

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成 29 年 2 月 24 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者） 平川 周作  
所属機関 福岡県保健環境研究所  
職 主任技師  
氏名 平川 周作

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

*In silico* 解析によるヒトチトクローム P450 を介したポリ塩化ビフェニルの代謝能評価

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 平川 周作	福岡県保健環境研究所	主任技師	<i>In silico</i> 解析の実施、代謝能評価研究のまとめ
分担者 梶原 淳睦	福岡県保健環境研究所	保健科学部長	PCB 蓄積特性の解析、代謝能評価
堀 就英	福岡県保健環境研究所	課長	化学分析、PCB 蓄積特性の解析
宮脇 崇	福岡県保健環境研究所	研究員	化学分析、PCB 蓄積特性の解析
拠点対応教員 岩田 久人	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	教授	<i>In silico</i> 解析及び代謝能評価に関する指導と助言

3 研究内容 （別紙）

## 研究課題名

*In silico* 解析によるヒトチトクローム P450 を介したポリ塩化ビフェニルの代謝能評価

## 共同研究者名

平川周作（代表、福岡県保健環境研究所）

梶原淳睦（分担、福岡県保健環境研究所）

堀 就英（分担、福岡県保健環境研究所）

宮脇 崇（分担、福岡県保健環境研究所）

岩田久人（拠点構成員、愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

## 研究目的

本共同研究では、ヒトのチトクローム P450 (CYP) 分子種を介した ポリ塩化ビフェニル (PCB) 異性体別の代謝の特徴を *in silico* 解析を用いて調査した。

1968 年、福岡県を含む西日本地域において、米ぬか油への PCB やダイオキシン類の混入による油症事件が発生した。現在でも、油症患者は、一般人に比べて血液中の総 PCB 濃度が高く、ダイオキシン類の一種である 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran の血液中濃度は約 10 倍高いことが報告されている。2000 年代に検診で採取した血液中の PCB 蓄積パターンを解析したところ、油症患者では一般人と比べて低塩素化 PCB が優先的に代謝されていることが推察された。そこで我々は、油症患者で誘導された CYP が低塩素化 PCB を代謝したと予想した。しかし、実験動物を対象とした PCB の代謝に関する研究は多いが、CYP の働きに生物種間差が認められることも報告されている。そこで、分子シミュレーションソフトウェアを用いて、ヒトの CYP 分子種と PCB のドッキング様式を調査することで、ヒトの体内で起こりうる PCB 代謝を推察した。

## 研究内容

愛媛大学沿岸環境科学研究センター化学汚染・毒性解析部門の岩田研究

室が所有している分子シミュレーションソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE) プログラム を利用し、PCB 異性体とヒト CYP 分子種のドッキングに関する *in silico* 解析を実施した。

CYP の活性中心にあるヘム鉄と基質の標的部位の距離が 5 Å (または 6 Å) 以内にある場合、効率的に代謝されるとの報告がある。そこで、CYP と PCB のドッキング様式をシミュレーションし、PCB における塩素が結合していない炭素原子とヘム鉄の最短距離を測定することにより、CYP 分子種が代謝する可能性のある PCB 異性体を調査した。本共同研究では、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP3A4 の 7 分子種とヒトの血液中から検出された 69 種類の PCB 異性体について解析を実施した。CYP 分子種の結晶構造は、Protein Data Bank から取得、PCB 異性体は Accelrys Draw 4.1 で構造式を作成し、それぞれ MOE を用いてシミュレーションに必要な前処理を行い、3 次元モデルを構築した。

## 研究成果

本共同研究により、ヒト CYP 7 分子種と 69 PCB 異性体のドッキング様式をシミュレーションすることができた。CYP のヘム鉄と PCB の標的部位の最短距離を測定した結果をまとめ、Table 1 に示す。CYP2C9 と CYP3A4 の測定値は、多くの PCB 異性体で 6 Å より大きく、PCB 代謝におけるこの 2 分子種の関与は低いものと考えられた。一方、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6 の測定値は、解析したほとんどの PCB 異性体で 6 Å より小さかったことから、これらの CYP 分子種を介

Table 1 The number of PCB congeners which have the Cl unsubstituted atom p or 6 Å of the heme Fe of CYP isozymes.

Distance	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C9	CYP3A4
<5 Å	46	23	37	59	60	5	1
<6 Å	60	64	63	65	65	13	3

In this study, 69 PCB congeners were analyzed.

した PCB 代謝の可能性が示された。特に、CYP2A6 と CYP2B6 は基準を 5Å とした場合でも多くの PCB 異性体が含まれることから、ヒトの体内における PCB 代謝に大きな役割を担っていると考えられた。

油症患者の血液から検出される PCB 異性体の特徴として、CB118 濃度が低く、CB156 濃度が高いことが挙げられ、これは油症診断基準の一つとされている。そこで、代謝されやすいと考えられる CB118 について、PCB 代謝への関与が示唆された CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6 のドッキング様式のシミュレーション結果をもとに標的部位を解析し、生成される水酸化代謝物を推測した (Figure 1)。その結果、CYP1A1、

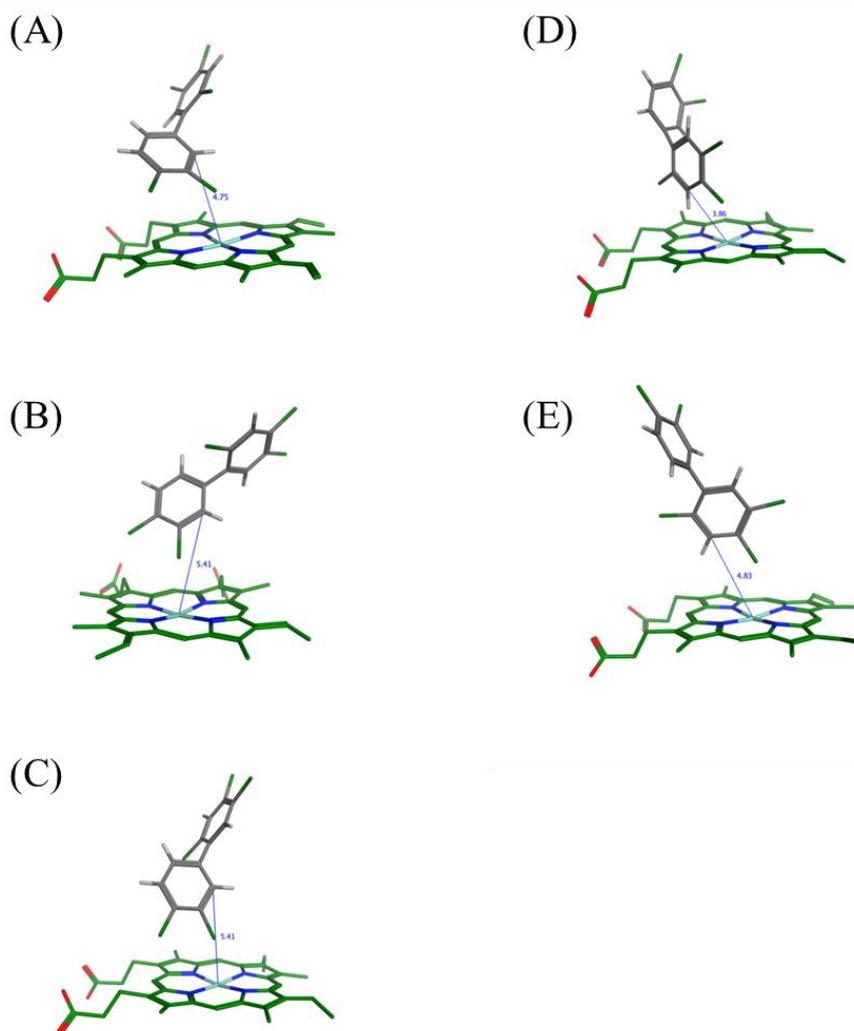


Figure 1 Comparison of docking positions of CB118 in human CYP isozymes. (A) CYP1A1, (B) CYP1A2, (C) CYP1B1, (D) CYP2A6, (E) CYP2B6. The shortest distance (Å) between the Cl unsubstituted carbon atom of CB118 and the heme Fe is shown by the blue line.

CYP1A2、CYP1B1 は 2'-position、CYP2A6 と CYP2B6 は 3-position を標的部位としており、CYP 分子種によって異なった水酸化代謝物が生成される可能性が示唆された。3-position を標的部位とした場合、ヒトの血液で検出される主要な水酸化代謝物の 4-OH-CB107 に代謝されることが知られている。また、ヒト血液中で 2',4-diOH-CB107 の報告事例があることから、2'-position を標的部位とした水酸化の可能性もある。このように、これまでに報告されている化学分析の知見とシミュレーション結果の一致が認められることから、CYP-PCB ドッキング様式に基づく代謝の推察は有効と考えられる。

### 今後の課題

本共同研究では、CYP の 7 分子種と PCB の 69 異性体についてドッキング様式をシミュレーションすることができたが、今回そこから獲得した情報は限られている。今後の課題は下記の 3 点である。

1. PCB 異性体の塩素置換位置と水酸化標的部位の位置の関係を調査するなど、シミュレーション結果の解析を進め、代謝されやすい PCB 異性体の特徴を明らかにする。
  2. 油症患者ではダイオキシン類も高濃度に蓄積していることから、ダイオキシン類についても CYP 分子種を介した代謝の可能性を調査する。
  3. PCB やダイオキシン類による生体影響への関与が報告されている他の CYP 分子種を追加し、化学物質と CYP の関係を総合的に評価する。
- これらの研究を通して、油症患者における PCB やダイオキシン類の体外排泄に関連した治療に寄与していきたい。

### 成果発表リスト

Hirakawa S., Miyawaki T., Hori T., Kajiwara J., Katsuki S., Hirano M., Iwata H., Furue M.: Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and assessment of their cytochrome P450-dependent metabolism by *in silico* docking simulation. *The 9<sup>th</sup> PCB workshop*, #3-8, Abstract 65, Kobe, Japan, October, 2016.

**Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and assessment of their cytochrome P450-dependent metabolism by *in silico* docking simulation**

*Hirakawa, Shusaku (Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences (FIHES)); Miyawaki, Takashi (FIHES); Hori, Tsuguhide (FIHES); Kajiwara, Jumboku (FIHES); Katsuki, Susumu (FIHES); Hirano, Masashi (Ehime University), Iwata, Hisato (Ehime University), Furue, Masataka (Kyushu University)*

In 1968, the Yusho incident occurred in western Japan. The incident was caused by the accidental ingestion of rice bran oil contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs) and various dioxins and dioxin-like compounds. The concentration of total PCBs and dioxins in the blood of the Yusho patients is still higher than that of control populations even in recent years. Furthermore, the composition of PCB congeners in the blood of Yusho patients is different from that of the controls, and is characterized by lower concentrations of pentaCB118 and higher concentrations of hexaCB156. In this study, we investigated the characteristics of accumulation patterns of 69 PCB congeners in the blood of Yusho patients ( $n = 237$ ) by comparing them to those of controls ( $n = 127$ ). The blood samples were collected at medical check-ups in 2004 and 2005, and informed consent was obtained from all participants. For the comparison of patterns of PCB congeners, we calculated the concentration ratio of each congener relative to hexaCB153 concentration. The concentration ratios of lower (4 and 5) chlorinated congeners in the blood of Yusho patients were significantly lower than those of controls, whereas the concentration ratios of higher (7 and 8) chlorinated congeners to hexaCB153 were significantly higher in Yusho patients. Therefore, we hypothesized that lower chlorinated PCB congeners were more efficiently metabolized by cytochrome P450 (CYP) isozymes induced by dioxins in Yusho patients compared to those in the controls. To examine CYP-dependent metabolic potential of PCB congeners, we conducted PCB-CYP docking simulation by *in silico* analysis. The docking models showed that human CYP1 isozymes, which are known to be induced by dioxins, had a substrate binding pocket in which the Cl unsubstituted carbon atom in most of the lower chlorinated congeners could be positioned within 6 Å of the heme Fe. This suggests that these congeners are efficiently metabolized by CYP1 isozymes. These results indicated that CYP1 isozymes may be involved in the characteristic accumulation patterns of PCB congeners in the blood of Yusho patients. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the MHLW, and by Joint Usage/Research Center–LaMer, Ehime University from the MEXT, Japan.