

# KP08

## SPEED98 掲載化合物およびその関連化合物のアンドロゲン受容体に対する活性と三次元構造活性相関

(名城大、京大院農) ○田村 廣人、石本 洋一、赤松 美紀

### 1. はじめに

外来化合物が惹起する内分泌かく乱作用は、その作用機構により大きく2つのグループに分類できる。1つは、外来化合物が直接核受容体と相互作用し、その遺伝子発現調節機構をかく乱する直接型内分泌かく乱 (receptor mediated response) であり、他方は、外来化合物が天然リガンド(ホルモン分子)の生合成や代謝分解過程を阻害することにより間接的に遺伝子発現調節機構をかく乱する間接的内分泌かく乱 (non-receptor mediated response) である。我々は、人工化合物が内分泌かく乱作用を示すか否かを確認するため、それらの中から優先的に評価する化合物のリスト「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」を作成し、その評価を実施してきた。その結果、これまでに内分泌かく乱作用を発現する事が確認された化合物の化学構造は多様であり、単純な推測によりその作用を予測することは極めて困難であるとされていた。ところが、最近の核受容体の結晶構造解析研究と計算化学の目覚ましい進展により、コンピュータグラフィックスを活用して直接型内分泌かく乱を惹起する化合物を予測しようとする研究が精力的に実施されてきた。一般に、これらの研究は、受容体と化合物との競合的結合アッセイ (competitive binding assay) により得られた生物データを用いて解析している。しかし、核受容体を経由した生体反応 (receptor mediated response) のかく乱には、アゴニスト作用とアンタゴニスト作用が存在するため、競合的結合アッセイ

の生物データでは正確に化合物の性格を反映した結果を得ることが出来ない。

従って、本研究では、供試化合物のアゴニストおよびアンタゴニスト作用を判別できるレポーター遺伝子系(ヒト乳がん細胞 MDA-MB-453-kb2)を用いて SPEED'98 掲載化合物およびその関連化合物のアンドロゲン受容体(AR)かく乱活性 (AR アゴニストおよびアンタゴニスト)を評価した。そして、得られた AR アンタゴニスト活性の三次元構造活性相関解析(CoMFA)を行い、活性発現に必要な構造を解明した。

### 2. 結果

本研究に用いたヒト乳がん細胞 (MDA-MB-453-kb2)は、アンドロゲンとグルココルチコイド受容体を持ち、これらの受容体に特異的に反応するプロモーター(MMTV)の下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を構築して構成的に細胞内で発現するように株化した、優れた培養細胞評価系である。本実験系にて約 100 化合物の AR かく乱活性を評価した結果、AR アンタゴニスト作用のみを示した化合物は 36、低濃度でアンタゴニストおよび高濃度でアゴニスト作用を示した化合物は 13 であった。一方、AR アゴニスト作用のみを示した化合物は、テストステロン、ジヒドロテストステロン、プロゲステロンおよびエストラジオールのステロイド骨格を持つ 4 化合物であった。興味あることに、女性ホルモン作用を示すエストロンおよびエチニルエストラジオールは、低濃度でアンタゴニストまた、高濃度でのみアゴニスト作用を示した。さらに、エストリオールと強い女性ホルモン

作用を示す今成エストロゲンのジエチルスチルベステロールは、AR アンタゴニスト作用のみを示した。このように、女性ホルモンアゴニストは、AR との反応では化合物の骨格により異なった作用を発現していることが明らかになった。

有機塩素系化合物では、DDT および DDD は塩素の置換基の位置に関係なく、AR アンタゴニスト活性を示し、活性強度はほぼ同じであった。しかし、DDE では、塩素の置換位置でその活性強度と作用が異なり、*p,p'*-DDE は AR アゴニスト／アンタゴニストの両作用を示し、そのアンタゴニスト作用は DDT 誘導体の中で最も強かったが、*o,p'*-DDE は他の化合物同様アンタゴニスト作用のみを示した。また、有機塩素系では、 $\gamma$ -ヘキサクロロシクロヘキサン( $\gamma$ -BHC)が、AR アンタゴニスト作用のみを示したが、塩素の位置異性体である $\beta$ -BHC は全く活性を示さなかった。カルボジイミド系のビンクロゾリンとプロシミドンは、ともに供試化合物の中で最も高い AR アンタゴニスト作用を示したが、ビンクロゾリンは、高濃度で AR アゴニスト作用を示し、プロシミドンは AR アンタゴニスト作用のみであった。

興味深いことに、これらの化合物には、AR の Arg752 と水素結合するステロイド骨格 3 位のカルボニル基に対応する強い水素結合能を有する置換基が存在しない。供試化合物中で最も高い AR アンタゴニスト作用を示した化合物は、ビンクロゾリンとプロシミドンに加え、エチニルエストラジオール、有機リン剤のフェニトロチオンおよびジフェニルエーテルのクロメトキシルであった。フェニトロチオンおよびクロメトキシルは、Arg752 と強い水素結合が可能な二トロ基を有しているが、一方エチニルエストラジオールの 3 位の置換基は水酸基でありカルボニル基より水素結合受容能は弱い。さらに、このような置換基をまったく持たない多環芳香族のベンゾピレンやピレンなども AR アンタゴニスト作用を示した。これらの知見は、Arg752 との水素結合のみでは AR とリガンドとの相互作用を十分に説明できないことを明らかにした。

そこで、AR アンタゴニスト作用のみを示した化合物(35)および AR アンタゴニスト／アゴニスト両作用を

示した化合物(13)およびすべての活性化合物(49)のアンタゴニスト活性について、それぞれ CoMFAを行った。AR アンタゴニスト作用のみを示した化合物では、プロシミドンの構造が特異なため有意な CoMFA 式を得ることが出来なかつたが、プロシミドンを省くことにより、解析結果は、3 components;  $r^2 = 0.825$ ;  $q^2 = 0.332$  となつた。Arg752 との水素結合能のみならず、ステロイド骨格 B 環 5,6 位に対応する箇所に立体的な制限があることが分かつた。また、D 環の  $17\beta$ -OH から少し離れたところに立体的許容領域が見られた。一方、AR アンタゴニスト／アゴニスト両作用を示した化合物(13)の CoMFA 結果(2 components;  $r^2 = 0.968$ ;  $q^2 = 0.549$ )から、D 環の  $17\beta$ -OH 付近におけるかさ高い置換基の存在がアンタゴニスト活性にとって好都合であることが明らかとなつた。