

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

化学物質の標的としての膜機能タンパク質発現系を利用したリスク評価法に関する研究
に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大和田 智彦

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
化学物質の標的としての膜機能タンパク質発現系を利用したリスク評価法 に関する研究	----- 1
大和田 智彦	
II. 分担研究報告	
1. タモキシフェンや松脂の成分の誘導体合成に関する研究	----- 7
大和田 智彦	
2. 発現系を利用したイオン・チャネル型受容体に対するリスク評価に関する研究	----- 9
中澤 憲一	
3. 発現系を利用したイオンチャネルに対するリスク評価に関する研究	----- 13
赤羽 悟美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 17

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費(化学物質リスク研究事業)

平成19年度総括報告研究報告書

化学物質の標的としての膜機能タンパク質発現系を利用したリスク評価法に関する研究

研究者代表者 大和田 智彦 東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室・教授

研究要旨

化学物質のリスクの作用点の解明および評価系開発を目的として、ヒトおよびラット等の膜タンパク質を cDNA より細胞系に発現させ、膜タンパク質の機能に対する各種化合物の影響を検討した。膜タンパク質は化学物質の最初の作用点である。リスクの作用点を解明する目的で、化学物質およびその標的となる膜タンパク質の両者の構造を段階的に改変させ、化学物質の標的膜蛋白に対する作用を定量的に解析する目的で、(目的1) 化学物質の膜タンパク質の機能に対するリスク評価系の開発、(目的2) 化学物質の膜タンパク質への作用点や作用メカニズムの解明および化学物質の構造特性の解明を行った。

A. 研究目的

エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンに含まれるジアリールエチレン構造を有する化合物を合成し非ステロイド作用としてイオンチャネル、イオン・チャネル型受容体やトランスポーターなどの膜タンパク質への効果を検討した。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアピエチン酸の誘導体の化学合成を行い、天然資源誘導体が持つイオンチャネルに対する作用も調査した。

アフリカツメガエル卵母細胞は遺伝子クローニングされた cDNA を利用することにより、目的とするタンパク質を簡便に発現できる系として広く用いられている。発現させたタンパク質は均一であり、各種化合物の作用の比較を確実にこなうことができる。野生型の cDNA を分子生物学的手法により改変を加え、変異型のタンパク質を発現することも容易である。この変異型タンパク質に対する作用を調べることで、化合物の作用点を特定することも可能である。これらの利点をリスク評価に活かすことを目的とし、アンチエストロゲンであるタモキシフェンおよびその関連物質の

イオン・チャネル型受容体であるニコチン様アセチルコリン受容体に対する作用を検討し、評価系としての有用性を確認した。

また、化学物質のリスク評価のハイスループット化に向けてその基盤となる評価系の構築と評価プロトコル確立のための基礎実験を行った。細胞膜に発現するイオンチャネル・トランスポーター・受容体に対する化学物質のリスク評価を行う系として、ヒト由来培養細胞 (HEK293 細胞) を用いた発現系を構築した。この系を用いて一部の化学物質の作用を検討した。さらに、これらの化学物質のグルタミン酸トランスポーター (GLAST) に対する影響も検討した。

B. 研究方法

タモキシフェンモ (1) は4置換オレフィンでありステロイド活性には、アンモニウム基の結合したベンゼン環(A)と同じオレフィン炭素に結合するベンゼン環(B)のパラ位の生体内での酸化による、フェノール基の生成が必須であることが分かっている。このようなフェノール基の存在が膜タンパク質であるイオンチャネルとの相互作用に重要であるかは不明である。

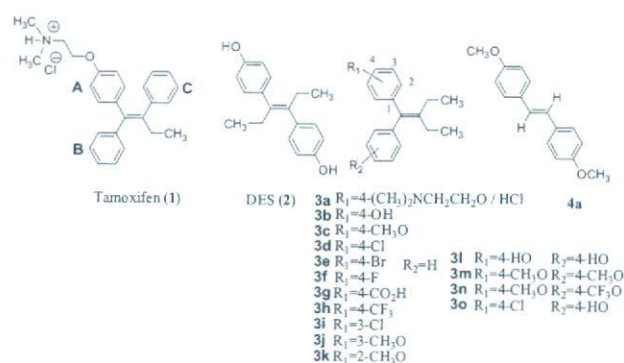


図1

そこで、合成的に簡便で誘導体合成に有用で、かつ一般に汎用されている化学物質の部分構造となりうるジアリールエチレン構造を抽出してその誘導体の合成に着手した。なお、ステロイドアンタゴニストであるDESもBKチャンネル開口活性が報告されており、スチルベン誘導体について今年度はその一部の検討を行った(図1および2)。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸(5)の誘導体の化学合成を行った(図3)。

ニコチン様アセチルコリン受容体の $\alpha 3$ および $\beta 4$ サブユニットをコードするcDNAを含むプラスミドを制限酵素で直鎖化し、これを鋳型として、RNAをインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNAを注入し、18℃で4-6日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なっ

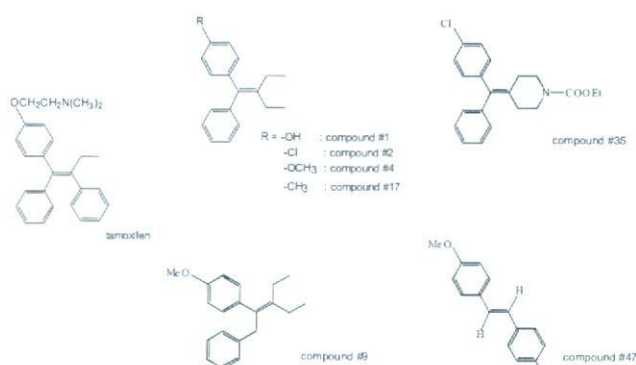


図2

た。実験に用いたタモキシフェンおよび関連化合物の構造式を図2に示す。なお、タモキシフェンをのぞく化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、化合物の番号は研究室における通し番号に従った。

く化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、化合物の番号は研究室における通し番号に従った。

また、Ca²⁺依存性K⁺チャンネル(hSlo α , rSlo α , hSlo β_1 , rSlo β_1 , hSlo β_4)、遅延整流性K⁺チャンネル(HERG, KvLQT1, minK)、電位依存性Ca²⁺チャンネル(Ca_v1.2, Ca_v1.3, Ca_v2.1, Ca_v2.2)、電位依存性Na⁺チャンネル(SCN5A)、Na⁺-Ca²⁺交換体(NCX1.1)をpcDNA3にサブクローニングし、哺乳動物細胞を用いた一過性発現系の構築を行った。さらにこの系を用いてタモキシフェン類縁化合物およびスチルベン誘導体ならびに松脂の成分について化合物の作用を評価した。評価は1)膜電位感受性色素を用いた化合物の(主としてカリウムチャンネルに対する)作用による膜電位変化を蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットに行い、さらに2)ホールセルパッチクランプ法およびインサイドアウトパッチクランプ法により詳細に検討した。実験に用いたタモキシフェンおよび関連化合物の構造式を図1および図3に示す。なお、タモキシフェンをのぞく化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、化合物の番号は研究室における通し番号に従った。

GLASTに対する影響の検討では生後3日令ラット脳大脳皮質を0.25%トリプシン及び0.01%DNase処理し、得られた細胞を10%FBS含有改変DMEM培地でコンフルエントになるまで10-15日間培養した。フラスコを振とうし、培養細胞からアストロサイト以外の細胞を除去し、再度コンフルエントになるまで7日間培養した。0.1%トリプシン1mMEDTAを用いてアストロサイトを96穴プレートに再播種しさらに7日間培養した。この培養細胞に検体を加えGLASTに対する影響を検討した。グルタミン酸取り込み量は、培地に100mMのL-グルタミン酸を添加し、1時間後の培地中グルタミン酸残存量により算出した。このとき、MTT/LDH同時測定法により被験物質の細胞毒性についても検討した。タモキシフェンをのぞく化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研

研究室で合成されたものであり、この報告書では研究室におけるコード名で記す。

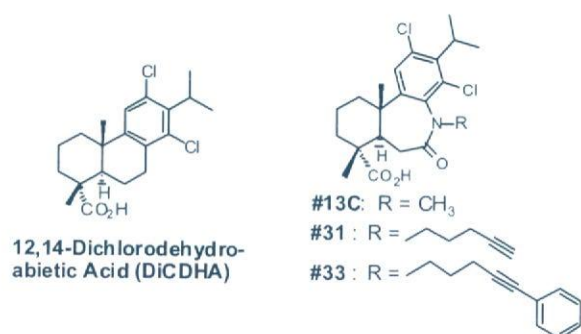


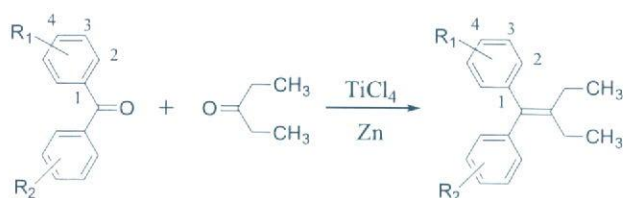
図3

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法)および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

C. 研究結果

化合物3は基本的には置換ベンゾフェノンとペンタン-3-オンとの McMurry カップリング反応によって合成した。収率は50~80%で生成物を得ることが出来た。カラムクロマトグラフィーによって精製した。



一方スチルベン誘導体は購入した。置換基を有する様々なスチルベン誘導体の合成については今後の検討課題である。

またデヒドロアビエチン酸(5)から容易に誘導化

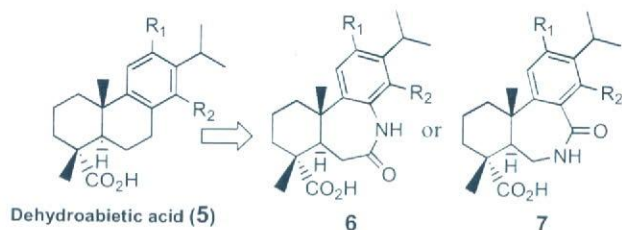


図4

されるヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)(7)を合成しイオンチャネルへの効果を調べた(図4)。以前デヒドロアビエチン酸(5)のチャネルへの効果を調査した経緯があるためである。ニコチン様アセチルコリン受容体に対する検討では、300 μ Mのアセチルコリンで誘発されるこの受容体チャネルを介するイオン電流に対し、試みた7つの化合物のうち、compound #2 および compound #17 は100 μ Mまでの濃度で明瞭な影響を示さなかった。compound #1, compound #4, compound #9, compound #35 の4つの化合物では、10 μ Mまでの濃度で影響が認められなかったが、100 μ Mにおいて明瞭な抑制作用が観察された。compound #47 では、1 μ M および 100 μ Mの濃度において抑制作用が認められたが、この作用は10 μ Mでは見られなかった。

ヒト培養細胞における化学物質リスク評価系として各種イオンチャネル(Ca²⁺チャネル、Na⁺チャネル、K⁺チャネル、Na⁺-Ca²⁺交換体)の一過性発現系を構築した。

Ca²⁺依存性 K⁺チャネルの活性に対する化合物(Fig. 1)の作用を検討した。タモキシフェンは10 μ Mの濃度で弱い増強を示した。compound #47(図2)は1~10 μ Mにおいて増強作用を示した。一方、12,14ジクロロデヒドロアビエチン酸は10 μ Mにおいて弱い増強作用を示したのに対し(図3)、化合物#13Cはほとんど作用を示さず、これに対し#31は弱い増強作用を示した。しかしながら、#33Cは著明なCa²⁺依存性K⁺チャネル開口作用を示した。この化合物はHEK293細胞に内在性に発現する電位依存性K⁺チャネルに対してはむしろ弱い遮断作用を示した。これらの結果から、電位依存性K⁺チャネルファミリーの中でもサブタイプ特異的に遮断作用あるいは開口作用を示すことが明らかとなった。

GLASTに対する検討では、このトランスポーターの培養ラットアストロサイトにおける発現を薬理的に確認したGLAST、GLT1に共通のアンタゴニストであるTBOA(24時間処理)ではL-gluの取り込みが有意に

阻害されたが、GLT1 特異的なアンタゴニストである DHK (24 時間処理) では L-glu の取り込みが阻害されなかったことから培養ラットアストロサイトには GLAST が選択的に発現していることが確認された。タモキシフェンおよび 16 種の関連化合物をこの系で評価したところ、タモキシフェンおよび YAK037 は 1 pM, 1 nM および 1 μ M において GLAST を介したグルタミン酸取り込みを阻害した。また、YAK01 は 1 μ M で阻害作用を示した。これらの化合物は 1 mM の濃度においてグルタミン取り込みを負の値(見かけ上の放出増大)を示したが、MTT/LDH 測定により、これは細胞毒性による生細胞数の減少に由来することが示唆され、このことは顕微鏡像からも支持された。タモキシフェン、YAK037 および YAK01 について阻害作用のメカニズム解明を試みた。まずグルタミン酸トランスポーター阻害薬である TBOA (1mM) 存在下でのトランスポーター活性について検討した。TBOA 存在下で化合物の阻害作用は一様に減弱し、化合物の作用はトランスポーターを介していることが示された。次に各々の化合物の阻害作用におけるエストロゲン受容体 (ER)、ホスフォイノシチド-3 キナーゼ (PI3K)、細胞分裂促進タンパク質キナーゼ (MAPK) の関与について ICI 182,780 (E2 受容体遮断薬)、LY294002 (PI3K 阻害薬)、U0126 (MAPKK 阻害薬) を用いて検討した。その結果、これらの薬物に対する感受性よりタモキシフェンおよび YAK01 のグルタミン酸取り込み阻害作用には ER、PI3K、および MAPK が関与することが示唆された。一方 YAK037 では MAPK のみが関与している可能性が示唆された。

D. 考察

合成した化合物を分担研究者の赤羽、中澤によってチャンネルへの効果を調査した。ヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)は遅延整流性カリウムチャンネルに対しては弱い抑制作用を示す一方でカルシウム依存性カリウムチャンネルに対して開口作用を示す化合物を見出し、その開口活性に関わる官能基を同定しつつある。タモキシフェン誘導体についても弱いながらもカルシウム依存性カリウムチャンネルに対して開口

活性を示す化合物を見出した。

ニコチン様アセチルコリン受容体に対する検討では、7 つのタモキシフェン関連化合物のうち、5 つが抑制作用を示した。抑制を示さなかった compound #2 および compound #17 は母核が共通で、1 か所の置換基のみが互いに異なる化合物である。抑制を示した化合物のうち compound #1 および compound #4 も同様の構造を有するが、この 2 つの化合物では compound #2 あるいは compound #17 とは異なり置換基に酸素原子が含まれている。このこと抑制作用の有無に係するのかも知れない。抑制を示した残りの 2 つの化合物は上記 4 つとは母核を異にするが、母核を構成する 2 つのベンゼン環の配置に類似しており、この構造も抑制に関与する可能性が考えられる。compound #47 ではその構造に含まれるベンゼン環の配置が上記の 6 つとは異なっており、このことが抑制作用における複雑な濃度依存性に関わる一因であるかも知れない。compound #47 に見られた複雑な濃度依存性は、昨年度検討した ATP 受容体チャネル (P2X 受容体) では比較的多く見られたこれらの化合物の複雑な作用態度と類似している。しかし、ATP 受容体チャネルへの作用には nM レベルという低濃度領域で観察されるものが含まれており、これと比較すると、ニコチン様アセチルコリン受容体への作用は弱いと言える。

電位依存性 K⁺チャンネルファミリーは蛋白分子内に相同性の高い領域とサブタイプ固有の領域を有する。よってこれら一連の K⁺チャンネルサブタイプに対する化合物#33C の作用をさらに検討することにより、化合物#33C の特異的な結合に関与するアミノ酸を特定することができ、化合物#33C が認識する蛋白構造を推定することができるであろう。特に K⁺チャンネルファミリーはイオンチャンネルの中でも早くから X 線結晶回折による 3 次元構造の解析が進んでいることから、化学物質の構造とそれが結合する蛋白の高次構造を計算する上で有用なプラットフォームとなる。今後、さらに低濃度での作用や構造の異なる受容体等に対する作用も検討する必要がある。

グルタミン酸トランスポーターに対して明瞭な阻害作用を示した化合物のうち、タモキシフェンおよび YAK01 は母核のベンゼン環の数は異なる(それぞれ 3 個と 2 個)が、置換基の種類は違うものの同等な位置に存在する 1 個のみである。これらと同様の構造を有する YAK024 では明瞭な作用が認められなかったものの、この構造は阻害作用の基本の 1 つであるかも知れない。阻害作用を示した残りの 1 つである YAK037 は母核の 4 つのベンゼン環を含むが、唯一の置換基の位置は上記の 3 つの化合物と同等である。薬理的検討の結果、YAK037 はタモキシフェンあるいは YAK01 とは異なる細胞内経路を介して抑制作用を惹起することが示唆された。このような違いも化学構造の違いに由来する可能性が考えられる。

E. 結論

アンチエストロゲンであるタモキシフェンの関連化合物のイオン・チャネル型であるニコチン様アセチルコリン受容体に対する作用をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で行ない、この系が各種化学物質のリスク評価に有用となりうることを示した。

哺乳類細胞発現系を用いた化学物質リスク評価系として各種イオンチャネル (Ca^{2+} チャネル、 Na^+ チャネル、 K^+ チャネル、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体)の一過性発現系を構築した。その一部を用いてステロイドのフラグメント構造を持つ化合物および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸の誘導体について作用を検討し、いくつかの化合物がカルシウム依存性 K^+ チャネルに対して著明な開口作用を示すことを見出した。また、培養細胞を用いたグルタミン酸トランスポーターに対する検討においてもこの系のリスク評価における有用性が示された。

基本的な構造を有するタモキシフェン誘導体および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸誘導体はチャネルへの開口活性を有し、生物学的な応答を引き起こすことが判明しつつある。さらにコンビナトリアルな合成法を取り入れ、基本部分構造の組み合わせた多種類の化合物合成を行う必要がある。

F. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K, b-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, 1150 108-120 (2007)

Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)

Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 21, 521-526 (2007)

Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K., and Usami, M. Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats. *Reproduct. Toxicol.* 24, 409-413 (2007)

Usami, M., Mitsunaga, K., and Nakazawa, K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured embryos. *Birth Defects Res. B* 80, 383-395 (2007)

Iida, K., Teng, J., Tada, T., Saka, A., Tamai, M., Izumi-Nakaseko, H., Adachi-Akahane, S., Iida, H.: Essential, completely conserved glycine residue in the domain III S2-S3 linker of voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunits in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* **282**(35): 25659-25667 (2007).

Oda, S., Sato, F., Okada, A., Akahane, S., Igarashi,

H., Yokofujita, J., Yang, J., Kuroda, M.:

Immunolocalization of muscarinic receptor subtypes in the reticular thalamic nucleus of rats. *Brain Res Bull.* **74(5)**: 376-384 (2007).

2. 学会発表

Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa, hGFAP プロモーター下流に DsRed をもつレンチウイルスを用いたアストロサイト特異的標識法の確立 第30回日本神経科学大会 (2007, 9)

Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, Astrocyte-specific labeling with a recombinant lentiviral vector carrying DsRed protein driven by a human glial fibrillary acidic protein promoter. 2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2007. 10)

佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤憲一, タモキシフェンと類縁化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用 第81回日本薬理学会年会 (2008. 3)

Sato K, Matsuki N, Nakazawa K, Estrogens inhibit L-glutamate uptake by astrocytes by membrane estrogen receptor alpha. US-Japan joint meeting for glia research (2008. 3)

Adachi-Akahane, S., Naguro, I., Izumi-Nakaseko, H., Tsuru, H.: Signaling molecular complex associated with L-type calcium channel in atria. XIX World Congress of the ISHR (International Society for Heart Research) (2007 年 6 月)

赤羽 悟美: カルシウムチャネルの構造と機能制御 脳血管シンポジウム (2007 年 8 月)

中瀬古(泉) 寛子, 村上慎吾, 倉智嘉久, 水流 弘通, 赤羽悟美: 心房筋 L 型 Ca^{2+} チャネル $\text{Ca}_v1.2$

と $\text{Ca}_v1.3$ の開閉制御機構とペースメーカー活動電位における役割 第17回日本循環薬理学会 (2007 年 12 月)

小川亨, 中瀬古寛子, 古美門千紗, 金子亜矢, 行方衣由紀, 恒岡弥生, 高原章, 田中光, 田中直子, 水流弘通, 赤羽悟美: 洞房結節活動電位の緩徐脱分極相に $\alpha 1D$ チャネル電流が寄与する: $\text{S}(+)$ -efonidipine を用いた検討 第81回日本薬理学会年会 (2008 年 3 月)

中瀬古寛子, 村上慎吾, 倉智嘉久, 水流弘通, 赤羽悟美: 心房筋 L 型カルシウムチャネル $\text{Ca}_v1.3$ のチャネル動態とペースメーカー活動電位における役割 第85回日本生理学会大会 (2008 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

佐藤薫, 中澤憲一, 大和田 智彦
発明名称: グルタミン酸トランスポーター阻害剤
出願日: 2008/02/14
出願番号: 特願 2008-32687

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費(化学物質リスク研究事業)

平成19年度分担報告研究報告書

タモキシフェンや松脂の成分の誘導体の化学合成に関する研究

分担研究者 大和田 智彦 東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室・教授

研究要旨

エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンは、その活性は比較的弱いものの非ステロイド作用としてカルシウム依存性カリウムチャネル(BKチャネル)開口活性を持つことが報告されている。このようにタモキシフェンの膜タンパク質との相互作用の一般性も考えられる。本分担研究ではタモキシフェンの構造から基本部分構造を抽出し、簡略化して、より汎用化学物質の構造に近い構造を設計し、その化学物質を合成した。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸の誘導体の化学合成を行いイオンチャネル、イオン・チャネル型受容体やトランスポーターに対する作用を調査するための化学物質合成を行った。

A. 研究目的

エストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンに含まれるジアリールエチレン構造を有する化合物を合成し非ステロイド作用としてイオンチャネル、イオン・チャネル型受容体やトランスポーターなど膜タンパク質に対する作用を調査する。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸の誘導体の化学合成を行い、天然資源誘導体を持つイオンチャネルに対する作用を調査する。本分担者は化合物の設計と合成を行った。

B. 研究方法

タモキシフェンモ(1)は4置換オレフィンでありステロイド活性には、アンモニウム基の結合し

たベンゼン環(A)と同じオレフィン炭素に結合するベンゼン環(B)のパラ位の生体内での酸化による、フェノール基の生成が必須であることが分かっている。このようなフェノール基の存在が膜タンパク質であるイオンチャネルとの相互作用に重要であるかは不明である。

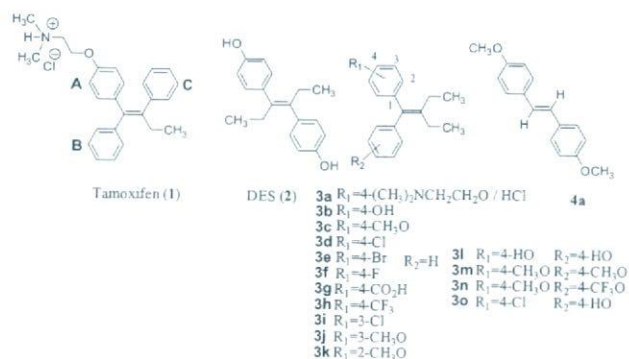
そこで、合成的に簡便で誘導体合成に有用で、かつ一般に汎用されている化学物質の部分構造となりうるジアリールエチレン構造を抽出してその誘導体の合成に着手した。なお、ステロイドアンタゴニストであるDESもBKチャネル開口活性が報告されており、スチルベン誘導体について今年度はその一部の検討を行った。また製紙表面加工等に汎用され自然界に豊富に存在する松脂の成分であるデヒドロアビエチン酸(5)の誘導体の化学合成を行った。

(倫理面への配慮)

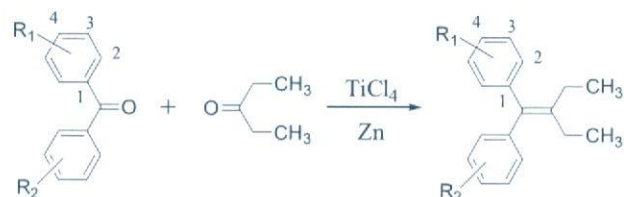
特になし。

C. 研究結果

化合物3は基本的には置換ベンゾフェノンとペンタン-3-オンとの McMurry カップリング反応によって合

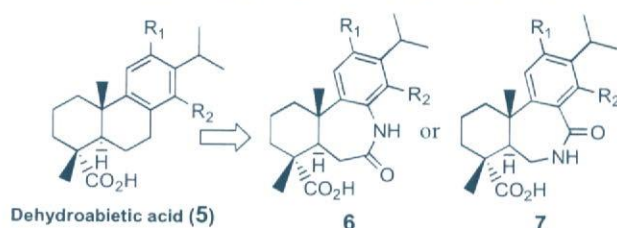


成した。収率は50～80%で生成物を得ることが出来た。カラムクロマトグラフィーによって精製した。



一方スチルベン誘導体は購入した。置換基を有する様々なスチルベン誘導体の合成については今後の検討課題である。

またデヒドロアビエチン酸(5)から芳香環の置換基によって誘導化されるヘキサヒドロジベン



ツアゼピノン誘導体(6)を合成しイオンチャンネルへの効果を調べた。以前デヒドロアビエチン酸(5)のチャンネルへの効果を調査した経緯があるためである。

D. 考察

合成した化合物を分担研究者の赤羽、中澤によってイオンチャンネル、イオン・チャンネル型受容体やトランスポーターへの効果を調査した。ヘキサヒドロジベンツアゼピノン誘導体(6)は遅延整流性カリウムチャンネルに対しては弱い抑制作用を示す一方でカルシウム依存性カリウムチャンネルに対して開口作用を示す化合物を見出し、その開口活性に関わる官能基を同定しつつある。タモキシフェン誘導体についても弱いながらもカルシウム依存性カリウムチャンネルに対して開口活性を示す化合物を見出した。タモキシフェンおよびこれに構造が類似した化合物7種のイオンチャンネル型受容体に対する作用を検討し細胞外 ATP の受容体である P2X2 受容体を介するイオン電流をに対し、検討した化合物のほとんどすべての化学物質が影響を与えた。

E. 結論

基本的な構造を有するタモキシフェン誘導体および

自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸誘導体はチャンネルへの開口活性を有し、生物学的な応答を引き起こすことが判明した。

F. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)

2. 学会発表

佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤憲一, タモキシフェンと類縁化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用 第81回日本薬理学会年会 (2008. 3)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (出願)

佐藤薫, 中澤憲一, 大和田 智彦

発明名称: グルタミン酸トランスポーター阻害剤

出願日: 2008/02/14

出願番号: 特願 2008-32687

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発現系を利用したイオン・チャネル型受容体に対するリスク評価に関する研究

分担研究者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長

協力研究者 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・第一室長

研究要旨

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、アンチエストロゲンであるタモキシフェンに構造が類似した化合物 7 種のイオン・チャネル型受容体に対する作用を検討した。アセチルコリンのイオン・チャネル型受容体であるニコチン様アセチルコリン受容体を介するイオン電流に対し、検討した化合物のほとんどが影響を与えたが、細胞外 ATP のイオン・チャネル型受容体である P2X2 受容体で認められたような低濃度からの作用は観察されなかった。これと並行して行ったグルタミン酸トランスポーターに対する検討では、タモキシフェンおよび関連化合物に阻害作用が認められ、この作用にはエストロゲン受容体、ホスフォイノシチド-3 キナーゼおよび細胞分裂促進タンパク質キナーゼが関与することが示された。以上のことから、これらの系が一連の関連化合物のリスク評価に利用可能であることが示された。

A. 研究目的

アフリカツメガエル卵母細胞は遺伝子クローニングされた cDNA を利用することにより、目的とするタンパク質を簡便に発現できる系として広く用いられている。発現させたタンパク質は均一であり、各種化合物の作用の比較を確実にこなうことができる。野生型の cDNA を分子生物学的手法により改変を加え、変異型のタンパク質を発現することも容易である。この変異型タンパク質に対する作用を調べることで、化学物質の作用点を特定することも可能である。これらの利点をリスク評価に活かすことを目的とし、アンチエストロゲンであるタモキシフェンおよびその関連物質のイオン・チャネル型受容体であるニコチン様アセチルコリン受容体に対する作用を検討し、評価系としての有用性を確認した。また、これと並行して、これらの化学物質のグルタミン酸トランスポーター (GLAST) に対する影響も検討した。

B. 研究方法

ニコチン様アセチルコリン受容体の $\alpha 3$ および $\beta 4$ サブユニットをコードする cDNA を含むプラスミドを制限酵素で直鎖化し、これを鋳型として、RNA をインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNA を注入し、18℃で 4-6 日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。検体として使用した化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、この報告書では研究室における通し番号で記す。

GLAST に対する影響の検討では生後 3 日令ラット脳大脳皮質を 0.25% トリプシン及び 0.01% DNase 処理し、得られた細胞を 10% FBS 含有改変 DMEM 培地でコンフルエントになるまで 10-15 日間培養した。フラスコを振とうし、培養細胞からアストロサイト以外の細胞を除去し、再度コンフルエントになるまで 7 日間培養した。0.1% トリプシン 1 mM EDTA を用い

てアストロサイトを 96 穴プレートに再播種しさらに 7 日間培養した。この培養細胞に検体を加え GLAST に対する影響を検討した。グルタミン酸取り込み量は、培地に 100 mM の L-グルタミン酸を添加し、1 時間後の培地中グルタミン酸残存量により算出した。このとき、MTT/LDH 同時測定法により被験物質の細胞毒性についても検討した。タモキシフェンをのぞく化合物は本研究事業の主任研究者である大和田の研究室で合成されたものであり、この報告書では研究室におけるコード名で記す。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウィルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法)および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

C. 研究結果

ニコチン様アセチルコリン受容体に対する検討では、300 μ M のアセチルコリンで誘発されるこの受容体チャネルを介するイオン電流に対し、試みた7つの化合物のうち、compound #2 および compound #17 は 100 μ M までの濃度で明瞭な影響を示さなかった。compound #1, compound #4, compound #9, compound #35 の4つの化合物では、10 μ M までの濃度で影響が認められなかったが、100 μ M において明瞭な抑制作用が観察された。compound #47 では、1 μ M および 100 μ M の濃度において抑制作用が認められたが、この作用は 10 μ M では見られなかった。

GLAST に対する検討では、このトランスポーターの培養ラットアストロサイトにおける発現を薬理学的に確認した GLAST, GLT1に共通のアンタゴニストであるTBOA(24時間処理)ではL-gluの取り込みが有意に阻害されたが、GLT1 特異的なアンタゴニストであるDHK(24時間処理)ではL-gluの取り込みが阻害されなかったことから培養ラットアストロサイトには

GLAST が選択的に発現していることが確認された。タモキシフェンおよび 16 種の関連化合物をこの系で評価したところ、タモキシフェンおよび YAK037 は 1 pM, 1 nM および 1 μ M において GLAST を介したグルタミン酸取り込みを阻害した。また、YAK01 は 1 μ M で阻害作用を示した。これらの化合物は 1 mM の濃度においてグルタミン取り込みを負の値(見かけ上の放出増大)を示したが、MTT/LDH 測定により、これは細胞毒性による生細胞数の減少に由来することが示唆され、このことは顕微鏡像からも支持された。タモキシフェン、YAK037 および YAK01 について阻害作用のメカニズム解明を試みた。まずグルタミン酸トランスポーター阻害薬である TBOA(1mM)存在下でのトランスポーター活性について検討した。TBOA 存在下で化合物の阻害作用は一様に減弱し、化合物の作用はトランスポーターを介していることが示された。次に各々の化合物の阻害作用におけるエストロゲン受容体(ER), ホスフォイノシチド-3 キナーゼ(PI3K), 細胞分裂促進タンパク質キナーゼ(MAPK)の関与について ICI 182,780(E2 受容体遮断薬), LY294002(PI3K 阻害薬), U0126(MAPKK 阻害薬)を用いて検討した。その結果、これらの薬物に対する感受性よりタモキシフェンおよび YAK01 のグルタミン酸取り込み阻害作用には ER, PI3K, および MAPK が関与することが示唆された。一方 YAK037 では MAPK のみが関与している可能性が示唆された。

D. 考察

ニコチン様アセチルコリン受容体に対する検討では、7 つのタモキシフェン関連化合物のうち、5 つが抑制作用を示した。抑制を示さなかった compound #2 および compound #17 は母核が共通で、1 か所の置換基のみが互いに異なる化合物である。抑制を示した化合物のうち compound #1 および compound #4 も同様の構造を有するが、この 2 つの化合物では compound #2 あるいは compound #17 とは異なり置換基に酸素原子が含まれている。このこと抑制作用の有無に関係するのかも知れな

い。抑制を示した残りの2つの化合物は上記4つとは母核を異にするが、母核を構成する2つのベンゼン環の配置に類似しており、この構造も抑制に関与する可能性が考えられる。compound #47ではその構造に含まれるベンゼン環の配置が上記の6つとは異なっており、このことが抑制作用における複雑な濃度依存性に関わる一因であるかも知れない。compound #47に見られた複雑な濃度依存性は、昨年度検討したATP受容体チャネル(P2X受容体)では比較的多く見られたこれらの化合物の複雑な作用態度と類似している。しかし、ATP受容体チャネルへの作用にはnMレベルという低濃度領域で観察されるものが含まれており、これと比較すると、ニコチン様アセチルコリン受容体への作用は弱いと言える。

グルタミン酸トランスポーターに対して明瞭な阻害作用を示した化合物のうち、タモキシフェンおよびYAK01は母核のベンゼン環の数は異なる(それぞれ3個と2個)が、置換基の種類は違うものの同等な位置に存在する1個のみである。これらと同様の構造を有するYAK024では明瞭な作用が認められなかったものの、この構造は阻害作用の基本の1つであるかも知れない。阻害作用を示した残りの1つであるYAK037は母核の4つのベンゼン環を含むが、唯一の置換基の位置は上記の3つの化合物と同等である。薬理的検討の結果、YAK037はタモキシフェンあるいはYAK01とは異なる細胞内経路を介して抑制作用を惹起することが示唆された。このような違いも化学構造の違いに由来する可能性が考えられる。

E. 結論

アンチエストロゲンであるタモキシフェンの関連化合物のイオン・チャネル型であるニコチン様アセチルコリン受容体に対する作用をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で行ない、この系が各種化学物質のリスク評価に有用となりうることを示した。また、培養細胞を用いたグルタミン酸トランスポーターに対する検討においてもこの系のリスク評価における有用性が示され

た。いずれの系も構造的類縁化合物を検体とすることにより、構造と作用との関連性を明らかにし、リスク評価において、化学物質のヒトへの影響についての予測性を高めることが期待される。

F. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K, b-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, 1150 108-120 (2007)

Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)

Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 21, 521-526 (2007)

Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K., and Usami, M. Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats. *Reproduct. Toxicol.* 24, 409-413 (2007)

Usami, M., Mitsunaga, K., and Nakazawa, K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured embryos. *Birth Defects Res. B* 80, 383-395 (2007)

2. 学会発表

Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa, hGFAP
プロモーター下流に DsRed をもつレンチウ
ィルスを用いたアストロサイト特異的標識法
の確立 第30回日本神経科学大会 (2007, 9)

Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K,
Astrocyte-specific labeling with a recombinant
lentiviral vector carrying DsRed protein driven by
a human glial fibrillary acidic protein promoter.
2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience
(2007. 10)

佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中
澤憲一, タモキシフェンと類縁化合物のアス
トロサイトグルタミン酸トランスポーターに
対する作用 第81回日本薬理学会年会 (2008.
3)

Sato K, Matsuki N, Nakazawa K, Estrogens inhibit
L-glutamate uptake by astrocytes by membrane
estrogen receptor alpha. US-Japan joint meeting
for glia research (2008. 3)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

佐藤薫, 中澤憲一, 大和田智彦

発明名称: グルタミン酸トランスポーター阻害剤

出願日: 2008/02/14

出願番号: 特願 2008-32687

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発現系を利用したイオンチャネルに対するリスク評価に関する研究

分担研究者 赤羽 悟美 東邦大学医学部医学科薬理学講座 准教授

研究要旨

哺乳類細胞発現系を用いた化学物質リスク評価系として各種イオンチャネル(Ca^{2+} チャネル、 Na^+ チャネル、 K^+ チャネル、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体)の発現系を構築した。その一部を用いてステロイドのフラグメント構造を持つ化合物および自然界に豊富に存在するデヒドロアビエチン酸の誘導体の作用について膜電位感受性色素・ Ca^{2+} 感受性蛍光色素・パッチクランプ法により検討した。その結果、いくつかの化合物が電位依存性 K^+ チャネルの開閉機構に影響を及ぼすことを見出した。また、プリン受容体に連関したカルシウムシグナル動因機構に影響を与えることを観察した。

A. 研究目的

化学物質の膜タンパク質の機能に対するリスク評価系の開発を目的として、リスク評価のハイスループット化へ向けてその基盤となる評価系の構築と評価プロトコル確立のための基礎実験を行った。ユビキタスに発現している膜タンパク質を評価の対象とし、ヒト由来培養細胞(HEK293 細胞)を用いてイオンチャネル・トランスポーター・受容体の発現系を構築した。さらにこの系を用いて一部の化学物質の作用を検討した。

B. 研究方法

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル(hSlo α , rSlo α , hSlo β_1 , rSlo β_1 , hSlo β_4)、遅延整流性 K^+ チャネル(HERG, KvLQT1, minK)、電位依存性 Ca^{2+} チャネル($\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$)、電位依存性 Na^+ チャネル(SCN5A)、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1.1)をpcDNA3にサブクローニングし、哺乳動物細胞を用いた一過性発現系の構築を行った。さらにこの系を用いてタモキシフェン類縁化合物およびスチルベン誘導体ならびに松脂の成分について化合物の作用を評価した。評価は 1) 膜電位感受性色素を用い化合物の(主としてカリウムチャネルに対する)作用による膜電位変化を、

また、カルシウム感受性蛍光色素を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットに測定し、2) 受容体応答および Ca^{2+} チャネル活性の指標として Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬(Fluo-4)の蛍光強度変化を蛍光プレートリーダーおよび蛍光画像解析装置を用いて解析し、さらに 3) ホールセルパッチクランプ法およびインサイドアウトパッチクランプ法によりイオンチャネルに対する作用を詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

各種イオンチャネルおよび交換体のヒト培養細胞における発現系を構築した。

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性に対する化合物(Fig. 1)の作用を検討した。タモキシフェンは 10^{-5}M の濃度で弱い増強を示した。化合物 #48 は作用を示さず、#47は $10^{-6}\sim 10^{-5}\text{M}$ において増強作用を示した。一方、12,14ジクロロデヒドロアビエチン酸は 10^{-5}M において弱い増強作用を示したのに対し、化合物#13Cはほとんど作用を示さず、これに対し#31は弱い増強作用を示した。しかしながら、#33Cは著明な Ca^{2+} 依存性 K^+

チャンネル開口作用を示した。この化合物は HEK293 細胞に内在性に発現する電位依存性 K⁺チャンネルに対してはむしろ弱い遮断作用を示した。また、これらの化合物は、電位依存性 Ca²⁺チャンネル、電位依存性 Na⁺チャンネル、Na⁺-Ca²⁺交換体に対しては顕著な作用が認められなかった。よって、電位依存性 K⁺チャンネルファミリーの中でもサブタイプ特異的に遮断作用あるいは開口作用を示すことが明らかとなった。

また、プリン受容体(P2Y 受容体)を介した Ca²⁺応答に対するこれらの化合物の作用も合わせて検討した。化合物 #1 は HEK293 細胞のプリン受容体応答(ATP に対するプリン受容体を介した細胞内 Ca²⁺濃度上昇)を 10⁻¹¹~10⁻⁷M の濃度において抑制した。一方、10⁻⁷M 以上の濃度では HEK293 細胞に直接作用し細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。化合物 #47 についても、10⁻¹¹~10⁻⁷M の濃度においてプリン受容体応答抑制作用が見られた。これに対し、化合物 #2 および #9 では顕著な作用は観察されなかった。低濃度(10⁻¹²~10⁻⁷M)での作用や構造の異なる受容体への作用を検討中である。

D. 考察

電位依存性 K⁺チャンネルファミリーはユビキタスに発現する膜蛋白である。K⁺チャンネルは分子内にサブタイプ間で相同性の高い領域とサブタイプ固有の領域を有する。また、他の電位依存性チャンネル(Ca²⁺チャンネル、Na⁺チャンネルなど)との間に保存された領域も知られている。よってこれら一連のイオンチャンネルに対する化合物#33C の作用をさらに検討することにより、化合物#33C の特異的な結合に関与するアミノ酸を特定することができ、化合物 #33C が認識する蛋白構造を推定することができる。特に K⁺チャンネルファミリーはイオンチャンネルの中でも早くから X 線結晶回折による 3 次元構造の解析が進んでいることから、化学物質の構造とそれが結合する蛋白の高次構造を計算する上で有用なプラットフォームとなる。3 次元構造モデルの構築に向けて、現在、電位依存性 K⁺チャンネルに対するこれらの化合物の作用を検討中である。

一方、プリン受容体も全身のあらゆる組織・細胞にユビキタスに発現している。化合物 #1 および #47 は低濃度(10⁻¹¹~10⁻⁷ M)でプリン受容体応答に影響を与えたことから、リスク化合物となる可能性が考えられる。現在、類縁化合物についてさらに検討中である。

E. 結論

哺乳類細胞発現系を用いた化学物質リスク評価系として各種イオンチャンネル(Ca²⁺チャンネル、Na⁺チャンネル、K⁺チャンネル、Na⁺-Ca²⁺交換体)の一過性発現系を構築した。その一部を用いてステロイドのフラグメント構造を持つ化合物および自然界に豊富に存在するデヒドロアピエチン酸の誘導体について作用を検討し、いくつかの化合物が電位依存性 K⁺チャンネルに対してサブタイプ特異的な開口または遮断作用を示すことを見出した。また、プリン受容体を介した Ca²⁺シグナル応答に対しても低濃度で影響を与えることを見出した。

特にタモキシフェン誘導体(化合物#1 および #47)はカルシウム依存性カリウムチャンネルやプリン受容体など、異なる種類の膜蛋白に低濃度で作用を示したことから、広範な膜蛋白に影響を与えるリスク化合物としての構造を有することが考えられる。一方、デヒドロアピエチン酸誘導体はカルシウム依存性カリウムチャンネルに選択的な作用を示したことから、特定の標的蛋白に対して構造特異的に結合しリスク作用を発現すると考えられた。

F. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iida, K., Teng, J., Tada, T., Saka, A., Tamai, M., Izumi-Nakaseko, H., Adachi-Akahane, S., Iida, H.: Essential, completely conserved glycine residue in the domain III S2-S3 linker of voltage-gated calcium channel alpha 1 subunits in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* **282**(35):

25659-25667 (2007).

- 2) Oda, S., Sato, F., Okada, A., Akahane, S., Igarashi, H., Yokofujita, J., Yang, J., Kuroda, M.: Immunolocalization of muscarinic receptor subtypes in the reticular thalamic nucleus of rats. *Brain Res Bull.* **74(5)**: 376-384 (2007).

2. 学会発表

- 1) Adachi-Akahane, S., Naguro, I., Izumi-Nakaseko, H., Tsuru, H.: Signaling molecular complex associated with L-type calcium channel in atria. XIX World Congress of the ISHR (International Society for Heart Research) (2007 年 6 月)
- 2) 赤羽 悟美: カルシウムチャネルの構造と機能制御 脳血管シンポジウム (2007 年 8 月)
- 3) 中瀬古 (泉) 寛子、村上慎吾、倉智嘉久、水流弘通、赤羽悟美: 心房筋 L 型 Ca^{2+} チャネル $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の開閉制御機構とペースメーカー活動電位における役割 第 17 回日本循環薬理学会 (2007 年 12 月)
- 4) 小川亨、中瀬古寛子、古美門千紗、金子亜矢、行方衣由紀、恒岡弥生、高原章、田中光、田中直子、水流弘通、赤羽悟美: 洞房結節活動電位の緩徐脱分極相に $\alpha 1D$ チャネル電流が寄与する: $\text{S}(+)$ -efonidipine を用いた検討 第 81 回日本薬理学会年会 (2008 年 3 月)
- 5) 中瀬古寛子、村上慎吾、倉智嘉久、水流弘通、赤羽悟美: 心房筋 L 型カルシウムチャネル $\text{Ca}_v1.3$ のチャネル動態とペースメーカー活動電位における役割 第 85 回日本生理学会大会 (2008 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K	b-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells.	Brain Res.	1150	108-120	2007
Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K,	Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes				submitted
Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K.	Two-demensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for develepmental toxicity studies.	Toxicol. In Vitro	21	521-526	2007
Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K., and Usami, M.	Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats.	Reproduct. Toxicol.	24	409-413	2007
Usami, M., Mitsunaga, K., and Nakazawa, K.	Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured embryos.	Birth Defects Res.	B 80	383-395	2007
ida, K., Teng, J., Tada, T., Saka, A., Tamai, M., Izumi-Nakaseko, H., <u>Adachi-Akahan</u> <u>ne, S.</u> , Iida, H.:	Essential, completely conserved glycine residue in the domain III S2-S3 linker of voltage-gated calcium channel alpha1 subunits in yeast and mammals.	<i>J. Biol. Chem.</i>	282(35):	25659-25667	2007.
Oda, S., Sato, F., Okada, A., <u>Akahane, S.</u> , Igarashi, H., Yokofujita, J., Yang, J., Kuroda, M.	Immunolocalization of muscarinic receptor subtypes in the reticular thalamic nucleus of rats.	<i>Brain Res Bull.</i>	74(5):	376-384.	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

平成19年度 総括・分担研究報告書の「研究成果の刊行物・別刷」は
平成17年度～平成19年度 総合研究報告書の平成19年度の
「研究成果の刊行物・別刷」と同一ですので、総合研究報告書に
添付したものを参照してください。