

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340027

研究課題名(和文) 環境汚染物質アルキルベンゼンスルホン酸の細胞性免疫に対する影響の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study on the cellular immunity of alkylbenzene sulfonate as an environmental pollutant

研究代表者

田中 進 (TANAKA, Susumu)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：70348142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性免疫に関与するカルシニューリン(CN)の阻害物質として、アクリロニトリルブタジエンゴム中から同定した直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)は、環境汚染物質として知られている。LASアナログを用いてCN活性阻害に関する詳細な検討を行ったところ、アルキル鎖の長さに依存して阻害作用は強くなり、陰イオン界面活性剤はLASによるCN阻害を回復させた。またLASは、非競合阻害によりCNを阻害することが示された。Jurkat細胞を使用して、ConA誘導性のIL-2を指標にLASの細胞性免疫に対する影響について検討したところ、LASは転写調節因子NFATを介してIL-2産生を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：We identified that linear alkylbenzene sulfonate (LAS) from acrylonitrile butadiene rubber, recognized as an environmental pollutant, is an inhibitor of calcineurin (CN)-related activity involved in cellular immunity. Studies on inhibition of CN activity using LAS analogues revealed that the inhibitory effect of LAS increased depending on the length of the alkyl chain and the anionic surfactant restored CN inhibition by LAS. Using a double-reciprocal plot, C12-LAS was determined to have noncompetitive inhibitory effects. Subsequently, we assessed the cellular immunity role of LAS by examining the effects of LAS on interleukin-2 (IL-2) produced by Jurkat cells. It was revealed that ConA-induced IL-2 produced by Jurkat cells was suppressed by LAS via the transcription factor NFAT.

研究分野：生化学

キーワード：カルシニューリン アルキルベンゼンスルホン酸 インターロイキン-2

1. 研究開始当初の背景

ホスホプロテインホスファターゼの一つであるカルシニューリン(CN)は、PP2Bとしても知られるカルシウム(Ca²⁺)/カルモジュリン(CaM)依存性セリン・トレオニンホスファターゼであり、CNは下等・高等生物を問わず真核生物が示す多くの生命機能において重要な役割を果たしている。特にヒトでは臓器移植の際の拒絶反応の抑制に参与する酵素であることから、免疫抑制剤の標的酵素となっている。

我々は、*in vitro*においてCN活性に対する各種因子の効果を検討している過程で、日常で流通・使用されているプラスチック・ゴム製品からCN阻害物質が溶出することを見出し、阻害物質の単離を試みたところ、アクリロニトリルブタジエンゴム(NBR)中に強いCN活性を阻害する物質が複数存在することを見出した。これらの物質の一部の構造解析を行ったところ、直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)(図1)の同族異性体であるウンデシルベンゼンスルホン酸及びドデシルベンゼンスルホン酸であることが明らかとなった。LASは、化学物質の中でも私たちの生活に密接に関係している陰イオン界面活性剤であり、家庭用の合成洗剤としてだけでなく、分散、可溶化、乳化重合剤などとして食品から医療など様々な分野で使用されており、その生産量は年間10万トン以上と推察されている。また一方で、LASはその生産量の多さとその毒性から、PRTR(環境汚染物質排出移動登録)法第一種指定化学物質に指定されており、環境への排出量や移動量には厳格な管理が義務付けられている。

更に、我々は、LAS標準品ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(C₁₂-LAS)を用いてラット脳CN活性に対する阻害解析を行い、50%阻害濃度(IC₅₀)を求めたところ、13.5 μMと非常に低濃度で強い阻害作用を示すことを明らかにした。また、海老由来、大腸菌由来およびウシ小腸由来のアルカリホスファターゼに対しては15 μMの濃度でも阻害効果を認めなかった。CNは、免疫系ではT細胞が産生するインターロイキン-2(IL-2)産生に参与していることから、先述したように免疫抑制剤の標的酵素となっており、細胞性免疫に強く関わる酵素として知られている。従ってこれらのことは、環境汚

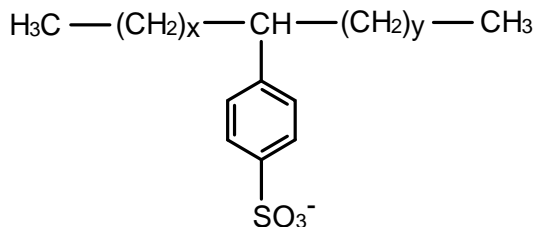


図1. 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)
X+Yは7以上11以下で、且つXは0以上で、Yは11以下である。

染物質であるLASがヒトの免疫系に大きな影響を与える可能性を示唆する。

2. 研究の目的

(1) CN阻害物質のスクリーニング範囲を食品用容器や医療材料まで広げて検討を行う。

(2) 市販標準品のLAS(デシルベンゼンスルホン酸:C₁₀-LAS、ウンデシルベンゼンスルホン酸:C₁₁-LAS、C₁₂-LAS、トリデシルベンゼンスルホン酸:C₁₃-LAS、テトラデシルベンゼンスルホン酸:C₁₄-LAS)を使用してアルキル基の長さに対するCN活性の影響を調べ、また、C₁₂-LASを用いて、キネティクス解析を行い、CN活性に対するLASの阻害様式を検討する。さらに同様に市販標準品のC₁₂-LASを用いて、CN活性阻害における陰イオン界面活性剤の影響を検討する。

(3) 直鎖型である4-ドデシルベンゼンスルホン酸(4-C₁₂-LAS)、4-テトラデシルベンゼンスルホン酸(4-C₁₄-LAS)、4-ヘキサデシルベンゼンスルホン酸(4-C₁₆-LAS)、4-オクタデシルベンゼンスルホン酸(4-C₁₈-LAS)の純物質を新たに化学合成し、CN活性に対する影響を検討する。

(4) ヒトT細胞株Jurkat細胞を使用して、コンカナバリンA(ConA)誘導性のIL-2を指標としたLASの細胞性免疫に対する影響を細胞レベルで検討する。またその作用機序について転写調節因子の解析を中心に行う。

3. 研究の方法

(1) CN活性の測定方法

CNはホスホプロテインホスファターゼ2Bとして知られているので、測定法は、人工基質として無色のパラニトロフェニルリン酸(pNPP)を使用し、目的のLAS等を加えた酵素反応系(HEPES-NaOH(pH7.5)、CaM、Ca²⁺、Ni²⁺、pNPP)にウシ脳から精製されたCNを加え、37℃、1時間の反応を行った。酵素反応の結果、生成した黄色のパラニトロフェノールをA₄₁₀で比色定量することにより、酵素活性を求めた。

(2) CNに対するC₁₂-LASのキネティクス解析

市販標準品のC₁₂-LASの濃度を0 μM、10 μM、15 μMの3点で固定し、様々な濃度の基質pNPPを用いてCN活性を測定した。阻害様式は、基質濃度[pNPP]を変化させた時に得られた速度V₀(formed pNP nmol/min)と基質濃度[pNPP]の両逆数プロット解析から決定した。

(3) Jurkat細胞のIL-2産生を指標としたLASの細胞性免疫に対する影響解析

Jurkat細胞はConAやイオノマイシン(IM)+ホルボールエステル(PMA)刺激な

どにより、細胞性免疫に關与するサイトカインの一つである IL-2 を産生することが知られている。従って細胞が産生する ConA 誘導性の IL-2 を指標に市販標準品の C₁₂-LAS の細胞性免疫に対する影響解析を ELISA 法で行った。また、T 細胞における IL-2 mRNA の発現は、CN 系を介した nuclear factor of activated T-cell (NFAT) と IκB kinase (IKK) 系を介した nuclear factor kappa B (NF-κB) および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を介した activator protein-1 (AP-1) の 3 つの転写調節因子によって制御されており、CN はリン酸化 NFAT の脱リン酸化反応を触媒することにより、NFAT を核内に移行させることが知られている。従って C₁₂-LAS の ConA 誘導性の IL-2 抑制に対する作用機序を検討するため、目的の細胞から核タンパク質を抽出し、ELISA 法を使用して NFAT の転写活性を検討した。

4. 研究成果

(1) 合成ポリマー製品中からの CN 活性阻害物質のスクリーニング

食品用容器やフタ、プラスチック製のスプーン及び医療材料として注射筒、分離パック袋などを試料として、それぞれの製品のエタノール抽出物について、CN 活性阻害物質のスクリーニングを行ったところ、A 社のシリンジ先端ゴムのエタノール抽出物が CN 活性を低下させることが示唆された。

(2) CN 活性に対する LAS の阻害作用

CN 活性に対する LAS のアルキル鎖の長さに対する影響

市販標準品の C₁₀-LAS、C₁₁-LAS、C₁₂-LAS、C₁₃-LAS、C₁₄-LAS を使用してアルキル側鎖の長さに対する CN 活性の影響を検討したところ、アルキル鎖の長さにより阻害作用が大きくなる傾向を示した。

C₁₂-LAS を用いたキネティクス解析

CN に対する LAS の阻害様式を検討するため、市販標準品の C₁₂-LAS を用いて、キネティクス解析を行った。その結果、C₁₂-LAS は非競合阻害により CN を阻害することが明らかとなった。

C₁₂-LAS の CN 活性阻害における陰イオン界面活性剤の影響

市販標準品の C₁₂-LAS の CN 活性阻害に対する陰イオン界面活性剤 (NP-40、Brij35、Tween20) の影響を検討したところ、これらの界面活性剤では C₁₂-LAS により活性が阻害された CN を回復させる効果があることが判明した。

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸の CN 活性に対する影響

市販標準品の LAS はアルキル鎖上のフェニル基の置換位置の異なる異性体の混合物

であったことから、直鎖型のアルキルベンゼンスルホン酸 (4-C₁₂-LAS、4-C₁₄-LAS、4-C₁₆-LAS、4-C₁₈-LAS) を新たに化学合成し、CN に対する影響を検討した。その結果、アルキル鎖の炭素数が長いほど CN 活性への阻害作用が大きいことが明らかとなった。

(3) Jurkat 細胞の IL-2 産生を指標とした LAS の細胞性免疫に対する影響解析

Jurkat 細胞を使用して、市販標準品の C₁₂-LAS の毒性作用を最初に検討したところ、200μM 前後の濃度で毒性作用が見られた。また、100μM の濃度の C₁₂-LAS を用いて細胞内に取り込まれた C₁₂-LAS を LC/MS で解析したところ、細胞の培養時間に依存して取込量が上昇した。さらに細胞が産生する ConA 誘導性の IL-2 に対する C₁₂-LAS の影響を検討したところ、毒性のない濃度で IL-2 産生の低下を認めた (図 2) 従って、C₁₂-LAS は細胞性免疫に影響を与えることが細胞レベルで示された。

次に、その作用機序を検討するため、IL-2 mRNA 発現に關与する転写調節因子 NFAT の転写活性を ELISA 法で調べたところ、C₁₂-LAS により有意に NFAT が低下することが明らかとなった (図 3)。

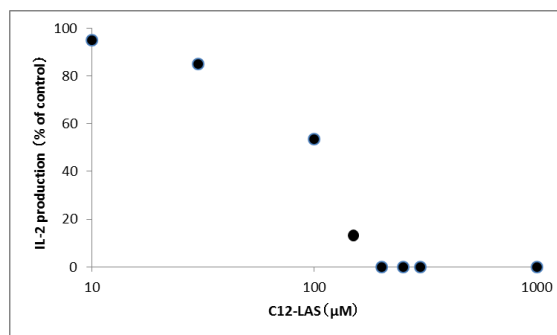


図 2. C₁₂-LAS による Jurkat 細胞の IL-2 産生の抑制

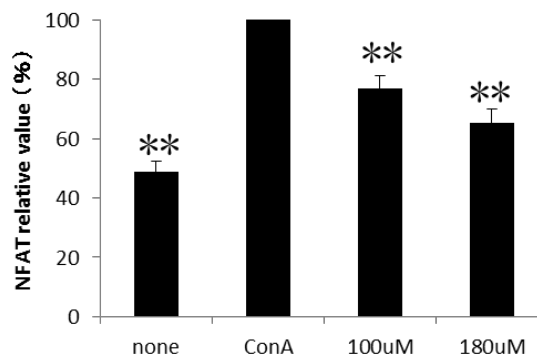


図 3. C₁₂-LAS は転写調節因子 NFAT の転写活性を抑制する。 (**p<0.01)

<引用文献>

Ito N, Shibuguchi N, Ishikawa R, Tanaka S, Tokita Y, Nakajima-Shimada J, and Hosaka K : Identification of alkylbenzene sulfonate surfactants leaching from an

acrylonitrile butadiene rubber as novel inhibitors of calcineurin activity. Biosci Biotechnol Biochem **77(5)**:954-960, 2013

伊藤 昇、時田佳治、保坂公平、嶋田淳子、高橋千由紀、田中 進：アルキルベンゼンスルホン酸のラット脳カルシニューリン活性への阻害作用に関する研究. Kitakanto Med J **64(1)**: 23-29, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

伊藤 昇、中島 徹、菅井貴裕、山際教之、嶋田淳子、保坂公平、田中 進：アルキルベンゼンスルホン酸によるプロテインホスファターゼ 1 活性への阻害作用の研究. Kitakanto Med J **65(1)**: 53-59, 2015

〔学会発表〕(計3件)

田中 進、島田沙織、神谷 明、中島 徹、秋山珠璃、伊藤 昇、山際教之、保坂公平：マイトジェン刺激した Jurkat T 細胞のサイトカイン産生に対するアルキルベンゼンスルホン酸の効果. 2014 年 10 月 日本生化学会、国立京都国際会館、京都

田中 進、伊藤 昇、菅井貴裕、中島 徹、秋山珠璃、山際教之、嶋田(中島)淳子、保坂公平：直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸のプロテインホスファターゼ活性に対する影響. 2015 年 12 月 日本生化学会、神戸ポートアイランド、神戸

秋山珠璃、中島 徹、山際教之、保坂公平、田中 進：直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸のウシ脳カルシニューリン活性に対する影響. 2016 年 9 月 日本生化学会、東北大学、仙台

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 進 (TANAKA, Susumu)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授
研究者番号：70348142

(2)研究分担者

山際教之 (YAMAGIWA, Noriyuki)
高崎健康福祉大学・薬学部・教授
研究者番号：70433638

保坂公平 (HOSAKA, Kohei)
高崎健康福祉大学・大学院健康福祉学研究科・講師
研究者番号：70108992