

samle No. **ED0855**
 chemical name **4-Aminoazobenzene**
 CAS. **60-09-3**

AR agonist assay

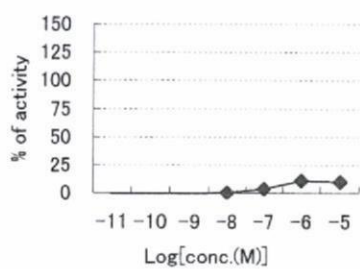
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	9.9
-6	10.6
-7	3.3
-8	-0.1
-9	-0.8
-10	-0.7
-11	-0.7

AR antagonist assay

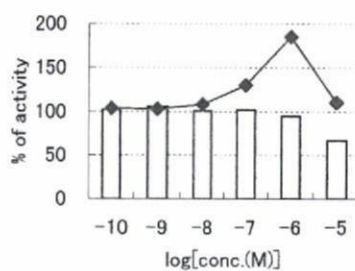
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	110	67
-6	185	95
-7	130	102
-8	108	100
-9	102	106
-10	104	102

□ cell viability

ED0855



ED0855



sample No. **ED0856**
 chemical name **Diphenamid**
 CAS. **957-51-7**

AR agonist assay

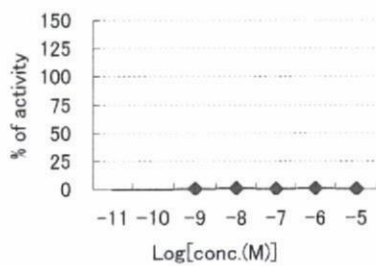
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	0.1
-6	0.5
-7	-0.1
-8	0.5
-9	-0.1
-10	-0.6
-11	-0.6

AR antagonist assay

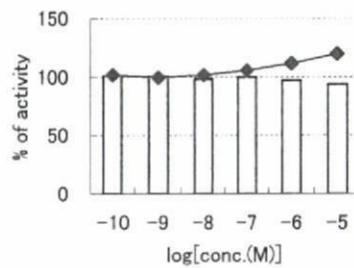
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	119	94
-6	111	97
-7	105	100
-8	101	98
-9	99	100
-10	101	101

□ cell viability

ED0856



ED0856



samle No. **ED0857**
 chemical name **Menthyl salicylate**
 CAS. **89-46-3**

AR agonist assay

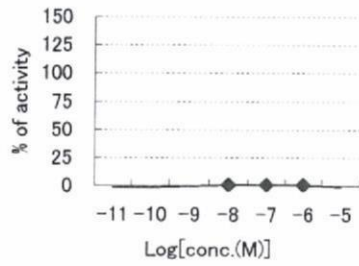
LOG[concentration(M)]	luc (%)
-5	-1.2
-6	0.7
-7	0.8
-8	0.7
-9	-0.5
-10	-1.6
-11	-1.6

AR antagonist assay

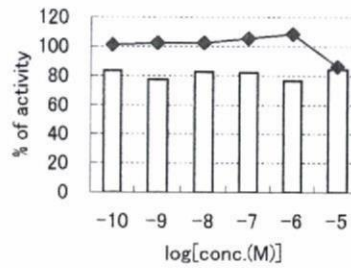
LOG[concentration(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	86	84
-6	108	76
-7	105	82
-8	102	83
-9	102	77
-10	101	84

□ cell viability

ED0857



ED0857



samle No. **ED0858**
 chemical name **alpha-Ionone**
 CAS. **127-41-3**

AR agonist assay

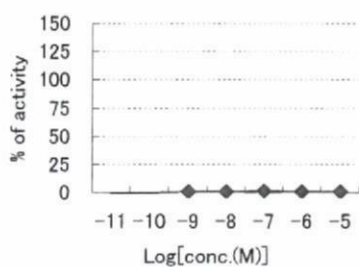
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	0.3
-6	0.5
-7	0.9
-8	0.6
-9	0.5
-10	-0.3
-11	-0.3

AR antagonist assay

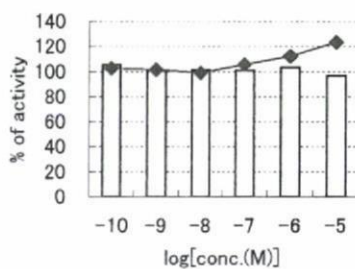
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	123	97
-6	112	103
-7	105	101
-8	99	101
-9	101	100
-10	103	105

□ cell viability

ED0858



ED0858



samle No. **ED0859**
 chemical name **Metazachlor**
 CAS. **67129-08-2**

AR agonist assay

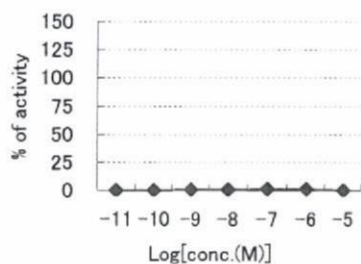
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	0.3
-6	1.0
-7	1.3
-8	0.6
-9	0.8
-10	-0.2
-11	-0.2

AR antagonist assay

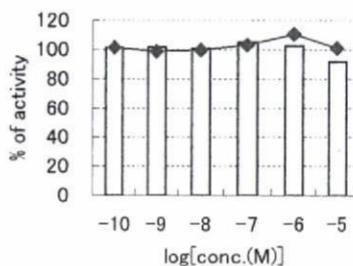
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	101	92
-6	110	103
-7	103	105
-8	100	101
-9	99	102
-10	101	101

□ cell viability

ED0859



ED0859



samle No. **ED0860**
 chemical name Taurocholic acid sodium salt hydrate
 CAS. 345909-26-4

AR agonist assay

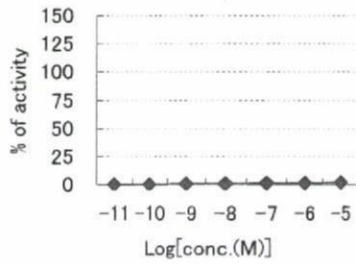
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	1.7
-6	1.2
-7	0.9
-8	0.6
-9	0.3
-10	0.2
-11	0.2

AR antagonist assay

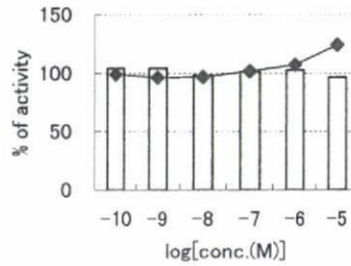
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	124	96
-6	107	103
-7	101	101
-8	97	98
-9	96	104
-10	99	104

□ cell viability

ED0860



ED0860



samle No. **ED0861**
 chemical name **5-Nitro-2-benzimidazolinone**
 CAS. **93-84-5**

AR agonist assay

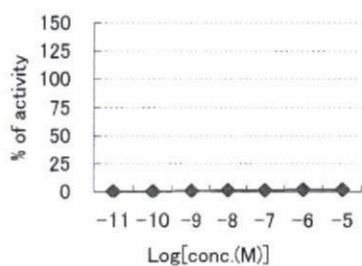
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	1.8
-6	1.8
-7	1.3
-8	1.1
-9	0.5
-10	-0.2
-11	-0.2

AR antagonist assay

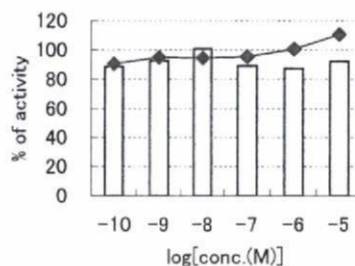
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	111	92
-6	100	87
-7	95	89
-8	94	101
-9	95	93
-10	90	89

□ cell viability

ED0861



ED0861



samle No. **ED0862**
 chemical name **N-Ethyl-N-phenylbenzylamine**
 CAS. **92-59-1**

AR agonist assay

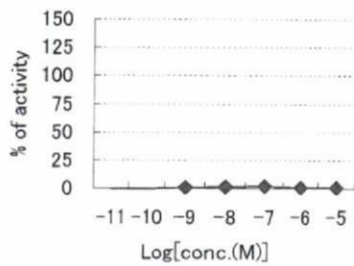
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	0.3
-6	0.7
-7	1.7
-8	1.1
-9	0.8
-10	-0.8
-11	-0.8

AR antagonist assay

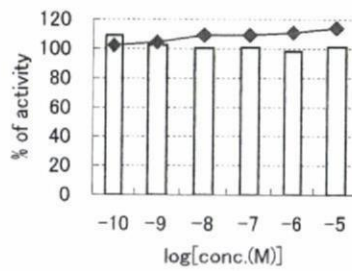
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	114	101
-6	111	98
-7	109	101
-8	109	100
-9	104	103
-10	102	109

□ cell viability

ED0862



ED0862



samle No. **ED0863**
 chemical name 2,5-Di-*t*-pentylhydroquinone
 CAS. 79-74-3

AR agonist assay

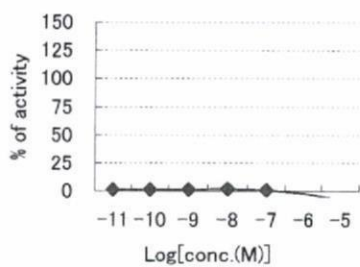
LOG[concc.(M)]	luc (%)
-5	-7.4
-6	-2.0
-7	0.8
-8	1.7
-9	1.4
-10	0.9
-11	0.9

AR antagonist assay

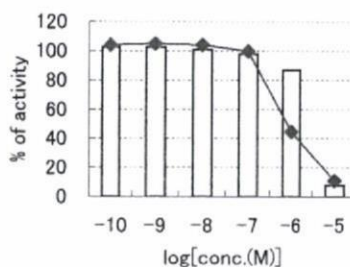
LOG[concc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	11	8
-6	45	87
-7	100	98
-8	104	101
-9	105	103
-10	104	103

□ cell viability

ED0863



ED0863



samle No. **ED0864**
 chemical name **Chlornitrofen**
 CAS. **1836-77-7**

AR agonist assay

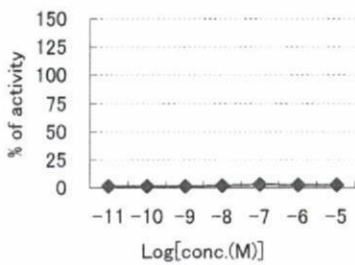
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	2.1
-6	2.4
-7	2.6
-8	1.6
-9	0.9
-10	0.9
-11	0.9

AR antagonist assay

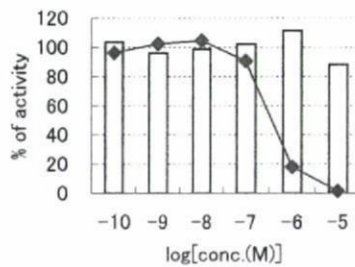
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	1	88
-6	18	111
-7	90	102
-8	104	99
-9	102	96
-10	96	103

□ cell viability

ED0864



ED0864



samle No. **ED0865**
 chemical name **Bicalutamide**
 CAS. **90357-06-5**

AR agonist assay

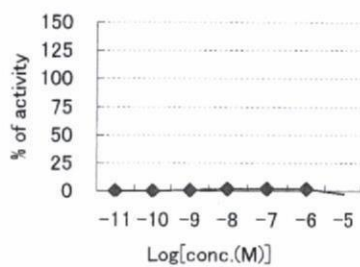
LOG[concc.(M)]	luc (%)
-5	-2.9
-6	1.6
-7	1.6
-8	1.5
-9	0.5
-10	-0.2
-11	-0.2

AR antagonist assay

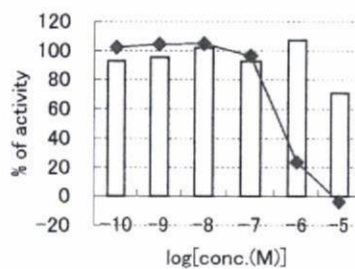
LOG[concc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	-4	71
-6	23	107
-7	97	93
-8	105	102
-9	104	96
-10	102	93

□ cell viability

ED0865



ED0865



samle No. **ED0866**
 chemical name Fluoranthene
 CAS. 206-44-0

AR agonist assay

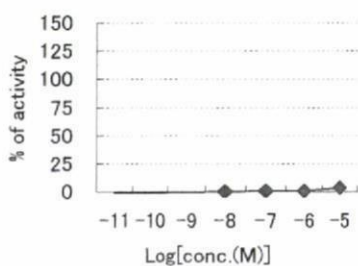
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	3.4
-6	0.8
-7	0.6
-8	0.2
-9	-0.3
-10	-0.9
-11	-0.9

AR antagonist assay

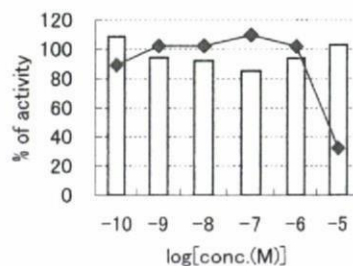
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	32	103
-6	102	94
-7	109	85
-8	102	92
-9	102	94
-10	89	109

□ cell viability

ED0866



ED0866



samle No. **ED0867**
 chemical name Procymidone
 CAS. 32809-16-8

AR agonist assay

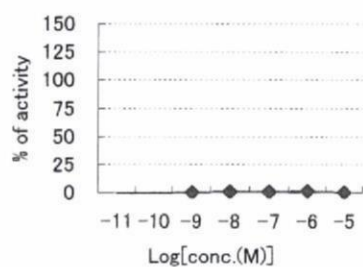
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	0.2
-6	0.9
-7	0.7
-8	0.8
-9	0.3
-10	-0.4
-11	-0.4

AR antagonist assay

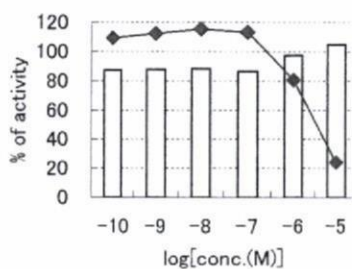
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	24	105
-6	80	97
-7	113	86
-8	115	88
-9	112	88
-10	109	87

□ cell viability

ED0867



ED0867



samle No. **ED0868**
 chemical name **Resveratrol**
 CAS. **501-36-0**

AR agonist assay

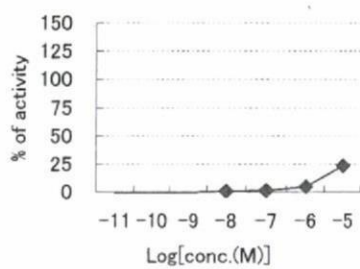
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	23.2
-6	4.6
-7	1.0
-8	0.5
-9	-0.3
-10	-0.7
-11	-0.7

AR antagonist assay

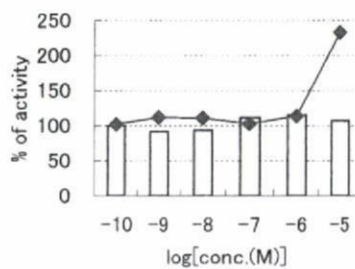
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	232	107
-6	114	115
-7	102	111
-8	111	94
-9	111	92
-10	102	100

□ cell viability

ED0868



ED0868



samle No. **ED0869**
 chemical name **Mifepristone (RU486)**
 CAS. **84371-65-3**

AR agonist assay

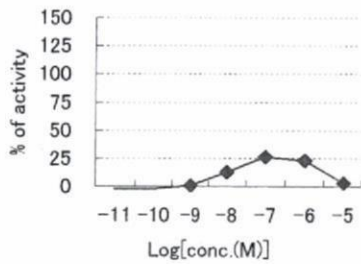
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	2.8
-6	22.5
-7	25.8
-8	12.4
-9	0.4
-10	-2.1
-11	-2.1

AR antagonist assay

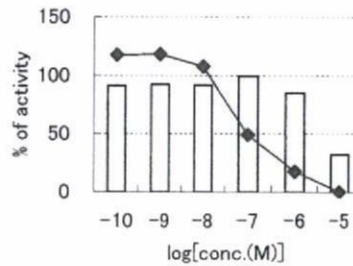
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	0	32
-6	17	85
-7	49	99
-8	108	92
-9	118	92
-10	117	91

□ cell viability

ED0869



ED0869



samle No. **ED0870**
 chemical name **Dibenzoylmethane**
 CAS. **120-46-7**

AR agonist assay

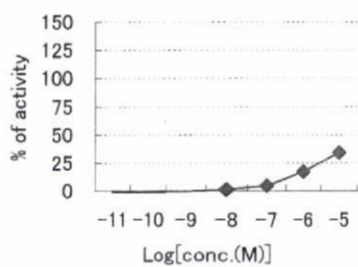
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	33.9
-6	16.9
-7	4.4
-8	0.9
-9	-0.3
-10	-1.4
-11	-1.4

AR antagonist assay

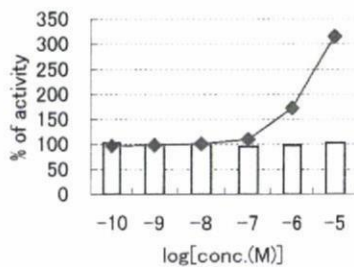
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	314	103
-6	172	98
-7	110	96
-8	100	99
-9	98	99
-10	97	103

□ cell viability

ED0870



ED0870



samle No. **ED0871**
 chemical name **N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide**
 CAS. **4979-32-2**

AR agonist assay

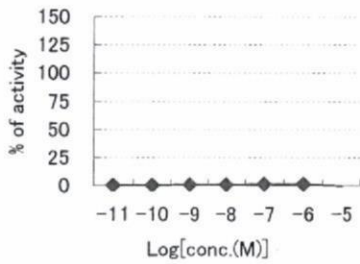
LOG[conc.(M)]	luc (%)
-5	-0.7
-6	1.3
-7	0.9
-8	0.8
-9	0.7
-10	-0.3
-11	-0.3

AR antagonist assay

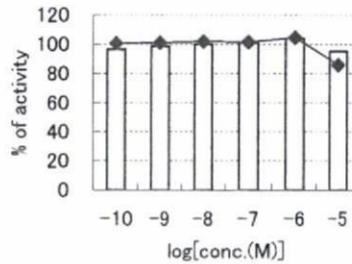
LOG[conc.(M)]	luc (%)	renilla (%)
-5	85	95
-6	104	104
-7	101	101
-8	102	100
-9	101	99
-10	100	96

□ cell viability

ED0871



ED0871



委託研究

2) ホルモン活性予測計算

- 高感受性集団へ影響を及ぼす化学物質の電算検索 -

委託先 板井 昭子 株式会社医薬分子設計研究所 所長
水谷 実穂 株式会社医薬分子設計研究所

研究要旨

核内受容体結合活性を有する化合物の高速スクリーニング手法として、自動ドッキング法 ADAM を核とした *in silico* スクリーニングにより標的核内受容体の三次元構造情報に基づく、化学物質の結合様式の推定ならびに結合性予測を行なった。これまでに、エストロゲン受容体 α (ER α)、エストロゲン受容体 β (ER β)、およびアンドロゲン受容体 (AR) を標的とした、結合強度予測システムの構築および結合性予測計算を実施してきた。

今年度は、昨年度予測精度向上をめざして再構築した AR 結合性予測システムを用いて、国立医薬品食品衛生研究所より供与された化合物リストに従い約 3,000 化合物の予測計算を実施した結果、2132 化合物について結合予測値が計算された。得られた予測結果は、詳細試験実施のための優先順位づけに有用である。

A. 研究目的

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す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)、およ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。我々は昨年度、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なった。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)の選別を工夫することにより、従来の予測性能の大幅な改善に成功した。本年度は、新たに構築した AR 結合予測システムの評価のため、国立医薬品食品衛生研究所より供与された化合物リストに従い約 3,000 化合物の予測計算を実施した。

B. 研究方法

1. AR 結合強度予測システム

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を選んだり、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。予測モデルには、昨年度の検討結果から公開されている AR 結晶構造のうち、dihydrotestosterone (DHT)、EM5744 が結合した2つの複合体構造を利用した。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。

次節に述べる方法で、それぞれの AR 立体構造の準備を行なった。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、2 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

2 つの AR 構造-DHT 結合、EM5744 結合-は、それぞれ分解能 2.07 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, 2pnu である。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。

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。

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。

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、2 つの AR 構造について、計算対象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. AR 予測システムを利用した in silico スクリーニング

昨年度構築した AR 予測モデルを用いて、国立医薬品食品衛生研究所より 供与された約 3000 件の化合物リストについて、昨年度の検討結果から 2 ステップモデルによる in silico スクリーニング計算を実施した。すなわち、まず 1t63 構造について安定複合体構造の計算を行い、安定複合体が得られたものについては予測計算を実施し、安定複合体が得られなかったものについてはさらに 2pnu 構造について予測計算を実施した。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。

C. 研究結果

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、今年度は既存化学物質を中心に約 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

AR 結合強度予測計算は 1t63 (DHT 結合)、2pnu (EM5744) の 2 つの結晶構造を用いて実施した。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 2 段階法により予測計算を行った。AR 予測モデルにおいて logRBA 推算のために用いた式を以下に示す。

1t63:

$$\begin{aligned} \log RBA(AR-1t63) = & - 2.213 \text{ GBelc} - 0.418 \text{ GBrep} \\ & - 0.021 \text{ GBcnf} - 0.106 \text{ Dlig} - \\ & 0.203 \text{ Desolv} + 0.125 \text{ GBsole} + 0.091 \text{ GBsolb} - \\ & 5.523 \end{aligned} \quad (1)$$

2pnu:

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

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