

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 総合研究報告書

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 17～19 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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

(資料)

添付 1:(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
研究図表

添付 2:(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図表

添付 3:(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
研究図表

添付 4:(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研究図表

添付 5:(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
の結果図表

添付 6:(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
研究図表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 437

III. 研究成果の刊行物・別刷 …… 439

別添 3

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総合研究報告書

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、内分泌かく乱性を始めとする核内受容体を分子標的とする化学物質による毒性評価に適用可能なメカニズムに立脚した信頼性の高いスクリーニング評価手法の開発のため、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レポーター測定系や *in silico* 法を用いて実施するとともに、化学物質の核内受容体作用について従来のスクリーニング手法では評価が困難な化学物質特異的な生体反応について標的受容体の生体分子との相互作用や遺伝子発現への影響から解析を行い、得られた結果をこれまで開発を進めてきたスクリーニング手法へフィードバックすることで、より信頼性の高いスクリーニングスキームの開発を目的とした研究を行うとともに、OECD 等の国際機関において、本研究成果からの提案を行うとともに、関連する国際動向の調査を実施した。本研究で構築された、ER、AR、TR の各レポーター測定系は、スクリーニング系として十分な感度や信頼性を有することが示された。このうち ER 系及び AR 系については、これまでの結果をもとに OECD におけるガイドライン化の提案を行った。また、*in silico* 予測システムにおいては、ER 系のレポーター系との結果を比較することによりスクリーニングにおける有用性が示されるとともに、AR 系については再構築を行うことにより予測精度の大幅な向上を得た。一方、受容体と相互作用因子との相互作用解析からは、化合物特異的な作用が検出可能であることが示され新たな評価法としての有用性が示された。一方、核内受容体や関連因子の発現プロファイル解析結果は、細胞を用いた研究結果の解釈に重要な知見を与えるものである。また、遺伝子発現解析から構築された分子ネットワーク解析により、生体内における核内受容体作用の新たなスクリーニング系へ適用可能であることが示された。これらの本研究結果から、核内受容体作用物質について、特徴の異なるスクリーニング手法の組合せにより効率的かつ信頼性の高いスクリーニングが可能であることが示された。今後、本研究成果をもとにした国際的に認められる化学物質スクリーニング手法の確立に向けて、さらなる研究を進める必要がある。

分担研究者

小野 敦・国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

小原有弘・医薬基盤研究所・生物資源研究部・細胞資源研究室・研究員

板井昭子・医薬分子設計研究所・代表取締役

菅野 純・国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部・部長

A. 研究目的

多くの化学物質が生体内で核内受容体に作用し、野生生物及びヒトの健康に内分泌かく

乱作用をはじめとする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用いられており、これらの化学物質の生体影響について迅速に調査評価する必要がある。このため、我々は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の構築を進めるとともに約 500 化合物についての測定を行い、詳細試験実施のための化学物質優先順位付けのためのスクリーニング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である核内受容体への結合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、これを用いた超高速スクリーニング法を開発した。さらに、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によるホルモン受容体と生体分子との相互作用情報から受容体におけるアゴニスト効果/アンタゴニスト作用を検出する手法を構築してきた。本研究では、これまでの研究成果をもとに核内受容体を標的とする化学物質による内分泌かく乱等の問題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実施による試験スキームの実証と化学物質優先順位付けを目的として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と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を実施した。一方、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 HTS や QSAR へフィードバックすることにより、生体反応をより科学的かつ迅速に評価するための技術を確認し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、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、核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究についての研究を実施した。さらに、本研究で得られた成果をもとに OECD 等の国際会議において、内分泌かく乱性のスクリーニング手法のガイドライン化に向けた提案を行うとともに、関連する国際動向の調査を実施した。

B. 研究方法

(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、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、エストロゲンレセプター(ER) α 、 β レポーター遺伝子測定系において各 211 化合物について、アンドロゲンレセプター(AR)及び甲状腺レセプターアッセイ(TR)レポーター遺伝子測定系を用いて各 150 物質の活性測定を実施した。一方、*in silico* スクリーニング系においては、ドッキングモデルを応用したエストロゲン受容体 α 、 β に対する化学物質の結合強度予測スキームを構築し、約 2 万化学物質について予測計算を実施するとともに、アンドロゲン受容体について最新の結晶構造データをもとにしたドッキングモデルの再構築を行い、得られたモデルを用いて約 3,000 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):Firefly Luciferase 遺伝子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 ER α 又は ER β 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して活性未知の 211 化合物の測定を実施した。

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 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 α coding cDNA 全長 (Genbank Accession No. M12674) 及びヒト ER β 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 (添付 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⁺ (添付 1 図 1) を使用した。

4) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地 (イーグル MEM ニッスイ) 4.7 g、10% 炭酸水素ナトリウム (10 g \rightarrow 100 mL) 9 mL 及び 3% L-グルタミン (3 g \rightarrow 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。

5) Steady-Glo Luciferase Assay Reagent

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

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、Vehicle Control (DMSO) 及び Positive Control (1 nM の E2) を添加した。

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

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

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 96-well プレートに播種

(104 cells/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 1mL になるよう無血清培地添加
 ↓ 懸濁
 ↓ 5mL の血清培地を添加
 ↓ 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 10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM [n=3]、Negative Control (DMSO) 及び Positive Control (1 nM の E2) [各 n=6])
 ↓ CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)
 ↓ 各 well から培地を除去
 ↓ PBS (0.3mM の MgCl₂ 含む) と Steady-Glo Luciferase Assay Reagent を 1:1 で混和し、各 well に 200 μ L ずつ添加
 ↓ 5 分間室温で静置
 ↓ 化学発光測定装置 (TopCount NXT™, PerkinElmer) による発光測定
 測定時間 : 1 秒/well

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、添付 1 図 2 で定義される陽性対照区の最大転写活性化倍率(1nM の 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様活性陰性 (-) と判定した。

(2)-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委託業務):これまでに構築した 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 150 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。さらに、これらのアッセイ法の実証研究とした。

ARレポータージーンアッセイ

AR-EcoScreen™ 細胞を 1x10⁵ 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 5x10⁻¹⁰M 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-EcoScreen™ 細胞に各ウェル 10 μ L 加え CO₂ インキュベータでさらに培養した(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-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。

TRレポータージーンアッセイ

CHO-K1 細胞を 1x10⁵cells/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アウムは 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 μ g、pRLTK 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 μ l 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。

(3)-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): 本研究では、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いる。これまで対象としてきた標的受容体は、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) で、各々に対する結合強度予測システムを構築してきた。ER α 及び ER β については、以前に構築した結合強度予測システムが、まだ課題は

残るものの、一定の予測性能を示すと検証されている。本研究においては、予測式や計算条件を更に整備し、今後の一貫した研究に利用できるようにした。また、AR については、以前に構築済みの結合性予測システムの精度が ER に比べて不十分であるため、システムの再構築を試みた。こうして構築・整備した結合性予測システムを、数多くの内分泌かく乱作用未知の化学物質に適用して、それぞれの結合性予測値を算出した。

ER α 、ER β 結合強度予測システムの整備と、それを用いた予測計算

ER α 、ER β に対する結合強度予測システムに用いる計算条件や予測式は、計算手法の改良に伴い、複数検討している状況にあった。これを一本化し、今後の一貫した研究に利用できるようにした。整備後の計算方法、計算条件及び予測式は以下のとおりである。

1) ドッキングに使用する受容体立体構造の準備

ER α の立体構造としては、Protein Data Bank (PDB) に登録されている複合体結晶構造 3ert を使用した。3ert では、アンタゴニストである 4-hydroxytamoxifen がリガンド結合ドメインに結合している。また、ER β については、アンタゴニストである ICI164384 が結合した複合体結晶構造 1hjl を使用した。PDB 中の蛋白質座標に水素を付加し、蛋白質分子力場計算プログラム AMBER で水素構造の最適化を行なった後、AMBER 原子タイプ・原子電荷の割り振りを行なった。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。3ert, 1hjl 複合体結晶構造から、結合しているリガンド分子をそれぞれ取り除き、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。

2) 予測計算の対象となる低分子立体構造の

準備

ER α とER β の両方に対する結合性予測計算には、133個の化学物質を対象とした。また、米国EPAが環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物として提示している58,591の化学物質を、ER α のみに対する予測計算の対象として検討した。しかし、EPAから提供されたデータベース中の化学構造式には、明らかな誤りや立体構造の記載不備が目立った。そこで、比較的正確さが期待できる市販化合物データベース(Available Chemicals Directory; ACD)を利用してデータの補完を行なった。その結果、EPA提示化学物質のうち19,667個について、ACDから立体構造情報を含む化学構造式が入手できた。さらにこれとは別に約2,600個の化学物質も、ER α に対する結合性予測計算の対象とした。

これらの構造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を付加した。

3) ER α 及びER β 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、各化学物質とER α /ER β と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。

4) 結合強度予測計算

結合性は、相対結合強度(RBA)の対数値logRBAとして推算した。logRBA値は、前項で

評価した各種エネルギー値を、以前に構築した以下の式に当てはめて算出した。

$$\log RBA(ER\alpha) = -1.668GBelc - 0.448GBrep - 0.229GBcnf - 0.148Desolv - 4.749 \quad (1)$$

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

GBelc, GBrep, GBcnf, 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

Desolv: Desolvで計算されるリガンド、蛋白質双方の複合体形成に伴う水素結合変化

AR 結合強度予測システムの再構築と、それを用いた予測計算

ARに関しては、平成18年度研究において、以前より構築済みの結合性予測システムを用いて、242個の化学物質の結合強度予測計算を行なった。しかし、この従来型の予測システムは、ARにR1881 (metribolone)が結合した複合体結晶構造が唯一の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り、それに基づいて構築した結合性予測システムも、ERに比べて精度的に不十分なものであった。本研究においては、最近急激に増えた結晶解析データを利用して、より予測能力の高いシステムの再構築を試みた。以下、新たな予測システムの構築とそれを用いた予測計算に焦点を絞って記載する。

新たな予測システム構築のために、PDBに公開されているAR結晶構造のうち、dihydrotestosterone (DHT)が結合した1t63、tetrahydrogestrinone (THG)が結合した2amb、EM5744が結合した2pnuの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ないやすいと考えられる。

1) 3つの AR 構造の準備

今回の検討の対象とする3つの AR 構造—1t63, 2amb, 2pnu—に対し、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なった後、AMBER 原子タイプ・原子電荷の割り振りを行なった。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。また、ER の場合と同様にそれぞれの結晶構造に対してドッキング対象領域を指定し、プログラム CALGRID によりその領域に三次元格子点データを計算した。添付 2 図 1 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。

2) 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 化合物を選んだ。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、ER の場合と同様に三次元化し、必要な種々の情報を付加した。

3) AR と各トレーニングセット化合物のドッキング計算と結合性予測式の導出

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。ER の場合と同様に、複合体モデルが得られた化合物についてエネルギー極小化計算を行なった後、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を算出した。最後に、これらのエネルギー項を各々独立変数とした重回帰分析を実施し、それぞれの AR 構造に対する結合性予測式を得た。

4) 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手順・条件は、トレーニングセット化合物の場合と同様である。各 AR 結晶構造において、検証化合物のエネルギー項の値を、それぞれの結合強度予測式に当てはめ、logRBA 予測値を算出した。logRBA 予測値と実測値との比較から、各 AR 結晶構造に対する予測式の有効性の検証を行った。また、その結果をもとに、新たな AR 結合強度予測システムに用いる結晶構造を決定した。

5) 新しい 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

こうして新たに構築した 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。

(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とともに、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行った。

SPR による ER 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、サンプルを相互作用因子固定化センサーチップにインジェクトして SPR 装置 (Biacore 3000, BiacoreAB) を使い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。

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 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から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、SPR 装置を用いて、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。

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。

核抽出液を用いた網羅的相互作用プロファイルの解析

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。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) と混合して結合した成分について SDS-PAGE (Laemmli 法) を行った。

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

MCF-7 細胞核抽出物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。ERE 固定化セファロース担体を用いてキャプチャーした結合成分を 50mM NaOH で溶出した。溶出液は、50mM HCl で中和した後、マイクロペット用逆相カラム (ZipTip C18) で脱塩濃縮して TOF-MS 解析を行った。

(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): 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。

<細胞に関して>

遺伝子発現解析を実施した細胞 50 種につ

いて、細胞名、由来組織、培地、倍加時間を表1にまとめた。

<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。実際の測定には TaqMan® Low Density Array を使用し、簡便で高感度かつ定量性の有る遺伝子発現解析を実施した。また、外部標準(シロイヌナズナ遺伝子)の導入により細胞の単位 DNA あたりの遺伝子発現量を解析した。

(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:内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体の直接間接的制御下にある生体分子や化学物質による内分泌かく乱機構に関連する遺伝子群の反応パスウェイを電算構築し、これを用いて遺伝子発現データから化学物質の核内受容体への作用の評価法を検討した。

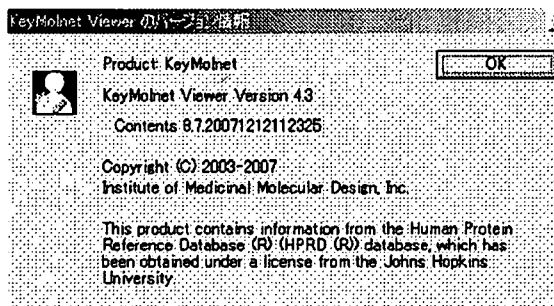
ネットワーク解析におけるデータ処理

Ethinyl estradiol(E2), Testosterone propionate (Test), Levothyroxine (Thyro), Clofibrate (Clo), All trans retinoic acid (Ret), Dexamethasone (Dex), Troglitazone (Tro), Genistein(Geni), Tamoxifen(Tam)を経口投与したマウスの肝臓(C57BL/6, 12W, ♂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。投与条件は以下のとおり。

Chemicals	Dose	Time(h)
Ethinyl estradiol	0, 1, 3, 10 (µg/kg)	2, 8, 24
Testosterone propionate	0, 1, 3, 10 (mg/kg)	2, 8, 24
Levothyroxine	0, 3, 10, 30 (µg/kg)	2, 8, 24
Clofibrate	0, 10, 30, 100 (mg/kg)	2, 4, 8, 24
All trans retinoic acid	0, 0.3, 1, 3 (mg/kg)	2, 4, 8, 24
Dexamethasone	0, 10, 30, 100 (µg/kg)	2, 4, 8, 24
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 (µg/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。



カノニカルパスウェイ“ER による発現調節”、“TR による発現調節”、“Androgen receptor による発現調節”、“PPARα による発現調節”、“RAR による発現調節”、“PPARγ 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“ER(estrogen receptor) による発現調節”、“TR(Thyroid hormone receptor) による発現調節”、“Androgen receptor (DHTR)による発現調節”“PPARαによる発現調節”、“RARによる発現調節”、“PPARγ による発現調節”に E2(ER), Test(DHTR), Thyro(TR), Clo(PPARα), Ret(RAR), Dex(GR), Tro(PPARγ), Geni(ER), Tam(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、各核内レセプター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。

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

以上の結果から、発現変動の大きかった観察点(ほぼ最高用量、時系列は E2, Test, Thyro, Clo, Ret, Dex, Tro, Geni, Tam 投与で 4 または 8 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。

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)

C. 研究結果

(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

活性測定結果

測定結果の図表を添付1に示す。

ER α あるいは ER β 選択的アゴニスト活性

平成 17、18 年度に実施した 141 物質に、本年度実施した 70 物質のデータを加えた計 211 物質の ER α 及び ER β アゴニスト活性測定の結果要約を表 1 に示す。また、ER α 及び ER β で PC50 が算出された 20 物質については PC50 を、ER α あるいは ER β のいずれかで PC10 が算出された 67 物質については PC10 をプロットした図を図 3 に示した。

ER α 選択的アゴニスト活性

ER β に比べ ER α でより強いアゴニスト活性が認められた物質は以下に示す 46 物質であった(表 2)。

・ER α 系において PC50 が算出されたが ER β では PC10 しか算出されなかった 10 物質

・ER α で PC50 が算出されたが ER β では PC 値が算出されなかった 10 物質

・ER α 系において PC10 が算出されたが ER β 系において PC 値が算出されなかった 25 物質

・上記 45 物質以外で ER α 系において算出された PC 値が ER β の PC10 の 1/10 であった 1 物質

ER β 選択的アゴニスト活性

ER α に比べ ER β でより強いアゴニスト活性が認められた物質は以下に示す 13 物質であった(表 3)。

・ER β 系において PC50 が算出されたが ER β では PC10 しか算出されなかった 3 物質

・ER β 系において PC10 が算出されたが ER α 系において PC 値が算出されなかった 8 物質

・上記 11 物質以外で ER β 系において算出された PC 値が ER α の PC10 の 1/10 であった 2 物質

(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

活性測定結果

測定結果の図表を添付2に示す。

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。測定対象とした 150 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 1,3-Benzenediamine, 4,4'-(4-methyl-1,3-phenylene) (AT101)

(PC10 = 3.96×10^{-8})及びPyrophosphoric acid, tetrapotassium salt (AT105) (PC10= 1.96×10^{-6})、Benzylparaben (AT171) (PC10= 1.00×10^{-6})、Anisindione (AT172) (PC10= 2.60×10^{-7})、Anthraflavic acid (AT176) (PC10= 1.32×10^{-6})、Benzoic acid, p-hydroxy-, isopentyl ester (AT177) (PC10= 5.62×10^{-6})、Benzophenone、4-phenyl- (AR192) (PC10= 1.62×10^{-6})、benzo(b)fluoranthene (AT203) (PC10= 2.70×10^{-6})、Cinnamic acid, phenethyl ester (AT205) (PC10 = 1.04×10^{-6})、Mepanipirim (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-trihydroxyisoflavone (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。

AR アントゴニスト活性

AR アッセイのアント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ト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ト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150物質について、IC20以上を算出することができたARアントゴニスト活性物質は20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。非常に強いアントゴニスト作用があったのは、既にARアントゴニスト作用が報告されているベンジジンの誘導体である2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-Benzidine (AT126) (IC50 = 3.60×10^{-7})であった。また、アントゴニストが比較的強い化合物には、Pyrethrins (AT104) (IC50= 2.00×10^{-6})、PROCHLORAZ(AT136) (IC50 = 2.06×10^{-6})、

4,4'-PROPYLIDENEDIPHENOL(AT156) (IC50= 1.93×10^{-6})、Methacrylic acid, isopropylidenedi-p-phenylene ester (AT158) (IC50 = 1.32×10^{-6})などがあつた。

TRアゴニスト活性

今回評価した150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pyrophosphoric acid (AT105)及び2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-benzidine (AT126)の2化合物であつた。2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-Benzidine (AT126)であつた(PC10 = 4.13×10^{-7})。図3にはこれらの化合物の濃度反応曲線を示す。さらに、これらの化合物がTRb、RXR、内在性の因子のいずれに反応しているかを調べるために、TRb、RXRそれぞれの単独発現系および受容体非存在下の系でこの2つの化合物の反応性測定を行った(図4)。その結果、AT105は受容体が非存在下でもベースラインから3倍程度の反応性を示したことから、AT105は、TRbではなく細胞内在性の何らかの因子に反応していることが明らかとなった。一方、AT126に関しても、受容体非存在下の系においてベースラインから3倍程度の活性が見られたので、こちらも細胞内在性の何らかの因子に反応していることがわかつた。しかしながら、AT126の場合、TRbとRXRの共発現系ではそれ以上(ベースラインから5.8倍)の反応性が確認されたことから、この化合物は内在性因子以外に、TRbとRXRのヘテロダイマーに特異的に反応性を示すことが示唆された。

TRアントゴニスト活性

本年度150化合物のTRアント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つた(AT103、AT104、AT109、AT111、AT120、AT121、TR141、TR144、TR149、AT165、AT178、AT183、AT85、TR193、TR194、TR197、AT236、TR242)ものの明確にアントゴニスト活性を示した化合物は認められなかつた。

(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

結果の図表を添付 3 に示す。

ER α 、ER β 結合強度予測システムを用いた予測計算

予測計算対象としてリストアップされた化学物質のうち、以下のような物質は対象から除外した。

- ・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、分子力場パラメー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

また、化合物のサイズや構造(形状、物理化学的性質)によっては、ER α 、ER β のリガンド結合領域にドッキング不可の場合もあった。

この結果、予測計算を実施して結合性予測値を得られた物質は、ER α /ER β 両方を対象とした 133 化合物については、124 個(ER α に対して)、125 個(ER β に対して)であった。ER α に対する予測 logRBA 値を表 1 に、ER β に対する予測 logRBA 値を表 2 に示す。また、EPA 提示化学物質の 19,667 個からは、15,256 個について ER α に対する結合強度予測値が得られた。このうち比較的強い結合性が予測された上位 1000 化合物について、予測 logRBA 値を表 3 にまとめた。更に EPA 物質等とは別に、約 2,600 個の物質についても予測計算を試みた。このうち 1,664 化合物について結合強度予測値が得られた。表 4 に予測 logRBA 値を示す。

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。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。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、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段階法をとることにした。

logRBA 推算のための式は、以下のように得られた。

$$\begin{aligned} \text{1t63:} \\ \text{logRBA(AR-1t63)} = & -2.213 \text{ GBelc} - 0.418 \\ & \text{GBrep} - 0.021 \text{ GBcnf} - 0.106 \text{ Dlig} \\ & - 0.203 \text{ Desolv} + 0.125 \text{ GBsole} + 0.091 \text{ GBsolb} \end{aligned}$$

-5.523 (3)

2pnu:

$$\log RBA(AR-2pnu) = -2.381 \text{ GBelc} - 0.479 \text{ GBrep} - 0.238 \text{ GBcnf} - 0.122 \text{ Dlig} - 0.133 \text{ Desolv} + 0.066 \text{ GBsole} - 5.880 \quad (4)$$

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, GBrep, GBcnf, Desolv, の説明は(1)(2)式参照。

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)

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

新しい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、約 3,000 化合物がリストアップされた。ER と同様の基準で一部の物質が計算対象外となり、またサイズや構造によってドッキング不可の化合物もあったため、最終的に結合強度予測値が得られたのは 1,499 化合物であった。表5に、各物質の AR に対する 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 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

アゴニスト結合型 ER 相互作用ペプチド(LxxLL)及びリガンド非結合型 ER 特異的相互作用ペプチド(APO1)を用いて、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 との相互作用について SPR 解析を行った結果、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た(図 1)。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、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)。他のスクリーニング法との比較より、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)。

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スクリーニングを実施した結果、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(図 4)。

ER と相互作用する新規分子の SPR 探索

探索を行ったペプチドのうち 9 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 との化合物特異的相互作用が検出された。特に PCG-1、PRIP、DAX1 由来ペプチドで ER α に比べ ER β で強い相互作用活性が認められた。今回の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、アポ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(図 5)。

網羅的相互作用プロファイルの解析

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においては、MCF7 核抽出液を用いた検討では SDS-PAGE による解析ではリガンド特異的バンドが検出され、化合物特異的相互作用因子の存在が示唆された(図 6)。一方、トリプシン消化核抽出物からの探索では、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た(図 7)。

(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

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細胞50種を選択し、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行った。本検討で使用した細胞はフェノールレッド不含培地で培養を行い、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。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た(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。

Format 384

P:N 4342265

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	SAMPLE
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	?
B	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	?
C	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	?
D	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	?
E	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	?
F	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	?
G	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	?
H	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	?
I	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	?
J	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	?
K	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	?
L	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	?
M	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	?
N	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	?
O	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	?
P	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	?

(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

カノニカルパスウェイ(Pathway) “ER による発現調節”、“TR による発現調節”、“Androgen receptor による発現調節”、“PPARα による発現調節”、“RAR による発現調節”、“PPARγ による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

E2, Test, Thyro, Clo, Ret, Dex, Tro, Geni, Tam 投与群に対し、上記 Pathway 上の遺伝子の発現変動を観察した。KeyMolnet コンテンツから上記 Pathway 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-I)。

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、E2, Test, Thyro, Clo, Ret, Dex, Tro, Geni, Tam 投与群に対し、それぞれ、投与 8、8、8、4、4、4、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。

E2; up 10(mg/kg) 8 時間後, down10(mg/kg) 2 時間後

Test; up 1(mg/kg) 8 時間後, down10(mg/kg) 8 時間後

Thyro; up 10(mg/kg) 8 時間後, down10(mg/kg) 8 時間後

Clo; up 100(mg/kg) 4 時間後, down100(mg/kg) 4 時間後

Ret; up 3(mg/kg) 4 時間後, down0.3(mg/kg) 4 時間後

Dex; up 100(mg/kg) 4 時間後, down100(mg/kg) 4 時間後

down100(mg/kg) 4 時間後

Tro; up 10(mg/kg) 4 時間後, down10(mg/kg) 4 時間後

Geni; up 100(mg/kg) 8 時間後, down100(mg/kg) 8 時間後

Tam; up 10(mg/kg) 4 時間後, down3(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。

D. 考察

(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

ER α に対して、選択的と思われるアゴニスト活性を示した物質の特徴的構造には phosphate 類、Benzoin 類及びその構造類縁体、二つのベンゼン環をひとつの炭素、窒素、酸素あるいは硫黄原子で結合させた Diphenylmethane 類、Diphenylamine 類、Diphenylether 類及び Diphenylthiole 類、Triphenylethylene 類、Benzoate 類、Phthalate 類があり、特に活性が強かった構造群は Diphenylmethane 類及び Triphenylethylene 類であった。

ER β に対して選択的なアゴニスト活性を示した物質の特徴的構造には Flavone 類、Isoflavone 類及び Diphenylethylene 類があった。Flavone 類、Isoflavone 類については ER β 選択的な活性があることが既知の構造群であり [Escade, et al., 2006; Kuiper, et al., 1998]、本研究でも同様の結果を得ることができていた。また、ER β において PC50 を示す強いアゴニスト活性を示す物質についてはいずれも ER α において PC10 が算出された。

(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

AR レポータージーンアッセイにおいて、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を 18 物質検出することができた。その中で比較的低濃度で活性が認められたのは 1,3-Benzenediamine, 4,4'-(4-methyl-1,3-phenylene) (AT101) (PC10 = 3.96×10^{-8}) 及び 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。Formononetin のようなフラボノイド類 (5 化合物) や Benz(a)anthracene (AT218) (PC10 = 2.02×10^{-7}) のような多環芳香族炭化水素類 (3 化合物) には弱いアゴニスト活性が認められた。

今回、アンタゴニスト活性を検出した 20 物質の中で最も強いアンタゴニスト活性を示した物質は 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-Benzidine (IC50 = 3.6×10^{-7} M) であった。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、最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 10 倍程度活性が低いが、かなり強い抗アンドロゲン活性があると考えられる。この化合物はベンジジンの誘導体であり、類似した化合物に 3,3'-Dichlorobenzidine dihydrochloride がある。この 3,3'-Dichlorobenzidine dihydrochloride は我々の研究によって (Araki et al., 2005) 非常に強い AR アンタゴニスト (IC50 = 2.27×10^{-7} M) として同定されており、ほぼ同程度の活性を示した。ベンジジンの誘導体は、実験用試薬、工業用の色素、トナーの原料等として広く用いられているが、膀胱がんとの関与が指摘されている (Iba, 1989)。また、同じくベンジジンの誘導体である 3,3'-dimethyl-Benzidine (AT218) においても弱いアンタゴニスト活性 (IC50 = 4.9×10^{-6} M) を示した。

また、Pyrethrins にも比較的強いアンタゴニスト作用 ($IC_{50} = 2.0 \times 10^{-6} M$)があることがわかった。Pyrethrins はピレトリン I 及び II、シネリン I 及び II、ジャスモリン I 及び II の混合物であり、除虫菊の有効成分として知られ、殺虫剤として使用されている。この Pyrethrins を元にして数多くの合成ピレスロイドが作られており、これらのピレスロイドは内分泌系へ影響を及ぼすという報告と、及ぼさないという報告があるが (Kunimatsu T, 2002)、我々の検討では比較的強い AR アンタゴニスト作用があった。ただし、図2に示すように $1 \times 10^{-6} M$ の濃度では細胞毒性もあることからアンタゴニスト作用を過大評価している可能性もある。また、AR アンタゴニスト作用を有すると知られている PROCHLORAZ (Vinggaard AM, 2002)にもアンタゴニスト作用 ($IC_{50} = 2.09 \times 10^{-6} M$)を確認した。PROCHLORAZ はイミダゾール系の農薬で殺菌剤などとして使用されている。イミダゾール系の化合物は細菌のステロール合成阻害作用を利用しており、また哺乳細胞が持つアロマターゼ阻害作用を有していることも知られている (ohno K, 2004)。

その他に、比較的強いアンタゴニスト活性を示した物質は Methacrylic acid, isopropylidenedi-p-phenylene ester (AT158) ($IC_{50} = 1.32 \times 10^{-6} M$)、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 ($IC_{50}=4.9 \times 10^{-8} M$) (Araki et al., 2005) に比べると約 2000 倍程度弱いことになる。我々はこれまでの検討で、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 (AT156) ($IC_{50}=1.93 \times 10^{-6} M$)などのビスフェノール類(4化合物)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。また、6-Bromo-2-naphthol (AT224) ($IC_{50}=2.42 \times 10^{-6} M$)などの多環芳香

族炭化水素類(5化合物)にも弱いアンタゴニスト活性が認められた。

一方、TR レポータージーンアッセイにおいては、測定を行った 150 化合物中、2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-benzidine (AT126)のみが弱いながらも TR アゴニスト活性を示した。この化合物の基本骨格は2つのベンゼン環が直接共有結合したビフェニル構造であり、内在性 TR リガンドである T3 のようなビフェニルエーテル構造とは異なる。昨年度の測定においても、ビフェニル構造を基本骨格にもつ化合物が TR アゴニスト陽性化合物であったこと(2,2'-bis(trifluoromethyl)benzidine および 3,3'-dimethyl-4,4'-biphenyl)、及び、以前にもビスフェノールの誘導体(ビフェニル骨格をもつ)が TR のアゴニスト、アンタゴニスト活性を持つという報告があること (Kitamura S. 2002, Moriyama K. 2005)を考慮すると、このようなビフェニル基本骨格を持つ化合物が TR の活性化に寄与しうることは明白である。実際にこれらのビフェニル化合物が TR に直接結合するかどうかを結合実験等で確認することが今後必要になると思われる。

(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

我々はこれまで、標的受容体のリガンド結合部位と化学物質の三次元構造を利用して、それらの安定な結合様式を推定し相互作用を定量的に解析・予測する手法を開発してきた。この手法は、化学物質が受容体リガンド結合キヤビティと物理化学的にフィットし得るかどうか、すなわち結合親和性を有するかどうかを直接的に見積もることができる有力な方法であると考えられる。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 の手法とは異なり、幅広い骨格構造を持つ化合物に適用でき、物理化学的基盤に立脚しているために信頼性も高い。この手法を用いれば、たとえ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相互作用の強さを計算により見積もるこ