

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高木 篤也

平成 20(2008)年 3 月

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高木 篤也

平成 20(2008)年 3 月

研究報告書目次

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 185
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 213
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 223
板井 昭子
4. 超高速分析法の検証と比較解析に関する調査研究 237
菅野 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 249

IV. 研究成果の刊行物・別刷 251

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・毒性部室長

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づ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を解析可能な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 70 物質についての測定を、AR 及び TR 系について各 50 物質についてのスクリーニング測定を実施した。また、ER α アゴニストアッセイ系については、OECDガイドライン化に向けて、ピアレビューにより示されたコメントへの対応を行った。一方、*in silico* スクリーニング系においては、アンドロゲン受容体(AR)について最新の結晶構造データをもとにモデルの再構築を行い予測性能の劇的な向上を得た。(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 系を用いアゴニスト型 ER、リガンド非結合型 ER と相互作用する配列を用いて約 50 化合物の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について、47 種の核内受容体及び関連する遺伝子の発現解析を進め、得られた結果を細胞のキャラクタライズ情報としてデータベース化した。(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、Troglitazone、Genistein、Tamoxifen を経口投与したマウスの肝臓における遺伝子発現データからの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。

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70物質についての測定を、AR及びTR系につ

いて各50物質についてのスクリーニング測定を実施した。また、ER α アゴニストアッセイ系については、OECDガイドライン化に向けて、ピアレビューにより示されたコメントへの対応を行った。一方、*in silico* スクリーニング系においては、アンドロゲン受容体(AR)について最新の結晶構造データをもとにモデルの再構築を行い予測性能の劇的な向上を得た。(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系を用いたアゴニスト型ER、リガンド非結合型ERと相互作用する配列を用いて約50化合物の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について、47種の核内受容体及び関連する遺伝子の発現解析を進め、得られた結果を細胞のキャラクタライズ情報としてデータベースした。(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、Troglitazone, Genistein, Tamoxifenを経口投与したマウスの肝臓における遺伝子発現データからの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。

B. 研究方法及び研究結果

(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スクリーニング手法の検証のため、既存化学物質についてそれぞれの系における大規模スクリーニングを実施し、得られた結果から化合物の内分泌か

く乱性についての検討と各系の結果の比較検討を行うことを目的としている。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 70 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 ガイドライン化に向けた作業として、ピアレビューにより示されたコメントへの対応を行った。一方、*in silico* スクリーニング系においては、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、アンドロゲン受容体 (AR) について最新の三次元構造情報に基づくドッキングモデルの再構築を行い、これまでに比べ予測性能の大幅な向上を得た。得られたモデルを用いて約 3000 化合物のバーチャルスクリーニングを実施した。

(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委託業務)

近年、化学物質の持つ有害作用の中で動物の生殖機能に影響を与えることが懸念される毒性影響、いわゆる内分泌かく乱化学物質 (EDCs) 問題が注目を集めている。化学物質の内分泌かく乱作用を評価するための毒性試験法は未だ確立されておらず、現在、OECD などの国際機関を中心に EDCs スクリーニング法の開発・評価プロジェクトが展開されている。本研究では Firefly Luciferase 遺伝子の上流にエストロゲ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) α 又は β 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) を使用した化学物質のエストロゲ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する。本年度は 70 物質についてヒト ER α 及び ER β を介するアゴニスト活性について検討を行った。

研究方法:

2.1 供試化学物質
付録 1 に示した。

2.2 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 Dimethylsulfoxide (DMSO) を溶媒として 10 mM に調製された試料、あるいは原粉として供給された化合物を、DMSO を溶媒として 10 mM に調製した試料を用いた。

10 mM に調製された化合物をそれぞれ DMSO にて 1/10 希釈を行い 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM 及び 10 nM とした。化合物は終濃度が 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM 及び 10 pM 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

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 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

当機構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 回連続繰り返り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。

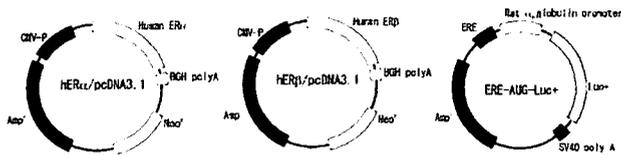


図 1 本研究に用いた受容体発現プラスミドおよびレポータープラスミド

3) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地 (イーグル MEM ニスシイ) 4.7 g、10% 炭酸水素ナトリウム (10 g→100 mL) 9 mL 及び 3% L-グルタミン (3 g→100 mL) 6 mL に精製水を加えて 500 mL とした (EMEM 基礎培地) 後、Dextran coated charcoal (DCC) 処理した牛胎児血清 (FBS) 56 mL を加え、ろ過滅菌して使用した。

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。

2.3 ER α 及び ER β アゴニスト検出系

2.3.1 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 (1 nM の E2) を添加した。

	化合物1		化合物2		化合物3		化合物4		化合物5		化合物6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	NC	-	-	-	-	-	-	-	PC	-	-	-

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

2.3.2 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 μ L/well)
- ↓ 培養一晚(12時間以上)

↓ Transfection 液調製

FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) 20 μ L

発現 Plasmid 2 μ g, レポーターPlasmid 8 μ g

無血清培地 580 μ 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 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(100 msec \times 50 interval)の積算

2.3.3 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。

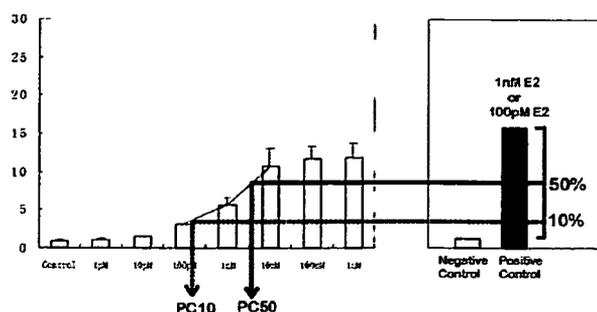


図2 DATA 処理法模式図(PC10、50 の定義)

研究結果:

3.1 本年度実施した ER α 及び ER β アゴニスト活性測定

本年度実施した 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、本年度実施した全 70 物質の試験結果を付録 1 に示す。

本年度実施した 70 物質のうち、ER α 及び ER β のいずれにおいても PC50 あるいは PC10 が得られた物質は 22 物質であり、その活性が同程度 (PC 値の違いが 5 倍未満) の物質は 15 物質であった。これらの物質には、4-Alkylphenol 類、Benzophenone 類、植物エストロゲン類、Diphenylmethane 類及び Fluorene を含む芳香族炭化水素などエストロゲン様作用を示すことが既知の物質が含まれていた。また、ER α 及び ER β のいずれにおいても PC50 を示した物質のうち ER889 (Clindamycin phosphate) はこれまでにエストロゲン様活性を示す物質として知見の無い構造であった。

(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: 大塚製薬診断事業エコスクリーン開発室)

昨年度までに構築した 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を用いてそれぞれ 50 化合物 (付録参照) についてアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を測定し、化合物の持つ特性についての知見を得ることを目的とした。

研究方法:

1. AR レポータージーンアッセイ

AR-EcoScreenTM 細胞を 1×10^5 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-GloTM: 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あらかじめ 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-EcoScreenTM 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、蛍光ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (Dual-GloTM: 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、pTRb-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)) 18.6ml を Medium (血清無添加) 620ml 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 6ml 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 pTRb-RXR 62ng、pIND-TRE-DR4 31

μg、phRLTK 31 μg のプラスミド Mix を同様に用いる。培養3時間後にサンプル及、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 μl を加え CO₂ インキュベータでさらに培養する。アンタゴニストアッセイの際に終濃度が 1x10⁻⁸M (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し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 benzo(b)fluoranthene (AT203) (PC10 = 2.70 × 10⁻⁶)、Cinnamic acid, phenethyl ester (AT205) (PC10 = 1.04 × 10⁻⁶)、Mepaniprim (AT209) (PC10 = 2.57 × 10⁻⁶)、4',6,7-Trimethoxyisoflavone (AT216) (PC10 = 1.81 × 10⁻⁷)、Formononetin (AT217) (PC10 = 8.22 × 10⁻⁸)、Benz(a)anthracene (AT218) (PC10 = 2.02 × 10⁻⁷)、2-hydroxyfluorene (AT221) (PC10 = 2.87 × 10⁻⁶)、7-Hydroxyflavone (AT222) (PC10 = 5.05 × 10⁻⁷)、6,7-dihydroxyflavone (AT232) (PC10 = 1.52 × 10⁻⁶)、3',4',7-trihydroxy isoflavone (AR248) (PC10 = 5.59 × 10⁻⁶) 及び 4-Hexanoylresorcinol (AR249) (PC10 = 2.35 × 10⁻⁶) が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、1,3-Diethyl-1,3-diphenylurea (AT201)、2-hydroxyfluorene (AT221)、6-Bromo-2-naphthol (ATA224)などがあった。

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(AT236、TR242)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)

近年、蛋白の単離精製や結晶構造解析技術の進歩はめざましく、内分泌かく乱化学物質の作用標的と推定される種々の核内受容体についても、リガンド結合ドメインの結晶構造データが多種公開されている。当研究者らは以前より、標的蛋白の立体構造(結晶構造またはモデリング)が利用できる場合に、任意の低分子リガンドの標的蛋白への結合様式と結合の強さを推定する自動ドッキングの方法論を確立してきた。また、化合物構造の高精度な3次元化法や標的蛋白-リガンドの複合体エネルギー極小化法、結合自由エネルギー推算法の開発も進めてきた。これら高度化した分子設計手法を効果的に組み合わせ、膨大な数の化合物から標的蛋白に安定に結合しうる少数の化合物を選別する *in*

silico スクリーニング法を開発し、実際の創薬テーマにおいて豊富な実績を上げている。本研究ではこれまでに、自動ドッキング法を核とした *in silico* スクリーニングの手法を、種々の化学物質の標的核内受容体に対する結合性予測に応用してきた。昨年度までは、エストロゲン受容体 α (ER α)、エストロゲン受容体 β (ER β)、及びアンドロゲン受容体 (AR) を標的として、各々の結合強度予測システムを構築し、それを多種の内分泌かく乱作用未知の化学物質に適用して、結合性予測値を導出してきた。これまでの一連の研究で、ER α 、ER β に関しては一定の予測性能が検証されているが、それに比較して、AR の結合強度予測システムの精度は明らかに不足していた。今年度の研究では、AR に対する予測精度向上をめざし、予測システムの再構築を行った。最近になって急激に増加した AR-リガンド複合体結晶構造からの知見を活かし、また、結合性予測式の導出に用いる実験データセット(トレーニングセット)の選別を工夫して、従来の予測性能の改善を目標とした。この新しい AR 結合性予測システムを用いて、約 3,000 化合物の予測計算を実施した。また、ER α に対しても、構築済みの予測システムを利用して、約 2,600 化合物の結合性予測を行った。

研究方法:

1. AR 結合強度予測システムの再構築

従来の AR 結合強度予測システムは、AR とアゴニスト R1881 (metribolone) の複合体結晶構造が唯一の立体構造情報であった時期(2004 年)に構築したものである。当時は AR 立体構造に対する知見が非常に限定的であった。最近になって、AR の結晶構造データが急速に増えてきており、本研究では、これらの情報を利用してより予測能力の高いシステムの構築を試みた。

一般に蛋白構造は、リガンドの結合に伴って一部の側鎖コンフォメーションが変化する。Induced fit と呼ばれる現象で、リガンドとの相互作用をより安定化するための動きである。時には主鎖コンフォメーションまで変化する。同じ標的蛋白であっても、どのようなコンフォメーションをとった構造を用いるかで、*in silico* スクリーニングの精度・成果が左右される。AR 結晶構造に対して、幾つかのリガンド(いずれも

アゴニスト)が結合した複合体構造が解明された現在では、*in silico* スクリーニングにより適した蛋白コンフォメーションの選択や、リガンド結合部位周辺の動きに関する知見をもとに戦略を立てることがやりやすくなった。今回は、公開されている AR 結晶構造のうち、dihydrotestosterone (DHT)、tetrahydrogestrinone (THG)、EM5744 が結合した3つの複合体構造の利用を検討した。これらの結晶構造におけるリガンド結合キャビティは他の構造に比べて比較的広く、多様な化学物質のドッキングが行いやすいと考えられる。

次節に述べる方法で、それぞれの AR 立体構造の準備を行った。また、3節に述べる方法で、予測システム構築のためのトレーニングセット化合物(98個)の立体構造準備も行なった。次に、4節で述べる方法で、3つの AR 構造に対する各化合物の自動ドッキング計算を実施して、それぞれの安定複合体モデルを生成した。その後、蛋白構造の動きを考慮した複合体構造のエネルギー極小化と詳細なエネルギー解析を経て、結合性予測式導出のための重回帰分析に使用する各独立変数の値を、各々の AR 構造に対して得た。最後に、重回帰分析により各々の AR 構造に対する結合性予測式を得た。

2. 3つの AR 構造の準備

前節で述べた3つの AR 構造-DHT 結合、THG 結合、EM5744 結合-は、それぞれ分解能 2.07 Å、1.75 Å、1.65 Å で解析され、Protein Data Bank (PDB)にて公開されている。PDB の ID は、順に 1t63、2amb、2pnu である。図1に、1t63 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。

各々の複合体結晶構造から、結合しているリガンド分子を取り除き、リガンド分子が結合していたポケット(結合ポケット)を、低分子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、各 AR

構造のリガンド結合部位(ドッキング対象領域)を示す。

3. トレーニングセット化合物の立体構造の準備

AR 結合強度予測システム構築に用いるトレーニングセット化合物は、財団法人化学物質評価研究機構(CERI)によりAR 相対結合強度(RBA)が測定され、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)により一般に公開されている低分子化合物より選んだ。今回検討するAR 結晶構造のリガンド結合部位にドッキング可能なサイズ・構造(すなわち結晶構造とは大きく異なる induced fit を起こす可能性が低い構造)の中から、結合強度や骨格のバリエーションに配慮して、98 化合物を選択した。一部、AR に結合しない物質(non-binders)も含まれている。これらの化合物の平面化学構造式を、低分子構造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。

4. AR と各トレーニングセット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、3つのAR 構造それぞれに対して、各トレーニングセット化合物の安定な複合体構造モデルを生成した。続いて、複合体モデルが得られた化合物について蛋白質-リガンド複合体構造最適化プログラム Bluto を使用して、複合体のエネルギー極小化を行なった。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 ならびに複合体形成に伴う水素結合・水和の変化を見積もるプログラム 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。

5. 予測システムの検証計算

3つのAR 結晶構造に対して構築された予測システムの検証計算を、それぞれ行った。検証計算には、トレーニングセットと同様、CERIがAR 結合強度

を測定してNITE で公開されている247 化合物を用いた。検証用化合物の準備や、各AR 構造への自動ドッキング、複合体構造最適化、各種エネルギー項計算の条件や過程は、前節までに記載したとおりである。エネルギー項の値を、各AR 結晶構造に対する結合強度予測式に当てはめ、各AR 結晶構造に対する各検証化合物の予測値を算出し、検証を行った。また、検証の結果をもとに、今年度のAR 結合強度予測システムに用いる結晶構造を決定した。

6. 今年度のAR 結合性予測システムを利用した、約3,000 化合物の予測計算

今年度構築したAR 結合性予測システムを、約3,000 件の化合物に適用して、それぞれのAR 結合強度予測値を算出した。予測計算の方法は、予測式構築や検証計算の際と同様である。

7. ER α 結合性予測システムに基づく、約2,600 化合物の予測計算

これまでに構築済みのER α 結合性予測システムを利用して、約2,600 化合物の予測計算を実施した。予測計算の方法は、AR の場合に準じた。

研究結果:

1. AR 結合強度予測システムの再構築と検証

1t63 (DHT 結合)、2amb (THG 結合)、2pnu (EM5744) の3つの結晶構造を用いて、それぞれAR 結合強度予測式を導出した。トレーニングセット化合物について、各予測式に基づいて算出された予測相対結合強度(対数値 logRBA)と実測 logRBA 値との相関係数は、1t63 が 0.85、2amb が 0.79、2pnu が 0.82 であった。従来の予測システムにおいては相関係数が 0.62 であり、今回、いずれの結晶構造を用いた予測システムにおいても、従来の予測性能を大きく上回る結果が得られた。図3(a), (c) に、今回特に相関が良かった 1t63, 2pnu 構造についての、logRBA 予測値と実測値との対比を示す。

また、トレーニングセット化合物とは別の化合物セット 247 個を用いて、3つの結晶構造を使った予測システムそれぞれの検証計算を実施した。ここでも 1t63 が最も良好な予測性能を示した。logRBA の予

測値と実測値の差が 2.0 以上であった結合性物質 (binders) は 3 個のみであり、non-binders の logRBA 値を -2.0 以上と予測したケースは 15 個であった (注: logRBA 値は、値が大きいくほど強い結合を示す。実測値データでは、最も弱い結合物質の logRBA 値は -3.1 程度である)。1t63 の予測システムにおいて、大半の化合物については、2桁以内の精度で結合性が予測できていることが示された。図3(b)に、1t63 における、検証化合物セットの logRBA 予測値と実測値の対比を示す。

一方、2pnu の予測システムは 1t63 よりも予測精度は若干劣るものの (図3参照)、ドッキング可能な化合物数は最も多かった。1t63 に対してドッキング可能な化合物は 194 個であったのに対し、2pnu においては 218 化合物である。これは、2pnu においてはリガンド結合部位の一部に大きな induced fit が生じ、他の結晶構造にはないサブポケットが出現したためと考えられる。このことを考慮して、新たな AR 結合強度予測システムにおいては、まず 1t63 を用いて結合性を予測し、1t63 に対してドッキング不可であった化合物についてのみ、2pnu を用いた予測計算を実施するという、2段階法をとることとした。logRBA 推算のための式は、以下のように得られた。

1t63:

$$\log\text{RBA}(\text{AR}-1\text{t}63) = -2.213 \text{GBelc} - 0.418 \text{GBrep} - 0.021 \text{GBcnf} - 0.106 \text{Dlig} - 0.203 \text{Desolv} + 0.125 \text{GBsole} + 0.091 \text{GBsolb} - 5.523 \quad (1)$$

2pnu:

$$\log\text{RBA}(\text{AR}-2\text{pnu}) = -2.381 \text{GBelc} - 0.479 \text{GBrep} - 0.238 \text{GBcnf} - 0.122 \text{Dlig} - 0.133 \text{Desolv} + 0.066 \text{GBsole} - 5.880 \quad (2)$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Dlig, Desolv, GBsole, GBsolb: 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水素結合変化

GBsole: GenB で計算されるリガンド脱溶媒和エネルギー

GBsolb: GenB で計算される蛋白脱溶媒和エネルギー

2. 今年度の AR 結合性予測システムを利用した、約 3,000 化合物の予測計算

AR への結合強度の予測計算を実施する化学物質として、今年度は約 3,000 化合物がリストアップされた。ただし、このうち以下のような化合物は計算の対象外とした。

- ・CAS 番号から化学構造式が得られなかった物質
- ・複数の物質の混合物
- ・複数の位置異性体を含む物質
- ・ポリマー
- ・金属錯体
- ・ケイ素、ホウ素、金属など、分子力場パラメタが未整備な元素を含む物質
- ・非常にフレキシブルな物質 (回転可能な結合が 30 本以上)
- ・自動ドッキングの足がかりに利用できる水素結合可能な原子 (酸素、窒素) や環構造等を全く含まない物質

上記の物質を除外した 2,281 化合物を対象とし、新たに構築し直した AR 結合性予測システムを利用して予測計算を実施した。結果として 1,499 化合物について AR に対する予測結合強度が得られた。表1に、各物質の AR に対する logRBA 予測値を示す。

3. ER α 結合性予測システムに基づく、約 2,600 化合物の予測計算

AR 結合性予測の対象物質のうち、一部を除く約 2,600 個 (実際に計算対象となったのは 1,917 個) については、ER α に対する結合強度予測も行った。表2に、結合強度予測値が得られた 1,664 化合物について、logRBA 予測値を示す。

(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 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

本研究では、化学物質の核内受容体作用による生体作用の迅速に評価し、さらには化合物特異的もしくは組織特異的な作用を検出可能なスクリーニング系構築のため、受容体に作用を有する物質が、その標的分子であるホルモン受容体との結合により他の生体分子との相互作用を変化させることに着目し、化合物結合による受容体と種々の生体分子との相互作用変化を SPR バイオセンサーやマスペクトル等を用いて解析する手法を確立し、得られた結果と生体作用との関連について検討を行うことを目的としている。本年度は、エストロゲン受容体についてアゴニスト結合型受容体及びリガンド非結合型受容体と相互作用するペプチドとの相互作用変化を約 50 化合物についてスクリーニング測定を実施して、その有用性について検討を行うと共に、相互作用スクリーニングに有用な新規特異的相互作用因子探索を目的として、これまでに検討を進めてきた培養細胞核抽出物からの ERE 固定化カラムを用いた化合物特異的相互作用因子の探索において核抽出物のトリプシン消化物を用いた検討を実施した。

研究方法:

1. 相互作用因子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、データベース探索により合成した数種のシークエンスのうち、最適な結合の得られた apo1 ペプチドを測定に用いた。

2. SPRによる受容体相互作用の測定

ER は、リコンビナント Human ER α 及び β を使用した。ER を測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8, 150mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.05% Tween 20%, BSA 5 μ g/ml, TCEP 5nM)で希釈して、対象化合物と混合し、30°Cで5分間インキュベートした後、サンプルを ERE 及び LxxLL を固定化したセンサーチップにインジェクトして SPR 装置(Biacore 3000, BiacoreAB)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。化合物の結合による相互作用への影響を解析するにあたっては、化合物を 10^{-5} ~ 10^{-8} M の濃度範囲で 10nM ER と混合し、ER と LxxLL 及び APO1 ペプチドに対する結合解離過程を各 2 分間測定した。測定後は、50mM KOH を流してセンサーチップを再生し、引き続き、次のサンプルの測定を行った。

3. 解析

各化合物の存在下及び非存在における ER-ERE 相互作用の結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してそのレスポンスの変化を比較した。また、2 分間のレスポンスの増加を、結合量として求めた。解析には市販のコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)及び JMP ver.3(SAS institute))を用いた。

4. トリプシン消化核抽出液を用いた網羅的相互作用因子の探索

ストレプトアビジンコートセファロース担体 (GE Healthcare) にビオチン化 ERE オリゴヌクレオチドを結合させた ERE 固定化セファロース担体を用いた。MCF-7 細胞核抽出物 (Active Motif 社) を非変性条件下で約 1 時間トリプシン消化してトリプシン消化物を得た。予め化合物と混合した ER 液を、トリプシン消化物と混合して 15 分間、4°C 下でインキュベートした。ERE 固定化セファロース担体はフィルターカラム (UltraFree-MC(0.45 μ m)、ミクロポア) に分注し、数回洗った後、ER-トリプシン消化物混合液を加え 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 回洗ったのち、50mM NaOH で溶出した。溶出液は、50mM HCl で中和した後、マイクロピペット用逆相カラム (ZipTip C18) で脱塩濃縮し、MALDI プレートに

スポットし、さらに乾燥後、CHCA をマトリクスとして TOF-MS 解析を行った。

研究結果:

1. アゴニスト、アンタゴニスト型認識ペプチドと ER α 相互作用ののリガンド濃度依存性の検討

図1にいくつかの代表的なエストロゲン受容体アゴニスト及びアンタゴニスト存在下での ER α と LxxLL 及び APO1 との相互作用強度の化合物濃度依存性を示した。17 β Estradiol(E2)の結果から ER α -APO1 相互作用がほとんど認められなくなる濃度以上では ER α -LxxLL 相互作用はほぼ飽和することから、全ての受容体分子が E2 と結合した状態で存在すると考えられる。一方、3種のアンタゴニスト(Clomiphene, ICI182,780, 4OH-Tamoxifen)では、ER α -APO1 相互作用は濃度依存的に低下しこれらの化合物が ER α 結合活性を有することを示した。一方、ER α -LxxLL 相互作用は認められなかった。また、弱いアゴニストである bisphenol A(BPA)では、ER α -APO1 相互作用がほとんど認められなくなる濃度においても、ER α -LxxLL 相互作用は、E2 の最大活性の約 20%程度であった。図2には、ER α -LxxLL 及び ER α -APO1 相互作用のリガンド濃度依存性について他のスクリーニング法との比較を示した。ER α -APO1 相互作用のリガンド濃度依存性は競合結合試験における濃度依存性とほぼ一致した。一方、ER α -LxxLL 相互作用はレポーター遺伝子アッセイに近い濃度依存性を示した。図3には、ER α -LxxLL と ER α -APO1 の相互作用変化の関係を示した。E2 では濃度上昇に従い、対角線上に変化するがアンタゴニストでは垂直に変化する。BPA による変化直線は、それらの中間に位置し、化合物結合による受容体への作用の違いを示している。

2. アゴニスト、アンタゴニスト型認識ペプチドを用いた化合物スクリーニング

代表的化合物で得られた結果をもとに、アゴニスト、アンタゴニスト型認識ペプチドを用いた受容体相互作用解析のスクリーニング系としての有用性を検討するため、約 50 種の化学物質についてスクリーニング測定を行った結果を図4に示した。ただし、

今回の測定は濃度3点のみで実施した。結果より、化学物質の受容体作用の有無及びアゴニスト性、アンタゴニスト性の簡易評価が可能であり、本測定系のスクリーニング系としての有用性が示された。

3. 培養細胞核タンパク質トリプシン消化物からの網羅的相互作用因子探索

核内受容体と相互作用する因子の ERE 結合カラムによる網羅的解析の手順を図5に示した。ERE をセファロース担体に固定化して、核抽出液中の ER 相互作用因子をフィルターカラムによりトラップし、溶出して解析した。昨年度は、本法により MCF-7 の核タンパク抽出物を用いて得られた結合成分の PAGE 解析によりリガンド特異的なバンドの検出に成功したものの、リガンド非特異的な多くのバンドが認められた。これは核抽出物であるため DNA 結合タンパクが多く含まれ、トラップに用いた DNA に直接結合しているものと考えられた。そこで本年度は、核抽出物をトリプシンで部分消化したタンパク分解物からの ER α 結合成分の探索を試みた。トリプシン処理条件や結合条件などの検討の後、得られた ER 結合成分を逆相カラムで脱塩濃縮して MALDI-TOF MS を用いて解析した結果を図5に示した。リガンド非存在下、E2 及び BPA 存在下での検討の結果、E2 と BPA に共通するピークがある一方、リガンド非存在下、E2 存在下では認められるものの BPA では認められないピークなどが検出された。

(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)

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undant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。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、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>

以下の細胞株に関して、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。

- SNG-II (子宮内膜)
- JHH-1 (肝臓)
- KMRC-1 (腎臓)
- UCBTERT-21 (骨髄由来間葉系幹細胞)
- RKN (卵巣)
- 8305C (甲状腺)
- MRC-5 (胎児肺)

<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 システムならびに 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、HuH-7 (肝臓)52時間、NCR-G3(精巣)54時間、NCR-G2 (精巣)63時間、HeLa (子宮頸部)39時間、RPMI1788(血球由来細胞)34時間、YMB-1(乳癌)80時間、NEC8(精巣)76時間、HEC-108(子宮内膜)56時間、SNG-II (子宮内膜)53時間、JHH-1 (肝臓)49時間、KMRC-1 (腎臓)11日、UCBTERT-21(骨髄由来間葉系幹細胞)39時間、RKN(卵巣)96時間、8305C(甲状腺)84時間、MRC-5(胎児肺)57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なら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、核内受容体なら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Format 384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/N 4342265)を採用した。

(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(分担研究者:板井 昭子 株)医薬分子設計研究所)

内分泌かく乱作用をもつ可能性のある化合物の毒性予測を行うため、DNAアレイ技術と、Perclonome methodによるデータ標準化法及びKeyMolnetによるネットワーク解析を組み合わせ、

毒性予測のための方法を構築する。フェノタイプの変化が明確でない化学物質の作用に対してもその毒性予測が可能な簡便かつプラクティカルな方法を構築する。また、このパイロットスタディーに必要なデータを蓄積する。

研究方法:

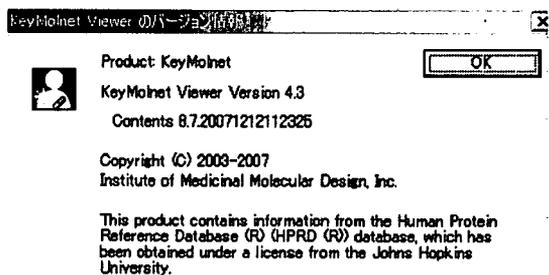
1. ネットワーク解析におけるデータ処理

Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 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すべての解析に用いた。投与条件は以下のとおり。

Chemicals	Dose	Time(h)
Troglitazone	0, 1, 3, 10 (mg/kg)	2, 4, 8, 24
Genistein	0, 10, 30, 100 (mg/kg)	2, 4, 8, 24
Tamoxifen	0, 1, 3, 10 (μ g/kg)	2, 4, 8, 24

用量0をコントロールとして、各3用量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)。

KeyMolnet は以下のバージョンを用いた。



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

KeyMolnet に収録されている“PPAR \cdot による発現調節”、“ERによる発現調節”に Troglitazone (PPAR \cdot), Genistein, Tamoxifen(ER)作用による各条件のデータをインポートし、各化合物の投与に対し、各核内受容体に発現調節される遺伝子の発現変動を観察した。

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倍以上発現亢進または低下した分子(変動分子)の数を抽出し、発現変動の大きい観察点を分子ネットワーク生成の代表点として採用した。

3. 化合物作用に対する upregulate 及び downregulate ネットワークの生成

2の結果から、発現変動の大きかった観察点(3化合物ともいずれも最高用量、時系列は Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 投与でそれぞれ 4, 8, 4 時間後のデータを選定)を抽出し、各化合物の各点における変動分子を検索端点(search point)として、KeyMolnet のコンテンツデータに基づき、分子ネットワークを生成した(相互関係検索法利用)。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)、病態における現象(病態イベント、Pathological Event)、について、これらの関与度(超幾何分布法利用)とともにサマライズした。Troglitazone に対しては全体的に変動分子が少なかったため、以下の各点における分子ネットワークを OR 論理演算により、マージして、同様にサマライズした。分子ネットワーク作成時の条件: 相互関係検索、3 パス、分子リレーションの種類コアコンテンツ(発現+-、直接+-)、セカンダリコンテンツ(直接的)

研究結果:

カノニカルパスウェイ(Pathway)“PPAR \cdot による発現調節”、“ERによる発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 投与群に対し、PPAR \cdot (Troglitazone), ER (Genistein,

Tamoxifen)により発現制御される遺伝子の発現変動を観察した。KeyMolnet コンテンツから“PPAR γ による発現調節”、“ER による発現調節”を呼び出し、遺伝子発現データ(投与量 0 をコントロールとした発現量比 foldchange を数値データとしてKeyMolnet にインポート)を色変換してマッピングした(図 1A-C)。観察点は3化合物とも最高用量、すなわち、10(mg/kg), 100(mg/kg), 10(mg/kg)かつ、4時系列を同時に可視化して示した。

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(及び低下)した分子(変動分子)の数を表 1 に示す。この結果より、Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 投与群に対し、それぞれ、投与 4, 8, 4 時間後のデータを次の分子ネットワーク生成に利用することにした。

化合物投与により upregulate 及び downregulate するネットワークの生成

分子ネットワーク生成に用いた観察点は以下の通り。

Troglitazone; up 10(mg/kg)4 時間後, down 10(mg/kg)4 時間後

Genistein; up 100(mg/kg)8 時間後, down 10(mg/kg)8 時間後

Tamoxifen; up 10(mg/kg)4 時間後, down 3(mg/kg)4 時間後

上記観察点において、有意に2倍以上発現亢進(または低下)した分子(変動分子)を検索端点にして、KeyMolnet の相互関係検索法を用いて分子ネットワークを生成させた(upregulation 図 3, downregulation 図 4)。生成した各分子ネットワークのサマリーを表 2(図 3 に対応)、3(図 4 に対応)に示す。さらに、Troglitazone 投与群に対しては、変動分子数が少なかったため、次の各観察点における変動分子により上記と同様の条件で分子ネットワークを生成した後、全分子ネットワークを OR 論理演算によりマージした(図 4)。表 4 には図 4 に示した分子ネットワークのサマリーを示した。

図 4 に示したネットワークに使用した観察点のデータ: 1(mg/kg)2 時間後, 3(mg/kg)4 時間後,

10(mg/kg)4 時間後, 3(mg/kg)24 時間後の有意に 2 倍以上発現亢進した分子

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 遺伝子の上流にエストロゲ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、70 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、70 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 19 物質、ER β のみにについて 1 物質であり、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、19 物質であった。本研究により ER α 及び ER β を介した化学物質のエストロゲン様活性の高速スクリーニング試験法を構築した結果、エストロゲン様活性物質の高速スクリーニングにおいて ER α 又は ER β の選択性を評価する手法として有用なものと考えられた。

一方、我々が開発した、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 機能を攪乱する可能性のある物質(アゴニスト、アンタゴニスト)の候補を選定することができた。

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においては、最近になって増加した構造的知見などを加味して、AR に対する結合性予測システムの再構築を行い予測値と実測値の相関係数は 0.85 となり、従来システムにおける相関係数 0.62 をはるかに上回る良好な予測性能を示した。また、予測計算可能な物質の範囲を広げるために、2つの結晶構造を組み合わせて用いる2段階法を開発した。この新たな AR 結合強度予測システムを用いて、約 3,000 個の化学物質の logRBA 予測値を算出した。また、ER α に対しても、これまでに構築済みの予測システムを利用して、約 2,600 個の

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

アゴニスト型エストロゲン受容体及びリガンド非結合型受容体と相互作用するペプチドとの相互作用変化を指標とした解析により、アゴニスト・アンタゴニストだけでなく従来、評価が難しかった受容体結合はするが活性が弱いアゴニストもしくはパーシャルアゴニストのような化合物を分類可能であることが示された。また、アゴニスト型相互作用ペプチドとの反応性はレポーター遺伝子アッセイの結果と、リガンド非結合型受容体作用ペプチドとの反応性は、競合アッセイとの結果とほぼ一致した。一方、培養細胞核抽出物からの ERE 固定化カラムを用いた化合物特異的相互作用因子の探索では、MALDI-TOF-MS を用いリガンド特異的なピーク検出に成功し、化合物特異的作用を検出可能な迅速スクリーニング系構築の可能性が示された。今後、さらに特異的な相互作用を示す因子の探索を進めるとともに他の受容体についても同様の相互作用測定系を構築することにより、個々の化学物質に特異的な作用について多面的かつメカニズムに即した迅速評価が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の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選択し、遺伝子発現解析を実施した。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、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行った。

(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

化合物特異的に upregulate 及び downregulate 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毒性作用、パスウェイなどのプロファイリングも行えた。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が必要であると思われる。作用未知の化合物に対しても同様の操作により得たデータを蓄積したデータと比較することで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づ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 レポーターアッセイ系を用いて既存の化学物質 70 物質についてアゴニスト活性の測定を行った結果、アゴニスト活性を有する物質は、ER α のみについて 19 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、19 物質であった。本研究により ER α 及び ER β を介した化学物質のエストロゲン様活性の高速スクリーニング試験法を構築した結果、エストロゲン様活性物質の高速スクリーニングにおいて ER α 又は ER β の選択性を評価する手法として有用なものと考えられた。一方、AR レポータージーンアッセイでは、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 11 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 Formononetin (AT217) (PC10 = 8.22×10^{-8})であった。Formononetin はクローバーに含まれるイソフラボノイドでエストロゲン様作用があることが知られている。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 6-Bromo-2-naphthol (IC50 = 2.42×10^{-6} M)であった。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 4000 倍程度弱いことになる。TR レポータージーンアッセイでは、TR アゴニスト作用及びアンタゴニスト作用を示す物質は確認できなかった。本研究で用いた 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。本年度のスクリーニング試験の結果、本測定法は感度及び精度に高い性能を保っていることを確認し、レポーターアッセイ用の細胞としては実用レベルに達し、低コストながら信頼性の高い測定法であると考えられた。

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では、今回、AR に対する結合性予測システムを新たに構築し直した。従来のシステムにおける logRBA の予測値と実測値の相関係数が 0.62 であったのに対し、今回のシステムでは 0.85 まで改善され、格段の精度向上が示された。この大幅な改善の要因としては、主に次の2つが考えられる。1つは、利用できる AR 複合体結晶構造がここ2、3年で急激に増加し、リガンド結合部位の構造の動きについても徐々に知見が蓄積されてきたことである。従来システムで利用していた 1e3g は、強力なアゴニストである R1881 が結合した構造で、このリガンドに強く induced fit したコンフォメーションをとっている。そのために、非ステロイド分子や、ステロイド骨

格であっても R1881 とは異なるタイプの構造の場合に、予測精度が落ちてしまう傾向が見られた。今回は複数の結晶構造を検討して、その中からより *in silico* スクリーニングの目的に適した蛋白コンフォメーションを選択することができた。しかも、様々なタイプの化合物の結合性をより精度よく予測することが期待できる 1t63 構造と、予測精度では若干劣るが、大きな induced fit により出現したサブポケットのために、1t63 にドッキングできない物質の予測も可能な 2pnu 構造を組み合わせる、2段階法をとることもできた。もう1つの要因は、トレーニングセットの選択法である。従来の予測システム構築においては、トレーニングセット化合物の結合強度分布にかなり偏りがあり、圧倒的多数を占める weak binders にオーバーフィッティングされてしまう傾向が見られた。また、利用する AR 結晶構造 (1e3g) に対して妥当なドッキングモデルを構築し得ないサイズ・構造をもつ化合物もトレーニングセットに多数含まれており、それらが異常な外れ値となって重回帰分析を乱し、適切な予測式を導き出すことができなかったと推測される。今回は、利用する AR 結晶構造のリガンド結合キャビティのサイズに合った化合物を中心に、トレーニングセットを選んだ。結合強度の分布にも配慮し、前回は含めなかった non-binders もトレーニングセットに加えた。検証のために、前回の 1e3g に対して今回のトレーニングセットを用いて予測式を再構築したところ、logRBA の予測値－実測値の相関係数は 0.76 であり、前回の 0.62 から大幅に改善された。以上のように、種々の工夫により AR 結合性予測システムの精度は大幅に向上したが、残された課題も多い。標的蛋白－リガンドの結合自由エネルギー推算に関する根本的な難しさ(物理化学における基礎的課題)、水分子の扱いの問題、蛋白構造の動き(induced fit)の問題などである。この中で特に、蛋白構造の動きが、予測の成否を左右する重大なファクターの1つとなっている。AR 構造については最近になって知見が増えたとはいえ、様々な化学物質の構造活性相関データから考えると、未だ解明されていない大きな induced fit の動きがあることは間違いない。現在解析されている複合体構造は全てアゴニスト結合型であり、アンタゴニストが結合した時の蛋白コンフォメーション変化の情