



International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2001

Saturday, December 15 - Monday, December 17, 2001

セッション 3
2001年12月16日(日)

Session 3
Sunday, December 16, 2001

HTPS・QSAR

(ハイ・スループット・スクリーニング／構造活性相関)

**High Throughput Pre-Screening (HTPS)
and Quantitative Structure-Activity
Relationship (QSAR) Techniques**

HTPS/QSAR (ハイ・スループット・スクリーニング/構造活性相関) 内分泌かく乱化学物質問題におけるスクリーニング手法と先端科学・技術

菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所

内分泌かく乱化学物質の生体影響の中心課題を受容体原性毒性として捉えると、本問題の特質が明確になると思われる。ホルモン様作用、ことにエストロゲン様作用を有する化学物質の存在は古くより知られ、また、エストロゲン受容体のリダンダンシーに起因するためか、環境化学物質の無視できない部分がエストロゲン様作用を発揮することが経験的に知られるに至った。他方、生体は恒常性維持機構を有しており、外来性のエストロゲン様化学物質が生体に有害影響を与えるか否かの認定が、従来の毒性試験法ではそう簡単ではないことが受容体原性毒性の観点から示唆されていた。そして、*in silico* / *in vitro* でのホルモン活性予測/測定法と、それに見合う感度を有するバイオアッセイの方法論は存在するものの、受容体原性毒性としての内分泌かく乱性をテストする方法論は、更なる研究開発を待たねばならない状況にある。

米国のEPA/EDSTACおよび、それを参考にしつつわが国において構成され、いくつかの省庁で採用されるであろう取り組みの戦略は、スクリーニング段階、すなわち、ホルモン様活性の有無による化学物質の選別とホルモン様活性の強弱による優先順位付け、および、テスト段階、すなわち、受容体原性毒性の扱える試験系における有害性認定のための詳細試験、の2段階からなるものである。

現行の毒性試験法においては所見が観測されないような低用量域にあっても、種々の不可逆的生体影響が特定の実験系で観察されるという報告が、いわゆる「低用量問題」を提起した。しかし、それらの用量域は内分泌学的には決して低いものではなく、単に現行の毒性試験法における観察可能用量域より「低用量」であるという意味なのである。

受容体原性毒性は、受容体に結合するリガンド分子の影響で、多くの意味で決して画一的でないシグナルが下流に及び、それが、形質を発現することで理解されるはずであることは疑いがないであろう。最先端の科学や技術によって、この過程が解き明かされ、それを正確に高速に測定できるようになると、従来の単純過程のスクリーニング手法から、複雑過程のスクリーニング手法への道が開けるであろう。そうすると、内分泌かく乱性をテストする方法論が開発されるのと並行して、内分泌かく乱性を高精度で予測しうるスクリーニング手法も開発されることが期待される。最先端科学であったころから何年も遅れて規制決定のために採用されるのが従来の試験法であったが、内分泌かく乱化学物質問題では、最新の科学および技術が、すぐさま試験法として取り上げられる可能性を考慮せざるを得ない。これは、毒性学が毒性所見というオールマイティーではあったが同時に大雑把であった観測点のみでは扱いきれない分子生物学の領域を相手にし始めたからであろう。

QSARを用いた内分泌攪乱化学物質の優先順位付け

ウェイダ トン¹、ホン ファン¹、フィシアオ ホン¹、チアン シエ¹、
ロジャー パーキンス¹、ウィリアム ブランナム²、ダニエル M. シーハン³

¹Logicon ROW Sciences、

²FDA国立毒性学研究所 (NCTR) 、

³ダニエル M. シーハンとそのチーム

米国議会によって承認された諸法律を受けて、米国環境保護庁 (EPA) は、エストロゲン様、アンドロゲン様、甲状腺ホルモン様化学物質のエンドポイントに関するスクリーニングと試験の戦略を開発および実行することになった。EPAの「内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験に関する諮問委員会 (EDSTAC)」は、20種類以上の *in vitro* および *in vivo* のアッセイを組み込んだ、複数エンドポイントからなる2段階の戦略を勧告した。内分泌攪乱作用の可能性のあるものとして、スクリーニングの対象とする必要があるとされる化学物質は、87,000種類に及んでいる。化学物質やアッセイも莫大な数にのぼるため、こうしたアッセイ群に対して、それぞれの化学物質を適切な時期に通過させることが困難である。したがって、どの化学物質が内分泌攪乱活性を持つ可能性が高いかを明らかにして、スクリーニングにかける順番に優先順位を設定することが肝要である。

定量的構造活性相関 (QSAR) を用いた優先順位付けは、医薬品の開発過程で広く用いられている。製薬産業における優先順位付けは、リード化合物に発展し得る活性物質、すなわち「当たり」の物質を見つけ出すチャンスを増やすことを目的にしている。したがって、偽陽性が非常に大きな問題となる。それに対して規制目的の場合は、物質が不活性であると判定されると優先順位の低いグループに分類されてしまうため、偽陰性を最小限に抑えることが重要である。規制を目的として米国食品薬品局 (FDA) 国立毒性学研究所 (NCTR) の「内分泌攪乱化学物質知識ベース (Endocrine Disruptor Knowledge Base : EDKB)」プロジェクトチームは、各種類のQSARモデルを、その強度に基づいて、連続する「4相」として合理的に組み込んだ総合計算システムを開発した。このシステムが、内分泌攪乱の可能性のある物質の優先順位付けを行なうのに適切であるかどうかについては、現在、EPAによる評価を受けているところである。第1相では、2種類の簡単な排除フィルターを用いて、エストロゲン様活性を有している可能性がもっとも少ない化学物質を除外する。第2相では、3種類のモデル (構造警告、ファルマコフォア、分類手法) を用いて、活性の定性的な予測を行なう。第3相では、比較分子場解析 (CoMFA) モデルを用いて、第2相で得られた化学物質のさらに正確な定量的活性予測を行なう。第4相では、エキスパートシステムを用いて、第2相と第3相の予測に、その物質の曝露や運命などの他の情報を統合して、優先順位付けを行なうことが推奨されている。この体系における各相は、それ以降の相で対象とする化学物質の数を減少させるふり分けとして用いられている。したがって、これら4相が段階的に働くことで、データセットの大きさが小さくなるにつれて、予測の精度が上がっていくことになる。

各相においては、相補的な異なるモデルを選び、それぞれに活性を決定づける鍵となる構造特性を受け持たせることによって、偽陰性率が最小になるように組み合わせられている。

このシステムは、エストロゲン様活性がすでに明確になっている複数のデータセットによって、有効性が確認されている。このシステムの試行実験において、規制目的の優先順位付けでは重要な点である

偽陰性率を小さく抑えながら、環境中の化学物質の80%以上を除外することが可能であることが示されている。現在、この統合体系はその他の内分泌攪乱メカニズム（例：AR結合）のエンドポイントも含めるように現在拡張中である。

標的受容体構造に基づく内分泌攪乱物質の三次元構造活性相関解析

富岡 伸夫、久保亜抄子、板井 昭子

株式会社医薬分子設計研究所

内分泌攪乱物質 (EDs) の多くは、生体内の特定の受容体に対してホルモン等の内因性の生理活性物質に代わって結合することにより作用を発現している。標的受容体に結合すると想定される物質 (リガンド) の受容体への結合の強さをコンピュータを用いて予測する方法が確立できれば、実験的手段によらずにEDsの活性の強さを予測したり、新規なED候補を探索したりするための有力な手段になることが期待される。

近年、遺伝子工学やX線結晶解析の技術の進歩により、EDsの標的受容体であるエストロゲン・アンドロゲン・甲状腺ホルモン等の核内受容体のリガンド結合ドメインの立体構造が原子レベルの分解能で解明されてきている。一般に、標的蛋白質の立体構造が既知の場合には、計算によりリガンドの蛋白質への結合様式を推定し、得られた安定結合様式に基づいてリガンドの結合の強さを推定する「ドッキングシミュレーション」が、リガンドの結合の強さを予測するための有効な手法として用いることができる。

我々は独自のドッキングシミュレーションの方法として、リガンドの配座と蛋白質上の相対位置の可能性を網羅的に考慮しつつ蛋白質へのリガンドの最安定結合様式を高精度かつ自動的に求めることができるプログラムADAMを開発してきた。さらに、リガンドの蛋白質への結合の強さを定量的に予測するために、ADAMにより求めた蛋白質-リガンドの最安定結合様式に基づいて、両分子間の結合自由エネルギーを推算するプログラムGenBも開発している。我々はこれまでに、両プログラムを蛋白質の立体構造に基づく薬物設計の分野に適用し、新規活性化合物の発見などの成果をあげてきた。

今回我々は、これらのプログラムのEDs研究への応用の可能性を検討するため、EDsの代表的な標的受容体であるエストロゲン受容体 (ER) を対象としたドッキングシミュレーションを行なった。既知EDsの構造活性相関解析への利用を想定したテストでは、ERへの結合の強さ (estradiolに対するRBA) が実験的に知られているEDsについて、ADAMとGenBを用いてER結合能の予測を試み、実測値と予測値の相関係数で0.8以上の良好な相関を得ることができた。また、新規ED候補の選抜を想定したテストでは、ERに結合することが知られている少数の化合物 (活性化合物) を多数の一般化合物群に混ぜ込み、全化合物のドッキングシミュレーションを行ない、各化合物のERへの予測結合強度による順位付けを行なった。その結果、活性化合物の大部分が上位にランクされ、本方法がED候補選抜の目的にも利用しうることが示された。

ドッキングシミュレーションの最大の利点は、対象とする蛋白質及びリガンドのサンプルが不要という点にある。人手していない化学物質や現存しない化学物質であっても評価が可能であり、薬物設計の分野と同様に、EDs研究の分野においても重要な手法の一つなることが期待される。

Reporter Gene Assayを利用したHigh Throughput Pre-screening法の有用性

武吉 正博

財団法人化学物質評価研究機構

レポーター遺伝子アッセイは分子生物学分野において遺伝子の転写調節領域の解析に汎用されていた実験法であり、特にエンハンサーやプロモーターの機能を研究するための手段として利用されており、その原理からホルモン作用の検出に利用可能である。財団法人 化学物質評価研究機構では経済産業省及び厚生労働省との共同研究プロジェクトとしてHigh Throughput Pre-screening (HTPS) すなわち高次スクリーニング試験に供する化学物質の優先順位付けに利用可能なReporter Gene Assay系の開発に取り組んできた。

これまでに我々は複数のReporter gene assay系を樹立した。ヒトエストロゲンレセプターを介する測定系では安定形質株を用いて脂肪族化合物、ベンゼン誘導体、多環芳香族、縮合多環化合物、フタル酸類、その他から構成される約500物質について測定を行い、同時に行ったヒトエストロゲンレセプターに対する受容体結合試験の結果との比較を行った。一過性発現系を利用したラットエストロゲン受容体を介するReporter gene assayでは25種類の化学物質について測定を行い、同時に行った幼若雌ラット子宮増殖試験の結果との比較を行った。その結果、ラットエストロゲン受容体を介するReporter gene assayによって陽性と判定された化学物質は幼若雌ラット子宮増殖試験でも陽性と判定され、両者は良好に相関することが示された。また、エストロゲン受容体に対する親和性を有さないにも関わらず、抗エストロゲン作用を示すall *trans* retinoic acidを用いた実験においてもReporter gene assayは抗エストロゲン作用の検出が可能であった。

以上のことから、Reporter gene assayは実験動物を使用せずに多検体のホルモン様作用を検出することが可能であり、内分泌かく乱物質のHigh throughput Pre-screening法として有望と考えられる。

機能的ゲノミクスに向けた新たなアプローチ

ブルース ブルンバーク、ブリジット リッグズ、ゴラフ シャルマ、フェリックス グラン
カリフォルニア大学

ヒトおよびげっ歯類のゲノムプロジェクトにおけるマッピングと塩基配列決定の段階は完了しつつある。この異例な情報量は、今後の新たな課題を提示している。すなわち、どのような方法でこれらの遺伝子の機能を確認するのかという問題である。この新たな研究分野は、一般に「機能的ゲノミクス」として知られている。ゲノム情報を最大限に活用するために、遺伝子産物の相互作用とそれらの相互作用がもたらす生物学的結果を理解することが求められている。これには、分子的相互作用と生物学的反応を明らかにするための、柔軟性を備えた高スループットの試験法を新たに開発することが必要である。

現在、様々な実験条件に対応した細胞や生物の応答を試験できる有用な新アプローチが数多くある。こうした実験では、細胞の応答プログラムに関する重要な情報が提供されるが、遺伝子の機能についてはわずかしか同定されない。また、タンパク間の相互作用を検出する試験も開発されている。技術が著しく進歩しているにもかかわらず、そのようなアプローチは何れも重大な制約がある。すなわち、ゲノム規模のスクリーンを行うことができる高スループットのフォーマットでは、タンパク質と高分子複合体との相互作用を検知することが不可能であることである。これは厄介な制約である。なぜならほぼすべての細胞タンパクが高分子複合体の一部として機能するからである。

我々は最近、単一のタンパク質と任意の大きさで成分の高分子複合体との相互作用を検知できる高スループットのスクリーニング技術を開発した。このアプローチの大きな利点は、タンパク、タンパク複合体、核酸、タンパクと核酸の複合体、低分子薬物、あるいは炭水化物でさえもターゲットにすることができることである。この柔軟性は、相互作用するタンパクの迅速な同定を可能にし、信号伝達経路の解明を容易にする。

エストロゲン受容体に相互作用するペプチドの
コンビナトリアル・ファージ・ライブラリ・スクリーニング：
外来性エストロゲン類の生物学・薬理学研究のためのツール

ジュリアン M. ホール
国立環境衛生科学研究所

エストロゲンの生物学的作用は、遺伝子的に明確に区別される2種類のエストロゲン受容体 (ER α と ER β) を介して起こる。これら受容体は、標的細胞において、リガンド依存性の転写制御因子として働く。ホルモンによって活性化されたER α と ER β は、標的遺伝子の制御領域内にある特異的なDNAエンハンサー配列であるエストロゲン応答配列 (ERE) に、高い親和性で結合する。DNA結合受容体に共役因子が補充されて、受容体の転写活性が更新され、一般的な転写装置への接触が促進される。ER α と ER β はともに、活性化機能-2 (AF-2) ドメインを有している。このドメインには高度に保存されている両親媒性の α -ヘリックス (H12) が含まれており、これは、アゴニスト依存性の転写活性化と、ステロイド受容体共役因子 (SRC) ファミリーに属する共役因子との相互作用に不可欠なものである。特に、受容体にアゴニストが結合することでAF-2の立体構造に変化が起き、疎水性の共役因子が結合するポケットが形成される。このことにより、受容体がLXXLLモチーフ (NRボックス) と相互作用することが可能になる。LXXLLモチーフは、検証済みの多くの共役因子のドメインと相互作用する受容体に含まれているものである。換言すれば、ERがアンタゴニストに結合することで誘導される立体構造変化ではLXXLLモチーフの動員は起こらないということである。

我々の研究室などのこれまでの研究によって、各々のERリガンド類 (エストロゲン類、抗エストロゲン類、外来性エストロゲン類) は、ER受容体への生物学的活性の違いに相関して、ER α と ER β の全体構造にそれぞれ独特の変化を誘導することが明らかにされている。しかし、AF-2の共役因子結合ポケットに対する各々のリガンドの作用については、その詳細を調べる手投が最近まで存在していなかった。また、ERの各サブタイプに特異的なアンタゴニストが存在しないことも、エストロゲン反応性細胞の各々におけるER α と ER β の意義、および外来性エストロゲンが各受容体サブタイプの活性に与える影響を評価することの障害になっていた。今回我々はER α や ER β の共役因子結合ポケットに相互作用するペプチドに関して、X₇LXXLLX₇の形式でペプチドを発現するコンビナトリアル・ファージ・ライブラリのスクリーニングを行なった。この手法を用いることにより、標的細胞に適用されるとER α や ER β と必須の共役因子との結合を競合的に阻害し、エストロゲン信号を完全にブロックすることができる高度に特異的で強力なペプチド性アンタゴニストの一群が見つかった。また、我々はこれらのペプチドをAF-2の立体構造変化のプロブとして使い、ER共役因子結合ポケットにおけるリガンド特異的な構造変化の検出も行なった。我々は、一群のエストロゲン類、抗エストロゲン類、外来性エストロゲン類を用いて、LXXLLモチーフの結合特異性に要求されるリガンドの性質を決定した。また、LXXLLペプチドの結合効率は、各々のエストロゲン類や外来性エストロゲン類がER α と ER β を介した転写を活性化する能力に相関していた。このように、ファージ・ディスプレイは、環境化学物質や既知の外来性エストロゲン類のエストロゲン様活性の有効で新しいスクリーニング法、およびそのような物質の受容体に対する活性

を阻害する手法になり得る。

つい最近の研究により、外来性エストロゲン類は全てのエストロゲン反応性遺伝子を同じ様式で制御するわけではなく、ERの標的プロモータに含まれるERE配列が受容体活性に影響を与えることがわかった。特に、ビテロゲニンA2、補体3遺伝子、pS2、ラクトフェリンのERE配列に対するERの活性を測定することにより、ER α やER β を介したエストロゲン類および外来性エストロゲン類のリガンド活性は、リガンドと応答配列の両方の性質によって大きく影響されることが明らかになった。ファージ・ライブラリ・スクリーニングで発見された、ER α やER β に相互作用する一連のペプチド類を用いることで、受容体と結合するEREのある種がERの共役因子ポケットの構造を制御することと、ER AF-2構造に対してはEREと外来性エストロゲン類リガンドの組み合わせ効果があることが明らかになった。ER α とER β のこうした立体構造状態の各々が機能に関連しており、それによって、エストロゲンや外来性エストロゲンが結合した受容体における受容体共役因子の結合選択性が予測できることが明らかになった点が興味深い。

ER α とER β に親和性が高いペプチド類が同定されたことで、エストロゲン類、抗エストロゲン類、外来性エストロゲン類のアゴニストおよびアンタゴニスト性状を評価する立体構造的プローブの開発が可能になり、それら分子の作用機序を解明する手法が得られるようになった。現在は、こうしたペプチド性アンタゴニスト類を改変して、動物の個体全体における研究に適したものを作成する研究に取り組んでいる。それによって、エストロゲン反応性組織におけるER α とER β の意義をさらに詳しく解析し、エストロゲン信号系に対する内分泌攪乱化学物質の作用を*in vivo*で研究することが可能になると考えている。