

厚生労働科学研究研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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 14～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 17(2005)年 4月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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 14～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 17(2005)年 4 月

研究報告書目次

目 次

I. 総合研究報告書

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  
スクリーニング法による内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究

菅野 純 ..... 1

スクリーニングデータ一覧

・ 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価 ..... 27

・ 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 ..... 49

・ レポーター遺伝子導入ヒト由来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 ..... 163

・ 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 ..... 243

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 321

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 323

別添 3

## 総合研究報告書

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による  
内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
総合研究報告書

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による  
内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究

主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

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係わる化学物質スクリーニングの実施と改良、開発を目的として(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共に、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る。さらに、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す。

(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 $\alpha$ 及び $\beta$ (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ )ドッキングモデルより結合様式と結合強度を予測する計算式を構築して約2万化合物の*in silico*スクリーニング計算を実施し、約15,000の物質について予測結果を得た。また、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により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。(2)培養細胞HTPS系では、3年間でER $\alpha$ 及びER $\beta$ 系において各200化合物、TR及びAR系において各100化合物の測定を行った。(3)表面プラズモン共鳴(SPR)HTPS系においては、既構築のER $\alpha$ 系において200化合物、ER $\beta$ 系については、系を新たに構築し100化合物の測定を実施した。

さらに、他の受容体や相互作用する因子との相互作用からのメカニズムの解析やその新規測定系について調査・検討するとともに、この課題での研究の国際的な進展状況についてWHO、OECDなどの国際会議への出席、関連研究機関への訪問などにより、関連情報の収集を行った。

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・センター長  
小野 敦・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・主任研究官  
板井昭子・医薬分子設計研究所・代表取締役

A. 研究目的

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

質について、内分泌かく乱性の観点から緊急に再評価する必要がある。我々は、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は、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 (Surface Plasmon Resonance 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測定することにより、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。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。これらの研究成果は、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、内分泌かく乱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た。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)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科学的諸要因に関する基礎的研究をさらに進め、内分泌かく乱の評価やメカニズム研究への有効応用を目指すものである。

## B. 研究方法

(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)

(1)-1. ドッキングモデルによる *in silico* スクリーニング系の構築

1. ドッキングに使用する受容体立体構造

### 1) ER $\alpha$

分担研究者らが開発してきた蛋白質-リガンドドッキングプログラムにおいては、蛋白質分子は剛体として扱われるためひとつひとつのリガンドの形状に合わせて結合キャビティが形状を変化させる現象(induced fit)は再現されない。エストロゲン受容体においては、helix12が結合するリガンド分子に応じて相互作用部位を変化させることが知られているが、このようなリガンド結合時の受容体構造変化はドッキング計算時に考慮されない。従って、多種多様な活性化合物のドッキングを成功させるためには、妥当な範囲でできるだけ大きいリガンド結合キャビティを形成している立体構造すなわちエストロゲン受容体においてはアンタゴニスト結合型の立体構造を使用する必要がある。今回は、Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型ER $\alpha$ 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を選択した。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) ER $\beta$

ER $\beta$ については、ICI164384が結合している結晶構造である1hj1.pdbを選択した。ER $\alpha$ の場合と同様に、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. ER $\alpha$ のリガンド結合ドメインとER $\beta$ のリガンド結合ドメインの比較

ER $\alpha$ とER $\beta$ 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

合キヤビティの形状比較・性質比較を行った。

### 3. 計算に使用した化学物質

#### 1) 結合強度予測式の評価に使用する活性既知化学物質

評価に使用する結合活性既知化学物質として *Endocrinology* 1998, 139 (10), 4252-4263 中から任意に選択した39化合物を使用した。各々の構造式を ISIS/Base に登録し、立体構造情報を含む構造式データベースを作成した。

#### 2) ER $\alpha$ への結合が予測された 100 化学物質

これまでの検討で ER $\alpha$  に対する結合活性を有すると推測された 100 の化学物質について再計算を実施した。1) と同様に各々の構造式を ISIS/Base に登録し、立体構造情報を含む構造式データベースを作成した。

#### 3) 結合強度予測の対象化学物質

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示された 58,591 の化学物質を対象とした。検討に先立って、提供されたデータベース中の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記載不備が目立った。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、より完成度が高いと考えられる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、EPA 提示化学物質のうち 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。これらを対象に検討を行った。

### 4. ドッキングに使用する三次元構造の準備 (低分子側)

3. で準備した各構造式データベース (二次元構造) から、低分子化合物三次元化プログラム Key 3D (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。

### 5. 各受容体と低分子化合物のドッキング計算

タンパク質-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タンパク質-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、タンパク質-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。

### 6. 結合強度予測式の評価

エストロゲン受容体に対する結合強度予測式として開発してきた式を利用した。これは、約 250 化合物の RBA (17 $\beta$ -エストラジオールに対する相対結合親和力) 測定実験データと、我々の計算手法によって独立して求められるタンパク質-リガンド間の結合自由エネルギーに寄与することが予測される各エネルギー計算値を用いて、各エネルギー項を独立変数、RBA の対数値を従属変数とした重回帰分析を行ない各項の重みを決定することにより得られた式である。今回は、この結合強度予測式の検証に *Endocrinology* 1998, 139 (10), 4252-4263 中から任意に選択した 39 化合物とそれらの ER $\alpha$  及び ER $\beta$  に対する RBA 値を使用した。相関の程度を確認した後、用いた文献測定値に合うよう更にスケールリングを行い、後の結合予測に利用した。

#### (1)-2. 遺伝子発現ネットワーク解析による、核内受容体パスウェイスクリーニング系の構築

##### 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、それぞれ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、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。

## 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) さらに、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。

i) 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

ii) 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

iii) DIFF 演算法: 複数のネットワークの差分を抽出する方法

(2) 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

(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)

Firefly Luciferase 遺伝子の upstream 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 $\alpha$  を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に且つ安定的に組み込ま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平成14年度に既存の化学物質約66物質についてER $\alpha$ を介するアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の測定を実施した。また、Firefly Luciferase 遺伝子の upstream 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 $\alpha$  又は 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、平成15年度に100物質についてER $\beta$ を介するアゴニスト活性を平成16年度に新たな100物質について、アゴニスト活性の測定を実施した。

## 1. 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 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 100nM, 10nM 及び 1nM とした。化合物は、終濃度が 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ 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

化学物質評価研究機構(当機構)にてクローニングしたヒト ER $\alpha$  coding cDNA 全長 (Genbank Accession No. M12674)及びヒト ER $\beta$  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 $\alpha$ /pcDNA3.1 及び hER $\beta$ /pcDNA3.1 を使用し



た。

## ii) レポータープラスミド

当機構にてクローニングした Rat  $\alpha_{2u}$ -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)を使用した。

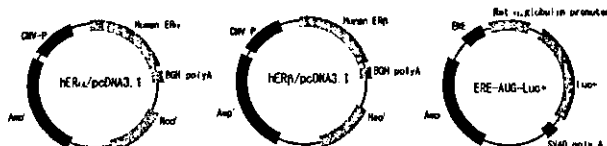


図1 本研究に用いた受容体発現プラスミド及びレポータープラスミド

## 3) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地(イーグル MEM ニッスイ) 4.7g、10%炭酸水素ナトリウム(10g→100mL) 9mL 及び 3% L-グルタミン(3g→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. ER $\alpha$ 及び ER $\beta$ agonist 検出系

### 2.1 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 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	100 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	10 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	100 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	10 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	NC	-	-	-	-	-	PC	-	-	-	-	-

NC: Negative control, DMSO; PC: Positive control, E2

## 2.2 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 $\mu$ L/well)

↓ 培養一晚(12 時間以上)

↓ Transfection 液調製

FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) 20  $\mu$ L

発現 Plasmid 2  $\mu$ g, レポーター-Plasmid 8  $\mu$ g

無血清培地 580  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM 及び DMSO 各 n=3 又は n=6)\*

↓ CO<sub>2</sub> 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 $\mu$ L $\times$ 2 回)

↓ 細胞溶解剤の添加(15 $\mu$ 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  $\mu$ L/well

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

## 2.3 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。

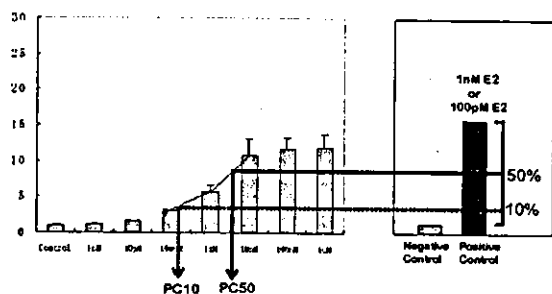


図 2 DATA 処理法模式図(PC10、50 の定義)

(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)

### 1. 受容体発現ベクターの構築

Androgen Receptor (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して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 (pZeoSV2 AR) とした。RXR 発現ベクターは、ヒト RXR $\alpha$  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 $\beta$  1 の遺伝子を組み込み、TR $\beta$  と RXR の 2 種類の受容体を共発現するベクター (pRXR-TR $\beta$ ) を構築した。

### 2. レポーター遺伝子ベクターの構築

AR レポーター遺伝子は、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ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) を組みこんだ pIND MCS-LUC に AR 応答

エレメント C3gene : AGTACGNNNTGTTCT 4 つを同じ向きに導入し、マルチクローニングサイトに Luc を導入して pIND ARE B-10 を作製し実験に供した。TR レポーター遺伝子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。(Figure 2) AR レポーター遺伝子と同様に pIND MCS-LUC に DR-4 エレメントを 4 個導入し、pIND-TRE-DR-4 を作成した。また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タケルシフェラーゼ発現ベクター pRL-TK (Invitrogen) を用いた。

### 3. AR 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 ウェ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  $\mu$ g の pZeoSV2AR、1.0  $\mu$ g pINDAREB-10、1.0  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL の Zeocin と Hygromycin を加えた M 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 5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン (5 $\alpha$ -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 ウェルプレートに 1 cell/well の割合で播種し、前述と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、ウミシタケルシフェラーゼ (Renilla Luc) を安定に発現し、さらに Luc 誘導活性の高さと安定性に優れた 1 つのクローン (AR-EcoScreen<sup>TM</sup>) を選抜し実験に供した。

### 4. AR レポーター遺伝子アッセイ

AR-EcoScreen 細胞を  $1 \times 10^5$  cell/mL の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 90  $\mu$ L/well で播種する。このときの培養メディウムは 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、及び標準物質を定められた各ウェルに 10  $\mu$ L 加え CO<sub>2</sub> 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せしめ、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。発光測定は ARVO.sx multilabelcounter (Wallac Berthold)を用いた。

アンタゴニスト測定は、培地に終濃度が  $5 \times 10^{-10}$  M となるように DHT を加えておき、DHT により活性化している Luc 発現の抑制能を評価する。発光強度の測定はアゴニストの測定と同様である。アンタゴニストの測定では、Renilla Luc の発現量も同時に測定し、化学物質による細胞への毒性の評価も同時に行う。

### 5. TR レポータージーンアッセイ

測定は Luc をレポーターとするレポータージーンアッセイシステムを用いた。これは、TR の活性化により TR response element の下流に存在する Luc 遺伝子の転写が活性化され、Luc の発光強度で TR 活性化の程度を評価するという仕組みである。TR にはいくつかのサブタイプが存在するが、本プロジェクトでは TR  $\beta$  を用いることとした。TR  $\beta$  は RXR (レチノイド X 受容体) とヘテロダイマーを形成して機能するという報告があるため、これら 2 つの核内受容体を共発現するシステムで測定を行った。アンタゴニスト活性は、あらかじめ一定濃度の T3 (3,5,3'-triiodo-L-thyronine、内在性 Thyroid hormone) を添加して Luc 遺伝子の転写を活性化しておき、化合物添加によりその活性がどの程度抑制されるかで評価した。また、アンタゴニストアッセイを行う場合、Renilla Luc 遺伝子も同時に細胞にトランスフェクションし、その Renilla Luc 活性がどの程度保持されているかで化合物の細胞毒性を評価した。

(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)

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。

(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)

#### 1. 化学品の調整

- ① 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°C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: スト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 MgCl<sub>2</sub>、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  $\alpha$ )

: Estrogen Receptor-alpha human recombinant (P2187, PANVERA 社)

- ① 化学物質を含む DMSO 溶液 1  $\mu$ l を 500  $\mu$ l のランニングバッファーで希釈する。
- ② ER を 80nM 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  $\mu$ l ずつサンプルチューブに取り、37°C、5 分間加温後、4°C 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  $\mu$ 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-tcgagcaaaagtcaggtcacagtcacgtgatcaat-3'

antisense ERE:

5'-attgatcaggtcactgtgacgtgactttgctcga-3'

ビオチン化 ERE を固定化するために、ストレプトアビジン(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。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  $\mu$ l を 105°C 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トレプトアビジンをブロックキングするために 1  $\mu$ 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 (KEKHKILHRLQD) 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。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. AO アッセイ

ヒト cathepsin D 遺伝子プロモーター領域のエストロゲンの ERE 周辺配列を含む合成オリゴヌクレオチド 5'-TTCGAGGGGGCCGGGCT GACCCGGAGCGGA ACTCTGCTCGACGGATT -3' をあらかじめ相補配列 5'-CCGCTCCGGGTC AGCCCGGCCCCCTCGAA-3' とアニーリングさせた後、ストレプトアビジンをコートしたセンサーチップに固定化したアダプターオリゴヌクレオチド 5' - Biotin-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' に約 220RU 程度ハイブリダイズして用いた。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。

#### 6. 化学物質の 3 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、TIF、及び AO 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、4 番目のフローセルに AO 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→4 と連続的に添加し、各々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、AO アッセイについてはフローセル4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 17 $\beta$  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 $\mu$ M ( $10^{-6}$ M)

サイクル5 対象化学物質 10 $\mu$ M ( $10^{-5}$ M)

サイクル6 対象化学物質 100 $\mu$ M ( $10^{-4}$ 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)。

$\% \text{ activation} = (\text{化学物質存在下の結合量} - \text{ネガティブコントロール結合量}) / (\text{ポジティブコントロール結合量} - \text{ネガティブコントロール結合量}) \times 100$

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。

(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)

#### 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クエンスについて検討し、最適な結合の得られた apol 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 $^{\circ}$ 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  $10^{-5}$ ~ $10^{-8}$ 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(BIA evaluation 3.0(BIACORE AB)及び JMP ver.3 (SAS institute))を用いた。

### C. 研究結果

#### (1)内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価

##### (1)-1. ドッキングモデルによる *in silico* スクリーニング系の構築

##### 1.ER $\alpha$ に対するドッキング計算

##### 1)スコア式の評価

Endocrinology 1998, 139 (10), 4252-4263 中から任意に選択した 39 化合物を使用して、スコア式の評価を行った。相関係数(R)は 0.73 であった。今回使用した検証データに合うようスケールリングを行なった結果、以下の①式を得た。

$$\log RBA(ER\alpha) =$$

$$-1.668GBelc-0.448GBrep-0.229GBcnf-0.148Desolv-4.749 \quad \textcircled{1}$$

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、タンパク双方の複合体形成に伴う脱溶媒和寄与

検証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。

##### 2) ER $\alpha$ への結合が予測された 100 化学物質の結合スコア

①式を利用して、これまでに ER $\alpha$  への結合が予測された化合物群から任意に選ばれた 100 化学物質について、ER $\alpha$  への結合活性値予測を行った。結果を表2. に示した。

##### 3) EPA 化合物リストから選択した化学物質の三次元構造準備(平成 14 年度)

58,591 化学物質のうち、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った。三次元化にはプログラム Olive (現 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ものが 153 分子あった。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 17,732 分子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。

##### 4) 化合物リストから選択した化学物質の ER $\alpha$ との結合様式の探索

プログラム Adam を用いて ER $\alpha$  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)や芳香族環をまった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 2,097 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 15,635 分子について結合様式探索を実行した結果、14,493 の化学物質について ER $\alpha$  との複合体構造が得られた。

##### 5) 化合物リストから選択した化学物質の ER $\alpha$ との結合活性予測

Adam で得られた各受容体-リガンド複合体構造について、プログラム Bluto による分子力場を用いた複合体でのエネルギー極小化計算を実行した。次いでプログラム 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 $\alpha$  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 化合物についてその CAS 番号と推定活性値を表3. に示した。

##### 2. ER $\alpha$ のリガンド結合ドメインと ER $\beta$ のリガンド結合ドメインの比較

ER $\alpha$  と ER $\beta$  のリガンド結合ドメインの構成アミノ酸配列比較を行い、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 $\alpha$  及び  $\beta$  の結

晶構造のうち、1ere.pdb(ER $\alpha$ と17 $\beta$ -エストラジオールの共結晶構造)と1qkm.pdb(ER $\beta$ 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 $\alpha$ でのLeu384及びMet421が、ER $\beta$ 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僅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みられなかった。

ER $\alpha$ とER $\beta$ 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 $\beta$ に対するドッキング計算

#### (1)スコア式の評価

Endocrinology 1998, 139 (10), 4252-4263 中から任意に選択した 39 化合物を使用して、スコア式の評価を行った。相関係数(R)は0.66でありER $\alpha$ の場合より低下した。使用した検証データに合うようスケーリングを行い、以下の②式を得た。

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

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、蛋白双方の複合体形成に伴う脱溶媒和寄与

#### 2) ER $\alpha$ への結合が予測された 100 化学物質の ER $\beta$ との結合スコア

②式を利用して、これまでに ER $\alpha$ への結合が予測された化合物群から任意に選ばれた 100 化学物質について、ER $\beta$ への結合活性値予測を行った。結果を表4. に示した。

#### 3) 化合物リストから選択した化学物質の三次元構造準備(平成16年度)

前述したとおり、正確な構造式が入手できた 19,667 の化学物質の三次元構造への変換を行った。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。

#### 4) 化合物リストから選択した化学物質の 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。

#### 5) 化合物リストから選択した化学物質の ER $\beta$ との結合活性予測

Adam で得られた各受容体-リガンド複合体構造について、プログラム Bluto による分子力場を用いた複合体でのエネルギー極小化計算を実行した。次いでプログラム 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 化合物についてその CAS 番号と推定活性値を表5.に示した。

#### (1)-2 遺伝子発現ネットワーク解析による、核内受容体パスウェイスクリーニング系の構築

##### 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、分子数が少なかったため、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レセプター(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, DHTR8hD10, 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”及び“threonine 代謝”の一部が活性化していた。

## (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

### 1. 安定株 ER alpha agonist 検出系

本実験系にて ER  $\alpha$  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 14 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。

IC50 [nM]	IC50 [pM]	IC50 [nM]	IC50 [pM]	IC50 [nM]	IC50 [pM]	IC50 [nM]	IC50 [pM]
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422

### 2. 安定株 ER $\alpha$ antagonist 検出系

本実験系にて ER alpha アンタゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果、以下の 1 物質のみに IC50 が算出された。

IC50 [nM]	IC50 [pM]	IC50 [nM]	IC50 [pM]
0.150144220	150.14422	0.150144220	150.14422

しかしながら、本物質では、ER  $\alpha$  安定形質株細胞のルシフェラーゼ活性の阻害がみられた用量域において Control 細胞でも同様にルシフェラーゼ活性の阻害が認められ、今回、Malachite green base にみられた ER  $\alpha$  アンタゴニスト作用は、細胞毒性に伴う False positive 反応と考えられた。従って、今回、実験に供した物質の中には ER  $\alpha$  に対するアンタゴニスト活性を有する化合物はないものと推察された。

### 3. ER $\beta$ agonist 検出系

100 物質について本実験系にて ER  $\beta$  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。



ATC No.	Chemical Name	PC10	PC50	PC100
N150001	1,4-bis(4-phenylphenoxy)butane	17.41	1.02E-01	
N150002	1,4-bis(4-phenylphenoxy)ethane	4.04E-02	1.02E-01	
N150003	1,4-bis(4-phenylphenoxy)propane	1.11E-01	1.02E-01	
N150004	1,4-bis(4-phenylphenoxy)hexane	5.82E-02	1.02E-01	
N150005	1,4-bis(4-phenylphenoxy)octane	1.11E-01	1.02E-01	
N150006	1,4-bis(4-phenylphenoxy)decane	1.11E-01	1.02E-01	
N150007	1,4-bis(4-phenylphenoxy)dodecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150008	1,4-bis(4-phenylphenoxy)tetradecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150009	1,4-bis(4-phenylphenoxy)hexadecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150010	1,4-bis(4-phenylphenoxy)octadecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150011	1,4-bis(4-phenylphenoxy)icosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150012	1,4-bis(4-phenylphenoxy)docosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150013	1,4-bis(4-phenylphenoxy)tricosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150014	1,4-bis(4-phenylphenoxy)pentacosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150015	1,4-bis(4-phenylphenoxy)heptacosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150016	1,4-bis(4-phenylphenoxy)nonacosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150017	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150018	1,4-bis(4-phenylphenoxy)hentriacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150019	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150020	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150021	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150022	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150023	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150024	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150025	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150026	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150027	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150028	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150029	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150030	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	

#### 4. ERα 及び ERβ agonist 検出系

100 物質について本実験系にて ERα 及び ERβ アゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果、PC10 が検出された物質は、ERα のみについて 21 物質、ERβ のみについて 2 物質であり、両者共に PC10 が検出された物質は、8 物質であった。この 8 物質中では、ERα に選択性の高いもの(5 倍以上濃度差のあるもの)3 物質、ERβ に選択性の高いもの 1 物質、同等のもの 4 物質であった。ERβ のみ検出された物質の中には 6-hydroxyflavanone があり、植物エストロゲン(Phytoestrogen)が ERβ に選択性が高いことと一致している。比較的強いアゴニスト活性(PC50)を有する物質は、ERα のみについて 1 物質、ERβ のみについてはなく、両者共に有する物質は、2 物質であった。

ATC No.	Chemical Name	PC10	PC50	PC100
N150031	1,4-bis(4-phenylphenoxy)butane	17.41	1.02E-01	
N150032	1,4-bis(4-phenylphenoxy)ethane	4.04E-02	1.02E-01	
N150033	1,4-bis(4-phenylphenoxy)propane	1.11E-01	1.02E-01	
N150034	1,4-bis(4-phenylphenoxy)hexane	5.82E-02	1.02E-01	
N150035	1,4-bis(4-phenylphenoxy)octane	1.11E-01	1.02E-01	
N150036	1,4-bis(4-phenylphenoxy)decane	1.11E-01	1.02E-01	
N150037	1,4-bis(4-phenylphenoxy)dodecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150038	1,4-bis(4-phenylphenoxy)tetradecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150039	1,4-bis(4-phenylphenoxy)hexadecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150040	1,4-bis(4-phenylphenoxy)octadecane	1.11E-01	1.02E-01	
N150041	1,4-bis(4-phenylphenoxy)icosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150042	1,4-bis(4-phenylphenoxy)docosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150043	1,4-bis(4-phenylphenoxy)tricosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150044	1,4-bis(4-phenylphenoxy)pentacosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150045	1,4-bis(4-phenylphenoxy)heptacosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150046	1,4-bis(4-phenylphenoxy)nonacosane	1.11E-01	1.02E-01	
N150047	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150048	1,4-bis(4-phenylphenoxy)hentriacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150049	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150050	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150051	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150052	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150053	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150054	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150055	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150056	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150057	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150058	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150059	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	
N150060	1,4-bis(4-phenylphenoxy)triacontane	1.11E-01	1.02E-01	

### (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

#### 1. AR レポーター遺伝子アッセイ

##### 1.1 スクリーニングシステムの評価

本研究で開発したアッセイ法を AR のアゴニスト

である DHT 等を用いて評価したところ、PC10 (10% of positive control) 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られた。また、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、DHT 添加コントロールの転写活性の 20% 低下(IC20)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。つまり、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った。

#### 1.2 AR アゴニスト活性ポジティブの化合物

本アッセイ法を用いて 100 物質についてアゴニスト活性を測定した結果、PC10 を算出することができた物質について、その結果を Table 1 に示す。Methyltestosterone, (PC10 = 6.48 × 10<sup>-11</sup>) や Stanolone (PC10 = 1.59 × 10<sup>-11</sup>) などの Androst-4-ene-3,17-dione (PC10 = 1.46 × 10<sup>-11</sup>) の類似体、3 種類については PC10 が 10<sup>-10</sup> 以下という非常に強いアゴニスト活性であった。また、Progesterone (PC10 = 8.43 × 10<sup>-8</sup>) 及びその類似化合物である Norethiridrone (PC10 = 2.15 × 10<sup>-10</sup>) や D(-)-Norgestrel (PC10 = 1.20 × 10<sup>-10</sup>) についても強いアゴニスト活性を認めた。また、非常に弱い活性を示した物質として chalcone 及びその誘導体、フラボン類、ベンゾフェノン誘導体があった。

#### 1.3 AR アンタゴニスト活性

測定対象とした 100 物質について、IC20 以上を算出することができた AR アゴニスト活性物質の結果を Table 2 に示す。IC50 が算出できたものについては、IC40 以下を算出せず、以下同様に算出できたものより下位の IC は算出していない。IC20 以上が算出できた物質は 31 物質、そのうち IC50 が算出できた物質は 18 物質あった。比較的強いアンタゴニスト作用が認められた物質には Progesterone やビスフェノール類やベンゾフェノン類があった。

#### 2. TR レポーター遺伝子アッセイ

##### 2.1 スクリーニングシステムの評価

内在性のサイロイドホルモンである T3 をコントロールとした実験では、その Luc 活性が Basal レベルから 15-20 倍に活性化されることが示され、このレポータージーンアッセイシステムを用いて TR 攪乱作用を持つ化合物を十分にスクリーニングできることが明らかとなった。

## 2.2 TR アゴニスト活性ポジティブの化合物

平成 15、16 年度において、それぞれ 50 化合物ずつ、計 100 化合物に対して TR アゴニストアッセイを行った。このうち、平成 15 年度には 5 化合物 (TR012、TR017、TR018、TR020、TR021)、平成 16 年度には 2 化合物 (AT061、AT087) に明確な TR アゴニスト活性が認められた。平成 15 年度の 5 化合物はいずれも本来の TR リガンドである T3 の誘導体であったが、平成 16 年度の 2 化合物はこれまでに TR 攪乱作用の報告がない化合物であった。

## 2.3 TR アンタゴニスト活性ポジティブの化合物

上述の 100 化合物に対して TR アンタゴニスト活性の有無も同時に評価した。このうち、2 つの化合物は弱いながらも TR アンタゴニスト活性を示した。(平成 15 年度:TR024、平成 16 年度:AT098)。

## (2)-3. 超高速選別法(HTPS)の検証の評価に関する調査研究

調査の結果、以下の 3 点に焦点を当てた超高速選別法が求められている。

### 1. 胎児・新生児における臨界点ウインドウと用量問題に関連した研究課題

この点については、環境中のホルモン様活性をもつ異物の臨界点ウインドウとして知られる胎児・新生児に特異的に関連した内分泌かく乱現象の検出を可能とする超高速選別法の開発が求められており、とりわけその中では、閾値の有無、低用量域における連続性もしくは非連続性反応の如何さらに早期臆開口やエピジェネティック発がんリスクの昂進など、老化機構とリンクした諸問題をカバーする試験法開発の可能性の検討。

### 2. 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の課題

芳香族炭化水素受容体シグナルと ER の転写活

性との間の相互作用が見出されるに至り、低用量における様々の発現遺伝子の変化が引き起す要因検索のハイスループット化が重要性を帯びている。

### 3. 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、トキシコゲノミクス樹立の課題

前項における遺伝子発現検索の問題点とも相まって、発現遺伝子の網羅的解析によるハイスループットの可能性も検討の対象となりつつある。膜受容体の発見は、本研究における未知部分の想定的重要性を明らかにしたが、トキシコゲノミクスの導入に際しては、この点でのデータの取扱いの配慮が肝要である。実際問題、トキシコゲノミクス手法は、これまで問題になってきた相加性、相乗性などを含む検索への期待が寄せられており、この点からもここに挙げた課題のハイスループット化は特に重要である。

### (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

#### 1. アッセイの条件検討

ER $\alpha$  及び ER $\beta$  について、それぞれスクリーニングを効率良く行うために ERE アッセイと TIF アッセイを同時に実施できるランニングバッファー、ER の反応時間、再生溶液などを至適化し、二つのアッセイの反応性を検証した。再現性の高いスクリーニング法とするために、センサーチップの再生条件、洗浄操作プロトコール等を検討した。

#### 2. アッセイの検証

ERE アッセイ及び TIF アッセイの再現性を確認するために、アッセイバリデーションを行った。ポジティブコントロール(100nM E2)とネガティブコントロール、(DMSO、終濃度 0.1%)を交互に繰り返す計 16 サイクル繰り返す測定を行った。ERE アッセイ、TIF アッセイでポジティブコントロールの平均値は各々 99.98%、100.14%、標準偏差は 4.68%、3.14%という非常に高精度の結果が得られ、これら 2 つのアッセイの再現性の高さが示された。両アッ

セイにおいて、ER の結合活性低下の補正法の妥当性、サイクルを繰り返したときのベースラインの安定性についても合わせて検証した。16 サイクルのアッセイを繰り返したときの ER の結合活性の変化は線形一次近似式でフィッティングすると相関係数  $R^2$  は 0.99 以上であり、この活性の補正法は妥当であることが示された。ER  $\beta$  についても同様のアッセイバリデーションを行った。

### 3. 化学物質のスクリーニング

ER  $\alpha$  を用いて 200 種類の化学物質のスクリーニングを行った。その結果から相対結合活性化度を判定基準として化学物質を分類した。100nM において E2 を 100% として、各化学物質の相対活性化度を求めた。また ERE アッセイと TIF アッセイの結果比較から、化学物質による作用点の違いも検出できることが示された。次にこの中から 100 種類の化合物を選択し、ER  $\beta$  を用いてスクリーニングを実施し、2 種類のレセプターの反応性を比較した。

### 4. アゴニストとアンタゴニストの判定

ERE アッセイでは、E2 の結果に対して、17 $\alpha$  エストラジオール、ジエチルstilbestロール (DES)、タモキシフェン、男性ホルモンのプロゲステロンの場合には、センサーグラムの形は明らかに異なり、化学物質により ER と ERE の反応速度に違いがあることが認められた。

### (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

#### 1. ER $\beta$ 受容体測定条件の最適化;

ER  $\beta$  は ER  $\alpha$  に比べタンパク立体構造が不安定であることが示唆されたため、測定条件の最適化にあたり、はじめにタンパクを安定化させることが知られる因子の効果について検討を行った。その結果、BSA (Bovine Serum Albmine) 及び TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl)Phosphine, Hydrochloride) それぞれが ER  $\beta$  構造安定化に有効であり、また、これらを組み合わせて添加することでより効果的に機能することが示された。最適化された測定バッファー条件は、Tricine 25mM (pH7.8), KCL 150mM,

MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, Tween20 0.05%, BSA 5  $\mu$  g/ml, TCEP 5nM、また化合物と ER タンパクのインキュベーションは、30°C、5min とし、以下の検討を行った。

#### 2. 17 $\beta$ -Estradiol (E2) 濃度依存性の検討;

新たに最適化された測定条件下において、ER  $\beta$  と ERE 及び LxxLL 相互作用の E2 濃度依存性について検討した。ER-ERE 相互作用は、pS2 プロモーター由来の ERE を用いて検討を行った。ER  $\beta$  は ER  $\alpha$  に比べ ERE からの解離が遅いことが示された。一方、ER  $\beta$ -LxxLL 相互作用の結合解離センサーグラムは、ER  $\alpha$  とほぼ同様、E2 結合により ER  $\beta$  もまたコファクターと強く相互作用することが示された。ER  $\beta$ -ERE、ER  $\beta$ -LxxLL 相互作用の見かけの EC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 9.0nM、4.0nM と見積もられた。

#### 3. エストロゲン受容体作用物質による ER $\beta$ 相互作用の検討;

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

#### 4. 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、通常の測定条件においてER $\alpha$ 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。その結果、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。

#### 5. 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 apol 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

##### (1) 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価 (1)-1. ドッキングモデルによる *in silico* スクリーニング系の構築

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ャ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。今回使用した各プログラムは、常に改良されており、例えば、低分子化合物の構造式から三次元構造を得る際に使用するプログラムである Key3D (旧称 Olive) の場合、Olive3.20 (2002.07.ver.、ER $\alpha$  とのドッキング計算用に使用) では、19,667 化学物質中 153 の物質についてパラメータ不足等の問題により三次元化できなかったが、Key3D3.50 (2004.06.ver.、ER $\beta$  とのドッキング計算用に使用) では三次元化に失敗した物質数は 77 まで減少し、より多くの化学物質の三次元化に成功した。Key3D3.50 でも三次元化できなかった化学物質はその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。

今回、計算対象とした ER $\alpha$  と ER $\beta$  のリガンド結合部位は、図 4. に示されているとおり非常に似通っており、キャビティの形状及びその静電的・疎水的環境に大きな変化はないように思われる。このことから、ER $\alpha$  の結合親和性予測に使用した各項のバランスは、ER $\beta$  にも応用可能であると判断された。ER $\beta$  の結晶構造を使用した検討の結果、文献記載の結合活性値と計算によって得られた推定結合活性値の相関係数 (R) は 0.66 であった。今後、ER $\beta$  に対する統一された結合実験結果が得られれば ER $\alpha$  の場合と同様の手法で ER $\beta$  にさらに特化した結合親和性予測式が得られると期待される。また今回は、ER $\beta$  の結晶構造として ICI164384 が結合した 1hjl.pdb を使用した。これは他の結晶構造での検討と比較した結果、最も文献記載の結合活性値との相関が良かったためであるが、この結晶構造では結合している ICI164384 に比較してもキャビティが広がっている。これが結晶構造解析上のアーティファクトであるかこの構造自体が ER $\beta$  の特徴のひとつでありそれにより ER $\alpha$  よりも大きなリガンドを結合し得るのかは現在のところ不明である。これまで述べたよ