

## 研究課題名

*In silico* 解析によるヒトチトクローム P450 2A6 を介した 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl 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)  
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)  
水川 葉月 (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

2022 年度までの共同研究プロジェクトにおいて示されたヒト薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) 2A6 分子種を介した 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) の代謝産物を特定するため、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) による分析と Molecular Operating Environment (MOE) ソフトウェアによる *in silico* シミュレーション解析を実施した。

1968 年、米ぬか油への polychlorinated biphenyls (PCBs) やダイオキシン類の混入による油症事件が福岡県を含む西日本地域で発生した。現在もこれらの化学物質は油症患者の体内に高濃度に残留していること、また、209 種存在する PCB 異性体のなかでも CB118 が一般人と比較して低く 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (CB156) が高いという特徴的な蓄積パターンを示すことが明らかになっており、油症診断基準の一つとして用いられてきた。さらに、我々は Hirakawa et al. (2018) (*Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 16455-16463) で実施した解析において、一般人と比べて油症患者において代謝または蓄積されやすい PCB 異性体が他にも存在すること、またその特徴について報告した。このような PCB 異性体の蓄積パターンは、PCB やダイオキシン類に曝露した油症患者の体内で CYP 酵素が誘導され、その働きによって一部の PCB 異性体が優先的に代謝されたためと考えられて

いる。しかし、多種存在する CYP 分子種のうち、どの CYP 分子種がどのような代謝産物を生成するのかなど、PCB の代謝経路に関する詳細は明らかになっていない。

2021 年度の LaMer 共同研究において、CB118 とヒト CYP2A6 を *in vitro* 系で反応させ代謝試験を実施した結果、脱塩素反応を伴った 4 塩素化体の水酸化 PCB の生成が確認された。ヒトや動物において検出頻度の高い水酸化 PCB の異性体については合成標準品を準備し、それらを同時に測定することで生成された水酸化 PCB の同定を行っている。しかし、CB118-ヒト CYP2A6 で生成した水酸化 PCB は同時測定した標準品と一致するものは無かった。生成した代謝産物を同定できなかったこと、また *in vitro* 代謝試験の緩衝液条件によって代謝活性が異なることも報告されているため、2022 年度に緩衝液及び NADPH regenerating system を変えて再試験を実施した。その結果、2021 年度と同じ 4 塩素化体の水酸化 PCB が生成され、異なる条件下でも同じ代謝産物が生成される再現性の確認がとれた。この CB118 代謝経路に関しては、これまでに報告されてない事例であることから、本研究の進展により新たな知見が得られる可能性がある。

2023 年度は、新たに入手した水酸化 PCB 標準品 (6-OH-CB77) の測定とフラグメントイオンの解析を行うとともに、CB118-ヒト CYP2A6 の *in silico* シミュレーションのドッキング様式を再解析し算出されたパラメーターから代謝産物の構造解明を試みた。

## 研究内容

### 【6-OH-CB77 と未同定水酸化 PCB 異性体のクロマトグラムの比較】

これまでに、太田ら(2005) (福岡医誌、96、232-240) が実施したモルモット肝ミクロゾームを用いた CB118 の *in vitro* 代謝試験においても塩素が 1 つ脱離した 4 塩素代謝産物の生成が報告されている。また、この報告ではフラグメントイオンの情報から、*ortho*-位への水酸基の置換が推測されていたが、代謝産物の特定はできていなかった。我々の共同研究でも未同定の CB118 代謝産物が確認されたことから、上記研究を含めた PCB 代謝研究を先駆的に実施されている中村学園大学の古賀名誉教授と太田准教授のもとに相談に伺い、CB118 の代謝に関

する助言をいただいた。

2023年度の共同研究では、CB118代謝産物の候補物質である6-OH-CB77の標準品を新たに入手し、トリメチルシリルジアゾメタンを用いて6-OH-CB77を6-CH<sub>3</sub>O-CB77に誘導体化した後、化学汚染・毒性解析部門水川准教授のもとでHRGC-HRMSにより測定した。また、2022年度に処理したCB118-ヒトCYP2A6 *in vitro* 代謝試験の反応液を同時に測定し、クロマトグラムを比較した。

### 【CB118-CYP2A6 *in silico* シミュレーションの再解析】

CB118-CYP2A6 *in vitro* 代謝試験で生成された未同定の水酸化PCB異性体の構造を推定するため、CB118-CYP2A6 *in silico* シミュレーションから得られたドッキング様式を再解析し、基質結合ポケット内のCB118とCYPのアミノ酸の相互作用についてPLIF (Protein Ligand Interaction Fingerprints) を計算して新たな情報の獲得を試みた。

### 研究成果

今回新たに入手した標準品6-OH-CB77およびCB118-CYP2A6 *in vitro* 代謝産物のクロマトグラムをFig. 1に示す。標準品と未同定のCB118-CYP2A6

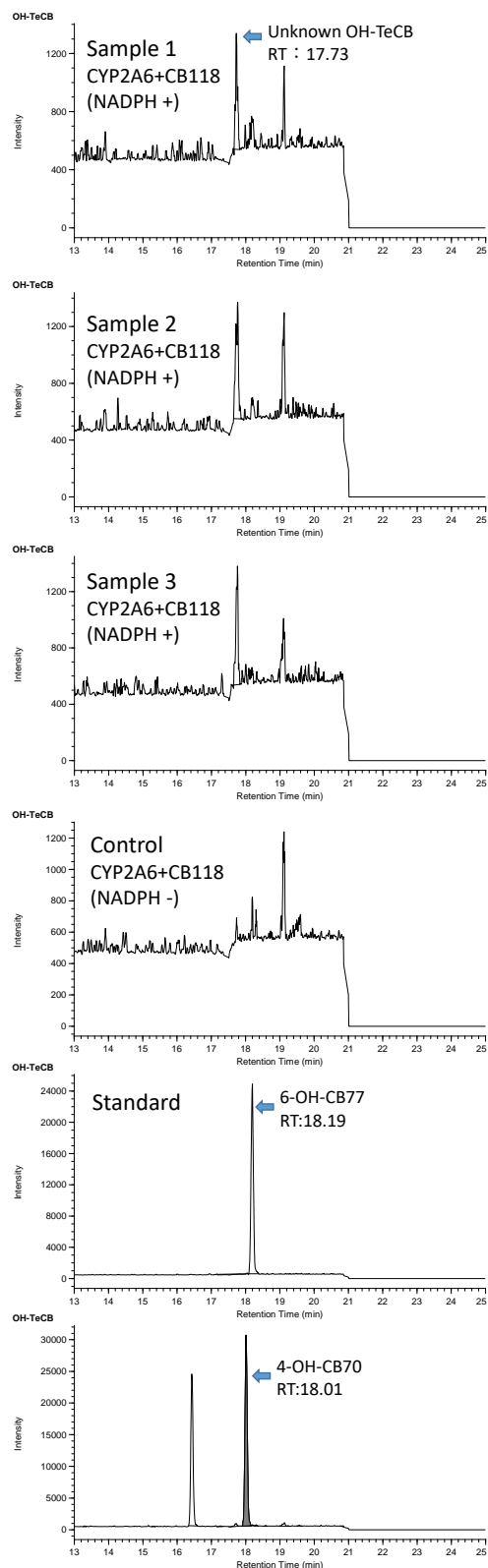


Fig. 1 Chromatogram of hydroxylated tetraCB metabolites of CB118 by human CYP2A6

*in vitro* 代謝産物はリテンションタイムが一致せず、6-OH-CB77 とは異なる物質であることがわかった。今後、愛媛大学水川准教授もとでフラグメントイオンの測定を実施し、水酸基が付加されている位置について情報獲得を試みる。

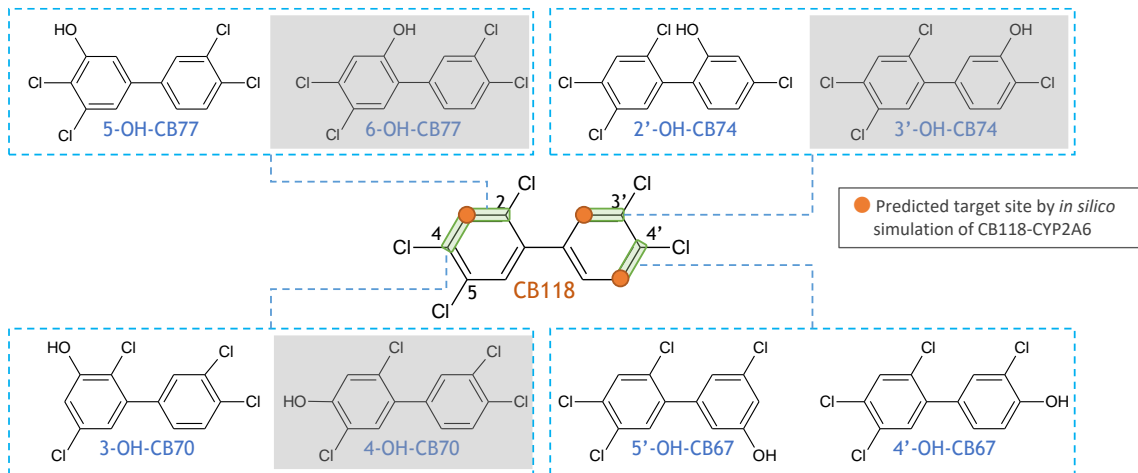


Fig. 2 Metabolic target sites of CB118 predicted from CB118-CYP2A6 in silico simulations and possible hydroxylated tetraCB isomers that may be produced (grey: confirmed not to match standard).

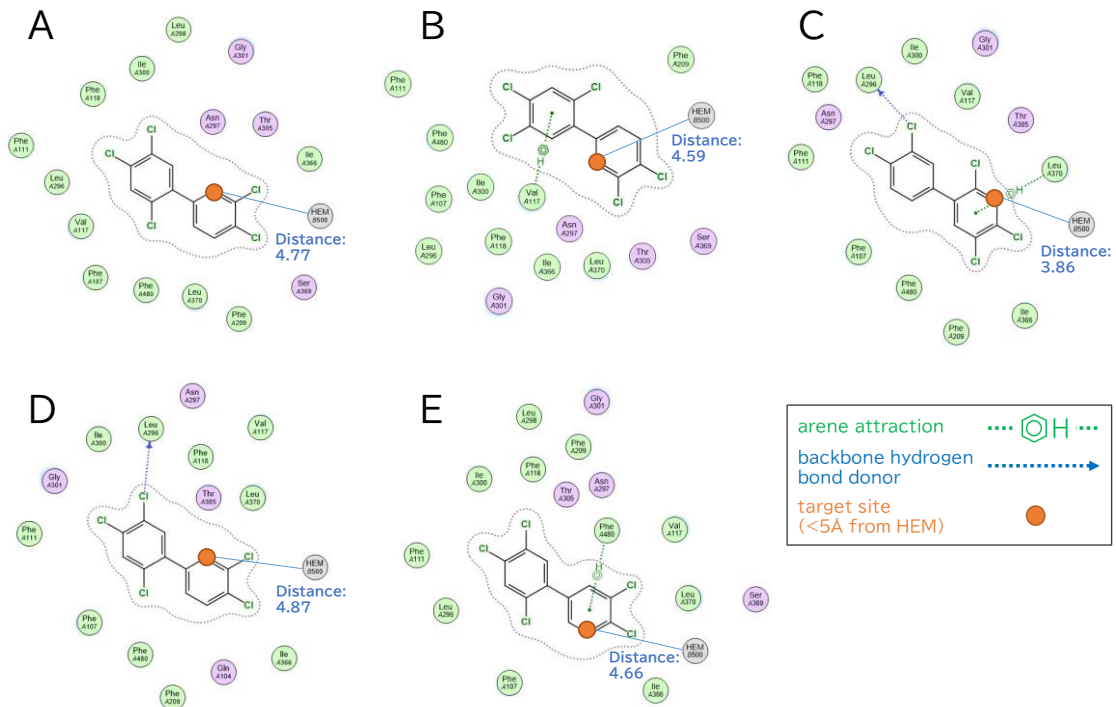


Fig. 3 Two-dimensional view of PLIF in the CB118-CYP2A6 docking pattern (A: no interaction, B: arene attraction, C: arene attraction and backbone hydrogen bond donor, D: backbone hydrogen bond donor, E: arene attraction)

CB118-CYP2A6 *in silico* シミュレーションのドッキング様式から予測された代謝標的部位の情報に基づき、脱塩素反応を介して生成される可能性がある 4 塩素化体の水酸化 PCB 異性体 (8 種類) を Fig. 2 に示した。本年度までに、入手・測定できた標準品 3 異性体 (6-OH-CB77、3'-OH-CB74、4-OH-CB70) ではないことが明らかとなった。

また、MOE ソフトウェアを用いて CB118-CYP2A6 のドッキング様式を *in silico* シミュレーションの PLIF (Protein Ligand Interaction Fingerprints) によって推定した。これまでの共同研究により、ヘム鉄と代謝標的部位の距離が 5Å 未満となり代謝の可能性が示唆された 5 パターンのドッキング様式のうち 4 パターンにおいて CYP2A6 アミノ酸と基質 CB118 の相互作用が認められた (Fig. 3)。その種類は、アレーン接触 (arene attraction) または主鎖水素結合のドナー (backbone hydrogen bond donor) の 2 つであった。相互作用を示したアミノ酸の働きについては、情報収集と解析を進める。

## 今後の課題

今後、未同定の水酸化 PCB 異性体のフラグメントイオン分析による水酸基置換部位の特定を行うとともに PLIF から得られた相互作用について解析を進め、CB118 代謝産物の絞り込みを行う。

CB118 は一般人に比べて油症患者における優先的な代謝が考えられている特徴的な異性体である。そのため、その代謝経路に関する知見はヒトにおける PCB 曝露後の体内挙動の把握において極めて重要である。一連の研究を通して、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。