

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群
に着目した化学物質の
毒性発現機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究
(H17-化学-一般-007)

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高木 篤也

平成 19(2007)年 3 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

生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群に着目した化学物質の毒性
発現機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究(H17-化学-一般-007)

平成 18 度 総括研究報告書

主任研究者 高木 篤也

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群に着目した化学物質の毒性発現
機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究 1
高木 篤也

II. 分担研究報告書

1. 核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の
開発 139
小野 敦
2. 受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究 151
小原 有弘
3. 核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究 161
板井 昭子
4. 超高速分析法の検証と評価に関する調査研究 181
菅野 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 187

IV. 研究成果の刊行物・別刷 189

別添 3

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書

生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群に着目した化学物質の
毒性発現機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究

主任研究者 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

本研究では、これに先立つ研究結果をもとに厚生労働省「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」において提案された「試験スキーム」に沿って要求される内分泌かく乱化学物質大規模スクリーニングを実施するとともに、これまでの研究結果をもとに内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体作用について、化学物質と受容体、応答 DNA 配列及び転写に関わる共役因子との相互作用、さらには受容体制御下にある遺伝子発現への影響について解析を行い、得られた結果をこれまで開発を進めてきた細胞系スクリーニング法や *in silico* 手法へフィードバックすることで、分子標的における作用メカニズムに基く見落としのないスクリーニング系とするとともに、より科学的なメカニズム解析による次世代評価系への応用を目的としている。

本年度は、(1)内分泌かく乱化学物質等核内受容体作用化学物質のハイスループット・スクリーニングのうち、レポータージーンアッセイの実施においては、ER α 、ER β 系について *in silico* 計算により活性が予測された化合物を中心に各 71 物質についての転写活性測定を、AR 及び TR 系については、それぞれ 50 物質についての測定を実施した。また、ER α アゴニストアッセイ系については、OECD においてガイドライン化に向けた作業を行い、現在、ピアレビューが実施されている。一方、*in silico* スクリーニング系においては、これまでの ER α 、ER β 系に関する研究成果をもとに、同じく内分泌かく乱化学物質の作用の標的であるアンドロゲン受容体(AR)に対し、化学物質の結合強度予測を実施した。(2)核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発では、SPR 系による相互作用因子探索により、新たにアゴニスト型 ER との相互作用が認められた 2 配列について、28 化合物の SPR スクリーニングアッセイを実施してその有用性について確認した。(3)受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株 10 種を選定し、47 種の核内受容体遺伝子発現解析を実施した結果、核内受容体遺伝子発現解析による細胞のキャラクタライズが可能であることが示唆された。(4)核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究では、核内受容体 PPAR α リガンドである、clofibrate 投与による遺伝子発現変動による分子ネットワークを生成し、その分子ネットワークに対するカノニカルなパスウェイ、病態イベント、生体イベント、Gene Ontology に関するプロファイリングを行い、フェノタイプの変化が顕著でない比較的低用量の化合物の毒性予測に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

多くの化学物質が生物の内分泌系をかく乱し、野生生物及びヒトの健康に影響を及ぼすことが懸

念されている。その一方、我々の現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用しているため、これらの化学物質の生体影響について早急に調査

する必要がある。このため、各国で提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無をスクリーニングする手法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良及び新規スクリーニング系の開発を行うための研究を平成10年度からスタートし、これまでに信頼できる系を構築するとともに、トータルで約 500 化合物についての測定を行い、詳細試験実施のための優先順位付けのためのスキームの構築を進めてきた。さらに、内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を原子レベルで理論的に解析する *in silico* ドッキングモデルを確立し、超高速スクリーニング法を開発した。これに合わせ、新規スクリーニング手法として表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)によるホルモン受容体に対する結合・解離等に関するデータの高速取得技術の開発を行い、*in vitro* における受容体と結合物質との相互作用情報から、受容体におけるアゴニスト効果/アンタゴニスト効果(障害)の予測や、共役因子との相互作用解析から化合物を分類可能であることが示され、化学物質ごとに特異の生体反応や臓器特異性がその作用ターゲットである受容体と他の細胞内因子との相互作用解析から検出可能であることを示した。本研究では、内分泌かく乱化学物質問題の解決に向けて厚生労働省「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」における「試験スキーム」に沿って要求される大規模スクリーニングを実施するとともに、内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体について、標的分子及び転写に関わる共役因子との相互作用への影響や受容体制御下にある遺伝子発現への影響を解析し、得られた結果をこれまでに開発してきたHTPSやQSARへフィードバックすることにより、生物システムにおける反応を迅速に評価するための技術として確立することにより内分泌かく乱性を始めとした化学物質の生体作用評価やメカニズム研究への有効応用を目的としている。

B. 研究方法および研究結果

(1) 内分泌かく乱化学物質等核内受容体作用化

学物質(以下、核内受容体作用物質)のハイスループット・スクリーニングの実施(主任研究者:高木篤也、分担研究者:菅野純、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

本年度は、ER α / β 系については *in silico* 計算により活性が予測された化合物を中心に各 71 物質についての測定を行い ER α / β サブタイプに対する応答性について解析した。また、AR 及び TR 系については、それぞれ 50 物質についての測定を実施した。ER α アゴニストアッセイ系については、OECD VMG-NA においてガイドライン化に向けた作業を行い、現在、ピアレビューが実施されている。一方、*in silico* スクリーニング系においては、昨年度までは、コンピュータスクリーニング法 ADAM を中心とした手法を用いて、三次元構造情報に基づくエストロゲン受容体 α (ER α) 及びエストロゲン受容体 β (ER β) に対する化学物質の結合様式の推定と結合強度予測式を利用した活性値予測を行ってきた。今年度の研究では、これまでの研究成果をもとに、同じく内分泌かく乱物質の作用の標的であるアンドロゲン受容体 (AR) に対し、化学物質の結合強度予測を実施した。

(1)-1. エストロゲン受容体 α / β サブタイプに対する応答性に関する研究 (主任研究者:(財)化学物質評価研究機構(CERI)委託業務)

本研究では Firefly Luciferase 遺伝子上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid とヒトエストロゲン受容体 (ER) alpha 又は beta サブタイプ蛋白を常時発現するための受容体発現 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本年度 71 物質の測定を実施した。

研究方法:

供試化学物質

付録 1 に示した。

試薬の調製

1) 化合物原液の調製

各化合物は国立医薬品食品衛生研究所にて 10 mM に調製された試料を用いた。ただし、ER792、808、829、830、831、832 及び 842 の 7 化合物については原粉で提供されたため、秤量した後、10mM となるように Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。10mM に調製した化合物は DMSO にて 1/10 希釈を行い 1mM, 100µM, 10µM, 1µM, 100nM 及び 10nM とした。化合物は終濃度が 10 µ M, 1µM, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM 及び 10pM となるように EMEM-10%FBS 培地に添加した (DMSO 終濃度:0.1%)。

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) 女性ホルモン受容体 (ER) 発現プラスミド

CERI 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 α /pcDNA3.1 及び hER β /pcDNA3.1 (図 1) を使用した。

ii) レポータープラスミド

C E R I にてクローニングした Rat alpha2u-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。

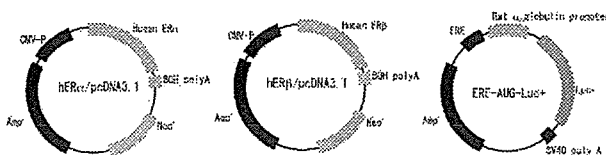


図 1 本研究に用いた受容体発現プラスミドおよびレポータープラスミド

3) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地 (イーグル MEM ニュッスイ) 4.7 g、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) Steady-Glo Luciferase Assay Reagent の調製

Steady-Glo ルシフェラーゼ活性測定試薬 (Steady-Glo Luciferase assay system, Promega) を使用した。Steady-Glo Luciferase Assay Substrate 1 vial に Steady-Glo Luciferase Assay buffer 1 vial 全量を直接加えて溶解した。

ER α 及び ER β アゴニスト検出系

1) Assay プレート上のサンプル配列

以下の plate format に従い、被験物質、Negative Control (DMSO) 及び Positive Control (1nM の E2) を添加した。

	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 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	100 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	10 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	100 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	10 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	NC	-	-	-	-	-	PC	-	-	-	-	-

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

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 (104/50µL/well)

↓ 培養一晚(12 時間以上)

↓ Transfection 液調製

FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) 20µL

発現 Plasmid 2µg, レポーター Plasmid 8µg

無血清培地 580 µL

↓ 15 分間静置

↓ total 1 mL になるよう無血清培地添加
 ↓ 各 well に 50 μ L ずつ添加
 ↓ インキュベータ内 2 時間静置
 ↓ 化合物の添加(終濃度 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM 及び DMSO 各 n=3 又は n=6)*
 ↓ CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)
 ↓ 培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L \times 2 回)
 ↓ 細胞溶解剤の添加(15 μ L/well)
 ↓ 10 分間室温で静置
 ↓ ルミノメータによる発光測定
 注入量 : 50 μ L/well
 測定時間: 注入 1 秒後~5 秒間(100msec \times 50interval)の積算

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 1nM 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 1nM E2)の 10%の値を与える濃度(PC10)及び 50%の値を与える濃度(PC50)を 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

PC10 が算出されない化合物はエストロゲン活性陰性(-)と判定した。

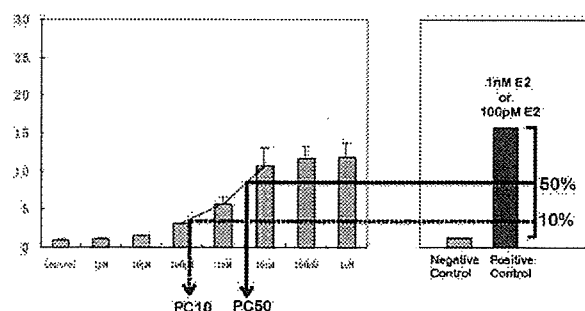


図 2 DATA 処理法模式図(PC10、50 の定義)

研究結果:

ER α 及び ER β agonist 検出系

ER α / β アゴニスト活性有無の要約及び ER α あるいは ER β でアゴニスト活性を示した物質の一覧をそれぞれ表 1 及び表 2 に示す。また、全 71 物質の試験結果を付録 1 に示す。

71 物質について本実験系にて ER α 及び ER β 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、ER α のみについて 9 物質、ER β のみについて 6 物質であり、両者共に PC10 が検出された物質は、14 物質であった。この 14 物質中では ER α に選択性の高いもの (PC10 に 5 倍以上濃度差のあるもの) が 3 物質、ER β に選択性の高いものは 1 物質、同等のものは 10 物質であった。

ER α のみ、あるいは ER β よりも強い活性 (PC10 が 5 倍以上小さい) を示した物質としては phosphate 類以外に構造的特徴は認められなかった。一方、ER β のみ、あるいは ER α よりも強い活性 (PC10 が 5 倍以上小さい) を示した物質は、flavone/isoflavone 骨格を有する phytoestrogen 類及び diphenylethylene 骨格を有する物質であった。PC50 が算出された物質は ER α では 14 物質、ER beta では 6 物質であり、これらのうちいずれのサブタイプに対しても PC50 が算出された物質は 4 物質であった。また、今回試験を実施した 71 物質のうち、最も強い活性を示した物質は ER α 及び ER β ともに triphenylethylene 骨格を有する Bromotriphenylethylene (ER838) であった。

(1)-2. アンドロゲン、甲状腺受容体レポーター遺伝子細胞系を用いた高速自動分析系に関する研究 (主任研究者: 大塚製薬ライフサイエンス事業部EDC分析センター委託業務)

研究方法:

1. AR レポータージーンアッセイ

AR-EcoScreenTM 細胞を 1 \times 10⁵ cell/mL の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 90 μ L/well で撒いた。このときの培養液は Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal/Dextran treated FBS (Hyclone) を用いた。翌日 (約 20 時間後) サンプル及び標準物質をプレートフォー

マットにしたがって各ウェルに 10 μ L 加え CO₂ インキュベーターでさらに培養した (約 20 時間)。翌日、ルシフェリン溶液 (Steady-Glo™: Promega) を加えて約 5 分間振とう混和して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。AR アンタゴニストアッセイには、細胞を培養している培養液の終濃度が 5×10^{-10} M となるように添加する被験物質に予め DHT を加えておき、その活性がどの程度阻害されるかでアンタゴニスト活性を評価した。サンプル調製プレートから AR-EcoScreen™ 細胞に各ウェル 10 μ L 加え CO₂ インキュベーターでさらに培養した (約 20 時間)。翌日、蛍ルシフェリン^o 及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (Dual-Glo™: Promega) をマニュアルにしたがって加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

2. TR レポータージーンアッセイ

CHO-K1 細胞を 1×10^5 cells/ml の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 84 μ 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、TR アゴニストアッセイにはプレート 1 枚あたり、pTR β -RXR 62ng、pIND-TRE-DR4 62ng を希釈トランスフェクション試薬 (FuGene6 (ロツシュ)) 18.6 μ L を Medium(血清無添加) 620 μ L で希釈したものに加え 96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6 μ L ずつ添加し、CO₂ インキュベーターで培養する。TR アンタゴニストアッセイには pTR β -RXR 62ng、pIND-TRE-DR4 31 μ g、phRLTK 31 μ g のプラスミド Mix を同様に用いる。培養3時間後にサンプル、標準物質及び各コントロール物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェル 10 μ L 加え CO₂ インキュベーターでさらに培養する。アンタゴニストアッセイの際に終濃度が 1×10^{-8} M (この濃度は最大活性の約 20%に相当) になるように T3 を加えておき、その T3 の活性をどの程度

阻害するかで対象サンプルの TR アンタゴニスト活性を評価した。翌日、蛍ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (アゴニストアッセイは Steady-Glo™、アンタゴニストアッセイは Dual-Glo™: Promega) をマニュアルにしたがって加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。蛍光及び発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

研究結果:

1. AR アゴニスト活性

これまでの検討から、PC10 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付けてよいと考えられた。よって本年度の検討においても、PC10 が算出できる物質を AR アゴニストとして定義することとした。本年度測定対象とした 50 物質について、PC10 を算出することができた AR アゴニスト活性物質について、その結果を表1及び図 1 に示す。表 1 に示すように Benzylparaben (AT171) ($PC_{10} = 1.00 \times 10^{-6}$)、Anisindione (AT172) ($PC_{10} = 8.72 \times 10^{-9}$)、Anthraflavic acid(AT176) ($PC_{10} = 1.32 \times 10^{-6}$)、Benzoic acid, p-hydroxy-, isopentyl ester (AT177) ($PC_{10} = 5.62 \times 10^{-6}$) 及び Benzophenone, 4-phenyl- (AR192) ($PC_{10} = 1.62 \times 10^{-6}$) が非常に弱いアゴニストとして検出された。

2. AR アンタゴニスト活性

AR アッセイのアンタゴニスト活性検出についてもこれまでの検討により、IC20 が算出できれば有意なアンタゴニスト活性が検出されたと判断できるが、細胞毒性が 15% から 20% 以上検出された場合は、その被検物質をレセプターアンタゴニストとしての判断するのは注意が必要であるとしている。本年度測定対象とした 50 物質について、IC20 以上を算出することができた AR アンタゴニスト活性物質は 5 物質あった。その結果を表2に示す。またその化学構造を図2に示す。アンタゴニストが比較的強い化合物には、4,4'-propylidenediphenol、Methacrylic acid、isopropylidenedi-p-phenylene ester などがあつ

た。

3. TR アゴニスト活性

今回評価した 50 物質の中に T3 活性の 10% 以上の TR アゴニスト活性を示したものはなかった。

4. TR アンタゴニスト活性

本年度 50 化合物の TR アンタゴニスト活性測定の結果、細胞毒性のために活性が下がった化合物はあった (AT165、AT178、AT183、AT85、TR193、TR194、TR197) ものの明確にアンタゴニスト活性を示した化合物は認められなかった。

(1)-3. 核内受容体ドッキングモデルによる *in silico* スクリーニング系の研究(主任研究者: 医薬分子設計研究所委託業務)

研究方法: 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およびエネルギー解析(結合自由エネルギー計算)を行なう方法を確立してきた。

今年度は、アンドロゲン受容体(AR)を研究対象とした。AR に対する化学物質の結合様式の推定と結合強度予測は、以前に本研究者らが構築した予測システムを利用して行なうことにした。このシステムは、財団法人化学物質評価研究機構(CERI)による AR への *in vitro* 結合性試験から得られた、150 化合物の相対結合強度(RBA) データを用いて構築したものである。この予測システムにより、242 個の化学物質の結合強度を推算した。

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タンパク質の立体構造として、ヒト・アンドロゲン受容体(hAR)のリガンド結合ドメインの結晶構造を用いた。hAR と強いアゴニストである metribolone (R1881)との複合体結晶構造が、分解能 2.4 Å で解析されている(PDB ID: 1e3g)。図1に、複合体結晶構造の全体像を示す。PDB 中の蛋白質座標に水素を付加し、蛋白質構造最適化プログラム Bluto 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。

1e3g 複合体結晶構造から、結合しているリガンド分子(metribolone (R1881))を取り除き、リガンド分子が結合していたポケット(結合ポケット)を、評価対象化合物をドッキングさせる領域(ドッキング対象領域)として指定した。ドッキング対象領域内で、自動ドッキング計算の際にリガンドとの相互作用計算に用いる格子点データをプログラム CALGRID により計算した。図2に、AR 構造のリガ

ンド結合部位(ドッキング対象領域)を示す。

2. ドッキングに使用する低分子立体構造の準備
AR に対する結合強度予測計算の対象となる低分子物質 242 個の準備を行なった。まず、CAS 番号より化学構造式を検索した。次に、それらの平面化学構造式を低分子化合物三次元化プログラム Key3D 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などを付加した。

3. AR 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なった。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と評価プログラム 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

相対結合強度の対数値 $\log RBA$ の推算には以前に本研究者らが構築・検証した以下の式を使用することにした。

$$\log RBA(AR) = -0.433GBelc - 0.316 GBrep - 0.204GBcnf - 0.034Dlig - 0.035Desolv - 4.205 \quad (1)$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Dlig, 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

Dlig: Bluto で計算されるリガンド分子内エネルギー変化(単独存在時と蛋白結合時とのエネルギー差)

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コスト

研究結果:

1. 低分子化合物の三次元化

242 個の化学物質のうち、CAS 番号 8003-34-7 は CAS に化学構造式の記載が無く、以後の計算から除外した。また、ケイ素を含む 2 化合物については、力場パラメタが未整備のため除外した。平面構造式三次元化プログラム Key3D を利用し、残りの 239 化合物について、高精度な三次元構造を得ることができた。

2. 低分子化合物と AR との結合様式の探索

三次元構造を生成した低分子化合物群について、プログラム ADAM を用いて AR に対するドッキング計算を行った。この結果、197 化合物についての結合様式が推定できた。それ以外の物質についてはドッキングができなかったが、この理由としては、化合物のサイズが大きく、AR の結合ポケットに入りきらなかったり、結合ポケットと安定に相互作用できないと判定されたことなどが挙げられる。

3. 結合強度の予測

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側鎖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式(1)に適用して、相対結合強度($\log RBA$)の予測を行った。予測値は表1にまとめた。

(2)核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発(分担

研究者:小野 敦 医薬基盤研究所・基盤研究部)

研究方法:

1. ERと相互作用する新規分子の SPR 探索

核内転写因子や転写共役因子として報告されている分子であって、これまで ER との相互作用についての報告のないタンパク質について、核内受容体と相互作用モチーフとの相同性を有する部位をデータベース探索して、候補となるアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列を含む周辺部位について N 末端ビオチン化ペプチドを合成し、測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.05% Tween 20%、BSA 5 μg/ml、TCEP 5nM)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 SPR 探索に用いた。SPR 探索では候補ペプチドを固定化したセンサーチップに、数種の代表的リガンドと混合した核内受容体をフローして結合活性を解析した。

2. 新規 ER 相互作用ペプチドを用いた化合物スクリーニング

新規に ER との相互作用活性が検出されたペプチドのうち、特に強い相互作用が認められた DAX1、AIB3 由来のペプチドを用いて約 30 種の化合物について ER アゴニストスクリーニングを実施した。ER は、リコンビナント Human ER α 及び β (invitrogen)を使用した。ER を測定用バッファーで希釈して、化合物を 10⁻⁵M の濃度で 10nMER と混合し、4℃、5 分以上インキュベートした後、サンプルをセンサーチップにインジェクトして SPR 装置 (Biacore3000, BiacoreAB)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。相互作用の結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してプローブ未固定のコントロール表面とのレスポンスの差より相互作用によるレスポンスを求めた。解析には BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)を用いた。

3. 核抽出液を用いた網羅的相互作用プロファイルの解析

核抽出液からの相互作用分子の分離には、

ERE 固定化セファロース担体(GE Healthcare)を用いた。すなわち予めストレプトアビジンコートされたセファロース担体にビオチン化 ERE を混合して約 1 時間放置し、ERE を固定化した。ER-核内たんぱく質複合体を形成のため、予めリガンド化合物と混合した ER 液を、MCF-7 細胞核抽出物 (Active Motif 社)と混合して、さらに 15 分間、4℃ 下でインキュベートした。ER-核内たんぱく質複合体を ERE 固定化セファロース担体でキャプチャーするため、まず ERE 固定化セファロース担体をフィルターカラム (UltraFree-MC(0.45 μm)、ミリポア)に分注し、数回洗った後、ER-核抽出液混合液を加え 5 分程度放置し卓上小型遠心機にて遠心して未結合成分を除去した。さらに、結合バッファーで 1 回洗い、0.5%SDS 溶液を加えて混合し ERE 固定化セファロース担体に結合した成分を溶出した。溶出液は、マイクロコン YM3 (ミリポア)で濃縮し、SuperSep7.5%ゲル (和光純薬)を用いて SDS-PAGE (Laemmli 法)を行った。泳動終了後、ネガティブ染色によりバンドを検出した。

研究結果:

1. ER と相互作用する新規分子の SPR 探索

検討を行った 21 種のペプチドのうち 8 種で、いずれかのリガンド存在下において ER α もしくは ER β との明確な相互作用が検出された。相互作用が検出されたペプチドはいずれも ER α に比べ ER β で強くもしくは同程度の相互作用活性が認められた。今回相互作用の認められたペプチドはいずれも、E2、GEN もしくは BPA 結合によるアゴニスト型 ER との相互作用であり、アゴ型もしくはアンタゴニスト型 ER との相互作用は認められなかった。

2. 新規 ER 相互作用ペプチドを用いた化合物スクリーニング

ペプチド探索において ER との相互作用活性が認められたペプチドのうち転写因子 DAX1 及び転写共役因子 PRIP に由来する 2 種のペプチドをプローブ用に高純度合成し、新規スクリーニング用プローブとしての有用性について、実際に 28 種の化合物について、これまでに開発した

SPR-HTTPS 系において用いてきた TIF2 プローブと並列に簡易スクリーニングを実施し比較検討した。スクリーニング対象化合物として、これまでに大規模スクリーニングにおいて ER アゴニスト活性が検出されている化合物を中心に選択し、スクリーニングを実施した結果、いずれの化合物においても TIF2 では ER α 、ER β ともにほぼ同程度の結合を示した。TIF2 で活性の認められた化合物はいずれも PRIP、DAX1 において ER β 系で非常に強い結合が認められたが、ER α ではいずれも弱い結合を示すのみであった。特に PRIP は ER β に対して TIF2 より強い結合活性を示し、これらの共役因子が共存する環境下では ER β はむしろ PRIP をリクルートする可能性が示唆された。これらの結果より、これら 2 種のペプチドは ER β 系のスクリーニングにおいて TIF2 よりもダイナミックレンジの広い測定が可能であることが示された。

3. 核抽出液を用いた網羅的相互作用プロファイルの解析

始めに、ER α もしくは ER β のみを ERE 固定化セファロースに添加して、本法により解析可能であるかどうかについて検討した結果、いずれの受容体についても ERE 結合画分より単一バンドの検出が可能であり、測定条件下で ER を ERE 上にトラップ可能であることが示された。添加する ER の量などについて検討を行った後、ER の代表的なリガンドの存在下における ER α と MCF7 核抽出液中での相互作用因子の探索を行った結果、カラム法では、リガンド非存在下においても ER α の ERE への結合が認められた。これはこれまでの報告と一致する。E2 及び BPA の存在下では ER の他に 3 つのバンドの検出が認められた。一方、OHT 存在下において E2 では認められないバンドが検出され、アンタゴニスト特異的に相互作用する因子の可能性が示唆された。

(3) 受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究 (分担研究者: 小原有弘 医薬基盤研究所・生物資源研究部)

研究方法: 内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に、個々

の細胞株におけるターゲット分子を含む各種の核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関しての網羅的、詳細な比較検討を行い、感受性差と関連分子の発現との解析により化学物質の作用特異性、個体差や臓器特異性の情報源としての有効性を検討する。またこれらのデータベース化・公開を図り、細胞のキャラクタライズ情報として情報提供することを目指す。

研究方法:

<細胞に関して>

LI90 (肝臓)

肝臓のイトウ細胞由来の正常細胞であり、脂肪蓄積能がある細胞。

培地: Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HUV-EC-C (血管内皮)

ヒト正常血管内皮細胞であり、*in vitro* における血管内皮の研究に多用されている。

培地: MCDB 107 with 10% FBS, 100 μ g/ml heparin and 50 μ g/ml endothelial cell growth supplement

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

NCR-G1 (精巢)

AFP 産生能のほか、Type IV collagen, fibronectin, laminin など細胞外基質の産生能を保持した細胞株

培地: G031101

継代方法: The cell is peeled off by pipetting. (handle it like embryonic stem cell.)

HeLaS3 (子宮頸部)

浮遊培養可能とした HeLa 細胞亜株。子宮頸部由来のがん細胞として非常に有名。

培地: Eagle's minimal essential medium with 10% calf serum.

継代方法: Cells are treated with 0.05% trypsin.

HL60(急性前骨髄球性白血病由来細胞)

がん遺伝子による分化誘導や DMSO による分化誘導による研究に良く用いられる細胞株。

培地: RPMI1640 medium with 20% fetal calf serum.

継代方法: Simple dilution.

MCF-7(乳癌)

エストロゲン受容体陽性細胞として広く内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに使用されている細胞。

培地: Eagle's minimal essential medium with NEAA, 1.5g/l NaHCO₃, 1mM pyruvate and 0.01mg/ml insulin with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

NEC14(精巣)

ヒト精巣テラトカルチノーマ由来の細胞種であり、HMBA (N,N'-Hexamethylene-bis-acetamide) 処理により、分化時に特徴的な形態変化・増殖活性の減少を起こすことが知られている細胞。

培地: RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HEC-1-A(子宮内膜)

世界初の子宮体癌株であり、71歳女性の子宮体癌より樹立された。エストロゲン受容体を発現していることが確認されている。

培地: EMEM with 15% heat inactivated fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

SKG-II(子宮内膜)

子宮頸部類上皮腫、大細胞非角化型の細胞株であり、黄体ホルモン療法に関する研究に使用されている。

培地: Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HepG2(肝臓)

毒性の分野で広く用いられているヒト肝癌由来細胞株であり、ダイオキシンに対する受容体発現が確認されている。

培地: Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

KMRC-3(腎臓)

腎明細胞がん由来細胞株。

培地: Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)

骨髄由来間葉系幹細胞にヒトパピローマウイルス遺伝子 E6, E7 ならびにヒテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞株。脂肪、神経、骨への分化能を有しており、再生医療研究に広く利用されている。分化には化学物質の影響も少なくなく、DMSO の添加により分化することが確認されている。

培地: Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

OVKATE(卵巣)

卵巣の漿液性乳頭状腺がん由来細胞株。

培地: RPMI1640 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.05% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

8505C(甲状腺)

ヒト甲状腺未分化癌由来細胞株。p53 に変異が認められている。

培地: Eagle's minimal essential medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

SW-13(副腎皮質)

ヒト副腎皮質癌由来細胞株。アドレノメデュリンが発現しており、ACTH、アンギオテンシン II、デキサメサゾンやサイトカインとの関連性に関して研究が行われている。

培地: Leibovitz's L-15 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

以上の細胞株に関して、フェノールレッド不含培地を用いて培養を行い、倍加時間を算出するとともに、最終継代から 24 時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種して RNA 抽出を行った。

<DNA・RNA 抽出に関して>

DNA・RNA 抽出に関しては、キアゲン社製の AllPrep DNA/RNA Mini キットを使用して DNA・RNA を別々に抽出した。

<リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析に関して>

リアルタイム RT-PCR には Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システム並びに Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを使用し、TaqMan プローブにて解析を行った。TaqMan プローブは TaqMan® Gene Expression Assays Inventoried プロダクトより選択して検討を行った。

研究結果:

本研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に選択し、その細胞での核内受容体ならびに関連分子に関する網羅的遺伝子発現解析を目的とした。本検討で使用した細胞はフェノールレッド不含培

地で行い、最終継代から 24 時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種して DNA・RNA 抽出を行った。今回用いた細胞の倍加時間はそれぞれ、LI90(肝臓)35 時間、HUV-EC-C(血管内皮)38 時間、NCR-G1(精巣)3.5 日、HeLaS3(子宮頸部)24 時間、HL60(急性前骨髄球性白血病由来細胞)18 時間、MCF-7(乳癌)58 時間、NEC14(精巣)62 時間、HEC-1-A(子宮内膜)72 時間、SKG-II(子宮内膜)47 時間、HepG2(肝臓)32 時間、KMRC-3(腎臓)14 日、UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)58 時間、OVKATE(卵巣)18 日、8505C(甲状腺)43 時間、SW-13(副腎皮質)74 時間、であった。細胞培養に際しては形態学的特徴を細胞の情報として記録するために動画撮影を行い、細胞増殖の過程を撮影した。遺伝子発現解析を行う遺伝子に関しては核内受容体並びにその関連分子を選択することとした。アプライドバイオシステムズ社で既に設計されている TaqMan® プローブである TaqMan® Gene Expression Assays Inventoried プロダクトより、核内受容体並びにその関連分子に関して検索抽出したところ、598 種類(598 遺伝子ではない)のプローブが選択できた。選択されたプローブの中には 47 種の核内受容体が含まれており(表1)、ほぼ核内受容体を網羅できる(この他ホルモンレセプター、サイトカインレセプターなども含む)。アレイのデザインは Format384 とし、ターゲット遺伝子 380 種類+内在性コントロール遺伝子 1 種類。cDNA サンプル数:1 種類の場合、1 遺伝子あたりの反復(レプリケート)数:n=1(P/N4342265)を採用した。

10 種の細胞で行った遺伝子発現解析の結果、全細胞で発現が認められなかったプローブが APRIN, EMR3, EMR4, GHRHR, GPX5, HSD3B2, PLA2G, SRD5A2, TPO の 14 プローブであった。また、細胞特有の遺伝子発現が認められた遺伝子もあった。核内レセプター 47 種に関して検討すると、全ての細胞で共通して発現したレセプター 23 種と細胞毎に異なる遺伝子発現を示した 24 種が認められた。HeLa 細胞を用いてジエチルスチルベステロール(DES)処理した際の遺伝子発現変動に関しても解析を行い、発現変動

した遺伝子群を抽出した。培養細胞を用いた高速分析系は各国で開発が進められており、様々な細胞が用いられている。エストロゲン受容体を始めとする核内受容体のリガンドは非常にリダンダントに他の受容体に作用することが明らかになっており、このため用いた細胞によってその応答性が大きく異なることもあり、結果の比較評価を困難にしている。この多様性は国際的バリデーションの際には統一性の問題となるものの、科学的には個体差や臓器特異性の関連情報源と成り得る。

(4)核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究(分担研究者:板井 昭子株)医薬分子設計研究所)

研究方法:

1. ネットワーク解析におけるデータ処理

Clofibrate を経口投与したマウスの肝臓(1 群 3 匹)から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2 により得た網羅的遺伝子発現データを Percellome method により標準化した値を用いた。実験における時系列は投与 2、4、8、24 時間後、用量 0、10、30、100(mg/kg)の各 4 点ずつである。用量 0 をコントロールとして、10、30、100(mg/kg)における各時系列の発現量比(fold change)を後のネットワーク解析に用いた。また、ここでは $p < 0.05$ を有意なデータとして採用した(統計処理には Spotfire®を利用した)。

2. カノニカルパスウェイ“PPAR α による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

すでに KeyMolnet に収録されている“PPAR α による発現調節”(レビュー誌に報告されている PPAR α と関連分子の関係)に各条件のデータを各々 KeyMolnet(KeyMolnet Viewer Version 3.6, Contents 8.62006920164953)にインポートし、PPAR α による発現変動を観察した。

3. 実験条件の絞り込み

上記 KeyMolnet 上で、各実験条件において、 $P < 0.05$ かつ 2 倍以上発現亢進した分子の数を抽

出した。

4. 化合物作用に対して up-regulate するネットワークの生成

3 の結果から、発現変動の大きかった投与 4 時間後のデータ(10、30、100mg/kg)についてコントロール(投与量 0)に比べて 2 倍以上有意に発現亢進した分子を KeyMolnet 上で抽出し、共通上流検索法によりネットワークを生成した。また、生成した各ネットワークに対し、KeyMolnet のサマリーシートを用いて、カノニカルパスウェイ(Pathway)、疾患(Disease)、病態における現象(病態イベント、Pathological Event)、生体現象(生体イベント、Bio-Event)、Gene Ontology について、これらの関与度とともにサマライズした。

ネットワーク検索条件:上流方向、1 パス、最短経路、コア、セカンダリコンテンツ、検索の種類、発現調節のみ

1. 研究結果:

カノニカルパスウェイ“PPAR α による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察
各実験条件(時系列 2、4、8、24 hr、10、30、100 mg/kg)における foldchange(コントロール:用量 0)において、いずれの時系列に対しても、最高用量時(100 mg/kg)での発現変動が大きかった。

2. 実験条件の絞り込み

上記 KeyMolnet 上で、各実験条件において、 $P < 0.05$ かつ 2 倍以上発現亢進した分子の数を解析した結果、投与 4 時間後で発現変動が大きいことが示された。

3. 化合物作用に対して up-regulate するネットワークの生成

KeyMolnet を用いて発現変動の大きかった投与 4 時間後のデータ(10、30、100mg/kg)についてコントロール(投与量 0)に比べて 2 倍以上有意に発現亢進した分子を端点として共通上流検索法によりネットワーク及び 3 つの分子ネットワークのプロファイルを生成した。

C. 結論

(1)核内受容体作用物質のハイスループット・スクリーニングの実施

Firefly Luciferase 遺伝子上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER α 又は ER β を常時発現するための Plasmid が同時に一過性に導入された細胞を使用し、71 種類の化学物質についてその ER α 及び ER β アゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、71 物質中アゴニスト活性を有する物質は、ER α のみについて 9 物質、ER β のみについて 6 物質であり、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、14 物質であった。この 14 物質中では算出された PC10 もしくは PC50 に 5 倍以上濃度差のあるものを選択性の高い物質とした場合、ER α に選択性の高いもの 3 物質、ER β に選択性の高いものは 1 物質、選択性なく同等とみなされるものは 10 物質であった。

一方、ホタルルシフェラーゼをレポーターにした AR レポータージーンアッセイ及び TR レポータージーンアッセイは、それぞれの内在性リガンドである DHT や T3 等に対して十分感度よく応答することがこれまでの検討からも明らかになっている。今年度の検討では新たにそれぞれ 50 物質についてスクリーニングした結果、AR 系においてはアゴニスト、アンタゴニスト活性がそれぞれ別の 5 物質で測定された。TR 系においては、本年度測定を実施したいずれの化学物質においてもアゴニスト・アンタゴニスト活性は検出されなかった。

開発したコンピュータスクリーニング法と結合強度予測システムを用いた *in silico* スクリーニング法では、たとえ入手困難あるいは実験困難な化学物質の結合親和性であっても、その化学構造式さえ判明していれば推定できる点が大きな特長である。また大量の化合物に関する推定も短期間に効率よく行うことができるため、実験の優先順位をつけるなどの目的にも適している。本年度は、AR をターゲットとして構築した予測システムを利用して、これまでにレポーターアッセイ系において AR 活性測定を実施済みの約 240 個の化学物質の結合様式推定及び結合強度予測を実施した。しかし、検証計算の結果、AR に対する予測

系には、まだ改良の余地があることが明らかであった。今後の改善のために必要な、蛋白結晶構造や結合強度実測データについて調査・検討したところ、ある程度期待の持てるデータが存在することがわかった。それらのデータを用いた予測システムの再構築と予測性の向上を、今後の課題としたい。

(2)核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発

核内受容体作用物質による化合物特異的もしくは組織特異的な生体作用を検出・評価する系の構築のため、リガンド結合により受容体と特異的に相互作用する種々の分子との相互作用変化を解析する手法の構築を目的として、本年度は、アミノ酸配列をもとにした相互作用分子の探索により、生殖機能発達に関与する核内受容体 DAX1 由来ペプチドがアゴニスト型 ER β 選択的に相互作用することが新規に明らかとなった。また、PPAR の転写共役因子である PRIP が、やはりアゴニスト型 ER β と非常に強く相互作用することが明らかになった。実施に化合物スクリーニングアッセイを行い、スクリーニング用プローブとしての有用性を検討したところ、いずれも ER β 系では、これまで用いてきた TIF2 由来のペプチドに比べダイナミックレンジの広い解析が可能であることが示された。一方、ERE 結合担体を用いた核内タンパク質からの相互作用因子の網羅的解析では、リガンド特異的な相互作用因子の検出に成功した。本系については、引き続き解析条件などの検討が必要であるが、今後、さらに多くの特異的相互作用因子の探索を進め、それらを統合的に解析する系を構築することで、より詳細なメカニズムに即した化合物スクリーニングが可能になり、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。

(3)受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究

核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関して網羅的に詳細な比較検討を行うため、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓

器に由来する細胞株を10種(MCF-7(乳癌)、NEC14(精巣)、HEC-1-A(子宮内膜)、SKG-II(子宮内膜)HepG2(肝臓)、KMRC-3(腎臓)、UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)、OVKATE(卵巣)、8505C(甲状腺)、SW-13(副腎皮質))選択した。シロイヌナズナのcDNAを外部標準として用いることで細胞1個あたり(ゲノム量あたり)の遺伝子発現量を定量的に比較することが可能となった。今回遺伝子発現解析によって核内レセプターによる細胞のキャラクタライズが可能であることが示唆された。今後細胞のキャラクタライズ情報としてデータベース化を行い、研究者が研究に用いる細胞を選択する際の有用情報として提供できるよう整備を進める。

(4)核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究

化合物特異的に up-regulate するネットワークが簡便かつ効率的に抽出でき、そのネットワークに関する作用、パスウェイなどのプロファイリングも行うことができた。今後はさらに他の化合物作用に対する特徴的なネットワークとそのプロファイリングデータを蓄積することによって既知化合物-ネットワーク-作用のパターニングを行う予定である。内分泌かく乱の可能性のある候補化合物に対しても、マイクロアレイデータからネットワークが生成し、毒性予測が行える可能性が示唆された。

D. 考察及び今後の展望

本研究では、厚生労働省「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」において提案された「試験スキーム」に沿って要求される内分泌かく乱化学物質大規模スクリーニングを実施するとともに、これまでの研究結果をもとに内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体作用について、化学物質と受容体、応答 DNA 配列及び転写に関わる共役因子との相互作用、さらには受容体制御下にある遺伝子発現への影響について解析を行い、得られた結果をこれまで開発を進めてきた細胞系スクリーニング法や *in silico* 手法へフィードバックし、分子標的作用メカニズムに基く見落としのないスクリーニ

ング系とするとともに、科学的により高度なメカニズム解析による次世代評価系への応用を目的としている。

内分泌かく乱化学物質大規模スクリーニングの実施において本年度は、内分泌かく乱性を評価するためのプレスクリーニング試験としてのレポーター遺伝子活性化試験の有用性を検討するためヒト ER α 及び ER β を介するアゴニスト活性について既存の化学物質 71 物質について検討を行った結果、71 物質中アゴニスト活性を有する物質は、ER α のみについて 7 物質、ER β のみについて 1 物質であり、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、8 物質であった。この 8 物質中では算出された PC10 もしくは PC50 に 5 倍以上濃度差のあるものを選択性の高い物質とした場合、ER alpha に選択性の高いものはなく、ER beta に選択性の高いものは 2 物質、選択性なく同等とみなされるものは 6 物質であった。

一方、AR及びTR系については、それぞれ50物質についての測定を実施した結果、AR系においてPC50を算出することができた比較的強いARアゴニスト作用を示す物質は今回の測定では検出できず、PC10を算出することができた比較的弱いARアゴニスト作用を示す物質が5物質検出することができた。その中で最も低濃度で活性が認められたのはAnisindione(AT172)(PC10 = 8.72×10^{-9})であった。Anisindioneはインダンジオン系抗凝血薬として利用されている物質で、ビタミンKと拮抗しプロトロンビンの生合成を阻害、血液凝固を阻止する作用を持っている。ARと関連した知見はこれまでにはない。今回評価した物質の中には強いアンタゴニスト作用を示した物質はなかったが、5物質に弱い活性を検出した。その中で最も強いアンタゴニスト活性を示した物質はMethacrylic acid, isopropylidenedi-p-phenylene ester(IC50 = 1.32×10^{-6} M)、いわゆるビスフェノールAジメタクリレートで、接着剤などに使用されている。この物質のアンタゴニストの活性の強さは、医薬品の抗アンドロゲン剤として使用されているHydroxyflutamide(IC50 = 4.9×10^{-8} M:これは我々が現在までに調べた限り、もっとも強いアンタゴニスト活性を示した)(Araki et al., 2005) に比べると

約2000倍程度弱いことになる。我々は昨年度の検討で、構造的にも類似しているBisphenol Aにもアンタゴニスト作用 ($IC_{50} = 2.68 \times 10^{-6} M$)を検出している。この他に構造的にも類似している4,4'-propylidenediphenol ($IC_{50} = 1.93 \times 10^{-6} M$)にも同等の活性が認められた。これらの結果は、既存の知見と一致するものであり、我々のAR活性スクリーニング手法の有用性を確認した。

In silico における高速スクリーニング法として我々はこれまで、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、それらの結合様式を推定し相互作用を解析する手法を開発してきた。我々の手法は、受容体の立体構造と化学物質の化学構造式の情報から、それらの結合様式を原子レベルで推定し、相互作用を定量的に推算するものである。単に平面の化学構造式の分子骨格や置換基の性質・パラメタなどを利用し数値化するだけの古典的な QSAR の手法と比べ、物理化学的な基盤に立脚したより信頼性の高い方法であり、対象とする化合物の骨格構造の種類を問わないことが大きな利点である。今年度は、AR に対する化学物質の結合強度予測に、我々の方法を利用した。しかし、今回使用したAR に対する予測式・予測システムは、ER に対するそれと比較してまだまだ不十分な点が多い。第一に、タンパク構造の問題が大きい。ER α では、ステロイドである 17 β -Estradiol や非ステロイドの Diethylstilbestrol といったアゴニストの結合した複合体結晶構造と、SERM (selective estrogen receptor modulator) である 4-Hydroxytamoxifen や Raloxifene などの結合した結晶構造が解析されている。アゴニスト結合型と SERM 結合型とでは、ER α のコンフォメーションが大きく異なり、結合ポケットの形状の差異も大きい。このようにタイプの異なる複数の複合体結晶構造から、ER α 結合ポケット周辺の残基の動きやすさ、induced fit の傾向といった重要な情報が得られ、予測システム構築の際に詳細な検討を行なうことができた。ところが、AR への結合強度予測システムを構築した当時(2004年)、wild type の蛋白とリガンドとの複合体構造としては、たった1種類(今回利用した 1e3g 構造)しか報告されていなかった。このた

め、AR の結合ポケット周辺の動き、induced fit については、十分に考慮できていない。また、1e3g 構造では、ステロイド・アゴニストが結合したポケットが非常にコンパクトな閉鎖空間となっているため、大きいサイズの binder が入りにくかったり、相互作用を適切に評価できなかつたりという問題もある。もし今後、タイプの異なるリガンドが結合した複数の結晶構造を利用できれば、予測システムの精度向上が期待できる。もう1つの問題は、AR 予測システム構築時に用いた実験データである。トレーニングセットとして利用した結合強度実測データは、CERI で一括して測定された 150 物質の実験値であり、信頼性、データ量、均質性などの点では申し分のないものであった。しかし、残念ながら、150 物質の結合強度の分布には大きな偏りが見られ、数の多い weak binder にオーバーフィッティングされてしまう傾向が生じた。このため今回の結果でも、高親和性の物質が、低い結合強度に見積もられてしまっている可能性がある。

以上の問題を克服し、予測システムを改善するために、必要な AR 結晶構造、実験データについての調査を行なった。まず、AR の結晶構造であるが、最も有用な情報である、アンタゴニストとの複合体構造の結晶解析ははまだ報告されていない。しかし、非ステロイド性の SARM (selective androgen receptor modulator) が結合した複合体結晶構造が2つ公開されている。この2つの結晶構造は、今回利用した 1e3g 構造とは結合ポケットの形状が一部異なっている。そのため、結合サイト付近の残基の動きやすさ等の情報を、部分的にはあるが得ることが出来る。これらの情報を利用した予測システムの改善は可能と考えられる。また、化学物質の結合強度の実験データに関しては、前回トレーニングセットとして利用した 150 物質以外にも、CERI で測定されたデータが 400 件近く存在する。今回はこれらのデータを、構築した予測システムの検証のために使用していた。今後、CERI の全ての実験データから、結合強度の分布や骨格構造のパラエティを考慮しつつ、トレーニングセットを選び直すことで、予測システムの精度向上が期待できる。とりわけ、高親和性の物質のデータを多く取り入れ、それらの

予測性を改善する必要があるだろう。

核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発研究において、本年度は、ER と特異的な相互作用活性を有する新たな分子プローブの探索のため、核内受容体との相互作用に関与するといわれるアミノ酸配列相同部位を有するたんぱく質の受容体との相互作用部位及びその相同配列について、ペプチドを合成して、代表的な数種のリガンド存在下における ER α ・ β との相互作用について検討を進め、新たに数種のペプチドとアゴニスト型 ERとの相互作用活性が示された。そのうち2種を用いてこれまでに大規模スクリーニングを実施した28化合物についてSPRスクリーニングを実施したところ、今回プローブとして選択したDAX1及びPRIR由来のペプチドは、いずれもこれまでスクリーニングに用いてきたTIF2に比べER β では強い相互作用活性を示し、これらが共存する環境下ではER β はTIF2よりむしろPRIPをリクルートする可能性が示唆された。一方、ER α ではDAX1及びPRIR由来ペプチドとの相互作用活性を示すもののTIF2に比べ非常に弱かった。今回、新たなスクリーニング用プローブとして選択した、DAX1はステロイド産生組織の発達に寄与する核内オーファン受容体で、レチノイン酸による転写の抑制因子として機能することが知られている。また、DAX1欠損や異常は先天性の副腎形成異常や生殖機能不全を引き起こすことが報告されており、これまでDAX1とERとの直接の相互作用の報告はないが、今回の結果は、内分泌かく乱物質による障害として示唆されている生殖機能発達への影響において、ERとDAX1との相互作用への影響が関連する可能性を示唆するものと考察された。一方、PRIP(PPAR interacting protein)は、昨年度の解析において新たにERとの相互作用が確認されたPCG-1と同様PPARの転写共役因子として選択したが、その後の検索の結果ASC-2、RAP250として報告されている転写共役因子と同一のもので、PPARsを始めGR, ERs, RARs, RXRs, TRs, VDRといった幅広い受容体と相互作用することがすでに報告されていた。PRIPは、クロマチンリモデリングを引起し、

NF-kappa-B パスウェイのコアクチベーションに関与する。PRIP由来ペプチドは、昨年度報告したPCG-1と同様、ER α に比べER β に対して非常に選択的な相互作用を示すことから、内分泌かく乱化学物質によるER β を介したPPARシグナルへの影響を示唆する結果と考察された。スクリーニングを実施した2ペプチド以外にも数種のペプチドにおいて相互作用活性が示されており、それらについても今後、解析を進める。

上記とは別に、本年度は新規相互作用因子の探索のため核内に存在する全タンパク質からの相互作用因子の網羅的解析法の基礎検討としてERE結合担体による相互作用因子の抽出を試みた。結合、洗浄等の条件検討の結果、ER α を用いた解析によりリガンド特異的に結合すると思われるバンドの検出に成功した。しかしながら、バンドの同定を行うには、再現性やバンドの分離精度などに問題が残されており、今後さらなる条件検討が必要であると考察された。今後は、上記の相互作用因子の探索により得られた結果をもとに、化合物の生体作用についてより詳細に検討できる新たなスクリーニング評価手法の開発を進める。

受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究においては、今回用いた細胞株の倍加時間を見ると3日以上の上乗時間を示すもの、HEC-1-A(子宮内膜)、KMRC-3(腎臓)、OVKATE(卵巣)、SW-13(副腎皮質)がある。このような細胞はもともとの増殖能が低く、培養に長い時間を要するため、スクリーニング試験として大量の細胞を用意するのに多くの時間を要し、化学物質のスクリーニングという観点からは非常に使いにくい細胞株であるといえる。しかし、細胞の機能維持という面では、増殖能の低い細胞の方が優位であることが、これまでの研究結果よりわかっている。その現象は染色体の安定性(逆にいえばゲノムの不安定性)に繋がっており、悪性度が高く増殖能が高い細胞は染色体プロファイルの変化が速い。従って、倍加時間や染色体の安定性の情報もスクリーニングに使用する細胞を選択するには重要であるといえる。HeLa細胞の倍加時間が約24時間程度であることを考えると、今回使用した増殖速度が遅いことがわか