



[原著]

カルシニューリン活性に対する市販のスルホン酸型陰イオン界面活性剤の影響

田中 進¹⁾、秋山琉璃²⁾

1) 高崎健康福祉大学 健康福祉学部 健康栄養学科

2) 東都大学 管理栄養学部 管理栄養学科

要旨

カルシニューリン (CN) は、カルシウムイオン／カルモジュリン依存性のタンパク質脱リン酸化酵素であり、免疫細胞をはじめとする多くの細胞において、カルシウムシグナルを転写制御に結びつける中心的な役割を果たす。特に免疫系では、リン酸化型 nuclear factor of activated T-cells (NFAT) を脱リン酸化し、サイトカイン遺伝子の発現誘導を介して細胞性免疫応答を制御する。また本酵素は、免疫抑制剤であるシクロスポリン A やタクロリムスの標的酵素でもあるため、臨床的にも注目されている。我々はこれまでに、陰イオン界面活性剤の一種である直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸標準品 (C₁₂-LAS) が、ウシ脳由来 CN (bCN)、ラット脳由来 CN (rCN)、および大腸菌由来リコンビナントヒト CN (rhCN) のホスファターゼ活性を阻害することを報告してきた。本研究では、日常的に使用されている市販の 5 種類のスルホン酸型陰イオン界面活性剤について、rhCN および bCN に及ぼす影響を比較検討した。その結果、いずれの界面活性剤も両 CN の活性を阻害することが明らかとなり、50 % 阻害濃度 (IC₅₀) 値には化合物ごとに大きな差異が認められた。また、由来の異なる rhCN と bCN の各化合物の IC₅₀ 値の間には正の相関が確認された。以上より、本研究で使用した市販スルホン酸型陰イオン界面活性剤は CN 活性を阻害することが示された。

キーワード：カルシニューリン、陰イオン界面活性剤、タンパク質脱リン酸化酵素

序論

カルシニューリン (CN) は、別名プロテインホスファターゼ 2B (PP2B) ともいわれ、カルシウムイオン (Ca²⁺) およびカルモジュリン (CaM) に依存して活性化されるセリン／トレオニンホスファターゼの一種である (1)。CN は真核生物に広く保存されており、下等生物から高等動物に至るまで、さまざまな細胞機能の制御において重要な役割を果たしている。特に免疫

系においては、T 細胞内に存在する転写調節因子リン酸化型 nuclear factor of activated T-cells (NFAT) の脱リン酸化を触媒し、その核内移行を促進することで、インターロイキン-2 (IL-2) やインターフェロン-γ (IFN-γ) といったサイトカインの mRNA 発現を誘導する (2)。この過程を通じて、細胞性免疫応答が活性化されることが知られている。さらに、臓器移植に伴う拒絶反応を抑制する目的で臨床使用

田中 進

〒370-0033 高崎市中大類町 37-1
高崎健康福祉大学健康福祉学部

e-mail: tanaka@takasaki-u.ac.jp

2025 年 7 月 10 日受付
2025 年 9 月 17 日受理

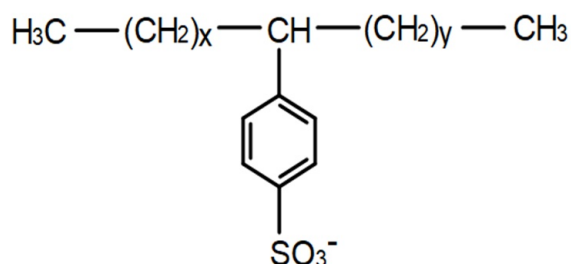


図 1 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)
X + Y は 7 以上 11 以下で、且つ X は 0 以上で、
Y は 11 以下である。

されている免疫抑制剤、シクロスポリン A やタクロリムス (FK506) は、それぞれシクロフィリンや FK506 結合タンパク質といったイムノフィリンと呼ばれる結合タンパク質を介して CN の活性を間接的に阻害する。これによりリン酸化型 NFAT の脱リン酸化が阻害され、T 細胞の活性化が抑制されることから、CN は免疫抑制剤の標的酵素となっている (3)。

一方、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) は陰イオン界面活性剤の一種であり、一般的に炭素数 10 から 14 のアルキル基に *p*-スルホフェニル基が結合した構造をしている (図 1)。LAS は、主に家庭用合成洗剤として日常的に利用されており、また、分散、可溶化、乳化重合剤などとして、食品から医療・工業など様々な分野で使用されている (4)。先行研究において、我々は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した LAS 標準品 (直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸: C₁₂-LAS) が bCN、rCN、rhCN のホスファターゼ活性をそれぞれ阻害することを明らかにしてきた (4-6)。本研究では、陰イオン界面活性剤の中でも、重合乳化剤、工業用洗浄剤、汎用湿潤浸透剤として市販され、日常的に使用されている 5 種類のスルホン酸型界面活性剤 (ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、アルキルジフェニルエーテルスルホン酸ナトリウム、アルカンスルホン酸ナトリウム、ジアルキルスルホコハク酸

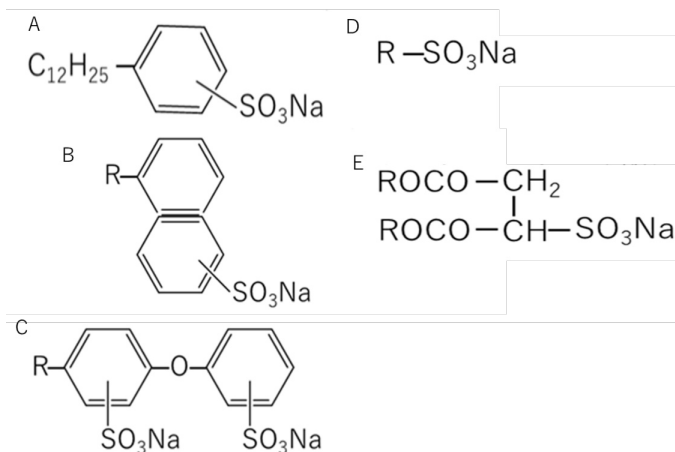


図 2 本研究で使用了スルホン酸型陰イオン界面活性剤

A:ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム
B:アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム
C:アルキルジフェニルエーテルスルホン酸ナトリウム
D:アルカンスルホン酸ナトリウム
E:ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム

ナトリウム) (図 2) を用い、rhCN および bCN に及ぼす影響について検討したので報告する。

材料と方法

(1) 試料

ウシ脳由来の CaM、bCN は Sigma 社 (St. Louis, USA) より購入した。塩化カルシウム (CaCl₂)、塩化ニッケル (NiCl₂)、塩化マグネシウム (MgCl₂)、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃)、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP)、パラニトロフェノール (pNP) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。HEPES (pH 7.5) は Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany)、Tris-HCl (pH 7.5) は株式会社ニッポンジーン (富山) よりそれぞれ購入した。rhCN 測定には、Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA) のホスファターゼアッセイキットを使用した。

市販品であるスルホン酸型陰イオン界面活性剤 (ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、アルキルジフェニルエーテルスルホン酸ナトリウム、アルカンスルホン酸ナトリウム、ジアルキルスルホコハク酸

ナトリウム) (図 2) は、ある企業 (A 社) より供与された製品を使用した。主に、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウムは、乳化重合用乳化剤、湿潤浸透剤、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウムは乳化重合用乳化剤、アルカンスルホン酸ナトリウムはポリ塩化ビニル (PVC)、ポリ塩化ビニリデン (PVDC) の重合乳化剤、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムは工業用洗浄剤、汎用湿潤浸透剤、乳化重合用乳化剤、洗剤配合基剤などとして様々な用途で使用されている。本実験では、市販品の有効成分 (%) から滅菌水を用いて濃度 (ppm) を調製し、CN への阻害作用の検討に使用した。

(2) rhCN のホスファターゼ活性の測定

rhCN の活性測定は、既報 (7-9) およびホスファターゼアッセイキットのプロトコルに基づいて実施した。まず、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、0.5 mM CaCl_2 、6 mM MgCl_2 、0.5 mM DTT、0.025 % NP-40 を含む酵素反応用バッファを調製し、これに 8 U/ μL の rhCN および 0.25 μM の CaM を加えて標準反応系とした。各スルホン酸型界面活性剤を任意濃度で添加し、基質として 150 μM の RII リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu) を加えた。反応は 30°C で 60 分間行い、その後、反応液に対して等量のマラカイトグリーン試薬を加えた。反応によって生成したリン酸を波長 620 nm (A_{620}) で測定し、酵素活性を評価した。活性の算出には、 A_{620} とリン酸濃度との検量線を用いた。

(3) bCN のホスファターゼ活性の測定

bCN のホスファターゼ活性は、Takahashi らの報告 (10) に準拠して測定した。反応液には、最終濃度で 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、0.2 mM NiCl_2 、1 mM CaCl_2 、5 mM MgCl_2 を調製し、これに 1 U の bCN および 2.5 U の CaM を添加して標準反応系とした。この反応系に、任意濃度の各スルホン酸型界面活性剤および 3 mM の pNPP (基質) を加え、37°C

で 60 分間インキュベーションを行った。反応後、最終濃度 0.8 M の Na_2CO_3 を加えることで反応を停止させた。反応によって生成した pNP の吸光度を波長 410 nm (A_{410}) で測定し、酵素活性を評価した。pNP の濃度は、 A_{410} と濃度の間に得られた検量線を用いて算出した。

(4) 統計処理

得られた結果は、スルホン酸型界面活性剤非添加のコントロール値を対象に Dunnett 検定 (エクセル統計 Ver.4.08、社会情報サービス: BellCurve for Excel) を用いて解析した。有意水準は $p < 0.05$ または $p < 0.01$ とした。相関係数の 2 乗 (R^2) は、Microsoft Excel for Microsoft 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて求めた。酵素の 50 % 阻害濃度 (IC_{50}) は、GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA) を用いて算出した。

結果

(1) rhCN のホスファターゼ活性

各スルホン酸型界面活性剤の濃度を 2、10、20、30 ppm にそれぞれ調製し、rhCN の測定を行ったところ、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウムは 10 ppm、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルカンスルホン酸ナトリウムは 20 ppm で有意な阻害を認めた (図 3)。従って、本研究で用いた市販のスルホン酸型界面活性剤は rhCN 活性に対して阻害作用があることが示された。 IC_{50} を求めたところ、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 9.9 ppm、アルカンスルホン酸ナトリウム 12.1 ppm、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム 26.4 ppm、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム 143.4 ppm、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム 6.9 ppm であり、同じスルホン酸型陰イオン界面活性剤であっても IC_{50} に違いが見られた。

(2) bCN のホスファターゼ活性

各スルホン酸型界面活性剤の濃度を 1、10、100、1000 ppm にそれぞれ調製し、bCN の測定を行ったところ、アルキルジ

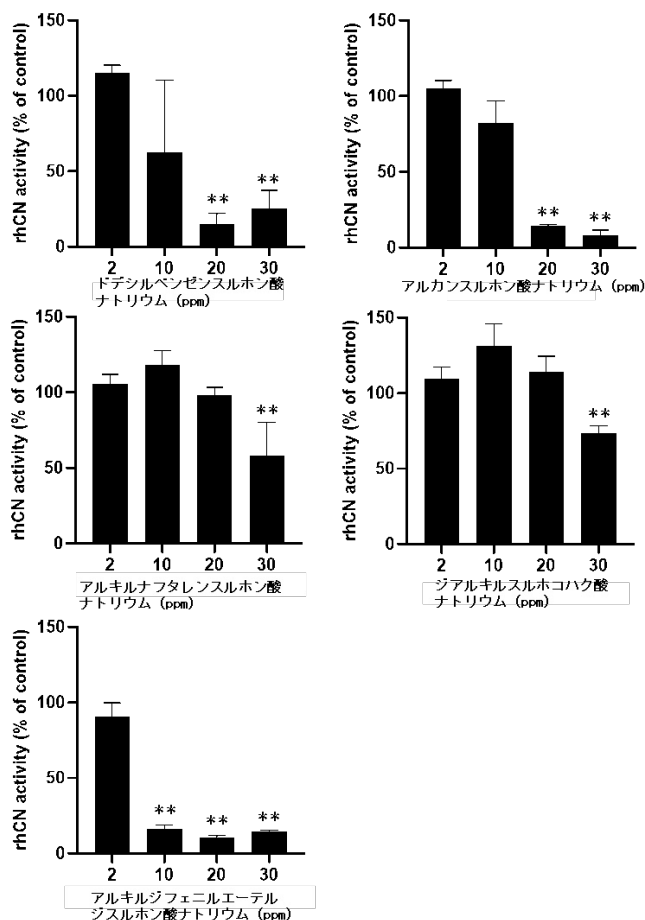


図3 リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 活性に対する各スルホン酸型陰イオン界面活性剤の影響

(スルホン酸型界面活性剤 0 ppm に対して、
** $p < 0.01$)

フェニルエーテルジスルホン酸ナトリウムは 10 ppm、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルカンスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウムは 100 ppm で有意な阻害を認めた (図 4)。従って、本研究で使用した市販のスルホン酸型界面活性剤は、rhCN だけではなく bCN 活性に対してもこれを阻害することが示された。IC₅₀ を求めたところ、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 35.2 ppm、アルカンスルホン酸ナトリウム 87.5 ppm、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム 297.0 ppm、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム 828.0 ppm、アルキルジフェニルエーテルジスルホ

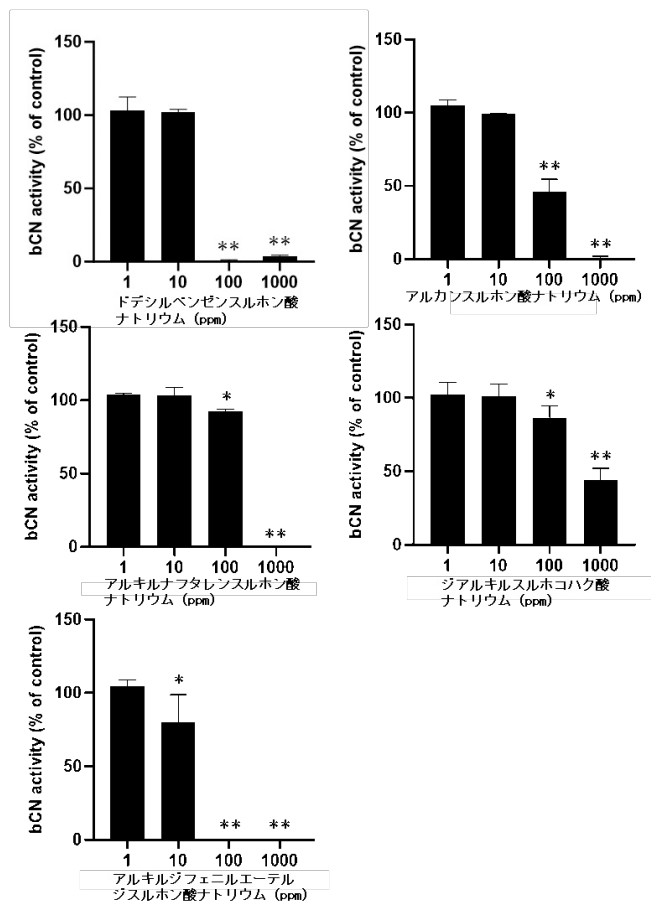


図4 ウシカルシニューリン (bCN) 活性に対する各スルホン酸型陰イオン界面活性剤の影響

(スルホン酸型界面活性剤 0 ppm に対して、
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

ン酸ナトリウム 13.6 ppm であり、rhCN の場合と同様に同じスルホン酸型陰イオン界面活性剤であっても IC₅₀ に違いが見られた。

考察

CN は、神経系や心筋細胞においてカルシウム応答に基づく多様な生理応答を制御しており、CN の機能異常は神経変性、心肥大、アルツハイマー病など多くの病態と関連があることが報告されている (11-13)。また CN は、T 細胞において IL-2 や IFN- γ mRNA の発現を制御する転写調節因子の一つであるリン酸化型 NFAT を脱リン酸化することで各 mRNA の発現を上昇させることから CN-NFAT 系は細胞性免疫を制御している (2)。従って、CN の阻害剤は臓器移植の際に免疫抑制剤として

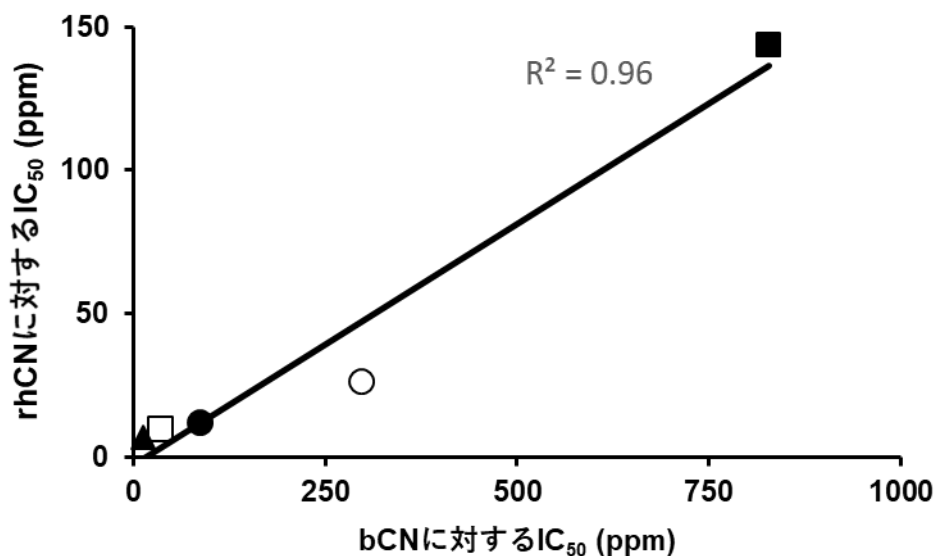


図5 rhCN と bCN に対する各スルホン酸陰イオン界面活性剤の IC_{50} の相関

- ▲ : アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム
- : ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム
- : アルカンスルホン酸ナトリウム
- : アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム
- : ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム

使用される (3)。CN は、触媒サブユニット A (CNA) と調節サブユニット (CNB) とが会合するホロ酵素であり、また CNA には、CaM 結合ドメイン、CNB 結合ドメイン、C 末端自己活性阻害ドメインなどが存在し、鉄イオン (Fe^{2+}) と亜鉛イオン (Zn^{2+}) 2 個の金属イオンを活性中心に内在している (14, 15)。また CNB は、4 つの EF ハンドモチーフにそれぞれ 1 つずつの Ca^{2+} を結合している特徴を持つ。先行研究において、我々は、本酵素を阻害する化合物をスクリーニングする過程において、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の類似体を見出し (4)、富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した LAS 標準品 C_{12} -LAS が bCN、rCN、rhCN のホスファターゼ活性をそれぞれ阻害することを見出した (4-6)。本研究では、市販され、日常的に使用されている陰イオン界面活性剤の中でもスルホン酸型界面活性剤に焦点を絞り、rhCN および bCN に対する影響を検討した。

最初に、rhCN のホスファターゼ活性に対する影響を検討した。その結果、本実験で使用したスルホン酸型界面活性剤 5 種 (図 2) は、いずれも rhCN の活性を阻害

することが確認された。中でもドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムについては、標準品 C_{12} -LAS と同様に製品形態においても阻害が確認されたことは興味深い。また、それぞれの IC_{50} には明確な差異が見られた。続いて bCN についても同様に評価したところ、rhCN と同様にスルホン酸型界面活性剤 5 種 (図 2) には、阻害が認められ、こちらも各 IC_{50} は異なる値を示した。CN の活性は細胞内では Ca^{2+} や CaM、その他の因子により調節されているが、*in vitro* においては Ni^{2+} や Mn^{2+} などの二価金属によって活性化されることが知られている (16)。また、我々の先行研究では、バナジウム化合物が Ni^{2+} で活性化された bCN を段階的に阻害する一方、rhCN にはほとんど影響を及ぼさなかったことを報告している (17-19)。このことから、CN はその由来により阻害剤への応答性が異なる可能性が示唆される。しかしながら本研究では、いずれのスルホン酸型界面活性剤も rhCN および bCN の両方に対して阻害作用を示した。ただし、各 IC_{50} を比較した結果、rhCN の方が bCN よりも低い濃度で阻害される傾向が見られた。そこで、各スルホン酸型界面活性剤に対す

る rhCN および bCN の IC_{50} の相関を調べたところ、両者の間には良好な正の相関が確認された (図 5)。このことから、由来の異なる CN に対しても、各スルホン酸型界面活性剤が示す阻害の相対的な強さは共通であることが明らかとなった。ただし、各界面活性剤に対する rhCN と bCN の IC_{50} 値が異なる理由としては、アッセイ条件の差異も影響している可能性が考えられる。本研究で用いた rhCN と bCN の測定系では、基質の構造、基質濃度、金属イオンによる活性化条件等が異なるため、阻害剤の感受性に差が生じた可能性が考えられる。

本研究では、市販のスルホン酸型陰イオン界面活性剤の製品を用い、製品表示の有効成分に基づき濃度 (ppm) を調製し、それぞれの製品形態として CN の酵素活性に対する阻害作用を評価した。その結果、市販品において rhCN および bCN のいずれに対しても阻害が確認された。しかしながら、本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、実験に使用した界面活性剤はいずれも実際に市販され日常的に使用されている製品であり、試薬としての純品ではなかった。そのため、入手できた情報は純度に限られ、アルキル鎖の炭素数の分布や有効成分以外の物質に関する情報は明らかではなかった。このため、ppm で得られた濃度を正確にモル濃度へ換算することが困難であり、モル濃度に基づく詳細な議論を本論文では行うことができなかった。第二に、先行研究 (4-6) においてアルキル基の炭素数と CN 阻害活性との関連が示されているにも関わらず、本研究で使用した市販品では鎖長情報が不明であるため、阻害活性との関連は不明であった。今後は純度や構造情報が明確な試薬を用いることで、モル濃度に基づいた評価やアルキル鎖長との関連解析を行うことが必要であると考えられる。

引用文献

- (1) Shi Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell*. 2009, 139, p.468-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>.
- (2) Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca^{2+} , calcineurin, and NF-AT. *Cell*. 1999, 96, p.611-614. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80571-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80571-1).
- (3) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991, 66, p.807-815. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90124-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90124-H).
- (4) Ito N, Shibuguchi N, Ishikawa R, Tanaka S, Tokita Y, Nakajima-Shimada J, Hosaka K. Identification of alkylbenzene sulfonate surfactants leaching from an acrylonitrile butadiene rubber as novel inhibitors of calcineurin activity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013, 77, p.954-960. <https://doi.org/10.1271/bbb.120902>.
- (5) 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による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. *北関東医学*. 2014, 64, p. 23-29. <https://doi.org/10.2974/kmj.64.23>.
- (6) 秋山珠璃, 曾根保子, 田中 進. ヒトカルシニューリン活性に対する直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の影響. *日本家政学会 第 74 回大会 研究発表要旨集*. 2022, 64 p. https://doi.org/10.11428/kasei.74.0_1.
- (7) 秋山珠璃, 田中佑季, 田中 進. 希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響. *微量栄養素研究*. 2018, 35, p.78-82. https://doi.org/10.51029/jtnrs.35.0_78.
- (8) 秋山珠璃, 田中佑季, 田中 進. クロムのカルシニューリン活性に対する影

- 響. 微量栄養素研究. 2019, 36, p. 35-38. 2019 https://doi.org/10.51029/jtnrs.36.0_35.
- (9) 秋山琉璃, 片山 豪, 田中 進. アルミニウムイオンのカルシニューリン活性に対する影響. 微量栄養素研究. 2020, 37, p.28-32, https://doi.org/10.51029/jtnrs.37.0_28.
- (10) Takahashi K, Akaishi E, Abe Y, Ishikawa R, Tanaka S, Hosaka K, Kubohara Y. Zinc inhibits calcineurin activity *in vitro* by competing with nickel. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 307, p.64-68. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01122-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01122-7).
- (11) Molkenstein JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. Cardiovasc Res. 2004, 63 ,p.467-475. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.021>.
- (12) Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic Neurodegeneration. J Biol Chem. 2004, 279, p.4929-4940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309767200>.
- (13) Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer' s disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin), J Neurochem. 1994, 62, p.803-806. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62020803.x>.
- (14) Hemenway CS, Heitman J. Calcineurin: structure, function, and inhibition. Cell Biochem Biophys. 1999, 30, p.115-151. doi: 10.1007/BF02737887.
- (15) Yu L, Golbeck J, Yao J, Rusnak F. Spectroscopic and enzymatic characterization of the active site dinuclear metal center of calcineurin: implications for a mechanistic role. Biochemistry. 1997, 36, p.10727-10734. doi: 10.1021/bi970519g.
- (16) Pallen CJ, Wang JH. Stoichiometry and dynamic interactions of metal ion activators with calcineurin phosphatase. J Biol Chem. 1986, 261, p.16115-16120.
- (17) 田中進, 大塚恵美子, 高橋克典, 増田泰紀, 本間千裕, 宮澤紀子, 保坂公平. ニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの効果. 医学と生物学. 2008, 152, p.88-93.
- (18) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中進. ニッケル刺激したカルシニューリン活性におけるバナジウム阻害のキネティック解析. 微量栄養素研究. 2008, 25, p.122-124. https://doi.org/10.51029/jtnrs.25.0_122.
- (19) 田中進, 田中佑季, 伊藤昇, 保坂公平. リコンビナントヒトカルシニューリン活性に対する金属イオンの効果. 医学と生物学. 2011, 155, p.483-488.

Effects of commercially available sulfonate-type anionic surfactants on calcineurin activity

Susumu Tanaka ¹⁾, Shuri Akiyama ²⁾

1) Department of Nutrition, Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare

2) Department of Nutritional Sciences, Faculty of Nutritional Sciences, Tohto University

Summary

Calcineurin (CN) is a calcium ion/calmodulin-dependent protein phosphatase that plays an important role in many cellular functions. In the immune system, CN dephosphorylates the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT), which regulates cellular immune responses by inducing the expression of cytokine genes such as IL-2 and IFN- γ . CN is also the target enzyme of the immunosuppressant drugs cyclosporine A and tacrolimus. We previously reported that linear dodecylbenzene sulfonic acid standard (C₁₂-LAS), an anionic surfactant, inhibits the phosphatase activity of bovine brain CN (bCN), rat brain CN (rCN), and recombinant human CN (rhCN) expressed in *Escherichia coli*.

In this study, we examined the effects of five commercially available sulfonate-type anionic surfactants, commonly used in daily life, on rhCN and bCN. The results revealed that all surfactants inhibited the activity of both CNs, and the IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) values varied considerably among the compounds. Furthermore, a positive correlation was observed between the IC₅₀ values toward rhCN and bCN. These findings indicate that sulfonate-type anionic surfactants used in this study can inhibit CN activity.

Keywords: calcineurin, anionic surfactant, protein phosphatase