

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30年2月27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
e-mail s-hirakawa@fihes.pref.fukuoka.jp

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及びダイオキシン類の代謝能評価

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
堀 就英	福岡県保健環境研究所	課長	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
芳之内 結加	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	博士課程2年	<i>In silico</i> 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及びダイオキシン類の代謝能評価

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)
芳之内 結加 (分担、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
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

本共同研究プロジェクトでは、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) 及びダイオキシン類の代謝の特徴を *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 (PeCDF) 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 を代謝したと仮説を立て、平成 28 年度に実施した LaMer 共同研究プロジェクトにおいて、*in silico* 解析を用いて PCB 異性体 (69 種) とヒト CYP 分子種 (7 種) のドッキング様式をシミュレーションした。その結果、ダイオキシン類に誘導される CYP 分子種が PCB 異性体を代謝しやすいドッキング様式をとることが示唆された。

平成 29 年度の共同研究では、新たにダイオキシン類と CYP 分子種の

in silico 解析を実施するとともに、PCB 異性体及びダイオキシン類と CYP 分子種のドッキング様式のシミュレーション結果をより詳細に解析し、代謝の特徴を調査した。

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 異性体及びダイオキシン類とヒト CYP 分子種のドッキングに関する *in silico* 解析を実施した。CYP 分子種の結晶構造は、Protein Data Bank から取得、PCB 異性体及びダイオキシン類は 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。

平成 28 年度の共同研究では、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 異性体についてドッキング様式のシミュレーションを実施している。平成 29 年度は、ダイオキシン類として、*non-ortho coplanar* PCBs (4 種)、*polychlorinated dibenzo-p-dioxins* (7 種)、*polychlorinated dibenzofurans* (10 種) と上記 7 種の CYP 分子種のシミュレーションを行った。CYP の活性中心にあるヘム鉄と基質の標的部位の距離が 5Å (または 6Å) 以内にある場合、効率的に代謝されるとの報告がある。そのため、ダイオキシン類における塩素が結合していない炭素原子を標的部位として、シミュレーション結果から CYP のヘム鉄と標的部位の最短距離を測定することにより、代謝の可能性を調査した。なお、一对の CYP と化合物の組み合わせでドッキング様式をシミュレーションすると 5 ~ 9 パターンの結果が得られるため、全てのパターンで標的部位との最短距離を測定し、その中でも最も短い距離になるものを「最短距離」として採用した。

また、平成 28 年度に実施した 69 種の PCB 異性体と CYP 分子種のドッキング様式のシミュレーションでは、最短距離の測定に重点を置いて

おり、標的部位に関する情報は十分に得られていない。標的部位を詳細に解析することにより、PCB の代謝によって生成される水酸化 PCB の種類や関与する CYP 分子種の予測が可能と考えられる。そこで、標的部位に関する情報を獲得するため、本年度に実施した 21 種のダイオキシン類及び平成 28 年度に実施した 69 種の PCB 異性体と CYP 分子種のドッキング様式について、より詳細な解析を実施した。

研究成果

平成 29 年度の共同研究により、新たにヒト CYP 7 分子種と 21 種のダイオキシン類について、ドッキング様式をシミュレーションすることができた。ダイオキシン類における塩素が結合していない炭素原子を標的的部位として、CYP のへム鉄と最短距離を測定した結果をまとめ、Table 1 に示す。CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6 は、最短距離が 6Å 未満となるダイオキシン類が認められたが、CYP2C9 と CYP3A4 は今回確認したダイオキシン類のほぼ全てで 6Å より大きく、ダイオキシン類の代謝におけるこれら 2 分子種の関与は低いと考えられた。また、5Å を閾値とした場合、CYP2A6 と CYP2B6 のみがダイオキシン類の代謝に関与すると示唆された。特に、油症患者で特異的に高濃度の残留が認められている 2,3,4,7,8-PeCDF は、CYP2A6 においてのみ最短距離が 5Å 未満であ

Table 1 The number of dioxin-like compounds which have the Cl unsubstituted atom positioned within 5 or 6Å of the heme Fe of CYP isozymes.

Distance	Compound (number)	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C9	CYP3A4
<5Å	Non-ortho Co-PCBs (4)	0	0	0	4	3	0	0
	PCDDs (7)	0	0	0	3	5	0	0
	PCDFs (10)	0	0	0	4	0	0	0
<6Å	Non-ortho Co-PCBs (4)	2	2	3	4	3	0	0
	PCDDs (7)	4	6	3	4	6	0	0
	PCDFs (10)	3	6	5	8	8	0	1

った。これらのドッキング様式のシミュレーション結果から、ダイオキシン類の代謝に関しては、CYP2A6 が重要な役割を担っていると考えられた。今後、この分子種の働きをより詳細に解析することにより、油症患者の治療への寄与が期待される。

次に、平成 28 年度の研究成果から PCB 及びダイオキシン類の代謝への関与が示唆された CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6 に着目し、本年度に実施した 21 種のダイオキシン類及び平成 28 年度に実施した 69 種の PCB 異性体と CYP 分子種のドッキング様式について、より詳細な解析を実施し、最短距離に加えて標的部位を調査した。一対の CYP と化合物のシミュレーションにより、5 ～ 9 パターンのドッキング様式が得られることから、全てのパターンにおいてヘム鉄と最短距離にある標的部位を調査した。計 2,403 パターンのドッキング様式を解析することにより、各パターンにおける標的部位の情報を獲得した。今後、本共同研究で得られた情報をもとに、代謝産物として生成する水酸化 PCB の予測や代謝に関与する CYP 分子種の解析を進展させる予定である。

今後の課題

これまでに実施した共同研究により、CYP 分子種と PCB 及びダイオキシン類のドッキング様式のシミュレーションから標的部位とヘム鉄との最短距離に関する情報を獲得することができた。今後研究を進展させるために取り組む課題は、下記の通りである。

1. PCB 異性体及びダイオキシン類の代謝標的部位と最短距離、これら基質の化学的特性等の要因を統合的に解析することにより、ヒトの体内で代謝されやすい異性体を調査し、油症患者におけるこれら物質の蓄積特性を解明する。
2. シミュレーションによって予測した PCB の代謝反応が実際に起こり得るかを確認するため、単一の CYP 分子種と PCB 異性体を *in vitro* 系で反応させ、生成した水酸化 PCB を測定する。

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代謝・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., Yoshinouchi Y., Iwata H., Mitoma C., Furue M. Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and prediction of their cytochrome P450-dependent metabolism by in silico analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, DOI: 10.1007/s11356-017-9498-z.

Hirakawa S., Miyawaki T., Hori T., Kajiwara J., Katsuki S., Hirano M., Yoshinouchi Y., Iwata H., Mitoma C., Furue M. Characteristics of PCB congeners accumulated in Yusho patients and estimation of their cytochrome P450-dependent metabolism by in silico docking simulation. *The 37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants and POPs*, P-261, Vancouver, Canada, 2017.