

の CAS 番号と推定活性値を表1.に示した。

(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における各ホルモンに対する遺伝子発現の変化

採用するデータとして p 値を 0.05 未満 \log ratio が 1 以上(コントロールと比較して2倍以上発現亢進)の分子を抽出したところ分子数が少なかつたため、閾値を下方に設定し直し \log ratio が 0.75 以上とした(図2)。ここで Testosterone propionate に対して発現亢進する分子数の推移に傾向は認められなかったが、Ethinyl estradiol, Levothyroxine に対しては 8h で用量依存的に発現亢進する分子が増加した。しかしながら、Ethinyl estradiol, Testosterone propionate, Levothyroxine に対する 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(図1)に上述した方法による各発現データ(fold change)を載せ、各ホルモンに対する核内リセプター(ER, DHTR, TR)に直接制御される分子群の発現量を観察すると、わずかに Testosterone propionate 投与による TR 下流分子の発現誘導が認められただけでその他のホルモンに対してはほとんど直接的な変動は認められなかった。そこで、発現量に変動の認められた分子に基づき、各ホルモンに対して特異的に変化するパスウェイを構築する必要があると考えられた。

2. 各ホルモン特異的に活性化するネットワークの構築

各ホルモンに対し、コントロールに比べ発現亢進した分子の数より、8h のデータを用いることが有用であることが示唆されたため ER8hD3, ER8hD10, DHTR8hD1, DHTR8

hD10, TR8hD3, TR8hD10 のデータを基にネットワークを生成した。ここでは各ホルモンそれぞれに対し、2つのネットワーク群の共通部分を AND 論理演算により抽出し ER, DHTR, TR 活性化ネットワークとした。さらに、3つのホルモンそれぞれに特異的に活性化するネットワークを抽出するため ER-(DHTR+TR), DHTR-(ER+TR), TR-(ER+DHTR)の DIFF 論理演算を行い ER(図3) DHTR, TR 特異的活性化ネットワークを抽出した。各ホルモンに対する特異的活性化ネットワークのプロファイルはサマリーシートによって行うことができる。ER 特異的活性化ネットワークのサマリーを図4に示すが、“STAT による発現調節”、“解糖系”の一部が特異的に活性化していた。さらに DHTR に対しては、“ephrin シグナル伝達”の一部が活性化しており、TR に対しては“TR による発現調節”、“threonine 代謝”の一部が活性化していた。

D. 考察

受容体リガンド結合部位と化学物質の三次元構造を利用して相互作用を解析する手法は、化学物質が受容体リガンド結合キヤビティと物理化学的にフィットするかどうか、すなわち結合親和性を有するかどうかを直接的に見積もることができる有力な手法であると考えられる。さらに、例え入手困難な化学物質の結合親和性でさえも、その化学構造式が判明していれば我々の開発した手法を用いて相互作用の強さを計算により見積もることも可能である。今回、化学物質の三次元に使用したプログラム Key3D では、パラメータ不足等の問題により三次元に失敗した物質数は 77 と非常に少数であった。これらの化学物質はほとんどが無機化合物であり、単独で作用を及ぼす可能性の低い物質であった。これまで

述べたように、受容体リガンド結合部位と化学物質の三次元構造を利用して相互作用を直接解析する手法は結合親和性を見積もるために非常に有効であると考えられるが受容体リガンド結合部位とリガンドが直接相互作用する段階は相互作用の最終ステップであり、受容体とリガンドが相互作用する初期の段階においてはまた別の相互作用が必要であると考えられる。例えば、ER α とER β のリガンド結合キャビティはアゴニスト結合状態では helix12 が蓋のように閉じた状態で安定化するが、この最終構造をと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でのヘリックス間の相互作用、また補因子とリガンド及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。実験的な結合活性値との相関をさらに高めるためには今後初期段階における相互作用に必要な要素を特定する必要と考察された。

一方、本年度新たに検討した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においては、Ethinyl estradiol, Levothyroxine に対して発現亢進した分子の数が 8h で用量依存的に増加したため、この time point における発現解析を行うことが有用であることが示唆された。各ホルモンに対する特異的な核内レセプターにより発現が制御される分子のパスウェイを抽出し、各々の発現データをインポートして直接の影響を観察すると、TR 以外のレセプター下流への直接影響は認められなかった。従って、特に低用量の環境ホルモンの毒性予測を行うためには直接影響を及ぼす分子とそれらを制御する核内レセプターによるパスウェイの観察のみでは困難であることが示唆された。そこで、各ホルモンに対して特異的に活性化するネットワークの抽出を試みたところ、Ethinyl estradiol に対

しては“STAT による発現調節”、“解糖系”の一部がホルモン特異的に活性化していることが示唆され、STAT 下流の分子の発現量や GO(Gene Ontology)term との関連などを考え合せると、細胞増殖が亢進している可能性が考えられた。今後は各ホルモンに対して特異的に抑制されるネットワークを構築し、活性化のネットワークと組み合わせることで毒性予測に用いれば、さらに有用であると考察された。

E. 結論

我々の開発したコンピュータスクリーニング法を利用して、ER β に対する多種化学物質の結合活性値予測を試みた。独自に入手した約 58,000 化学物質のうち、約 20,000 の化学物質について ER β への結合様式の推定を行なった後結合強度の予測を行なった結果、約 15,000 の物質について結合様式と結合強度を予測することができた。われわれの手法は化学物質の構造を選ぶことなく結合様式を推定でき、かつ結合強度が予測可能であるため非常に有用であると考えられる。

一方、ホルモン特異的に活性化するパスウェイの構築のためのネットワーク解析により、各ホルモンに対して幾つかの特徴的なネットワークパターン抽出が可能であることが示唆された。今後はこの方法を基にさらにデータ数を蓄積し、より確実なネットワークを抽出することで、内分泌かく乱による生体作用予測のよい指標になると考えられた。

F. 研究発表

特になし

G. 知的所有権の取得状況

特になし

表 1. 上位 1000 化合物のスコア値 (結合強度予測値)

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000050-02-2	0.18	000057-24-9	0.09	000067-03-8	0.48
000050-03-3	0.35	000057-63-6	0.92	000067-96-9	1.29
000050-04-4	0.29	000057-83-0	0.38	000067-97-0	0.63
000050-14-6	2.07	000057-85-2	0.47	000068-22-4	0.07
000050-22-6	0.63	000057-87-4	1.57	000068-23-5	0.41
000050-23-7	0.04	000057-91-0	0.82	000068-26-8	0.87
000050-27-1	1.46	000057-96-5	0.23	000069-23-8	-0.05
000050-28-2	1.16	000057-97-6	0.36	000071-58-9	0.45
000050-33-9	0.03	000058-18-4	0.68	000071-68-1	-0.02
000050-34-0	0.16	000058-22-0	0.55	000072-33-3	0.45
000050-37-3	0.44	000058-39-9	0.20	000072-48-0	-0.04
000050-41-9	0.65	000058-60-6	-0.06	000072-69-5	-0.04
000050-48-6	-0.06	000058-64-0	0.68	000076-42-6	0.05
000050-50-0	0.55	000058-72-0	0.21	000076-43-7	0.70
000050-52-2	0.32	000058-74-2	0.45	000076-58-4	0.33
000051-98-9	-0.02	000058-97-9	0.17	000076-61-9	0.93
000052-21-1	0.05	000059-02-9	0.20	000076-99-3	0.03
000052-39-1	0.66	000059-05-2	0.71	000077-08-7	1.72
000052-76-6	0.41	000059-30-3	1.04	000077-09-8	0.70
000052-78-8	0.32	000060-81-1	1.03	000078-32-0	0.11
000052-88-0	0.17	000060-93-5	0.13	000078-33-1	0.60
000053-06-5	0.47	000060-99-1	0.14	000079-96-9	0.04
000053-16-7	0.59	000061-25-6	0.19	000079-97-0	0.30
000053-41-8	0.31	000061-73-4	0.87	000080-04-6	0.44
000053-42-9	-0.01	000062-90-8	0.06	000080-49-9	0.37
000053-43-0	0.24	000063-01-4	0.92	000080-51-3	0.30
000053-70-3	0.15	000063-37-6	0.80	000080-75-1	0.25
000053-86-1	-0.04	000064-72-2	0.37	000081-14-1	0.19
000054-28-4	0.59	000064-85-7	0.44	000081-23-2	0.40
000054-62-6	0.76	000064-86-8	1.36	000081-26-5	0.95
000055-80-1	0.09	000065-19-0	0.54	000081-37-8	0.33
000056-49-5	0.65	000065-28-1	0.41	000081-68-5	0.31
000056-53-1	0.63	000065-61-2	0.24	000081-92-5	0.41
000056-65-5	0.31	000066-28-4	0.10	000081-95-8	0.98

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000082-08-6	0.79	000092-74-0	0.13	000125-02-0	1.98
000082-22-4	0.66	000092-75-1	0.31	000125-04-2	0.03
000083-44-3	0.46	000093-23-2	0.11	000125-20-2	1.04
000083-49-8	0.18	000093-45-8	-0.05	000125-28-0	0.03
000083-63-6	0.08	000093-46-9	0.48	000125-31-5	1.59
000083-80-7	0.06	000093-69-6	1.47	000125-56-4	0.03
000084-16-2	0.29	000096-66-2	0.29	000127-25-3	0.20
000084-17-3	1.04	000096-69-5	0.36	000128-13-2	0.32
000084-19-5	0.28	000097-56-3	0.02	000128-20-1	0.37
000084-61-7	0.15	000099-21-8	0.04	000128-23-4	0.56
000084-62-8	0.11	000101-01-9	0.39	000128-62-1	0.92
000084-80-0	-0.02	000101-02-0	-0.02	000128-70-1	0.97
000084-94-6	0.26	000101-56-4	-0.02	000128-80-3	0.41
000085-00-7	0.37	000102-02-3	0.49	000128-87-0	0.33
000085-32-5	0.35	000103-96-8	-0.06	000128-88-1	0.86
000085-83-6	0.44	000113-52-0	-0.02	000129-73-7	0.35
000085-86-9	0.06	000115-40-2	0.34	000130-40-5	0.54
000086-15-7	0.02	000115-41-3	1.18	000130-80-3	0.96
000086-44-2	0.10	000115-86-6	0.13	000130-86-9	0.08
000088-24-4	0.38	000116-31-4	0.45	000130-90-5	-0.06
000090-18-6	0.83	000117-46-4	-0.02	000131-22-6	0.27
000090-66-4	0.12	000117-92-0	1.07	000131-99-7	1.21
000090-68-6	0.51	000118-08-1	0.52	000132-18-3	0.11
000090-94-8	0.30	000119-13-1	1.12	000132-69-4	0.08
000091-73-6	0.28	000119-15-3	0.02	000135-16-0	0.22
000091-78-1	0.82	000119-47-1	0.29	000135-48-8	0.22
000091-84-9	-0.06	000119-90-4	-0.06	000135-57-9	0.99
000092-21-7	0.08	000119-93-7	-0.02	000135-61-5	0.04
000092-29-5	0.17	000120-24-1	-0.07	000135-62-6	-0.05
000092-31-9	0.72	000120-70-7	0.04	000135-64-8	0.59
000092-32-0	0.76	000121-06-2	1.12	000137-52-0	0.12
000092-36-4	0.08	000121-54-0	0.20	000140-64-7	2.67
000092-72-8	0.13	000122-11-2	0.07	000140-66-9	-0.05
000092-73-9	0.24	000123-03-5	0.23	000140-72-7	0.23

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000143-62-4	0.20	000297-76-7	0.22	000465-39-4	0.99
000143-74-8	0.69	000298-57-7	0.38	000466-09-1	0.44
000145-13-1	0.33	000298-93-1	1.02	000466-99-9	-0.02
000145-14-2	0.52	000298-96-4	0.51	000467-15-2	0.04
000145-15-3	0.86	000302-95-4	0.46	000467-62-9	0.39
000145-39-1	-0.06	000303-49-1	-0.05	000470-37-1	0.21
000145-41-5	0.40	000304-28-9	-0.03	000470-55-3	0.73
000145-50-6	1.79	000313-04-2	1.64	000471-77-2	0.16
000146-48-5	0.54	000313-06-4	0.68	000471-95-4	0.21
000146-56-5	-0.05	000314-19-2	0.46	000472-41-3	0.29
000146-68-9	0.86	000315-37-7	0.37	000472-54-8	0.34
000151-73-5	0.85	000316-14-3	-0.05	000472-86-6	0.59
000152-11-4	0.36	000357-57-3	0.23	000474-07-7	0.63
000152-43-2	0.41	000360-70-3	0.26	000474-25-9	-0.04
000153-00-4	0.67	000362-05-0	1.83	000474-86-2	0.68
000154-21-2	0.35	000362-06-1	1.35	000475-25-2	0.24
000154-23-4	0.98	000362-07-2	0.70	000475-71-8	0.68
000155-41-9	0.58	000362-08-3	0.46	000475-91-2	0.27
000155-84-0	0.10	000366-29-0	-0.06	000476-32-4	0.58
000189-55-9	0.53	000378-44-9	0.54	000476-66-4	0.19
000189-64-0	0.44	000379-68-0	0.16	000476-70-0	0.15
000190-26-1	0.63	000382-44-5	0.01	000477-30-5	0.29
000191-24-2	0.07	000382-45-6	-0.01	000477-73-6	1.97
000191-26-4	-0.02	000382-67-2	0.18	000479-13-0	0.44
000191-30-0	0.30	000426-13-1	-0.06	000479-20-9	0.18
000192-65-4	0.55	000434-03-7	0.44	000479-23-2	0.19
000193-39-5	0.16	000434-07-1	0.46	000479-33-4	1.01
000213-46-7	0.34	000434-13-9	0.22	000479-98-1	0.13
000214-17-5	0.16	000434-22-0	0.58	000480-18-2	0.56
000215-58-7	0.26	000434-85-5	0.56	000481-29-8	0.82
000224-41-9	0.07	000438-07-3	0.70	000481-30-1	0.21
000224-42-0	0.13	000440-17-5	0.10	000481-53-8	0.42
000226-36-8	-0.01	000446-72-0	0.18	000483-04-5	0.37
000226-88-0	0.35	000458-37-7	0.58	000483-65-8	0.00

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000484-47-9	0.00	000520-85-4	0.34	000563-04-2	0.27
000485-72-3	0.46	000521-10-8	1.35	000565-20-8	0.09
000486-66-8	0.29	000521-11-9	0.56	000569-57-3	1.42
000487-24-1	-0.07	000521-17-5	1.50	000569-61-9	0.55
000487-41-2	-0.03	000521-18-6	0.52	000571-20-0	1.32
000490-46-0	0.66	000521-35-7	0.14	000574-45-8	0.54
000491-70-3	0.68	000521-78-8	0.28	000574-61-8	0.31
000491-80-5	0.38	000522-12-3	1.71	000574-69-6	0.10
000493-77-6	0.31	000523-44-4	0.39	000580-35-8	0.53
000497-76-7	0.00	000526-08-9	0.29	000581-64-6	0.25
000500-38-9	0.87	000528-48-3	0.25	000596-03-2	0.90
000501-24-6	0.11	000530-14-3	0.53	000596-09-8	0.22
000508-52-1	-0.02	000531-52-2	0.26	000596-27-0	1.36
000510-13-4	0.34	000531-95-3	0.19	000599-79-1	0.17
000510-50-9	0.11	000532-43-4	0.48	000600-57-7	0.68
000510-64-5	0.08	000538-41-0	-0.07	000602-09-5	0.21
000510-74-7	0.23	000538-71-6	0.20	000602-55-1	0.10
000511-09-1	0.17	000539-17-3	0.37	000603-34-9	0.09
000511-15-9	0.45	000544-47-8	0.26	000603-45-2	0.50
000512-69-6	0.26	000545-26-6	-0.01	000603-48-5	1.18
000514-17-0	0.76	000547-58-0	0.01	000603-50-9	0.27
000514-73-8	1.13	000547-75-1	0.75	000604-53-5	0.13
000514-85-2	0.18	000547-81-9	1.06	000604-59-1	0.07
000515-03-7	0.06	000548-37-8	1.03	000606-68-8	0.93
000516-15-4	0.31	000548-62-9	0.96	000606-91-7	0.11
000516-54-1	0.45	000548-73-2	0.46	000612-71-5	0.61
000516-92-7	0.46	000549-18-8	0.25	000612-78-2	0.11
000517-09-9	0.53	000549-56-4	0.13	000612-82-8	-0.02
000518-20-7	0.33	000550-15-2	1.75	000620-42-8	0.57
000518-28-5	0.84	000550-70-9	0.38	000622-21-9	0.46
000520-12-7	0.16	000552-22-7	0.16	000630-56-8	0.64
000520-27-4	0.11	000552-58-9	0.11	000632-51-9	0.57
000520-28-5	0.09	000553-24-2	0.38	000633-65-8	1.08
000520-36-5	-0.03	000561-27-3	0.30	000633-96-5	0.37

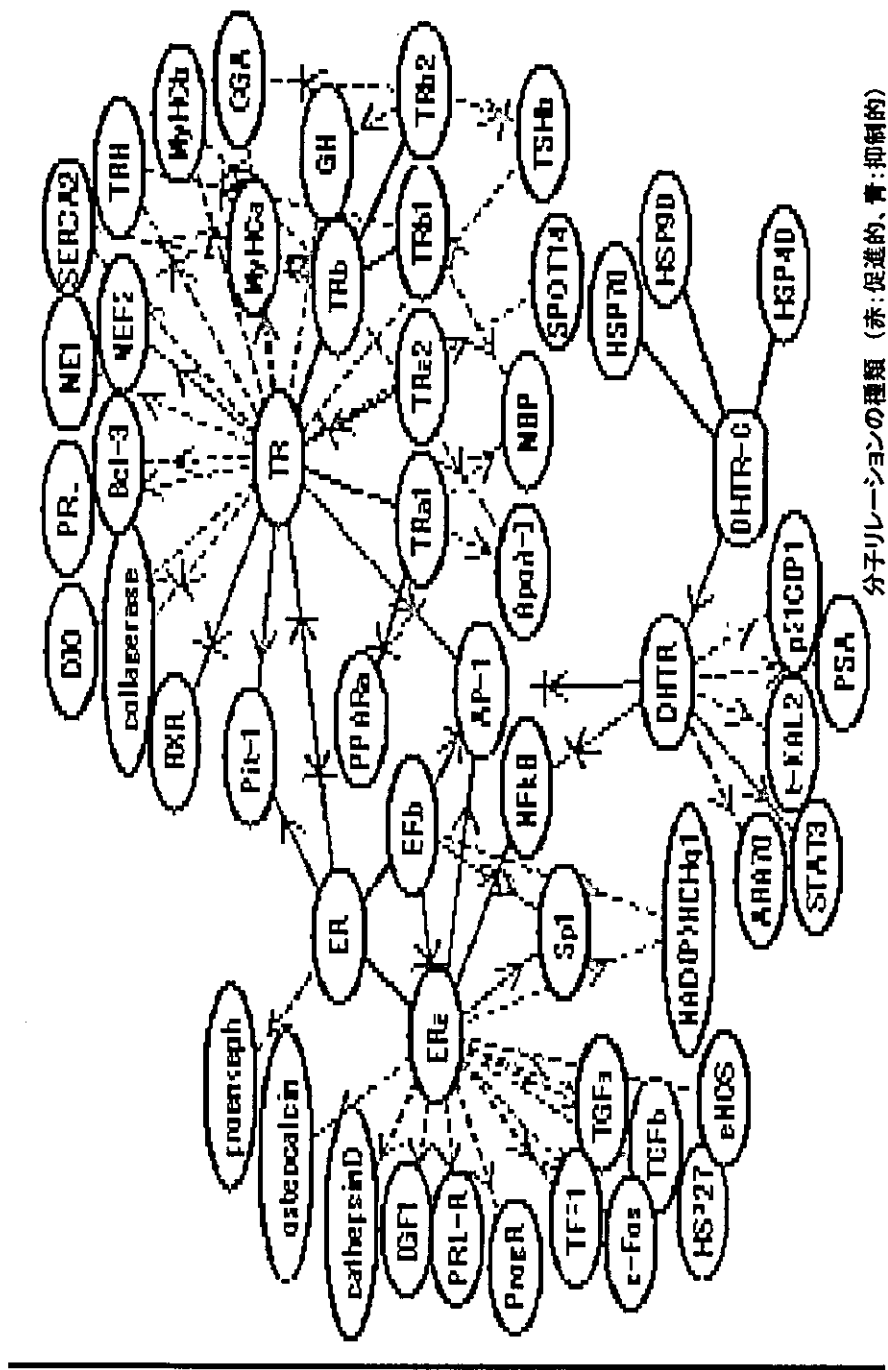
CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
000634-21-9	1.34	000979-02-2	0.35	001229-24-9	1.08
000642-04-6	0.35	000979-32-8	1.37	001229-29-4	0.00
000643-84-5	1.48	000985-13-7	0.25	001231-82-9	0.14
000653-63-4	0.14	000987-24-6	0.06	001231-93-2	1.02
000659-22-3	0.04	000987-65-5	0.31	001234-35-1	0.41
000739-71-9	0.24	000989-38-8	1.19	001236-72-2	1.18
000744-45-6	0.07	001034-01-1	-0.06	001237-75-8	0.02
000749-02-0	0.33	001045-69-8	0.02	001239-79-8	0.66
000785-30-8	0.05	001046-56-6	0.07	001249-97-4	0.78
000791-69-5	1.23	001056-77-5	0.63	001251-85-0	0.18
000793-24-8	0.04	001058-71-5	0.64	001320-06-5	0.48
000797-63-7	0.03	001087-26-9	-0.02	001330-78-5	0.31
000804-63-7	0.13	001096-38-4	0.37	001424-00-6	0.65
000834-28-6	0.21	001096-80-6	0.51	001434-54-4	0.48
000838-88-0	-0.03	001097-51-4	0.36	001446-61-3	0.00
000846-46-8	0.15	001098-97-1	0.08	001450-63-1	1.46
000846-48-0	0.12	001099-45-2	0.09	001474-53-9	0.61
000848-53-3	0.10	001100-88-5	0.21	001476-34-2	0.42
000853-23-6	0.48	001104-22-9	0.06	001483-74-5	0.60
000853-34-9	0.01	001113-21-9	0.19	001485-92-3	0.32
000855-38-9	0.15	001153-51-1	0.51	001498-88-0	0.04
000895-37-4	0.46	001158-94-7	0.55	001499-10-1	0.76
000897-55-2	0.09	001159-53-1	0.69	001533-45-5	-0.03
000901-56-4	1.16	001162-53-4	1.35	001607-57-4	0.27
000901-93-9	-0.03	001162-56-7	0.40	001617-90-9	0.17
000905-96-4	0.97	001165-14-6	0.66	001620-68-4	0.87
000906-83-2	1.00	001166-52-5	0.13	001624-62-0	0.17
000908-54-3	2.78	001169-54-6	0.29	001658-56-6	0.65
000911-77-3	2.73	001173-26-8	0.06	001662-01-7	0.06
000963-74-6	0.06	001218-35-5	0.09	001663-45-2	0.21
000963-89-3	0.32	001222-05-5	0.33	001672-46-4	1.14
000974-23-2	0.67	001224-92-6	0.69	001674-18-6	1.28
000976-71-6	0.72	001224-95-9	0.09	001684-14-6	0.17
000977-96-8	0.91	001225-43-0	0.85	001696-60-2	0.59

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
001705-85-7	0.07	002321-07-5	0.63	003073-87-8	0.32
001707-75-1	0.48	002381-16-0	0.21	003085-82-3	0.28
001733-12-6	1.63	002381-39-7	0.06	003118-97-6	0.40
001778-02-5	0.72	002381-40-0	0.04	003147-14-6	0.46
001784-04-9	1.29	002387-03-3	0.76	003147-75-9	0.19
001801-42-9	0.28	002390-54-7	0.69	003166-00-5	0.11
001817-68-1	0.17	002392-39-4	0.58	003176-77-0	-0.02
001852-53-5	0.97	002397-00-4	0.86	003180-81-2	0.04
001919-48-8	0.63	002417-04-1	0.15	003230-39-5	0.12
001934-20-9	0.09	002425-85-6	0.30	003236-71-3	0.26
001936-15-8	0.08	002447-57-6	0.02	003294-03-9	0.78
001943-97-1	1.44	002456-45-3	0.58	003301-79-9	0.38
001944-12-3	0.03	002465-27-2	-0.07	003326-32-7	0.65
001972-08-3	0.08	002479-49-4	0.01	003326-34-9	0.60
001973-05-3	0.13	002492-87-7	-0.01	003327-24-0	0.03
002026-24-6	0.00	002498-75-1	0.09	003351-32-4	0.17
002030-63-9	0.71	002512-29-0	0.41	003379-38-2	0.12
002079-00-7	0.33	002582-07-2	0.66	003468-63-1	0.23
002090-82-6	3.70	002622-26-6	0.07	003482-37-9	0.11
002103-64-2	0.90	002624-43-3	0.21	003483-82-7	0.22
002123-35-5	0.07	002646-17-5	0.02	003520-42-1	1.02
002132-70-9	0.02	002650-17-1	1.07	003521-06-0	1.42
002135-17-3	0.13	002657-25-2	0.13	003564-15-6	0.12
002140-67-2	0.56	002666-17-3	0.38	003564-22-5	1.04
002150-48-3	0.33	002716-10-1	0.25	003618-58-4	1.01
002162-74-5	0.89	002800-80-8	0.43	003618-63-1	0.03
002185-86-6	1.32	002832-40-8	-0.03	003648-36-0	0.75
002197-01-5	1.04	002955-38-6	0.02	003682-35-7	0.12
002208-12-0	0.50	002959-74-2	-0.01	003689-20-1	0.11
002218-94-2	0.54	003016-97-5	0.13	003697-24-3	-0.07
002299-73-2	0.27	003027-01-8	0.21	003704-09-4	0.76
002303-01-7	1.26	003029-32-1	0.31	003734-33-6	1.05
002313-87-3	-0.02	003065-79-0	1.31	003734-67-6	0.18
002320-96-9	0.93	003071-70-3	1.18	003770-80-7	-0.05

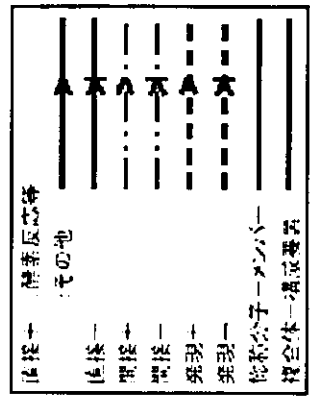
CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
003770-82-9	0.21	005384-21-4	0.06	006318-17-8	0.44
003808-20-6	0.36	005385-75-1	0.09	006358-31-2	0.04
003810-51-3	0.32	005392-67-6	0.80	006361-29-1	0.77
003846-71-7	0.12	005413-75-2	-0.05	006361-49-5	0.17
003864-99-1	0.19	005418-95-1	0.26	006368-72-5	0.42
003924-22-9	1.56	005421-66-9	0.70	006406-32-2	1.35
003930-19-6	0.09	005442-32-0	0.20	006408-51-1	0.29
004098-40-2	1.07	005466-99-9	0.37	006408-57-7	0.85
004181-05-9	0.44	005486-84-0	0.21	006408-72-6	0.56
004208-80-4	1.80	005521-31-3	-0.01	006410-10-2	0.10
004270-70-6	0.37	005550-12-9	0.35	006416-57-5	0.03
004403-89-8	0.11	005591-45-7	0.40	006441-82-3	1.41
004403-90-1	0.16	005613-46-7	0.38	006441-96-9	0.24
004424-03-7	1.29	005663-04-7	0.33	006535-42-8	0.65
004430-20-0	0.94	005836-29-3	0.25	006620-60-6	0.05
004441-01-4	-0.02	005850-16-8	-0.04	006625-46-3	0.59
004474-24-2	0.89	005850-35-1	0.05	006708-61-8	1.51
004477-79-6	0.37	005850-39-5	0.11	006709-58-6	0.30
004546-55-8	0.34	005858-33-3	0.07	006737-42-4	0.11
004546-72-9	0.21	005873-16-5	1.26	006738-04-1	0.04
004548-53-2	0.58	006035-94-5	0.70	006807-17-6	0.21
004657-00-5	2.17	006051-87-2	0.05	006844-74-2	-0.06
004678-45-9	0.80	006052-15-9	-0.02	007385-67-3	-0.04
004691-65-0	1.21	006054-48-4	0.43	007423-31-6	0.96
004733-39-5	0.61	006088-51-3	0.12	007477-67-0	0.20
004759-48-2	-0.04	006106-46-3	0.58	007478-69-5	0.01
005007-67-0	0.04	006163-58-2	0.54	007496-02-8	0.03
005051-62-7	0.59	006197-30-4	-0.03	007496-10-8	-0.02
005102-79-4	0.34	006224-63-1	0.20	007507-01-9	0.36
005150-50-5	0.36	006232-56-0	0.39	007549-43-1	0.13
005232-99-5	0.01	006232-57-1	0.69	007688-25-7	0.05
005254-41-1	0.16	006268-49-1	0.14	007689-03-4	0.13
005290-62-0	0.29	006271-79-0	0.10	007695-91-2	0.35
005326-42-1	-0.05	006300-37-4	0.16	007727-33-5	1.33

CAS No.	Score	CAS No.	Score	CAS No.	Score
007757-83-7	-0.03	014263-94-6	1.38	020440-93-1	0.29
007773-03-7	-0.05	014414-32-5	0.68	020440-95-3	0.60
007782-99-2	-0.03	014521-96-1	1.02	020721-50-0	-0.02
008004-87-3	0.96	014806-50-9	0.95	020725-03-5	0.16
010048-13-2	0.06	014926-29-5	0.71	020838-44-2	0.03
010049-83-9	0.08	014934-37-3	1.18	021145-77-7	0.24
010081-67-1	0.32	015086-94-9	-0.05	021255-69-6	0.35
010117-38-1	-0.05	015185-43-0	1.07	021259-20-1	0.30
010161-34-9	0.10	015546-43-7	1.03	021637-25-2	1.85
010191-41-0	-0.04	015940-86-0	0.13	022395-24-0	0.03
010192-30-0	-0.03	016178-48-6	0.68	022525-43-5	0.18
010196-04-0	-0.03	016432-81-8	-0.01	022948-06-7	0.24
010291-28-8	0.35	016574-43-9	-0.04	023001-29-8	0.33
010418-03-8	1.29	016740-38-8	-0.05	023060-42-6	0.23
010453-86-8	0.14	016766-09-9	0.13	023236-18-2	0.00
010526-07-5	0.51	016803-97-7	-0.04	023582-02-7	0.35
010540-29-1	0.75	016840-28-1	-0.05	023807-28-5	0.59
010592-13-9	0.14	017230-88-5	0.79	023941-48-2	0.63
012270-13-2	0.22	017540-75-9	0.02	024136-83-2	1.02
013080-86-9	0.76	017560-51-9	0.09	024140-30-5	0.19
013080-89-2	0.54	017610-24-1	0.11	024316-19-6	0.12
013161-28-9	1.19	018434-12-3	0.61	025152-49-2	0.81
013245-90-4	0.33	018524-94-2	0.93	025389-94-0	0.17
013280-61-0	0.43	018801-00-8	0.09	025425-12-1	0.92
013288-70-5	0.03	018846-91-8	0.86	025746-37-6	0.41
013324-20-4	0.63	018942-46-6	-0.04	025973-55-1	0.23
013401-40-6	0.88	019074-59-0	0.83	026002-80-2	0.35
013451-02-0	-0.03	019237-84-4	0.01	026266-77-3	0.20
013464-24-9	0.38	019274-72-7	0.68	026444-49-5	0.08
013465-98-0	-0.03	019356-17-3	0.84	026644-96-2	0.40
013597-44-9	-0.05				

- ① TSE
- ② T2
- ③ T3
- ④ T4
- ⑤ T5
- ⑥ T6
- ⑦ T7
- ⑧ T8
- ⑨ T9
- ⑩ T10
- ⑪ T11
- ⑫ T12
- ⑬ T13
- ⑭ T14
- ⑮ T15
- ⑯ T16
- ⑰ T17
- ⑱ T18
- ⑲ T19
- ⑳ T20
- ㉑ T21
- ㉒ T22
- ㉓ T23
- ㉔ T24
- ㉕ T25
- ㉖ T26
- ㉗ T27
- ㉘ T28
- ㉙ T29
- ㉚ T30
- ㉛ T31
- ㉜ T32
- ㉝ T33
- ㉞ T34
- ㉟ T35
- ㊱ T36
- ㊲ T37
- ㊳ T38
- ㊴ T39
- ㊵ T40
- ㊶ T41
- ㊷ T42
- ㊸ T43
- ㊹ T44
- ㊺ T45
- ㊻ T46
- ㊼ T47
- ㊽ T48
- ㊾ T49
- ㊿ T50



分子リレーションの種類 (赤:促進的、青:抑制的)

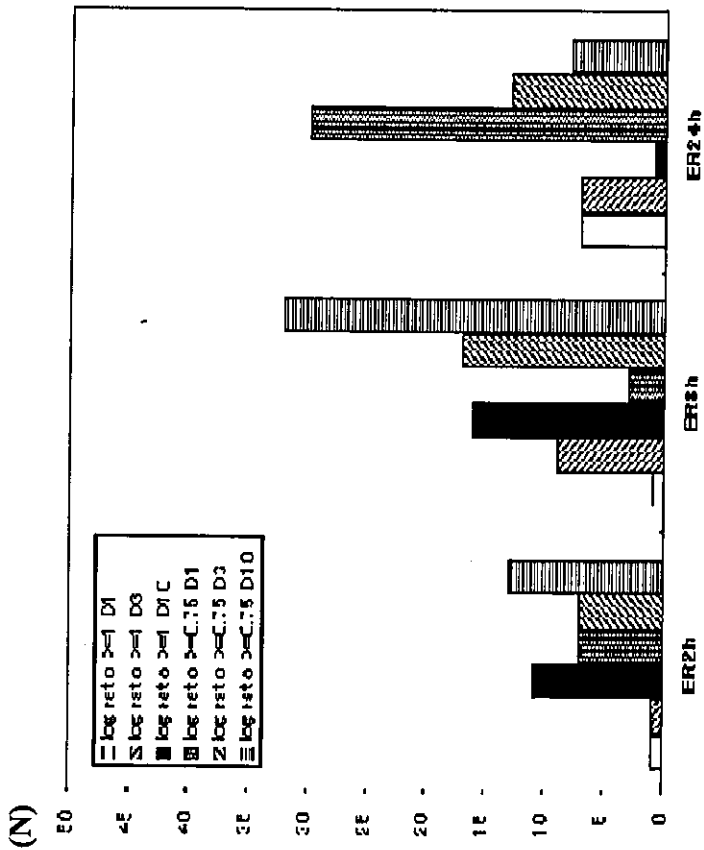


分子の種類



図1 ER, DHTR, TRおよびこれらに直接制御される分子群によるパスウェイ

A



172 C

B

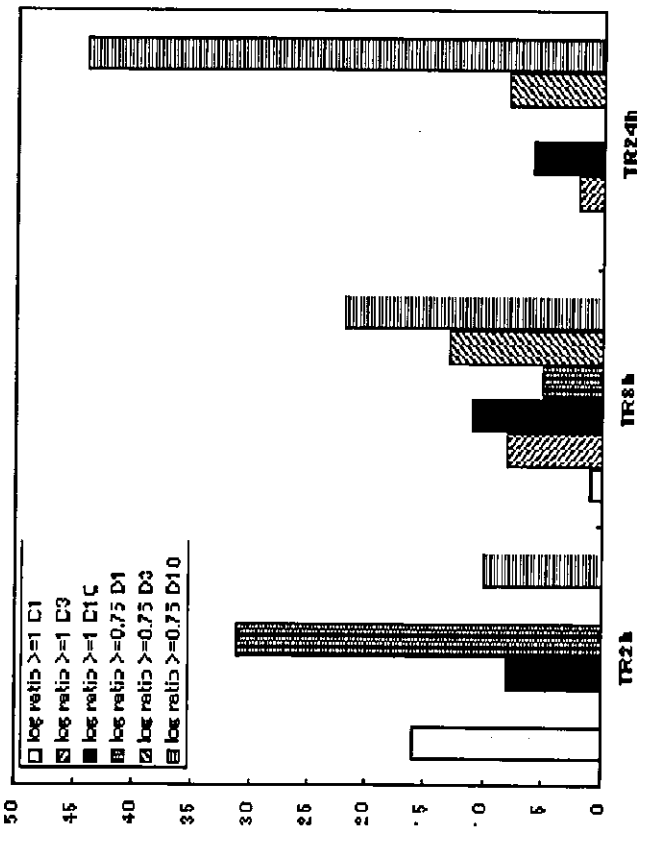
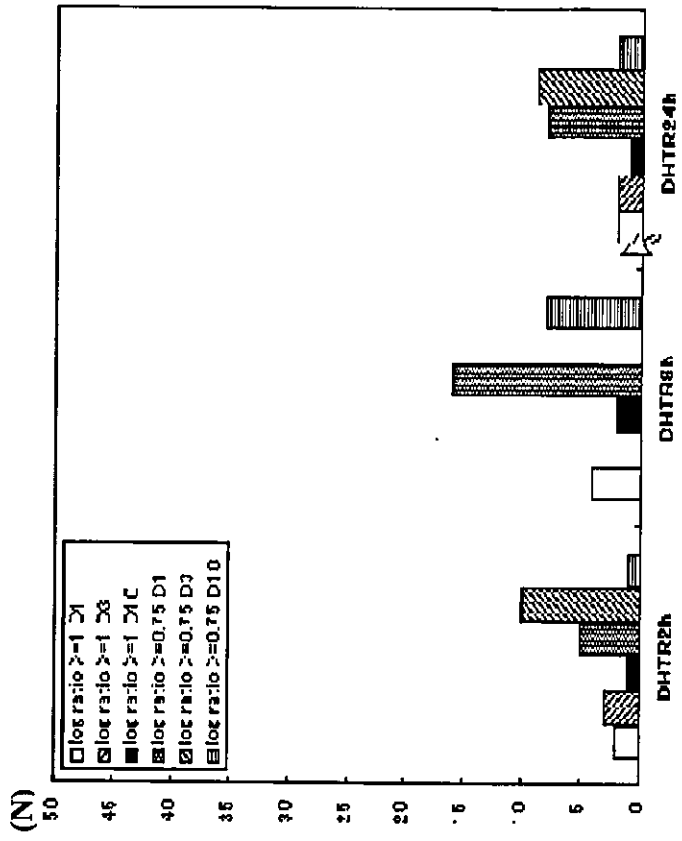
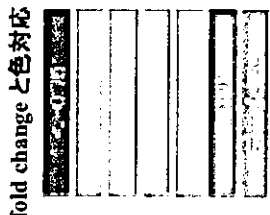
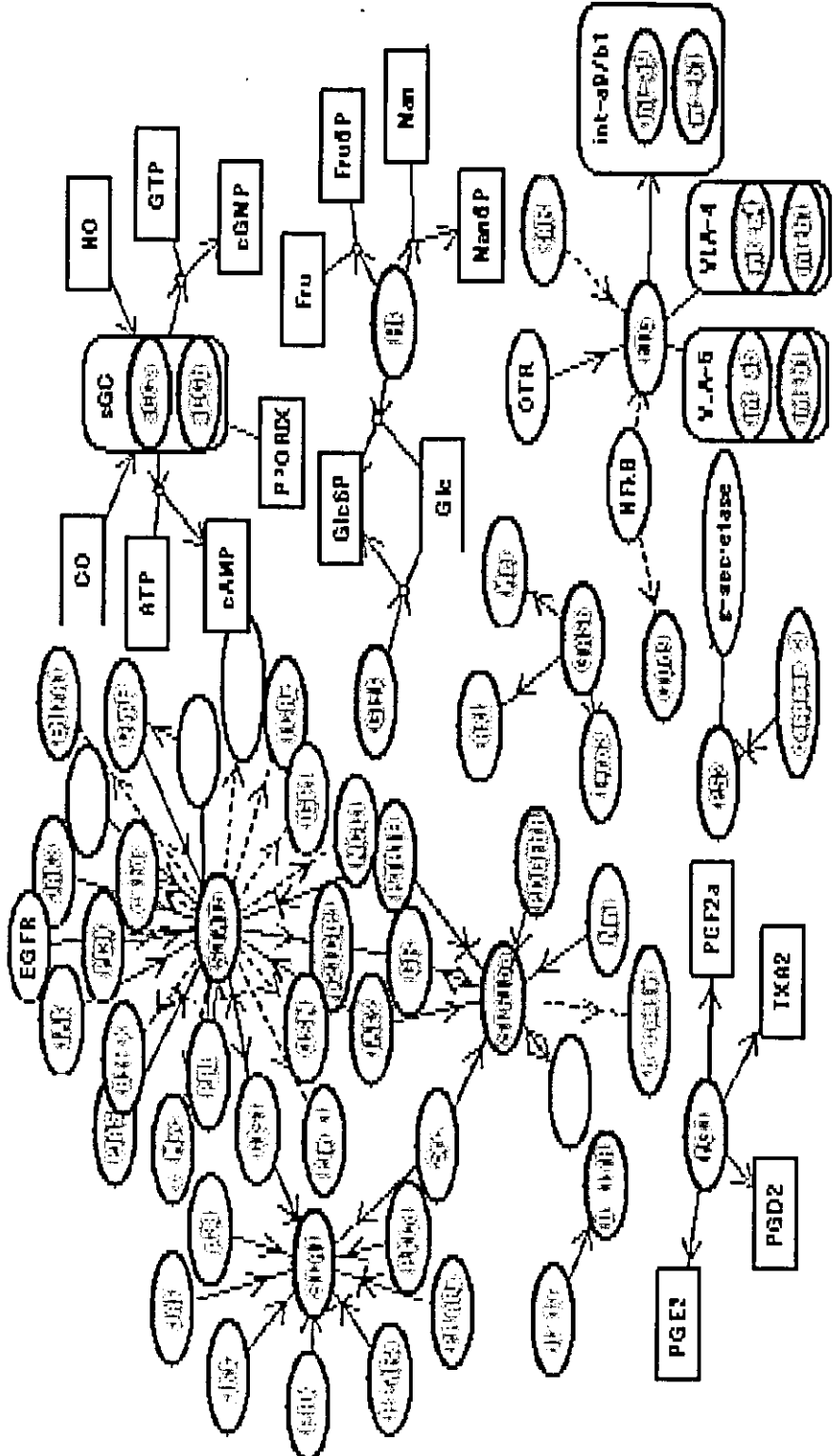
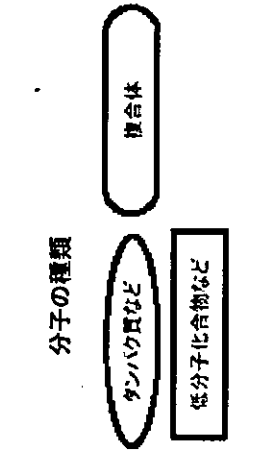


図2 各ホルモンに対して発現亢進した分子数

- ① EGFR
- ② beta-arrestin
- ③ caspase-3
- ④ desferrioxamine
- ⑤ EGFR kinase inhibitor
- ⑥ EPO
- ⑦ furosemide
- ⑧ cAMP response element-binding protein
- ⑨ cAMP response element-binding protein
- ⑩ G-protein-coupled receptor
- ⑪ G-protein-coupled receptor
- ⑫ G-protein-coupled receptor
- ⑬ G-protein-coupled receptor
- ⑭ G-protein-coupled receptor
- ⑮ G-protein-coupled receptor
- ⑯ G-protein-coupled receptor
- ⑰ G-protein-coupled receptor
- ⑱ G-protein-coupled receptor
- ⑲ G-protein-coupled receptor
- ⑳ G-protein-coupled receptor
- ㉑ G-protein-coupled receptor
- ㉒ G-protein-coupled receptor
- ㉓ G-protein-coupled receptor
- ㉔ G-protein-coupled receptor
- ㉕ G-protein-coupled receptor
- ㉖ G-protein-coupled receptor
- ㉗ G-protein-coupled receptor
- ㉘ G-protein-coupled receptor
- ㉙ G-protein-coupled receptor
- ㉚ G-protein-coupled receptor
- ㉛ G-protein-coupled receptor
- ㉜ G-protein-coupled receptor
- ㉝ G-protein-coupled receptor
- ㉞ G-protein-coupled receptor
- ㉟ G-protein-coupled receptor
- ㊱ G-protein-coupled receptor
- ㊲ G-protein-coupled receptor
- ㊳ G-protein-coupled receptor
- ㊴ G-protein-coupled receptor
- ㊵ G-protein-coupled receptor
- ㊶ G-protein-coupled receptor
- ㊷ G-protein-coupled receptor
- ㊸ G-protein-coupled receptor
- ㊹ G-protein-coupled receptor
- ㊺ G-protein-coupled receptor
- ㊻ G-protein-coupled receptor
- ㊼ G-protein-coupled receptor
- ㊽ G-protein-coupled receptor
- ㊾ G-protein-coupled receptor
- ㊿ G-protein-coupled receptor



fold change と色対応



分子リレーションの種類 (赤: 促進的, 青: 抑制的)

直線+ : 酵素反応等
 : その外

直線- : 抑制
 点線+ : 促進
 点線- : 抑制
 赤線+ : 促進
 赤線- : 抑制
 青線+ : 促進
 青線- : 抑制

虚線+ : 分子-メンバー
 虚線- : 複合体-構成要素

図3 Ethynyl estradiol 特異的活性化ネットワーク

Pathway

rank	name	score	frequency	selected
1	STATによる発現調節	69.375	0.295	0181
2	Proteinシグナル伝達	38.877	0.157	0208
3	IL-5シグナル伝達	21.595	0.070	0515
3	EPCシグナル伝達	21.595	0.070	0515
5	Tyrosineキナーゼシグナル伝達	20.078	0.042	1000
6	guanylate cyclase/可溶性シグナル伝達	18.727	0.070	0517
7	IL-3シグナル伝達	15.737	0.055	0237
8	Prostanoid receptorシグナル伝達	13.180	0.055	0154
9	GM-CSFシグナル伝達	12.794	0.042	0277
10	TGFシグナル伝達	12.320	0.042	0231

Gene Ontology

rank	name	score	frequency	selected
1	JAK-STAT cascade	20.381	0.384	0259
2	signal transduction	18.718	0.482	0015
3	protein modification	18.710	0.265	0049
4	neutrophil cell efferent	12.755	0.048	0286
5	cellular process	11.883	0.351	0029
6	proliferative metabolism	11.551	0.217	0049
6	proliferative metabolism	11.551	0.217	0049
8	cytokine cascade mediated signal transduction	11.212	0.024	0000
9	intracellular signaling cascade	11.052	0.253	0044
10	cell communication	10.445	0.464	0032

図4 Ethynyl estradiol 特異的活性化ネットワークのサマリー

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
板井昭子、菅野純	ドッキングモデルを用いた構造活性相関	井口泰泉 監修	環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発	シー・エム・シー出版	東京	2003	259-263
菅野 純	環境ホルモン		食品の安全性と確認	(株)サイエンスフォーラム	東京	2003	123-127
井上 達	化学物質と健康-低用量問題	井口泰泉 監修	環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発	Springer-Verlag Tokyo	東京	2003	3-10

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
Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S, Inoue, T, and Kanno, J	Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor.	Anal Sci.	20	611-616	2004
Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willileche 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
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
Inoue T	Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health	Pure Appl. Chem	75	2555-61	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
Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T	Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice	Exp Biol Med	29(6)	109-20	2004

環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発

Recent Aspect of Endocrine Disrupters

— Measurement, Examination and Equipments —

監修：井口泰泉 *Supervisor : Taisen Iguchi*

シーエムシー出版

環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発

第Ⅱ編 環境ホルモンの測定・分析・試験・機器開発

第2章 12 ドッキングモデルを用いた構造活性相関

(株)医薬分子設計研究所

板井昭子

国立医薬品食品衛生研究所 安全生物試験研究センター毒性部

菅野 純

12 ドッキングモデルを用いた構造活性相関

菅野 純*¹, 板井昭子*²

12.1 はじめに

ホルモン活性を有する化学物質 (Hormonally Active Chemicals, HACs) が存在することは周知の事実であり, HACsの一義的作用はホルモン受容体に結合し作用を発揮することであると考えられる。これに対して内分泌かく乱化学物質 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) は, HACsの中で生体に有害作用を及ぼすもの, すなわち受容体原性毒性を発揮するものということが出来る。ホルモン作用の強弱や有無を検討するスクリーニング試験の設定は可能であるが, 他方, 有害性を検討する試験法 (詳細試験) には受容体原性毒性を見極める性能が要求され, 後述の理由から現在のところ, 最適な方法はその開発を待つ状況にある。

12.2 スクリーニング・テスト・ストラテジー

暫定的に従来の多世代生殖毒性試験に代表される大型試験, 或いはその改良が考慮されるが, その実施には多大な費用と時間がかかるため多数の物質についての逐次実施は困難であると考えられている。そこで厚生労働省では, 内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種の化合物について, ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め, もって, 詳細試験に資する優先順位リストの作成及び詳細試験の開発を平行して行うこととした。現在までに国内外で行われたホルモン活性測定の結果は, その大半がエストロジェン, 或いは抗アンドロジェン作用物質であることを示してきた。一方, 甲状腺ホルモン受容体に直接的に結合して影響を与える可能性のある物質は殆ど見つかっていない。むしろ, 甲状腺ホルモン系に関しては, 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害物質が従来型の毒性試験によって検出されている。よって, 現在, EDCs問題の中心となっているのはエストロジェン様作用を発揮する化合物 (E物質) である。E物質の生体内での作用点の内, そのメカニズムの解析が進んでいるものを利用して, HACsのスクリーニング試験法が考案されている。スクリーニングの対象となる化合物が, 既存化学物質を含めて数万種類以上存在することから, 「受容体分子への結合性」を検討するスクリーニング試験法のひとつに, *in silico*による三次元構造活性相関 (Structure Activity Relationship, SAR) 手法を採用した。また, 「ホルモン受容体依存性蛋白合成誘導」を検討するスクリーニング試験法には, ヒト由来培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験法を採用した。これは, HeLa細胞にヒトERおよび応答遺伝子 (ルシフェラーゼ) を導入し, ハイスループットスクリーニングを実施するものである。さらに, 前述

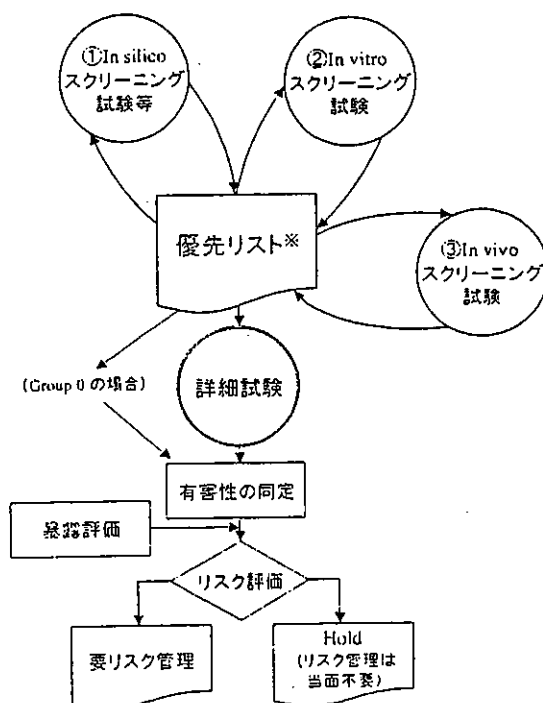
*1 Jun Kanno 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

*2 Akiko Itai (株)医薬分子設計研究所 代表取締役社長

の *in silico* 及び *in vitro* の系で認定されたホルモン活性が生体内において発揮されるか否かを検討する *in vivo* スクリーニング系には、E物質に関する子宮肥大試験 (Uterotrophic assay), アンドロジェン様物質に関するハーシュバーガー試験を採用した。これらの物質のホルモン活性の評価は、新たな科学的知見や、或いは将来的な手法の増強により、変動することが科学的に十分予想されるとの立場から、スクリーニング段階では化学物質の優先順位リストを提供するのみとし、その順位は逐次再評価の上入れ替えを行い、その上位のものから詳細試験に供するという構想を打ち立てた (図1)。新しい情報や試験結果により、時間とともにリストの内部構造が成熟して行く事となる。

リスト上位の化合物から逐次詳細試験を行い、有害性評価, 暴露評価を経てリスク評価を行い、「要リスク管理」物質及び「リスク管理は当面不要」物質にふるい分け, 前者については必要な措置を施し, 後者については新たな科学的知見により再評価が必要となるまで暫定的にholdする事となる (なお, 例外として, 農薬等, 多世代試験などの大型詳細試験がすでに実施されている物質については, 内分泌かく乱性の評価

に十分であると考えられるデータが伴っている場合のみ, 直ちに有害性評価, 曝露評価, リスク評価へと進むことが出来る。図1中Group 0)。詳細試験に関しては, 従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し, その改良, また従前の肉眼・組織形態所見の他, 遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れる試みを含むところの試験法開発を, 2005年を目標に進めているが, 現在筆者らは「一生涯試験」という概念を提唱し, その「部品」とみなしうる実験系の統合, 開発を開始した。



○ ①~③の試験を行った場合には, その結果を逐次優先リストに記録し, 並び替えを行う。

○ 優先リストの上位の物質から, 詳細試験を実施する。

○ 優先リストは, 今後新たに知見(作用メカニズム等)が得られた場合や新たな試験法が開発された場合に, それらをリスト構造に加え, 並び替えを進める。

※優先リスト内部構造

	物質名	In silico 試験等	in vitro 試験	in vivo 試験
Group 0 in vivo F-2841	...	○○○	●●●	●●●
Group 1 in vivo F-2841	...	○○○	●●●	●●●
Group 2 in vivo F-2841	...	○○○	●●●	●●●
Group 3 in vivo F-2841	...	○○○	●●●	●●●
Group 4 F-2841	...	○○○	●●●	●●●

12.3 *In silico*スクリーニングの位置付け

*In silico*予測は, エストロゲン受容体のように, 受容体構造が既知の場合には, 受容体にうまく

図1 試験法スキーム

埋り込む分子モデルを探すドッキングシミュレーションに基づくバーチャルスクリーニング法が有効との見地から、我々はこれのドッキングモデル(図2)を採用した一般的にはCoMFAと呼ばれる統計解析ベースの三次元定量的構造活性相関(3D-QSAR)の方法を用いることが多いが、これは、受容体の構造情報がない場合に、活性に必要な構造条件を推定するために有効と考えられる。このドッキングモデルを用いて、市販データベースACD(Available Chemical Directory)の約20万化合物等について、バーチャルスクリーニングを行った。1物質当たりの計算所要時間は、1~2分である。結果については暫時我々が並行して進めている表面プラズモン共鳴法(Surface Plasmon Resonance, SPR法)による無細胞系及び、Hela細胞を用いた応答反応系におけるデータとの照合・考察を進めているところである。殊に、SPR法によって、ER分子とDNA上のERE配列との結合解離、あるいはCofactor配列(LxxLL)との結合解離がリガンド依存的に変化することが明らかとなってきたが、LBDからDBDあるいはHelix 12を含むCofactor binding特性決定部位への構造影響、あるいはミュータント受容体の構造と結合活性の予測への拡張の可能性にも期待がもたれる。

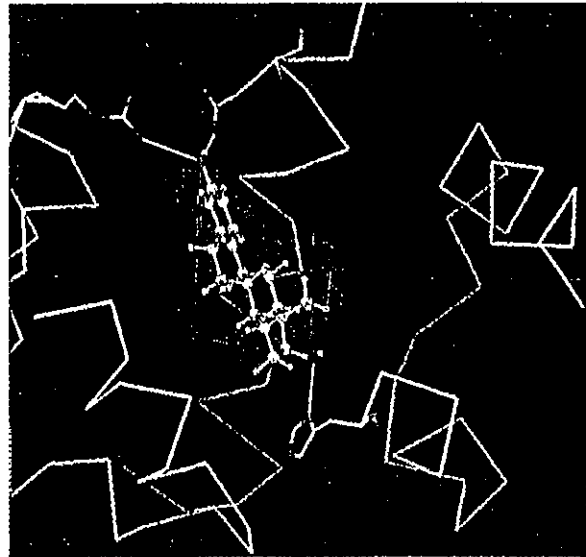


図2 ER α の結晶解析構造データを元にした17 β -estradiolがER α のLBDに収まったところの、アミノ酸骨格とリガンド結合ポケットの形状表示例

ドッキングシミュレーションでは、この様な低分子化合物の結合様式と蛋白質との分子間相互作用を計算することで、結合性の予測を行う。

12.4 エストロゲン受容体ドッキングモデル

現在までに、結晶構造が解析されており受容体の立体構造情報が利用可能なエストロゲン受容体 α と、エストロゲン受容体への結合能が報告されている既知の内分泌かく乱化学物質との相互作用様式とその強さを理論的に解析し、アゴニスト活性の予測・評価法を検討した。アンタゴニスト予測の試みも実施しており、その場合、Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型ER α のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ラロキシフェン(RAL)が結合している1err.pdbを使用した。いずれも、タンパク質座標に水素を付加し、タンパク質分子力場計算プログラムAMBERで付加した水素の構造の最適化・AMBER原子タイプ・原子電荷の割り振りを行った。さらに自動ドッキングプログラムAdam & Eveを実行する際に必要な水素結合情報