

研究課題名

In silico 及び *in vitro* 解析によるヒトチトクローム P450 2A6 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)
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)
野見山 桂 (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) の代謝能を *in silico* 及び *in vitro* 解析により調査した。

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。申請代表者の所属機関は、検診において油症患者の血液中の PCB 及びダイオキシン類の測定を実施しており、事件後約 50 年が経過した現在でも、油症患者の体内には、これらの化学物質が高濃度に残留していることが明らかになっている。これまでに実施した LaMer 共同研究プロジェクトでは、ヒトの血液从中から検出される PCB 異性体 (69 種) とヒト CYP 分子種 (7 種) のドッキング様式を *in silico* 解析でシミュレーションした結果、CYP2A6 及び CYP2B6 分子種が多くの PCB 異性体に対して代謝しやすいドッキング様式をとることが示された。

2019 年度の共同研究では、ヒト体内で最も高濃度に検出される HxCB153 とヒト CYP2A6 組換え酵素を *in vitro* 系で反応させ、生成された水酸化 PCB の分析を実施した。生成された水酸化 PCB を同定し、シミュレーション結果と統合することにより、CYP2A6 を介した HxCB153 の代謝経路を予測した。

研究内容

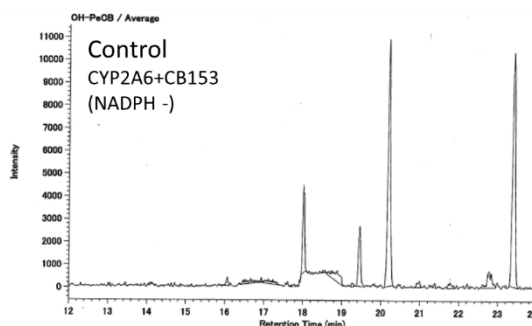
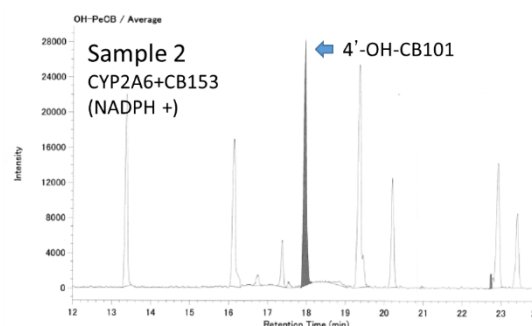
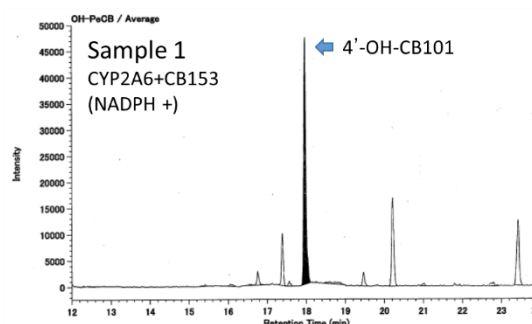
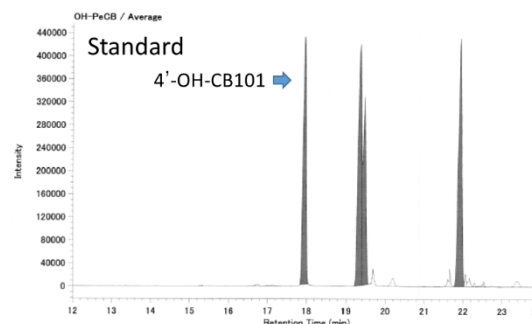
【CYP2A6 と HxCB153 を用いた *in vitro* 試験と水酸化 PCB の測定】

市販されているヒト CYP2A6 組換え酵素 (Human CYP2A6 + P450 Reductase + Cytochrome b₅, CORNING) 及び HxCB153 (AccuStandard Inc.) を用いて、*in vitro* 系で代謝試験を実施し、生成した水酸化 PCB を分析した。測定は、化学汚染・毒性解析部門の野見山准教授が保有しているガスクロマトグラフ二重収束型高分解能質量分析装置 (HRGC-HRMS) で実施した。

In vitro 試験は下記のように実施した。10 mL 試験管に Mix PCB バッファー (100 mM リン酸バッファー pH 7.4、5 mM MgCl₂)、0.55 µM HxCB153 異性体、80 nM CYP2A6 を加え、37 °C で 10 分間プレインキュベートした。続いて、NADPH regenerating system (フナコシ) を加えて代謝反応を開始させ、37 °C で 180 分間インキュベートした。氷冷メタノールを 1 mL 添加することにより、反応を停止させた。なお、CYP2A6-HxCB153 の代謝試験は 2 連で実施し、NADPH regenerating system を添加しない系をコントロールとして用いた。

In vitro 試験後の反応液について、生成した水酸化 PCB を測定するため、次の通り前処理を実施した。試験管内の代謝試験反応液に ^{13}C ラベルした水酸化 PCB をクリーンアップスパイクとして添加し、HCl (1+1)を 2 mL、2-propanol を 1 mL、50% methyl tert-butyl ether (MTBE)/hexane を 2 mL 加え、ボルテックスにて 1 分間撹拌した後、遠心分離し、有機層を分取した (繰り返し 3 回)。抽出液に 10% NaCl を 2 mL 加え、1 回の天地逆転で混合後、30 分間静置し、下層の夾雑層を除き、2 mL まで窒素気流下で濃縮した。1 M KOH (50% ethanol/Hexane 洗浄水) を 2 mL 濃縮した抽出液に加え、1 分間撹拌し、PCB を含む有機層と水酸化 PCBs を含む KOH 層に分配した (繰り返し 2 回)。KOH 層に濃硫酸を数滴加えて pH 2 以下にし、50% MTBE/hexane を 2 mL 加え、撹拌して水酸化 PCBs をヘキサンに転溶し、上層の有機層を分取した (繰り返し 3 回)。分取した溶液を窒素気流下で 1 mL まで濃縮した後、メタノールを 250 μL 、ジクロロメタンを 250 μL 、trimethylsilyldiazomethane を 150 μL 加え、一晩静置して水酸化 PCBs を $\text{CH}_3\text{O-PCBs}$ に誘導体化した。その後、3 g の活性化シリカ

OH-PeCB

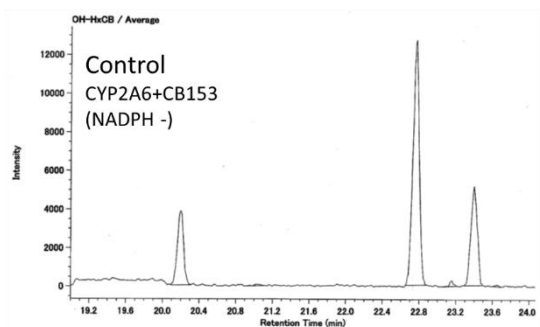
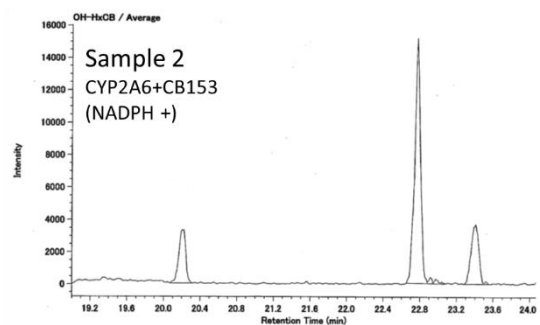
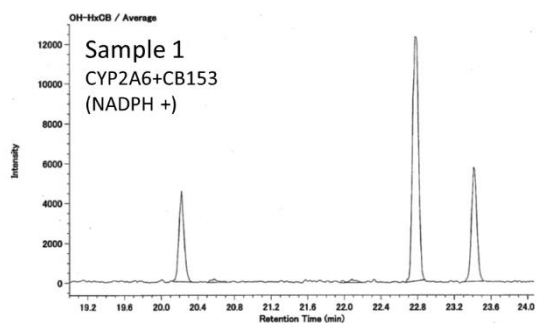
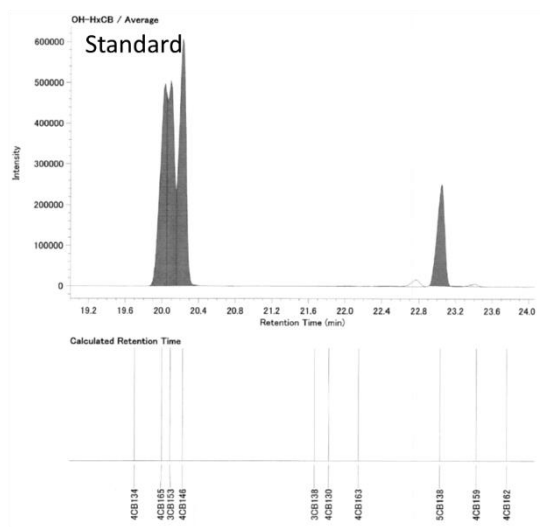


ゲルカラムクロマトグラフィー (Wako-gel S-1) を用いてクリーンアップし、140 mL の 10% DCM/hexane を用いて CH₃O-PCBs を溶出し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、濃縮管に分取した。窒素気流下で 50 μL まで濃縮したものを最終溶液とし、HRGC-HRMS を用いて測定した。

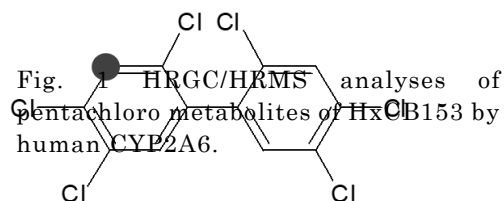
研究成果

CYP2A6 と HxCB153 (6 塩素化体) の *in vitro* 代謝試験の結果、5 塩素化体の 4'-OH-CB101 の生成が認められた (Fig. 1)。Grimm *et al.* (*Crit. Rev. Toxicol.* 2015) による PCB 代謝に関するレビューでは、HxCB153 の代謝物として、OH 基の直接付加による 3-OH-CB153 や 3, 4-epoxide 体の生成後の NIH shift による 4-OH-CB146 の生成が推測されている。しかしながら、本研究では、これら 6 塩素化体の水酸化 PCB は検出されなかった (Fig. 2)。

OH-HxCB



HxCB153



● Predicted target site by *in silico* simulation of CYP2A6-HxCB153

↓
NIH shift
+ dechlorination

4'-OH-CB101

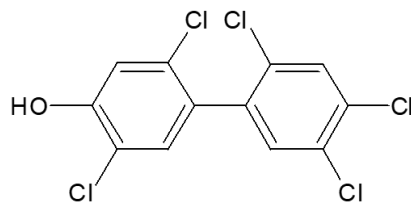


Fig. 3 Proposed metabolic pathway for HxCB153 by human CYP2A6.

CYP2A6 と HxCB153 の *in silico* ドッキングシミュレーション結果から予測された標的部位を考慮すると、HxCB153 の 3' 位が標的部位となり、3', 4'-epoxide 体の生成に引き続き、4' 位に存在していた塩素が脱離して 4'-OH-CB101 に代謝されたと予測された (Fig. 3)。Mise *et al.* (*Toxicol. Sci.* 2016) の報告においても、4 塩素化体の PeCB118 の代謝物として 3 塩素化体の 5-OH-CB66 が検出されており、脱塩素化を伴う

水酸化 PCB の生成反応は起こり得ると考えられる。本共同研究により、HxCB153 の代謝として、CYP2A6 を介した 4'-OH-CB101 の生成経路を新たに示すことができた。

Fig. 2 HRGC/HRMS analyses of hexachloro metabolites of HxCB153 by human CYP2A6.

成果発表

- 学会発表(口頭) Hirakawa S., Miyawaki T., Hori T., Kajiwara J., Katsuki S., Hirano M., Yoshinouchi Y., Iwata H., Mitoma C., Furue M. IN SILICO PREDICTION OF THE METABOLISM OF PCB CONGENERS BY CYTOCHROME P450 ISOZYMES IN YUSHO PATIENTS. *The 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants and POPs*, 1C2-PM1-06, 95-98, Kyoto, Japan, 2019.
- 論文 Hirakawa S., Miyawaki T., Hori T., Kajiwara J., Katsuki S., Hirano M., Yoshinouchi Y., Iwata H., Mitoma C., Furue M. (2019). IN SILICO PREDICTION OF THE METABOLISM OF PCB CONGENERS BY CYTOCHROME P450 ISOZYMES IN YUSHO PATIENTS. *Organohalogen Compounds*, 81, 171-174.

今後の課題

これまでに実施した共同研究から、ヒト CYP 分子種と PCB の *in silico* 解析によるシミュレーション及び単一の CYP 分子種と PCB 異性体を用いた *in vitro* 試験を統合する手法を用いることで、PCB 代謝経路の予測に利用できることが示唆された。

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 異性体の代謝標的部位及び最短距離に関するシミュレーションの解析結果と PCB の異性体別の化学的特性等の要因を総合的に統計処理し、代謝されやすい PCB 異性体の特徴と関与する CYP 分子種の特徴から、油症患者におけるこれら物質の蓄積特性を解明する。
2. CYP 分子種と PCB 異性体を *in vitro* 系で反応させ、生成される水酸化 PCB を測定し、*in silico* 解析によるシミュレーションの結果と統合することで代謝経路の予測を試みる。まず、油症患者で特徴的に低い蓄積パターンを示す PeCB118 に着目し、その代謝経路と関与する CYP 分子種を明らかにする。

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。