

CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA
26896-18-4	-1.87	29926-41-8	-2.92	34285-88-6	-0.68
26915-97-9	-2.32	30076-98-3	-1.81	34451-19-9	-2.15
26999-29-1	-1.48	30086-02-3	-2.38	34495-71-1	-2.02
27043-36-3	-2.39	30113-45-2	-1.64	34644-00-3	-3.30
27126-93-8	-2.75	30390-50-2	-2.47	34644-03-6	-3.30
27247-96-7	-2.44	30484-77-6	-0.74	34686-71-0	-1.55
27375-52-6	-0.84	30499-70-8	-2.22	34759-34-7	-1.20
27431-39-6	-2.41	30558-43-1	-2.08	34761-47-2	-6.36
27431-40-9	-2.66	30574-97-1	-2.89	34764-02-8	-2.02
27458-92-0	-1.40	30673-60-0	-2.29	35044-68-9	-1.26
27776-21-2	-1.20	30845-78-4	-2.10	35180-01-9	-2.95
28060-90-4	-3.23	30895-79-5	-2.87	35203-06-6	-1.83
28069-74-1	-2.11	31375-17-4	-1.10	35203-08-8	-1.65
28098-03-5	-2.73	31529-46-1	-1.82	35234-22-1	-2.77
28217-92-7	-1.72	31582-45-3	-1.01	35234-25-4	-1.99
28305-25-1	-3.02	31618-90-3	-1.37	35250-53-4	-2.79
28434-00-6	-1.18	31879-05-7	-1.36	35270-09-8	-3.04
28474-90-0	-2.04	31983-27-4	-2.10	35274-05-6	-1.21
28588-73-0	-1.41	32046-75-6	-3.02	35448-31-8	-1.81
28664-35-9	-2.02	32214-91-8	-0.22	36267-71-7	-2.32
28701-67-9	-1.64	32329-20-7	-1.80	36306-87-3	-1.41
28908-00-1	-2.32	32585-08-3	-2.42	36347-52-1	-1.93
28959-02-6	-2.55	32588-76-4	-2.36	36362-19-3	-1.18
29066-34-0	-1.04	32634-37-0	-1.97	36431-72-8	-0.36
29081-56-9	-4.26	32647-67-9	-2.06	36438-54-7	-1.64
29171-20-8	-1.71	32687-77-7	0.01	36687-82-8	-2.36
29239-07-4	-1.70	32797-50-5	-2.93	37064-20-3	-2.46
29329-71-3	-1.50	32813-95-9	-0.81	37161-74-3	-2.11
29350-73-0	-0.16	33174-74-2	-1.30	37172-05-7	-1.64
29387-86-8	-2.83	33513-44-9	-3.13	37220-82-9	-2.53
29548-14-9	-1.74	33878-50-1	-0.48	37514-30-0	-1.44
29592-95-8	-3.59	34086-51-6	-0.20	37674-57-0	-1.96
29606-79-9	-1.74	34131-99-2	-0.24	37674-63-8	-2.89
29911-27-1	-1.45	34135-85-8	-3.27	37717-68-3	-0.84

CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA
37734-45-5	-3.31	41239-48-9	-2.00	50892-23-4	-1.68
37811-72-6	-1.81	41253-21-8	-3.03	50980-84-2	-2.23
37853-59-1	-2.28	41448-29-7	-1.81	51000-52-3	-1.88
37887-04-0	-2.74	41453-56-9	-2.06	51011-05-3	-1.78
37971-36-1	-3.10	41543-92-4	-0.94	51115-63-0	-1.70
38185-06-7	-3.14	41556-26-7	-0.27	51115-64-1	-2.49
38205-64-0	-2.66	41678-36-8	-1.42	51219-00-2	-1.12
38325-25-6	-0.93	41820-22-8	-2.99	51411-24-6	-0.19
38565-53-6	-2.44	41890-92-0	-1.13	51441-65-7	-1.22
38713-41-6	-2.47	42175-41-7	-1.58	51566-62-2	-2.16
38718-97-7	-1.76	42240-73-3	-1.05	51632-16-7	-1.23
39026-94-3	-2.22	42348-12-9	-2.03	51755-66-9	-2.23
39067-80-6	-2.05	42474-44-2	-3.20	51981-33-0	-1.84
39148-24-8	-3.11	42558-01-0	-2.00	52166-72-0	-2.59
39198-34-0	-0.52	42604-12-6	-2.00	52184-19-7	0.01
39251-86-0	-2.18	43040-01-3	-2.90	52299-20-4	-2.86
39251-88-2	-2.15	43083-12-1	-2.74	52304-21-9	-2.45
39252-02-3	-2.31	43219-68-7	-1.67	52314-67-7	-2.40
39718-00-8	-2.81	44860-68-6	-2.54	52509-84-9	-1.94
40164-69-0	-1.63	44914-03-6	-2.51	52628-03-2	-2.32
40220-08-4	-2.72	46948-72-5	-2.40	52698-46-1	-2.62
40267-72-9	-1.98	49561-96-8	-2.54	52836-31-4	-2.04
40348-72-9	-2.22	49584-26-1	-2.83	52950-18-2	-3.15
40607-48-5	-1.27	49653-17-0	-2.67	53004-93-6	-0.39
40630-63-5	-2.26	50328-50-2	-1.07	53153-66-5	-2.30
40654-82-8	-2.10	50594-44-0	-1.17	53219-21-9	-1.56
40790-04-3	-2.72	50594-77-9	-1.02	53398-87-1	-2.41
40843-73-0	-0.62	50623-57-9	-2.14	53405-98-4	-2.05
40853-53-0	-1.77	50626-02-3	-1.32	53910-28-4	-2.02
40853-56-3	-2.05	50639-37-7	-2.54	54060-92-3	0.61
40910-49-4	-1.26	50649-12-2	-1.61	54484-73-0	-2.28
40923-64-6	-1.31	50671-48-2	0.81	54512-75-3	-3.15
40942-73-2	-1.68	50789-44-1	-1.20	54546-26-8	-1.22
41203-81-0	-1.12	50849-47-3	-1.08	54644-28-9	-2.28

CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA
54731-72-5	-2.60	58102-02-6	-0.98	63149-22-4	0.77
54815-13-3	-1.96	58244-29-4	-1.27	63449-64-9	-2.11
54888-12-9	-3.41	58430-94-7	-1.95	63449-68-3	-0.96
54889-48-4	-2.35	58567-11-6	-1.74	63759-55-7	-2.25
55418-52-5	-1.90	58574-03-1	-1.78	64354-92-3	-2.18
55526-94-8	-0.51	59191-78-5	-1.19	64577-91-9	-1.52
55590-83-5	-2.42	59259-38-0	-0.94	64667-33-0	-2.43
55701-05-8	-2.30	59259-90-4	-2.03	64969-79-5	-2.43
55704-78-4	-1.64	59313-58-5	-1.22	64988-06-3	-1.85
55764-22-2	-2.45	59557-05-0	-1.45	65287-04-9	-1.47
55954-19-3	0.10	59569-67-4	-2.25	65405-68-7	-2.08
56001-43-5	-1.26	59902-01-1	-2.91	65405-73-4	-1.51
56038-89-2	-1.12	60066-88-8	-1.50	65505-24-0	-1.62
56105-46-5	-1.12	60345-97-3	-2.04	65505-25-1	-0.99
56107-04-1	-0.35	60754-24-7	-2.85	65620-50-0	-1.11
56172-46-4	-1.40	60763-40-8	-2.08	66068-84-6	0.36
56423-43-9	-1.95	60763-42-0	-1.51	66222-24-0	-1.93
56481-85-7	-1.82	60763-44-2	-2.10	66327-54-6	-1.20
56718-71-9	-1.76	61361-18-0	-2.48	66408-78-4	-0.93
56767-18-1	-2.45	61444-39-1	-2.25	66992-27-6	-3.49
56966-52-0	-1.67	61444-41-5	-1.78	67124-09-8	-1.09
57082-24-3	-0.29	61551-69-7	-0.56	67557-76-0	-1.50
57110-29-9	-1.80	61683-99-6	-1.31	67564-91-4	-0.37
57124-87-5	-2.58	61692-83-9	-2.44	67634-00-8	-2.56
57246-09-0	-1.28	61699-38-5	-2.53	67634-15-5	-1.80
57371-42-3	-0.66	61792-11-8	-2.02	67663-01-8	-1.66
57378-68-4	-1.07	61810-55-7	-1.73	67707-75-9	-1.75
57486-68-7	-2.56	61889-11-0	-1.73	67715-79-1	-1.79
57499-57-7	-0.54	61949-23-3	-1.56	67715-80-4	-1.96
57583-54-7	1.29	62346-96-7	-1.93	67715-81-5	-2.17
57648-55-2	-1.91	62561-74-4	-2.36	67746-30-9	-2.18
57813-59-9	-2.84	62563-80-8	-0.15	67762-27-0	-1.39
57931-25-6	-2.64	63133-74-4	-1.78	67801-46-1	-1.60
57943-67-6	-2.00	63148-97-0	-0.43	67801-47-2	-0.43

CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA	CAS 番号	推算 logRBA
67845-26-5	-1.97	68938-80-7	-3.19	78761-39-4	-1.53
67860-38-2	-2.30	68938-81-8	-2.34	79637-74-4	-1.22
67874-80-0	-1.81	68987-51-9	-2.93	80443-63-6	-1.16
67879-60-1	-2.06	69094-18-4	-2.57	80550-09-0	-1.38
67905-32-2	-1.15	69112-21-6	-3.11	80866-83-7	-1.78
67906-30-3	0.18	69121-78-4	-1.52	83111-01-7	-3.47
67953-77-9	-2.39	69205-13-6	-0.48	83623-32-9	-2.11
67989-23-5	-2.53	69929-16-4	-1.69	84012-64-6	-0.54
68039-38-3	-1.63	70172-00-8	-0.53	84029-92-5	-0.80
68133-72-2	-2.63	70293-55-9	-1.69	84434-20-8	-2.38
68223-93-8	-3.41	70693-32-2	-2.13	84632-65-5	-1.41
68227-51-0	-2.49	70693-50-4	0.79	84787-87-1	1.03
68239-19-0	-2.39	70714-66-8	-4.42	85068-29-7	-2.32
68258-95-7	-1.11	71172-75-3	-2.40	85238-31-9	0.57
68334-62-3	-2.71	71441-80-0	-1.01	85554-69-4	-1.74
68345-22-2	-1.06	71500-37-3	-1.70	85554-70-7	-2.54
68366-65-4	-1.10	71566-49-9	-1.65	85895-78-9	-2.89
68391-39-9	-1.37	71662-27-6	-2.55	86803-90-9	-1.54
68412-48-6	-1.52	71672-75-8	-2.03	87061-04-9	0.39
68459-99-4	-0.70	72207-94-4	-1.78	88385-22-2	0.64
68480-17-1	-1.07	72541-09-4	-0.53	88973-62-0	-2.30
68515-48-0	-0.55	72928-52-0	-1.63	90731-56-9	-2.57
68515-50-4	-1.01	73019-14-4	-1.23	92345-48-7	-2.16
68526-79-4	-2.61	73566-30-0	-0.69	93892-03-6	-1.27
68526-83-0	-2.08	74094-60-3	-1.86	93892-04-7	-1.59
68526-84-1	-2.25	74367-97-8	-1.20	93892-05-8	-1.05
68527-79-7	0.16	74758-91-1	-2.79	93892-07-0	-2.02
68548-08-3	-0.85	75980-60-8	0.11	93919-04-1	-1.25
68583-51-7	-2.45	76025-08-6	-1.90	94021-42-8	-1.66
68603-87-2	-3.12	76649-15-5	-2.11	94050-90-5	-1.85
68705-63-5	-1.35	77098-07-8	-2.65	94089-01-7	-2.28
68797-70-6	-1.10	77182-82-2	-2.31	94089-21-1	-1.84
68922-11-2	-1.48	77635-32-6	-0.47	94089-23-3	-1.40
68938-79-4	-3.19	78761-38-3	-1.65	94159-30-5	-2.50

CAS 番号	推算 logRBA
94159-31-6	-2.42
94159-32-7	-2.50
94278-27-0	-2.44
94386-39-7	-1.39
94386-48-8	-0.73
94944-51-1	-2.07
96478-09-0	-0.38
96562-58-2	-1.58
99422-01-2	-2.05
100760-25-6	-2.65
104222-32-4	-0.47
107481-28-7	-2.18
112290-07-0	-3.08
113170-55-1	-2.41
114040-31-2	-1.24
118585-13-0	-0.53
119094-83-6	-1.31
119515-38-7	-1.02
121199-28-8	-0.95
129136-92-1	-1.26
129283-82-5	-0.94
143807-66-3	0.46
149979-41-9	-0.58
159011-87-7	0.78
160430-64-8	-1.90
161728-47-8	-1.63
161981-34-6	-2.11
178813-81-5	-0.67
195520-29-7	-0.88
195520-32-2	-1.64
291314-39-1	-2.36
391197-78-7	-0.46

別添 4

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

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

研究要旨

本研究では、化学物質の核内受容体作用による生体作用を迅速に評価し、さらには化合物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およ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 化合物について検討を行い、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。さらに、アゴニスト結合型受容体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良く一致することが示された。さらに、本スクリーニング系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行い、MALDI-TOF-MSにより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さらに詳細に評価可能な迅速スクリーニング系への応用の可能性が示された。

A. 研究目的

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されているため、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。一方、これまでの研究より同程度のホルモン様作用を示す化合物であってもその生体作用が化合物ごとに異なることが示されており、科学的に裏付けられた対応が求められている。しかし、核内受容体作用物質の標的分子である核内受容体及びその下流のレギュレーションについては未だ不説明の部分も多く、個々のホル

モン様作用の内分泌かく乱性による生体影響や危険性についての評価は依然困難であり、化合物の内分泌かく乱メカニズムに即した信頼性の高いスクリーニング系の構築が求められている。内分泌ホルモンは、その「特異的」受容体と結合することでその作用を発現する。核内受容体はリガンドとの結合により立体構造が変化して、制御下にある遺伝子のプロモーター領域に存在する受容体レスポンスエレメントにコファクターをリクルートしてその転写を制御し、引き続く生体反応を惹起する。本研究では、受容体作用物質が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、種々の分子

と受容体相互作用の変化を SPR バイオセンサーやマススペクトル等を用いて解析する手法を構築し、その変化と生体作用との関連について検討を行う。核内受容体作用リガンドが受容体構造に及ぼす影響が化合物特異的に異なることは、これまでも報告されているが、それらを生体作用との関連から解析する試みはなされていない。また近年の遺伝子発現解析技術の発達によりそれぞれの化合物の暴露による反応結果としての遺伝子発現変化が化合物ごとに異なる情報も蓄積されつつあるが、全てのホルモン受容体作用物質について多数の臓器で解析を行うことは困難である。

一方、内分泌かく乱性が危惧される物質の作用分子である核内受容体は、そのものが転写調節因子であり化学物質が結合した状態における受容体の挙動すなわち他の細胞内因子との相互作用を解析することが出来れば、引き続き生体反応である遺伝子発現調節との関連において化学物質の生体作用を解析することが可能である。またさらに、受容体作用物質の組織特異性や種差について解析する手法の構築のため、受容体作用物質が影響を及ぼす可能性のある組織や細胞における構成要素からなる擬似生体系を *in vitro* に構築し、標的分子(ホルモン受容体)と生体分子との特異的な相互作用の変化について解析するための手法の開発を行う。これまでもエストロゲン受容体と相互作用する細胞内因子に関する報告は多数ある。本研究による化学物質によるそれぞれの因子との相互作用変動についての解析やそれを応用した評価手法は、化学物質による核内受容体作用による内分泌かく乱を始めとした生体作用の迅速評価やそのメカニズムの解明に貢献する。

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

化を指標とした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。

B. 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 末ビオチン化ペプチドを合成し、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受容体との相互作用測定に用いた。アゴニスト結合型 ER 認識ペプチドとして、TIF2 の LxxLL モチーフを、アポ型受容体を認識するペプチドとして apo1 配列を測定に用いた。

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 および 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 10⁻⁵~10⁻⁸M 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

核抽出液からの相互作用分子の分離には、ERE を固定化セファロース担体 (GE Healthcare)を用いた。ストレプトアビジンコートセファロース担体にビオチン化 ERE を混合して約 1 時間放置して ERE 固定化セファロース担体を準備した。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。

C. 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たが、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 および 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 相互作用変化の相互関係を示した。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さらに検討するため、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。結果からの化学物質の受容体作用評価の例を図4に示した。なお、本年度測定を行った

化合物一覧を表1に全化合物の測定結果は、図7に示した。スクリーニング測定は濃度3点で実施し、同時に測定した E2 飽和 (10⁻⁷ M) ER 及びリガンド非結合 ER の測定値をもとにした相対値により示している。図4の結果より、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6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が検出され、リガンド特異的相互作用成分が検出可能であることが示された。

D. 考察

本研究では、化学物質による核内受容体への特異的作用を核内受容体と相互作用する生体分子との相互作用変化から解析する手法の迅速スクリーニングへの応用を目的として、化合物特異的な相互作用活性を示す生体因子の相互作用部位の探索と得られた相互作用因子を用いた化合物スクリーニング手法の検討を進めてきた。昨年度までに、転写共役因子を始めとした核内受容体作用に関連する分子からのデータベース探索により 10 以上の配列についてエストロゲン受容体とのリガンド特異的相互作用の検出に成功した。しかし、それらの相互作用における化合物特異性は以前より相互作用が示されていた TIF2 由来の LxxLL 配列といずれも同じでアゴニスト結合受容体との特異的相互作用活性を示すものであった。

本年度は、これまでの研究によりアゴニスト結合型エストロゲン受容体と特異的な相互作用活性が示されている LxxLL ペプチドと化合物非結合型受容体と特異的相互作用が示されている APO1 ペプチドの 2 種を用いて相互作用スクリーニングを実施し、スクリーニング手法としての有用性について検討を行った。一方、本スクリーニング系に有用な化合物特異的な相互作用活性を有する生体分子をさらに探索するため、細胞核抽出物からの相互作用因子の抽出を昨年度に引き続き検討した。それぞれ、相互作用特性の異なる LxxLL、APO1 の 2 種のペプチドとの相互作用の同時解析により、代表的な化合物による相互作用変化の結果から、本アッセイ系により受容体作用の有無及びアゴニスト活性、アンタゴニスト活性の程度を迅速に評価可能であることが示された。従来のスクリーニング手法との比較より、ER α -APO1 相互作用の低下は化合物の受容体結合の指標として、一方、ER α -LxxLL 相互作用

の上昇は化合物結合に伴う遺伝子転写活性の指標としてとらえることが可能であることが示唆された。このことは従来、別々に実施していた2種のエンドポイントについて同時に評価可能であることを示している。さらにBPAによる結果から、APO1 相互作用の結果から全ての受容体が BPA と結合した状態となる濃度においても転写共役因子との相互作用の強さは、E2 の約 20%程度に留まり、BPA 結合による不完全な受容体構造の変化が明確に示された。さらに約 50 種の化合物についてスクリーニング測定を実施した結果から、物質ごとに化合物の受容体結合とアゴニスト活性の強度の違いを迅速評価可能であることが示され、本系がスクリーニング系としての有用であることが示された。これまでも、化学物質結合の受容体構造に及ぼす影響は、アゴニスト同士もしくはアンタゴニスト同士でも同一ではないことが、様々な研究から示唆されている。そうした、化合物特異的な受容体作用は、生体内においては単に作用の強さだけではなく化合物特異的な影響を及ぼす可能性がある。

一方、さらに化合物特異的な相互作用を示す因子を探索し、本測定系に適用することが出来れば、その違いについてさらに詳細な評価が可能となる。そこで、本研究ではそのような相互作用活性を示す因子の探索について試みた。これまでに、ERE 簡易カラムを用いて MCF-7 核タンパク画分からのエストロゲン受容体相互作用因子の探索を試み、化合物特異的な相互作用因子の存在を示唆する結果を得ていたが、単離同定には至らなかった。本年度は、予めトリプシンで部分消化した核タンパク抽出物から同様の手法を用いた、相互作用因子の探索を試み、MALDI TOF-MS レベルでの化合物特異的なピークの検出に成功し、前年度の結果とあわせて、特異的な相互作用因子の存在が示唆された。今後、これらの因子を

相互作用スクリーニング系に適用することで化合物特異的な作用をさらに詳細に評価可能な迅速スクリーニング系を構築できる可能性が示された。

核内受容体は、遺伝子転写因子であることからわずかな作用の違いであっても、大きく異なる生体影響を引き起こす可能性がある。本研究で測定された化合物特異的な受容体作用と生体因子との相互作用変化が最終的に生体内で惹起される生体影響の関連については、さらなる研究が必要であるが、本測定系からは断片的とはいえ、従来のスクリーニング法では得られない化合物特異的な作用の違いを迅速評価可能である。本研究で用いたエストロゲン受容体以外の核内受容体についてもその遺伝子転写のメカニズムは共通であることから、同様のスクリーニング系を構築可能であり、今後、様々な受容体について特異的な相互作用因子を探索し評価でき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学物質のスクリーニングが可能になると考察された。

E. 結論

核内受容体に作用する化学物質による化合物特異的な生体作用を検出・評価する系の構築を目的として、リガンド結合により受容体と特異的に相互作用する分子の探索と、相互作用変化を解析する手法の有用性について検討を行った。アゴニスト型エストロゲン受容体およ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、アゴニスト型受容体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良く一致し、一方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良く一致することが示された。一方、培養細胞核抽出物からの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の探索によりリガンド特異的な因子が検出された。今後、特異的な相互作用を示す因子のスクリーニング系への適用を進める一方で他の受容体についても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。

F. 研究発表

1. 誌上発表

小野 敦, トキシコゲノミクスプロジェクト(3) トキシコゲノミクスの IT 戦略と TG-GATEs の構築, Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2007, Vol. 22 DMPK ニュースレター.

Kiyosawa N, Uehara T, Gao W, Omura K, Hirode M, Shimizu T, Mizukawa Y, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, and Urushidani T, 'Identification of glutathione depletion-responsive genes using phorone-treated rat liver.', J Toxicol Sci, 2007, 32(5), 469-486.

Omura K, Kiyosawa N, Uehara T, Hirode M, Shimizu T, Miyagishima T, Ono A, Nagao T, and Urushidani T, 'Gene expression profiling of rat liver treated with serum triglyceride-decreasing compounds.', J Toxicol Sci, 2007, 32(4), 387-399.

Uehara T, Kiyosawa N, Hirode M, Omura K, Shimizu T, Ono A, Mizukawa Y, Miyagishima T, Nagao T, and Urushidani T, 'Gene expression profiling of methapyrilene-induced hepatotoxicity in

rat.', J Toxicol Sci, 2008, 33(1), 37-50.

2. 学会発表

小野 敦. DNA チップを活用した大規模研究例 トキシコゲノミクス—遺伝子発現データ生成と解析. Biotechnology Japan セミナー, 東京 (2007.2.16).

中村 昌文, 半田 洋士, J.D.Gordon, G.C.Clark, 小野 敦, 小島 肇. LUMI-cell ER アッセイ法の基礎性能及び国際的バリデーション計画について. 第 10 回環境ホルモン学会研究発表会・国際シンポジウム, 埼玉 (2007.12.10-11).

Kakiuchi D, Ono A, Miyagishima T, Urushidani T and Nagao T,. The search for toxicogenomics biomarkers bridging between in vivo and in vitro, analysis of the hepatotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. SOT 46th Annual meeting, Charlotte, USA.(2007.3.25)

Urushidani T, Ono A, Nakatsu N, Miyagishima T and Ohno Y,. The second stage of the Toxicogenomics Project in Japan: a multicenter validation study of gene expression in rat liver. SOT 47th Annual meeting, Seattle, WA, USA.(2008.3.19)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

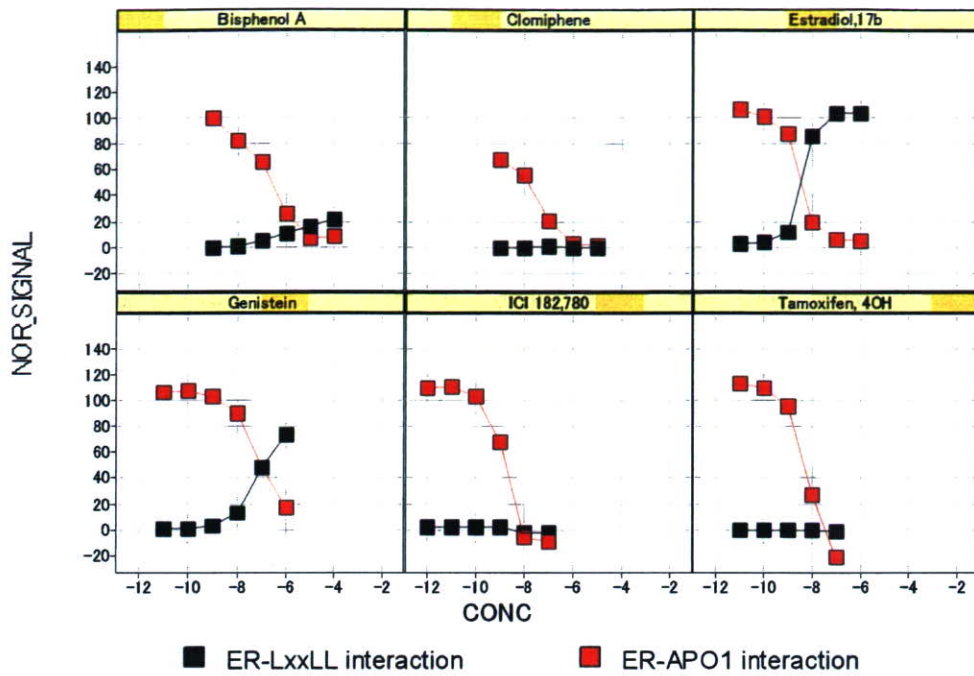


図1 代表的なエストロゲン受容体作用物質によるER-LxxLL, ER-APO1相互作用変化

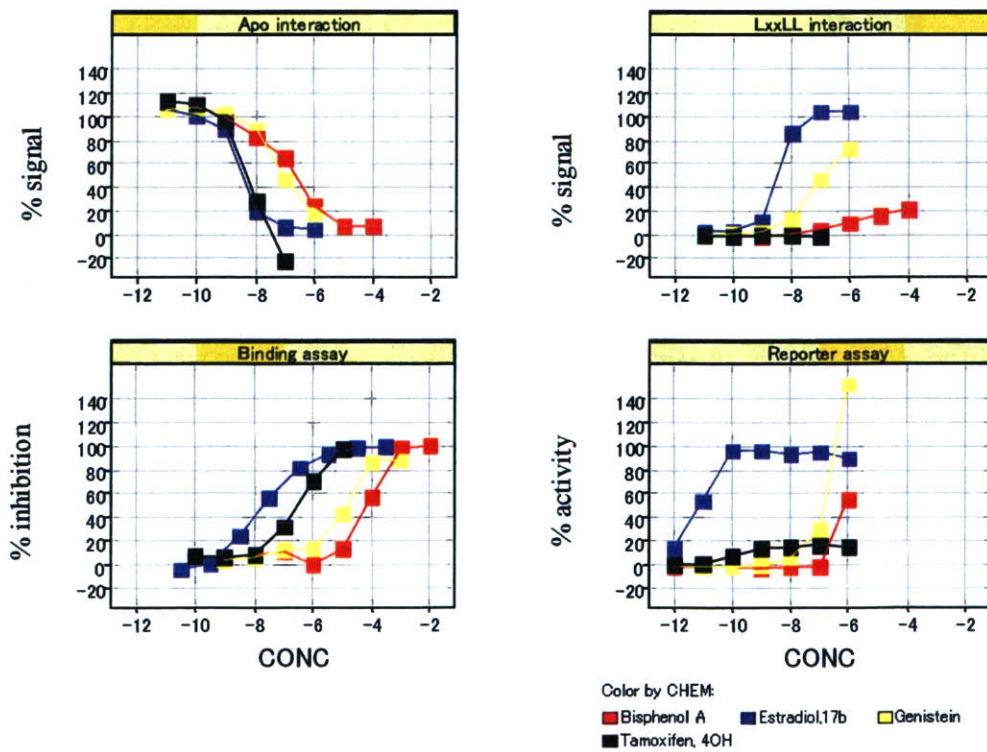


図2 ER-LxxLL, ER-APO1相互作用変化と他のスクリーニングデータとの比較

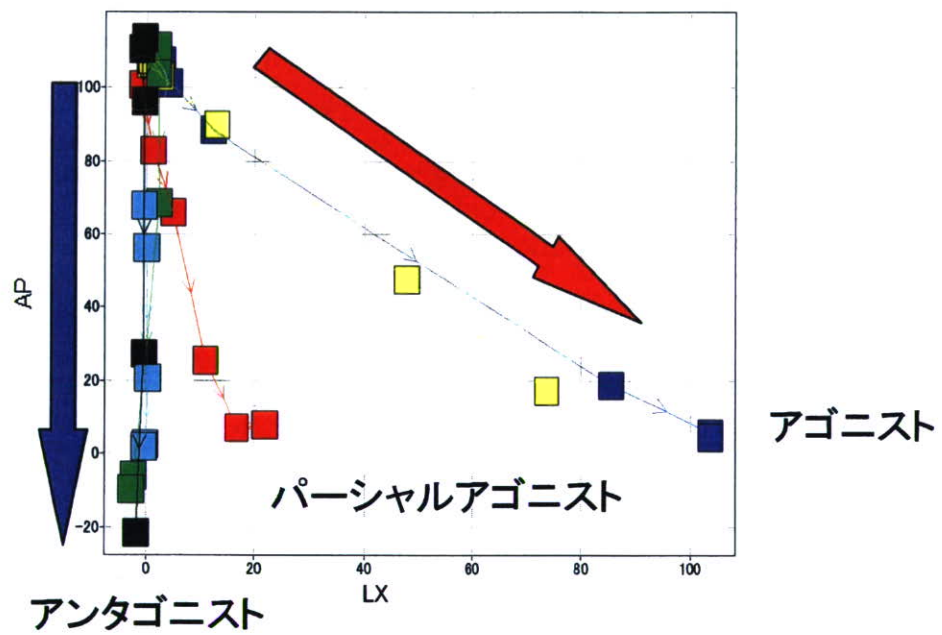


図3 ER-LxxLL, ER-APO1相互作用変化の関係図

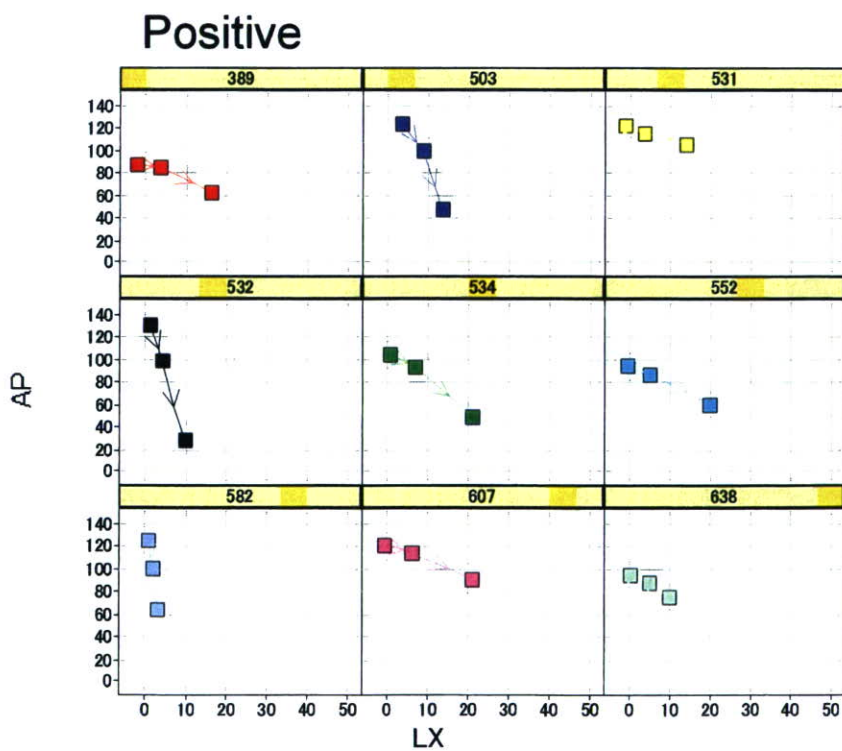
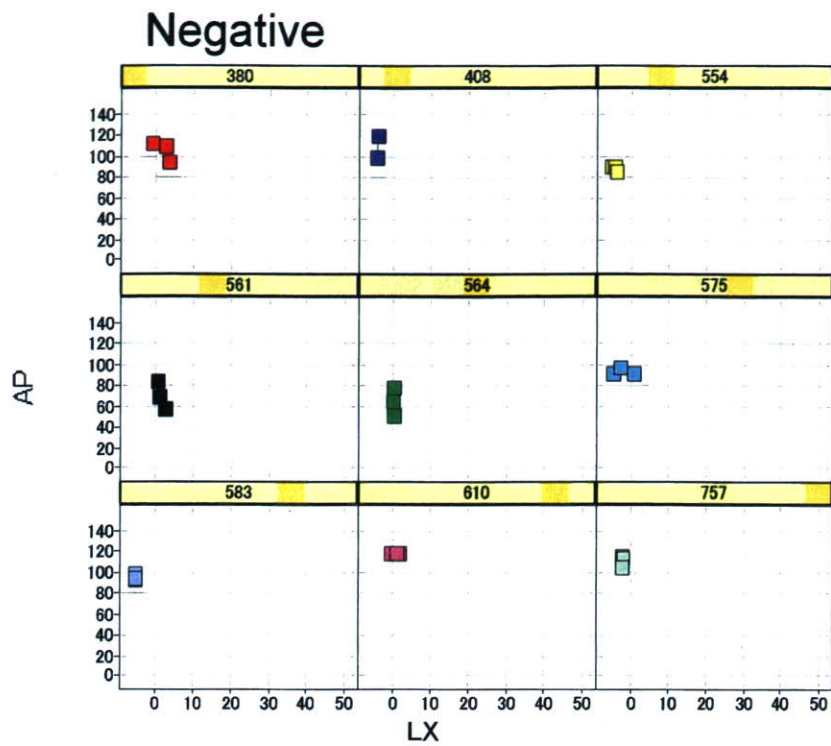


図4 ER-LxxLL, ER-APO1相互作用変化を指標とした化学物質の受容体作用評価結果
:化学物質のIDは表1に示した

DNA固定化ビーズを用いた
核内受容体リガンド特異的相互
作用因子の解析

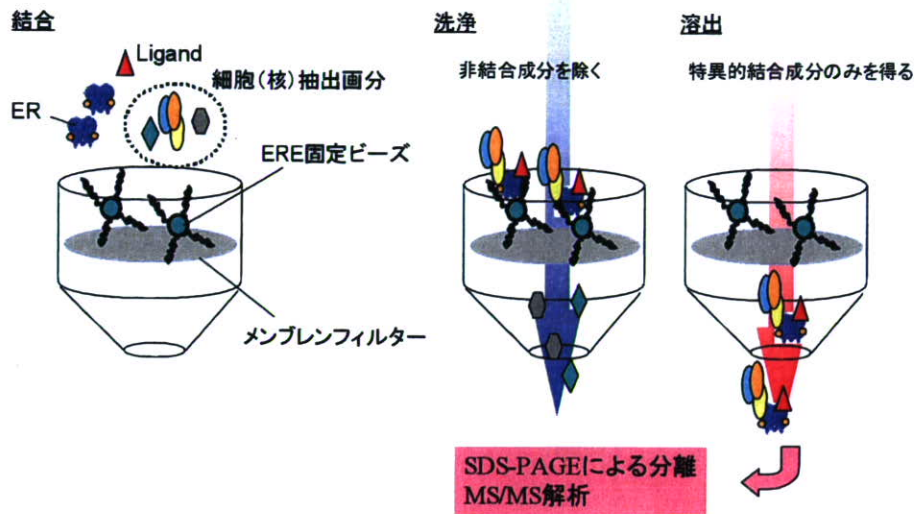


図5 DNA固定カラムによる核内受容体相互作用因子探索の概略図

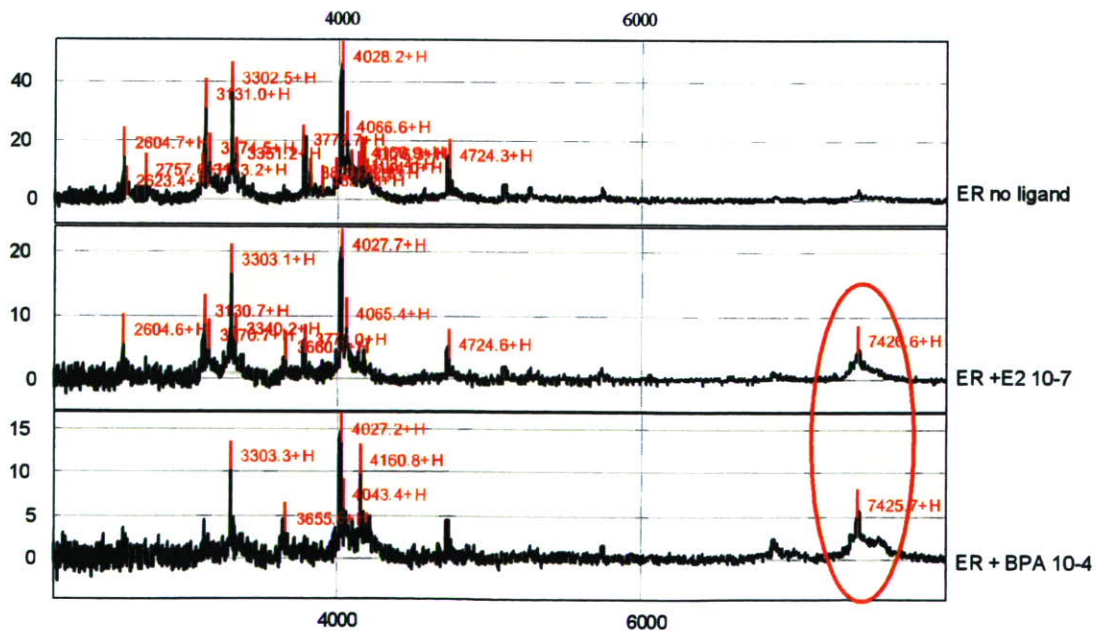


図6 核タンパク質トリプシン消化物からのリガンド特異的ER結合成分のTOF-MS解析

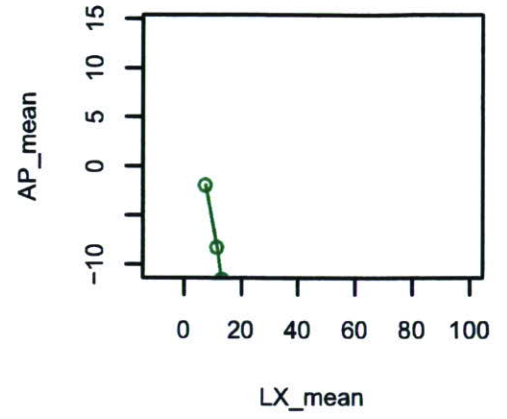
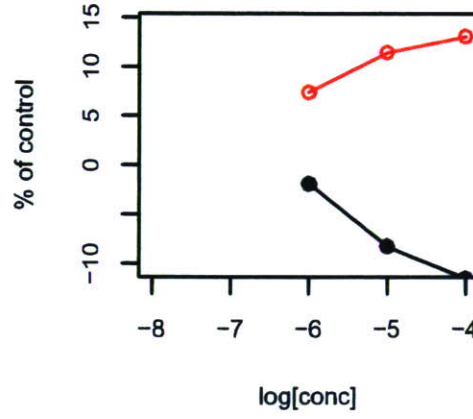
表1 スクリーニング測定化合物一覧

CHEM ID	CAS No.	Name
ER206	6807-17-6	4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)diphenyl
ER208	843-55-0	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol
ER210	5153-25-3	4'-Hydroxybenzoic acid 2-Ethylhexyl ester
ER234	1139-46-4	4-tert-Octylcatechol
ER236	14392-69-9	4'-HYDROXYNONANOPHENONE
ER276	1085-12-7	N-Heptyl 4-Hydroxybenzoate
ER277	81-92-5	Phenolphthalol
ER278	341-58-2	2,2'-Bis(Trifluoromethyl)benzidine
ER284	81936-33-6	p-(trans-4-Propylcyclohexyl)phenol
ER292	ER292	4-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenoxy]benzamide
ER303	1038-66-0	4,4'-Diaminooctafluorobiphenyl
ER340	52222-87-4	6-BENZOYL-2-NAPHTHOL
ER345	6468-96-8	3-Phenylumbelliferone
ER346	2589-73-3	1-(4-Hydroxyphenyl)octan-1-one
ER348	5402-37-9	4-(1-Indanyl)phenol
ER349	ER349	1-(4-Hydroxyphenyl)-2-Phenyl-3-Heptanone
ER352	7507-01-9	3,4-Bis(4-Hydroxyphenyl)-3,4-Hexanediol
ER360	472-41-3	3,4-Dihydro-4-(4-Hydroxyphenyl)2,2,4-Trimethyl-2H-1-Benzopyran
ER362	59517-19-0	3,3'-Dimethyl-4,4'-Biphenol
ER366	ER366	1-[(2,6-Dichlorobenzyl)oxy]-6-(Methylsulphonyl)Indole
ER370	ER370	N-Allyl-2-[(2,4-Dichlorobenzyl)sulfanyl]-6-[(Methylsulfanyl)Methyl]-4-Pyrimidinamine
ER380	2657-25-2	4'-hydroxychalcone
ER386	ER386	3-[[2,6-Dinitro-4-(Trifluoromethyl)Phenyl]Thio]-1H-1,2,4-Triazole
ER389	103-16-2	4-benzyloxyphenol
ER408	96-69-5	4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)
ER503	140-66-9	4-Octylphenol(tert)
ER531	64-86-8	Colchicine
ER532	500-38-9	nordihydroguaiaietic acid
ER534	596-27-0	o-Cresolphthalein
ER552	58-22-0	Testosterone
ER553	58-18-4	Testosterone, methyl
ER554	52-86-8	Haloperidol
ER561	50-23-7	Cortisol
ER564	119-61-9	Benzophenone
ER575	120-83-2	2,4-Dichlorophenol
ER583	96-29-7	2-Butanone oxime
ER607	131-54-4	2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone
ER610	131-57-7	Benzophenone, 2-hydroxy-4-methoxy-
ER638	14938-35-3	p-n-pentylphenol
ER747	103-34-4	Morpholine, 4,4'-dithiodi-
ER751	603-35-0	TRIPHENYLPHOSPHINE
ER757	3001-15-8	Biphenyl, 4,4'-diiodo-
	73-22-3	Tryptophan
	5351-17-7	4-Aminobenzhydrazide
	72-48-0	alizarin
	1634-82-8	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid
	50-67-9	serotonin
	485-49-4	bicuculline

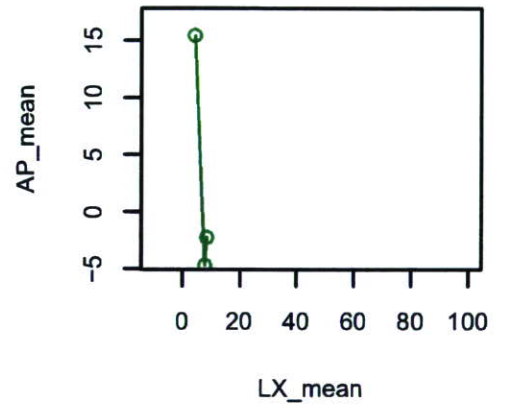
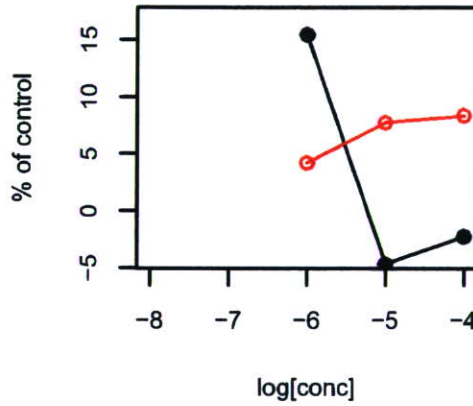
図7 相互作用スクリーニングの結果一覧

: 左図; ER-LxxLL相互作用 (赤)、ER-AP01相互作用の化合物濃度依存性
 : 右図; ER-LxxLL相互作用 (X軸)、ER-AP01相互作用 (Y軸) の関係図

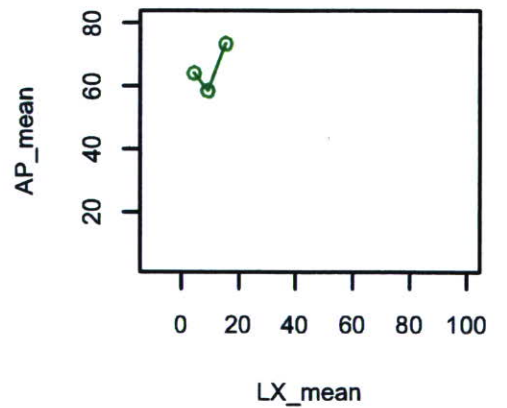
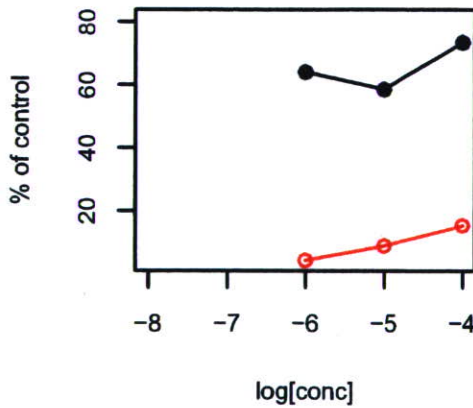
CAS
6807-17-6
NAME
4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene
iphenyl



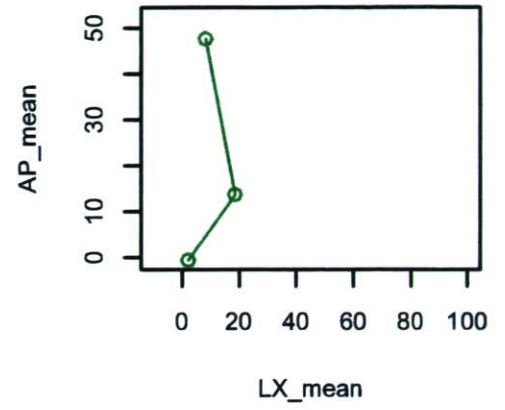
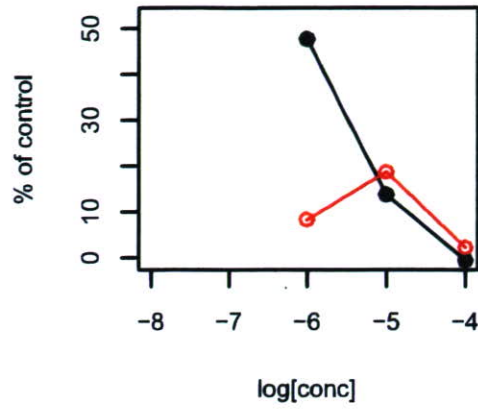
CAS
843-55-0
NAME
4,4'-Cyclohexylidenebispher



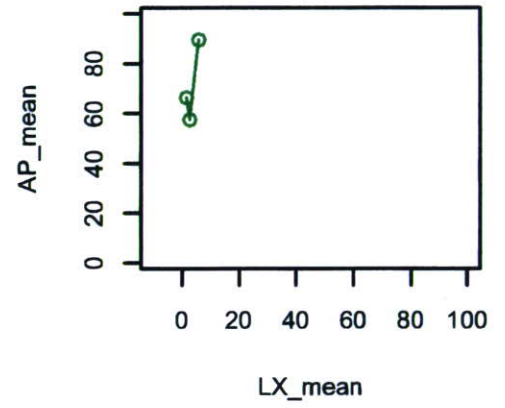
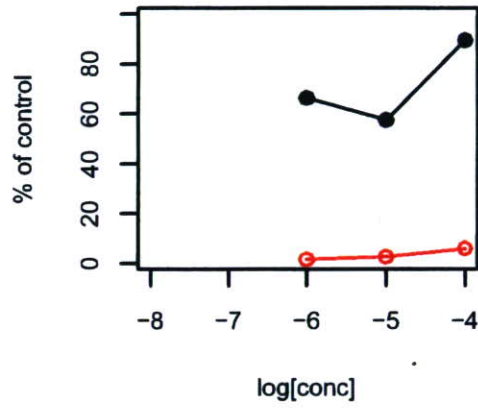
CAS
5153-25-3
NAME
4'-Hydroxybenzoic acid 2-E
hexyl ester



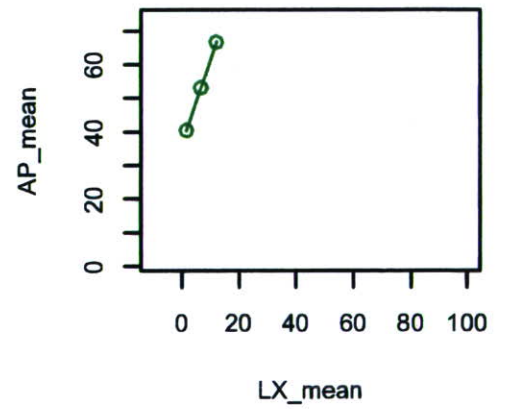
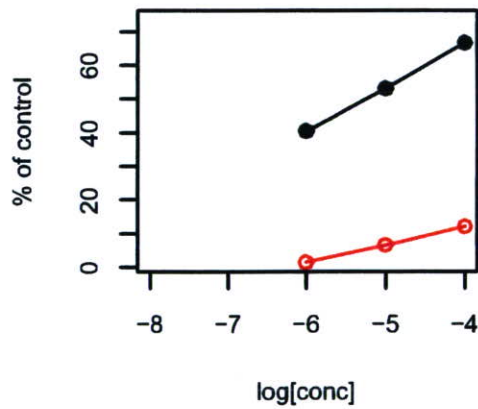
CAS
1139-46-4
NAME
4-tert-Octylcatechol



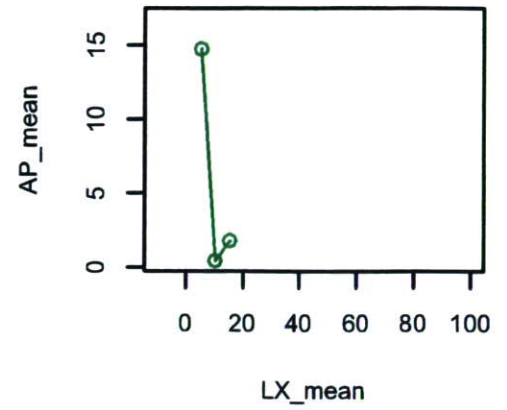
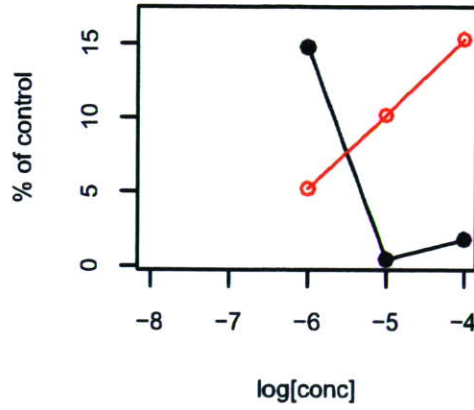
CAS
14392-69-9
NAME
4-HYDROXYNONANOPHE



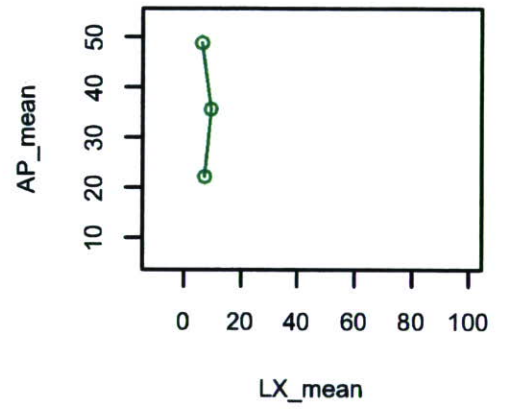
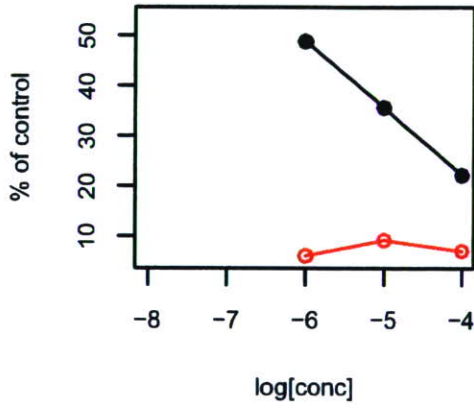
CAS
1085-12-7
NAME
N-Heptyl 4-Hydroxybenzoal



CAS
81-92-5
NAME
Phenolphthalol



CAS
341-58-2
NAME
2,2-Bis(Trifluoromethyl)ben:
dene



CAS
81936-33-6
NAME
p-(trans-4-Propylcyclohexy
enol

