

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

印

Identification of alkylbenzene sulfonate surfactants leaching from an acrylonitrile butadiene rubber as novel inhibitors of calcineurin activity.

(アクリロニトリルブタジエンゴムから浸出したカルシニューリンの新規阻害剤アルキルベンゼンスルホン酸の同定)

プラスチック・ゴム製品は、その利便性により食品から製薬、医療の分野において幅広く利用されている。これらの製品には可塑剤、酸化防止剤など様々な化学物質が使用されており、内分泌攪乱作用や腫瘍の増加等、ヒトへの悪影響が懸念されている。カルシニューリン (CN) は、ホスホプロテインホスファターゼ 2B としても知られるカルシウム (Ca^{2+}) /カルモジュリン (CaM) 依存性セリン・スレオニンホスファターゼの一つであり、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に使用される免疫抑制剤の標的酵素として知られている。また、最近では神経細胞死、心筋肥大の形成、統合失調症の発症関連遺伝子群として CN 系遺伝子が同定され、益々その重要性が高まっている。

本研究では、新たな CN 阻害剤の精製と同定を行うために、先ず日常生活において流通及び使用されているプラスチック・ゴム製品に関して CN 阻害物質が含まれているか否かのスクリーニングを実施した。スクリーニングは、製品のエタノール抽出溶液を用いて、異なる2つの半定量的反応系で評価した。一つは酵素に市販ウシ脳 CN を使い、基質にパラニトロフェニルリン酸 ($p\text{NPP}$) を用いた。もう一つの系では酵素にヒト遺伝子組み換え型 CN 及び合成リン酸化ペプチドを基質とする市販の CN ホスファターゼアッセイキットを用いた。その結果、21 種類の製品の中でアクリロニトリルブタジエンゴム (NBR) を材質とする製品から CN 阻害活性を最も強く示す物質が浸出することを見出した。その後、ラットの部分精製 CN を用いた阻害活性の定量的方法を確立し、阻害物質の精製を行った。先ず 20g の細断した NBR から 930mg のエタノール抽出物を得た。その一部 109mg をケイ酸カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、吸着、溶出など分離諸条件の検討を行った。最終的に 600mg の抽出物を用いてケイ酸カラムクロマトグラフィーにてこの CN 阻害物質を分離したところ、極性の強い成分と極性の弱いマイナーな成分に分かれることが明らかになった。量的に最も多く得られた極性の強い画分 11.7mg を、TLC にて分離精

製を進めたところ、さらに16種類のバンドに分離された。これらの画分で原点に近いRf 0.31付近の極性の強い部分に最も高いCN阻害成分があることを特定した。このCN阻害物質6.2mgの一部2.1mgをさらにHPLCにて単離精製を行ったところ、13成分に分離され、阻害活性も複数のピークに存在した。これらのピークの中で、高いCN阻害活性を示し且つ量的に多く確保することができた3番目(430 μ g)と6番目(240 μ g)のピーク成分につき、質量分析(MS)とNMRによる構造解析を行った結果、直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の同族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が同定された。

LASは合成アニオン界面活性剤として有名である。しかし、他にエマルジョン重合促進剤としてポリマーを合成する時に使用され、製品中に残留する可能性のあることが報告されていた。その事実を踏まえると、LASがNBRから浸出した理由、そして市販LASの成分が側鎖炭素数10~14個の混合物であるため、HPLC精製で複数のピークに分離された理由も説明することができた。そこで、検証の為に、LASの代表的な成分であり、市販されている直鎖型ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品(C₁₂-LAS)を得て、C₁₂-LAS及びその類縁化合物であるベンゼンスルホン酸、オクチルベンゼンスルホン酸、ラウリル硫酸ナトリウムのウシ脳CNへの作用について詳細に解析を行ったところ、C₁₂-LASは20~40 μ Mで強い阻害を示し、そのIC₅₀は9.3 μ Mであり最も強い阻害作用を示した。一方、パラオクチルベンゼンスルホン酸とラウリル硫酸ナトリウムは弱い阻害を示し、ベンゼンスルホン酸は100 μ Mでも全く阻害しなかった。また、類似のホスファターゼ反応を行うエビ、大腸菌及びウシ小腸由来のアルカリホスファターゼを用いて、C₁₂-LASの作用についての解析を行ったところ、100 μ Mの高濃度でも阻害を示さなかった。また、CNと同様にCa²⁺/CaM依存性酵素であるミオシン軽鎖キナーゼに対しては36 μ Mまで全く阻害を示さなかった。以上の結果は、C₁₂-LASがCNに対して強力で選択性のある阻害物質であることを示している。

今回、CNの新たな阻害物質としてLASが同定された。LASは環境汚染物質排出移動登録法(PRTR法)第一種指定化学物質に分類されており、環境中への排出量の管理が厳格に義務付けられているが完全ではない。魚類や藻類など水生生物への毒性は報告されているが、今後は、哺乳動物への影響も詳細に調べる必要があると思われる。

研究経過の概要

氏 名 伊 藤 昇

保坂らは、カルシニューリン (CN) への種々の薬物阻害作用の解析中に候補物質の溶液を保存していたプラスチック容器の蓋の O-リングから阻害物質が浸出していたことに気がついたが、阻害剤の精製と同定には至らなかった。私は、保坂らの研究から CN 阻害物質に興味を持ち、先ず日常環境において流通及び使用されているプラスチックやゴム製品中に CN 阻害物質がどの程度含まれているかのスクリーニングを行ったところ、アクリロニトリルブタジエンゴム (NBR) 中に強い阻害物質が含まれていることを見出した。

次に、NBR 中の阻害物質の精製を試みた。精製には阻害活性の定量的測定法が必要であり、ラットの脳から部分精製した CN を用いるシステムを確立した。CN 阻害物質は学位論文の要旨に記載のとおり精製した。最終段階の HPLC 精製で阻害活性の強い 2 つのピークを分取し、構造を質量分析 (MS) と NMR で解析したところ、直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) の同族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判明した。

何故、アニオン界面活性剤の成分が阻害物質として得られたのか不思議であったが、文献を調べるとポリマー化反応のエマルジョン重合促進剤として汎用的に用いられていること、製品内に残留する可能性のあることがわかった。検証の為、LAS の代表的な成分であり、市販されている直鎖型ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品 (C₁₂-LAS) を得て、ラット脳の部分精製 CN への作用を調べると 20~40 μ M で強い阻害作用が見られた。LAS の類縁化合物としてベンゼンスルホン酸、オクチルベンゼンスルホン酸、ラウリル硫酸ナトリウムの作用とを比較すると C₁₂-LAS の阻害作用が最も強く、その IC₅₀ は 13.5 μ M だった。ラウリル硫酸ナトリウムは高濃度でわずかに阻害したが、それ以外の物質は 100 μ M を超えても阻害しなかった。また、エビ、大腸菌及びウシ小腸由来など種々の生物由来のアルカリホスファターゼに対し、C₁₂-LAS の添加 (10 μ M と 15 μ M) による阻害効果も解析したが、阻害作用は認められなかった。次に、C₁₂-LAS が CaM に作用して CN 活性を阻害していないことを確認するため、同じ CaM 依存性酵素のミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 活性への作用についても解析を行ったところ、C₁₂-LAS は 36 μ M 濃度でも全く影響を及ぼさなかった。さらに、ラット脳 CN を用いて C₁₂-LAS の CN に対する阻害様式を酵素キネティクス解析より求めたところ、非競合阻害を示した。これらの研究成果を修士論文にて発表した。

次に学位論文の執筆を始めたが、精製したラット脳酵素の純度の問題点と、間違いなく CN であると言い切れない弱点があることに気が付いた。直ちに、市販品のウシ脳 CN を購入して、C₁₂-LAS の特異的阻害実験 (学位論文の図 3 と 4) の追試を行い、学位論文の要旨の項で述べた結果を得た。また、種々の生物由来のアルカリホスファターゼに対し、100 μ M までの高濃度添加による C₁₂-LAS の阻害効果を追加解析したが、阻害作用は認められなかった。さらに、製品 (NBR) の洗浄に用いた洗剤が製品表面に付着している可能性を否定する実験や、製品から浸出する阻害物質は水では抽出されないが、エタノールにより抽出されること等のベースとなる検証実験を幾つか行った。CaM 依存性 MLCK への作用や阻害剤のスクリーニング・精製のデータ等は修士論文のデータを利用し、過去にアルキルベンゼンスルホン酸類が CN を阻害するという報告がないことを文献的に調べて今回の学位論文を執筆した。

その後、抗 CN 抗体を用いると、ラット脳から部分精製した CN 活性が特異的に免疫沈降する結果を得たので、用いたラット脳酵素が CN であることを証明することができた。さら

に、ラット脳CNを用いてLASの側鎖長の違いによる阻害の強さを解析したところ、C₁₂-LAS、C₁₃-LAS及びC₁₄-LASのCNに対するIC₅₀は各々13.5 μM、5.7 μM、2.9 μMとなり、側鎖が長くなるほど強くCNを阻害した。以上の結果と修士論文の一部の結果を併せて北関東医学誌に発表した（参考論文1）。