

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550041

研究課題名(和文) PPCPsのエストロゲン様作用の一斉スクリーニング分析

研究課題名(英文) In silico docking simulation analysis of PPCPs to the fish estrogen receptor subtypes

研究代表者

石橋 弘志 (ISHIBASHI, HIROSHI)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：90403857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水環境汚染が問題視されている医薬品類や化粧品等のパーソナルケア製品(PPCPs)と魚類エストロゲン受容体(ER)サブタイプの分子間相互作用を評価するため、in silicoスクリーニング系を開発した。鎮痛剤/抗炎症剤、脂質調節剤、遮断薬、抗鬱剤などのPPCPsは、一部の魚類ERに対して比較的強く相互作用し、相互作用に関与したERsのアミノ酸の種類や数、水素結合の有無やリガンド-ERs間の距離は異なり、生物種間差が明らかになった。開発したin silico試験系は、PPCPs-ERs分子間相互作用のスクリーニング手法として極めて有用であり、生態リスク評価ツールとしての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the interaction potential of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on fish estrogen receptor (ER) subtypes in silico, a three-dimensional model of the ER ligand-binding domain (LBD) was built and docking simulations were performed. Docking experiments revealed that medaka, zebrafish, roach, fathead minnow, carp, and stickleback ER LBD protein strongly interacted with natural estrogens. Moreover, analgesic/anti-inflammatory, lipid regulation, -blocker, and antidepressant drugs were docked to several fish ER LBD. We also found differences in the key amino acid residues among the fish ER LBDs, indicating involving the differences between species and estrogenic potencies of the selected PPCPs. These results suggest that the ER signaling is disrupted by exposure to these PPCPs. Our in silico analysis may provide an insight into the potential effects of PPCPs on teleost fish.

研究分野：生態毒性学・環境分子毒性学

キーワード：医薬品 水環境汚染 エストロゲン受容体 計算化学 メダカ 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

1990年代後半から欧米を中心に、低濃度で生理活性を示し、生態系へ影響を及ぼす可能性のある医薬品類や化粧品等のパーソナルケア製品 (pharmaceuticals and personal care products: PPCPs) が注目を集めている。これらの物質群は日常的に使用され続け、かつ最終的に水環境中に放出されるため、特に魚類などの水棲生物は慢性的な影響を受ける可能性がある。しかしながら、これまで PPCPs の慢性毒性影響はほとんど評価されておらず、一部の PPCPs を対象として、甲殻類、藻類あるいは魚類に対する急性毒性影響の評価のみ実施されている。

魚類では、慢性毒性影響のエンドポイントのひとつとして産卵数の減少や受精率の低下などが知られている。これら繁殖影響に関するエンドポイントは、次世代影響の評価という観点からも極めて重要であり、魚類ではエストロゲン受容体 (ER) の機能と密接な関連があることが知られている。これまでの報告では、一部の PPCPs は ER を介してエストロゲン様作用を示すことが明らかになっている。しかしながら、PPCPs のエストロゲン様作用を網羅的に調査した研究はほとんどなく、数千~数万存在すると考えられている PPCPs について、それらを明らかにすることは急務の課題である。また、PPCPs の生態リスク評価においても重要な情報を提示できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、環境毒性学の研究で汎用される魚類を対象として、それらの ER サブタイプ (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 1 及び ER $\beta$ 2) と相互作用する PPCPs の化学構造を計算化学の駆使により明らかにし、それら候補化合物の ER 依存的な転写活性化能を *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系により明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、estrone (E<sub>1</sub>)、17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) 及び estriol (E<sub>3</sub>) など内因性エストロゲン類と約 80 種類の PPCPs を対象とした (Christian *et al.*, *Environ Health Perspect*, 1999)。対象とした魚類は、環境毒性学の研究で汎用されるメダカ (*Oryzias latipes*)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)、ローチ (*Rutilus rutilus*)、コイ (*Cyprinus carpio*)、ファットヘッドミノー (*Pimephales promelas*) 及びイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) とした。これら魚類のエストロゲン受容体 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 1 及び ER $\beta$ 2) に対するエストロゲン様作用を *in silico* 及び *in vitro* 系で網羅的に探索・評価した。具体的には、(1) *in silico* による魚類 ERs タンパク質の立体構造予測、(2) *in silico* による化合物-ERs 結合特性のドッキングシミュレーション解析、(3) *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系による ERs 依存的転写活性化能の測定を実施した。これら計算化学・分子生

物学の先端手法を駆使して、魚類 ERs と相互作用する PPCPs を一斉スクリーニングした。

### 4. 研究成果

#### (1) 魚類 ER $\alpha$ リガンド結合領域タンパク質のホモロジーモデリング

統合計算化学システム Molecular Operation Environment (MOE) program (Chemical Computing Group Inc., Montreal, QB, Canada) を用いて、まずメダカ、ゼブラフィッシュ、ローチ、コイ、ファットヘッドミノー及びイトヨの ER $\alpha$  リガンド結合領域 (LBD) の立体構造モデルを構築した。これらは既知のヒト ER $\alpha$  LBD タンパク質立体構造を鋳型 (PDB: 1A52) として、そのアミノ酸配列から ER $\alpha$  LBD タンパク質の立体構造モデルを構築した。

#### (2) 魚類 ER $\alpha$ LBD タンパク質に対する PPCPs のドッキングシミュレーション解析

MOE のドッキングプログラム ASEDock を用いて、estrone (E<sub>1</sub>)、17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) 及び estriol (E<sub>3</sub>) などエストロゲン類と、79 種類の PPCPs との結合ポテンシャルエネルギーを算出し結合状態を解析した。

各魚類の ER $\alpha$  LBD タンパク質に対する E<sub>1</sub>、17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 及び E<sub>3</sub> などエストロゲン類の相互作用ポテンシャルエネルギーは低く、イトヨ以外の魚類では 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> < E<sub>3</sub> < E<sub>1</sub> の順であった (イトヨ: 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> < E<sub>1</sub> < E<sub>3</sub>)。また、各魚類の ER $\alpha$  LBD タンパク質に対して、indomethacine (鎮痛剤/抗炎症薬)、bezafibrate (脂質調節剤)、metoprolol ( $\beta$ 遮断薬)、fluvoxamine (抗鬱剤)、fenoterol ( $\beta$ 2-交感神経様作用薬)、gentisic acid (鎮痛剤/抗炎症薬 acetylsalicylic acid の代謝産物)、ketoprofen (鎮痛剤/抗炎症薬) などの PPCPs の相互作用ポテンシャルエネルギーは 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> より低く、これら PPCPs は各魚類 ER $\alpha$  タンパク質に高い結合親和性を示すことが示唆された。さらに、ホルモン補充剤として使用される医薬品成分のいくつかは、エストロゲン類と同程度の相互作用ポテンシャルエネルギーを示し、各魚類 ER $\alpha$  LBD タンパク質に高い結合親和性を示すことが示唆された。

以上のことから、各魚類の ER $\alpha$  LBD タンパク質に対して相互作用を示す PPCPs のスクリーニングに成功した。

#### (3) 魚類 ER $\alpha$ LBD タンパク質に対する PPCPs の相互作用ポテンシャルエネルギーの魚種間比較

魚類 ER $\alpha$  LBD タンパク質に対する PPCPs の相互作用ポテンシャルエネルギーについて、各魚種 ER $\alpha$  LBD タンパク質間で比較した。結果として、全ての魚類 ER $\alpha$  LBD タンパク質間で有意な正の相関関係がみられた。そのなかでもメダカとゼブラフィッシュ、ゼブラフィッシュとローチ、ローチとファットヘッドミノーの相関係数は 0.77~0.83 と高値

を示した。また、メダカ、ゼブラフィッシュ、ローチ及びファットヘッドミノールとコイあるいはイトヨの ER $\alpha$  LBD タンパク質間の相関係数は 0.36~0.71 と低い傾向を示した。さらに主成分分析したところ、コイ及びイトヨの ER $\alpha$  LBD タンパク質に対する PPCPs の相互作用ポテンシャルエネルギーは、メダカ、ゼブラフィッシュ、ローチ及びファットヘッドミノールと異なるグループに分類された。

以上のことから、魚類 ER $\alpha$  タンパク質に対する PPCPs の相互作用ポテンシャルエネルギーは、コイ及びイトヨは他の魚類と異なる傾向を示すと考えられた。

#### (4) PPCPs との相互作用に關与する魚類 ER $\alpha$ LBD タンパク質のアミノ酸の推定

魚類 ER $\alpha$  LBD タンパク質に対する PPCPs の相互作用ポテンシャルエネルギーの魚種間比較において、コイあるいはイトヨは他の魚類と異なる傾向を示したことから、これらの要因を明らかにするため、メダカ、コイ及びイトヨ ER $\alpha$  LBD タンパク質について、PPCPs との相互作用に關与するアミノ酸の推定を試みた（上位約 20 種 PPCPs を対象）。

メダカ ER $\alpha$  LBD との相互作用ポテンシャルエネルギーの低かった indomethacine、bezafibrate あるいは metoprolol は、Met351、Asp359、Glu361、His532、Leu533 あるいは Lys537 のいずれかのアミノ酸に対して相互作用を示した。ステロイド骨格を有するエストロゲン類は、Met351 と Leu395 に対して相互作用を示し、Leu395 (2.57~2.64 Å) までの距離は Met351 (3.67~4.12 Å) と比較して短かった。また、equilenin とその代謝物は、Phe412 に対しても相互作用を示した。

コイ ER $\alpha$  LBD との相互作用ポテンシャルエネルギーの最も低かった fenoterol は、Thr359、Glu365、Gly533 及び Leu537 に対して相互作用を示した。メダカ ER $\alpha$  LBD に対して最も低い相互作用ポテンシャルエネルギーを示した indomethacine は、コイ ER $\alpha$  LBD では異なるアミノ酸に対して相互作用を示した。ステロイド骨格を有するエストロゲン類との相互作用に關与するアミノ酸は Met355 と Leu399 でありメダカ ER $\alpha$  LBD と同様だった。また、equilenin とその代謝物は Phe416 に対しても相互作用を示しメダカ ER $\alpha$  LBD と同様だった。

イトヨ ER $\alpha$  LBD との相互作用ポテンシャルエネルギーの最も低かった gentisic acid は、Leu316 と Glu323 に対して相互作用を示した。ステロイド骨格を有するエストロゲン類との相互作用に關与するアミノ酸は、コイあるいはメダカ ER $\alpha$  LBD と同様に Leu357 は共通したが、Met313 や His494 の関与は物質によって異なった。例えば、17 $\beta$ -E<sub>2</sub> は His494 と相互作用したが、Met313 は関与しなかった。また、equilenin とその代謝物は、コイあるいはメダカ ER $\alpha$  LBD と同様に Phe374 に対しても相互作用を示した。

以上のことから、メダカ、コイ及びイトヨ ER $\alpha$  LBD タンパク質において PPCPs と相互作用するアミノ酸が明らかとなった。PPCPs と相互作用するアミノ酸は PPCPs の種類によって魚種間で差があり、ステロイド骨格を有する物質では特にイトヨで差がみられた。

#### (5) 魚類 ER サブタイプに対する PPCPs の結合親和性及び転写活性化能の評価

魚類では 3 種類の ER サブタイプの存在が知られている。そこで、メダカをモデルとして、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 1 及び ER $\beta$ 2 のリガンド結合領域 (LBD) の立体構造モデルを *in silico* で構築し、PPCPs とのドッキングシミュレーション解析を試みた。

まず、ドッキングシミュレーション解析で得られた各 ER-LBD と 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> の結合位置と構造が、X 線結晶構造解析で実験的に得られたものをどの程度再現しているかを確認するため、X 線結晶構造の報告されているヒト ER $\alpha$  及び ER $\beta$  LBD タンパク質と比較した。メダカの各 ER サブタイプにおいて算出された RMSD は 1 Å 以下を示し、本研究で構築した ER サブタイプの立体構造モデルは正確に予測できたと考えられた。

次に、PPCPs との相互作用をスクリーニングしたところ、一部の医薬品成分や内因性エストロゲン類である E<sub>1</sub>、17 $\alpha$ -E<sub>2</sub>、17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 及び E<sub>3</sub> は各 ER サブタイプに対して高い結合親和性を示した。そこで、開発した *in silico* 系の有用性を検証するために、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系を用いて ER $\alpha$  依存的転写活性化能を測定したところ、*in silico* 系で確認されたりガンド-ER $\alpha$  分子間相互作用の強弱と同様に ER $\alpha$  も活性化され、本スクリーニング手法の有用性が示された。さらに、リガンドとの相互作用に關与する各 ER サブタイプのアミノ酸の推定を試みたところ、リガンドによって相互作用に關与する ER サブタイプのアミノ酸の種類や数は異なり、水素結合の有無やリガンド-ER 間の距離も異なっていた。

以上のことから、メダカ ER サブタイプに対する PPCPs のエストロゲン様作用が明らかとなった。本研究で開発した *in silico* 試験系は、PPCPs-ERs 分子間相互作用のスクリーニング手法として極めて有用であり、PPCPs の生態リスク評価ツールの一つとして活用されることが期待される。

#### < 引用文献 >

Daughton, C.G. and Ternes, T.A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.*, 107, 907-938.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Tohyama, S., Miyagawa, S., Lange, A., Ogino, Y., Mizutani, T., Tatarazako, N., Katsu, Y., Ihara, M., Tanaka, H., Ishibashi, H., Kobayashi, T., Tyler, C.R., Iguchi, T.: Understanding the molecular basis for differences in responses of fish estrogen receptor subtypes to environmental estrogens. *Environmental Science and Technology*, in press, 査読有.

Miyagawa, S., Yatsu, R., Kohno, S., Doheny, B.M., Ogino, Y., Ishibashi, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Guillette L.J.Jr., Iguchi, T.: Identification and characterization of the androgen receptor from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Endocrinology*, in press, 査読有.  
DOI: 10.1210/en.2015-1037

Uchida, M., Ishibashi, H., Yamamoto, R., Koyanagi, A., Kusano, T., Tominaga, N., Ishibashi, Y., Arizono, K.: Endocrine-disrupting potentials of equine estrogens equilin, equilenin, and their metabolites, in the medaka *Oryzias latipes*: in silico and DNA microarray studies. *Journal of Applied Toxicology*, in press, 査読有.  
DOI: 10.1002/jat.3098

Inokuchi, A., Yamamoto, R., Morita, F., Takumi, S., Matsusaki, H., Ishibashi, H., Tominaga, T., Arizono, K.: Effects of lithium on growth, maturation, reproduction, and gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Applied Toxicology*, in press, 査読有.  
DOI: 10.1002/jat.3058

Kobayashi, J., Imuta, Y., Komorita, T., Yamada, K., Ishibashi, H., Ishihara, F., Nakashima, N., Sakai, J., Arizono, K., Koga, M.: Trophic magnification of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in an estuarine food web of the Ariake Sea, Japan. *Chemosphere*, 118, 201-206 (2015) 査読有.  
DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.066

Inokuchi, A., Nihira, M., Minakoshi, M., Yamamoto, R., Ishibashi, H., Tominaga, N., Arizono, K.: Comparative study of the biological effects of antimicrobials, triclosan and trichlorocarbon, for *C. elegans*. *Journal of Environment and Safety*, 5(2), 95-98 (2014) 査読有.  
URL: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/daikankyoku/5/2/5\\_E14RP0201/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/daikankyoku/5/2/5_E14RP0201/pdf)

Dau, P.T., Sakai, H., Hirano, M., Ishibashi, H., Tanaka, Y., Kameda, K., Fujino, T., Kim, E.Y. and Iwata, H.: Quantitative analysis of the interaction of constitutive androstane receptor with chemicals and steroid receptor coactivator 1 using surface plasmon resonance biosensor systems: a case study of

the Baikal seal (*Pusa sibirica*) and the mouse. *Toxicological Sciences*, 131(1), 116-127 (2013) 査読有.

DOI: 10.1093/toxsci/kfs288

Nakashima, S., Ji, H., Ishitobi, S., Kawazoe, S., Koga, M., Shinohara, R., Ishibashi, H., Tominaga, N. and Arizono, K.: Study of dietary phytoestrogens and estrogenic activity in pet animal diets. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20(1), 22-30 (2013) 査読有.

URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009603493/en>

〔学会発表〕(計 22 件)

有菌幸司, 石橋弘志, 内田雅也, 宮川信一, 富永伸明, 石橋康弘, 井口泰泉: メダカを用いたエクインエストロゲン類のエストロゲン様作用の評価, 第 42 回日本毒理学学会学術年会, 2015 年 6 月 29 日~7 月 1 日, 石川県立音楽堂, 金沢市アートホール, ホテル日航金沢

有菌幸司, 石橋弘志, 内田雅也, 宮川信一, 一川暢宏, 富永伸明, 石橋康弘, 井口泰泉: *In silico*, *in vitro* および *in vivo* 試験系を用いた医薬品プレマリン成分の女性ホルモン様作用の評価, 第 24 回環境化学討論会, 2015 年 6 月 24 日~26 日, 札幌コンベンションセンター

小林淳, 小森田智大, 石橋弘志: 食物網蓄積モデルを用いた残留性有機汚染物質の生態リスク評価の検討: 第 24 回環境化学討論会, 2015 年 6 月 24 日~26 日, 札幌コンベンションセンター

Ogino, Y., Kuraku, S., Ishibashi, H., Miyakawa, H., Miyagawa, S., Yamada, G., Baker, M.E., Iguchi, T.: Gain of function mutations in two paralogous Androgen receptor (AR) genes of teleosts: Implications for evolution of AR gene function, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Ibaraki, Tsukuba, 2-5 June 2015

Yamaguchi, A., Ishibashi, H., Arizono, K., Tominaga, N.: *In vivo* and *in silico* studies to evaluate the estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka, *Oryzias latipes*, 環境ホルモン学会第 17 回研究発表会, 2014 年 12 月 9 日~10 日, 東京大学山上会館

中尾彩美, 石橋弘志, 内田雅也, 山元涼子, 小柳暁子, 草野輝彦, 富永伸明, 石橋康弘, 有菌幸司: 医薬品プレマリン成分のメダカに対するエストロゲン様作用, 環境ホルモン学会第 17 回研究発表会, 2014 年 12 月 9 日~10 日, 東京大学山上会館

Arizono, K., Ishibashi, H., Tominaga, N.: *In vivo* and *in silico* studies to evaluate the estrogenic effects of bisphenol analogues on medaka, Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Vancouver, British Columbia, 9-13

November 2014

内田雅也, 小柳暁子, 草野輝彦, 石橋弘志, 富永伸明, 石橋康弘, 有蘭幸司: メダカ (*Oryzias latipes*) に対するエクインエストロゲンの潜在的内分泌かく乱作用, 第20回日本環境毒性学会研究発表会, 2014年9月10日~11日, 富山国際会議場

石原史隆, 小林淳, 小森田智大, 石橋弘志, 有蘭幸司, 古賀実: 魚類におけるポリ臭素化ジフェニルエーテルの体内分配に及ぼす代謝の影響, 第23回環境化学討論会, 2014年5月14日~16日, 京都大学百周年記念時計台記念館, 芝蘭会館, 芝蘭会館別館

瀬原葉子, 石橋弘志, 石橋康弘, 有蘭幸司: PPCPsのエストロゲン様作用の *in silico* スクリーニング, 環境ホルモン学会第16回研究発表会, 2013年12月12日~12月13日, 東京大学山上会館

Hirano, M., Ishibashi, H., Kim, E. Y., Arizono, K., Iwata, H.: Identification of amino acid residues critical for ligand binding and transactivation in ecdysone receptor, 環境ホルモン学会第16回研究発表会, 2013年12月12日~12月13日, 東京大学山上会館

Hirano, M., Ishibashi, H., Kim, E. Y., Arizono, K., Iwata, H.: *In vitro* and *in silico* analyses to predict the effects of environmental chemicals through the mysid ecdysteroid receptor signaling pathway, The 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants - Dioxin 2013, Daegu, Korea, 25-30 August 2013

石原史隆, 小林淳, 小森田智大, 中島尚哉, 伊牟田優希, 梅原亮, 石橋弘志, 有蘭幸司, 堤裕昭, 古賀実: 海産魚類における残留性有機汚染物質の体内分布特性, 第22回環境化学討論会, 2013年7月31日~8月2日, 東京農工大学

伊牟田優希, 小林淳, 小森田智大, 中島尚哉, 石原史隆, 梅原亮, 石橋弘志, 有蘭幸司, 堤裕昭, 古賀実: 有明海の河口域に棲息する水生生物への残留性有機汚染物質の蓄積解析, 第22回環境化学討論会, 2013年7月31日~8月2日, 東京農工大学

Ishibashi, H., Uchida, M., Hirano, M., Kobayashi, J., Komorita, T., Nakamura, H., Kagami, Y., Kusano, T., Ishibashi, Y., Arizono, K.: Transcriptomic analysis of the liver of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to Kanechlor-500, BDE47 or PFOS, 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Hong Kong, China, 17-21 June 2013

[図書](計3件)

石橋弘志, 有蘭幸司 (2014): 13.6 内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン). 健康と環境の科学(川添禎浩編, 総頁数161), 講談

社, 145-151.

石橋弘志, 高本亜希子 (2013): E. 化学性食中毒. 健康・栄養科学シリーズ 食べ物と健康 食品の安全(有蘭幸司編, 総頁数243), 南江堂, 91-93.

石橋弘志, 高本亜希子 (2013): D. 食品成分の変化により生ずる有害物質. 健康・栄養科学シリーズ 食べ物と健康 食品の安全(有蘭幸司編, 総頁数243), 南江堂, 146-153.

[その他]

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~conse/toppage.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 弘志 (ISHIBASHI, Hiroshi)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号: 90403857