、DHTR\_8h\_D3、DHTR\_8h\_D10、DHTR\_24h\_D1、DHTR\_24h\_D3、DHTR\_24h\_D10

### 3. トランスクリプトーム解析とホルモン特異的ネットワークの構築

1) 各ホルモンに対し、それぞれの時間において、投与量 0 をコントロールとして発現亢進した分子を端点として周辺検索法 1 によりネットワークを生成する。

2) 各ホルモンに対し、この中で変動の認められた実験セットに対するネットワークの共通部分を AND 論理演算法 2 により抽出し、3 種のホルモンに対するネットワークを抽出する。

3) DIFF 演算法 3 によりホルモン特異的に活性化しているネットワークを抽出する。

1 周辺検索法: 指定した端点の上下流の周辺の分子リレーション(分子-分子の関係)を辿ってネットワークを生成する方法

2 AND 論理演算法: 複数のネットワークの共通部分を抽出する方法

3 DIFF 演算法: 複数のネットワークの差分を抽出する方法

## C. 研究結果

(1) ER  $\beta$  ドッキングモデルによる、*in silico* 大規模スクリーニング

### 1. 低分子化合物の三次元化

国立医薬品食品衛生研究所より提供された

58,591 化学物質リストのうち、正確な構造式が入手できた 19,667 化学物質の三次元構造への変換を行なった。三次元化にはプログラム Key3D を使用した。その際、力場パラメータ不足等により三次元化できなかった化合物が 77 化合物あった。これらのほとんどは無機化合物であった。ラジカルや金属イオン等の計算に適さない原子を含む分子、ならびに 1 分子あたりの構成原子数が 200 原子より多い分子等を変換時に除外し、最終的に 17,744 化学物質について原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造が得られた。

### 2. ER $\beta$ との結合様式の探索

プログラム Adam を用いて ER  $\beta$  とのドッキング計算を行った。受容体とリガンド間のマッチングの足がかりに利用する水素結合可能な原子(酸素、窒素)や芳香族環を全く含まないもしくは 1 分子中の回転可能結合数が規定以上である等の理由により計算実行困難な化学物質が 2,198 分子含まれていたがこれらは計算の対象外とした。残りの 15,546 分子について結合様式探索を実行した結果、15,287 の化学物質について ER  $\beta$  との複合体構造が得られた。

### 3. 結合活性値の予測

Adam 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。そこでプログラム Bluto により、Adam で得られたすべての複合体構造それぞれについて、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各リガンドとを対象とした複合体でのエネルギー極小化計算を実行した。ついでプログラム GenB、Desolv によるエネルギー解析によって得られた各エネルギー項をもとに、ER  $\beta$  に対する結合活性値を予測した。予測された結合活性値の上位 1000 化合物についてそ