

# 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の研究

伊藤 昇,<sup>1</sup> 時田 佳治,<sup>1</sup> 保坂 公平<sup>1</sup>  
嶋田一中島淳子,<sup>1</sup> 高橋 千由紀,<sup>1</sup> 田中 進<sup>2</sup>

## 要旨

**【背景・目的】** 我々は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) がウシ脳カルシニューリン (CN) 活性の強力な阻害剤であることを報告したが、その阻害様式の解明には至らなかった。本研究では LAS のラット脳 CN 活性に対する阻害効果を確認し、その阻害様式を明らかとした。**【材料と方法】** 精製したラット脳 CN を用い、LAS の阻害効果とキネティクス解析により阻害様式を決定した。**【結果】** C<sub>12</sub>-LAS、C<sub>13</sub>-LAS 及び C<sub>14</sub>-LAS に強い阻害効果を認め、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) はそれぞれ 13.5 $\mu$ M、5.7 $\mu$ M、2.9 $\mu$ M であった。また C<sub>12</sub>-LAS は非競合阻害により CN 活性を阻害することが明らかとなり、阻害定数 (K<sub>I</sub>) は 13.8 $\mu$ M と算出された。**【結語】** アルキル側鎖の炭素数 12 から 14 の LAS はラット脳 CN に対して強い阻害作用を示し、C<sub>12</sub>-LAS の阻害様式は非競合阻害であった。CN は免疫抑制剤の標的酵素として知られているので、本研究で得られた知見は、新規の構造を有する免疫抑制剤のリード化合物の探索研究に応用されることが期待される。(Kitakanto Med J 2014 ; 64 : 23~29)

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, 阻害様式, 免疫抑制剤

## はじめに

無機及び有機化合物を併せた化学物質の種類は現在 7,000 万を超え、1 日あたり約 14,000 の物質が Chemical Abstracts Service (CAS) に登録されていると言われていいる。これらの化学物質は、特に医療・保健衛生の発展、衣食住など我々の生活の質の向上に貢献してきた。

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸化合物 (LAS) (図 1) は、私たちの生活や産業に密接に関係している陰イオン界面活性剤である。家庭用の合成洗剤としてだけでなく、工業的には分散、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おり、その生産量は年間 10 万トン以上と推察されている。<sup>1</sup>

カルシニューリン (CN) は、プロテインホスファターゼ 2B (PP2B) としても知られるカルシウム (Ca<sup>2+</sup>)/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であり、下等・高等生物を問わず真核生物が示す

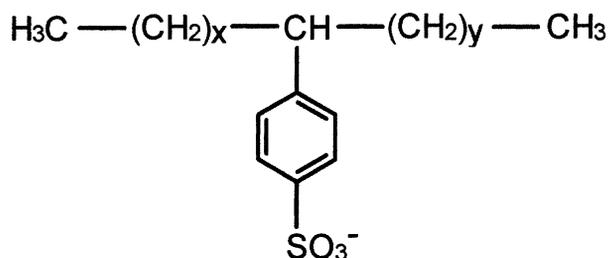


図 1 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)  
X+Y は 7 以上 11 以下で、且つ X は 0 以上で、Y は 11 以下である。

多くの生命機能において重要な役割を果たしている。特にヒトでは免疫系や神経系細胞において重要な役割を担う酵素として知られている。例えば、Ca<sup>2+</sup> によって引き起こされる神経細胞のアポトーシス<sup>2</sup> やアルツハイマー病で見られる異常にリン酸化されたタウ因子の形成に CN が関与しているという報告などがある。<sup>3,4</sup> また、免疫抑制剤の標的にもなっている。<sup>5</sup>

1 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院保健学研究科  
平成25年10月8日 受付  
論文別刷請求先 〒370-0033 群馬県高崎市中大類町37-1 高崎健康福祉大学健康栄養学科 田中 進

2 群馬県高崎市中大類町37-1 高崎健康福祉大学健康栄養学科

保坂らは *in vitro* での CN 活性に対する薬物効果を検討している過程で、偶然にも実験用プラスチック・ゴム製品から CN 阻害物質が溶出することを発見した。<sup>6</sup> そこで我々は、保坂らの研究を更に発展させ、新たな免疫抑制剤のシード化合物の発見を期待し、日常で使用されているプラスチック・ゴム製品を対象に CN 阻害物質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中に強い CN 阻害物質が複数存在することを発見した。これらの物質を単離して構造解析を行ったところ、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を明らかにした。<sup>7</sup> 市販の直鎖型ドデシルベンゼンスルホン酸 ( $C_{12}$ -LAS) を用いた阻害解析の結果、市販のウシ脳 CN に対する 50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は、およそ  $13.5\mu\text{M}$  と強い阻害を示したが、海老由来、大腸菌由来及び牛小腸由来のアルカリホスファターゼに対しては  $100\mu\text{M}$  濃度でも阻害効果を認めなかった。また、CaM 依存性酵素ミオシン軽鎖キナーゼの活性に対しては  $36\mu\text{M}$  濃度でも影響を及ぼさないことを明らかにした。しかしながら、 $C_{12}$ -LAS の CN に対する阻害様式の解明までには至らなかった。本研究では、ラット脳から精製した CN を用いて更に詳細な解析を行い、 $C_{12}$ -LAS 及びその類縁体の CN 阻害効果と  $C_{12}$ -LAS の阻害様式を明らかにしたので報告する。

## 材料と方法

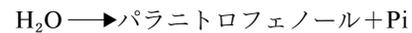
### 1. 試薬

ウシ脳の CaM, パラニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) は Sigma 社 (St. Louis, USA) より購入した。デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( $C_{10}$ -LAS), ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( $C_{11}$ -LAS), ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( $C_{12}$ -LAS), トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( $C_{13}$ -LAS), テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( $C_{14}$ -LAS), ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及び *p*-オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( $C_8$ -LAS) は和光純薬 (Osaka, Japan) より標準品として、ベンゼンスルホン酸ナトリウム (BS) は Aldrich 社 (St. Louis, USA) から購入した。抗 CN・PP2B (B) 抗体 (ウサギポリクロナール IgG) と抗 NFATc3 抗体 (ウサギポリクローナル IgG) は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, USA) から、そして Protein A アガロースサスペンション液は Merck 社 (Darmstadt, Germany) から購入した。タンパク質定量キット (Bio-Rad Protein Assay Kit) は Bio-Rad Laboratories 社 (Hercules, USA) の製品を用いた。標準検量線の作成には bovine serum albumin (BSA) を用いた。

### 2. CN 活性の測定方法

CN は次の反応を触媒することが知られている。

パラニトロフェニルリン酸+



パラニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) が脱リン酸化して生成するパラニトロフェノール (*p*NP) は、中性からアルカリ性条件で強い黄色を呈するため、波長 410nm における吸光度 ( $A_{410}$ ) を測定することにより定量することができる。特に記載しない限り標準酵素反応液は、100mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2mM  $\text{NiCl}_2$  及び 1.5mM *p*NPP に、2.6~4.1mU の精製ラット脳 CN と 5U の CaM を加え全量を  $400\mu\text{l}$  とし、 $37^\circ\text{C}$  で 20 分間反応させた。反応は  $600\mu\text{l}$  の 50mM EDTA 水溶液 (pH8.0) を加えて停止させ、最終的な溶液の吸光度を波長 410nm で測定することによって *p*NP の遊離量を定量した。場合により  $\text{NiCl}_2$  を除いたり、反応時間を 60 分にした。反応液から上記の条件で 1 分間に  $1\mu\text{mol}$  の *p*NP を生成する酵素量を 1U と定義した。

### 3. ラット脳 CN の精製

ウシ脳の CN 精製方法<sup>8,9</sup> を参考にラット脳から以下の様に精製した。なお、全ての操作は特に記述しない限り  $4^\circ\text{C}$  で行った。まず、ラット脳 40g に 3 倍量 (120ml) の 100mM Tris-Cl 緩衝液 [pH7.5, 2mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA),  $25\mu\text{M}$  フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) を含む] を加え、ポリトロンで粉碎し、ホモジネート後、その溶液を  $10,000\times g$  で 30 分間遠心分離を行い、上澄み液 95ml を得た。この上澄み液を 100mM Tris-Cl (pH7.5) 緩衝液で平衡化した DEAE Sepharose (バイオラッド社, DEAE Sepharose Fast Flow) カラム ( $\phi 5.5\times 15\text{cm}$ ) にアプライした。200ml の 100mM Tris-Cl 緩衝液 (pH7.5) を用いてカラムを洗浄後、150ml の 50mM NaCl, 2mM EDTA 及び  $25\mu\text{M}$  PMSF を含む 100mM Tris-Cl 緩衝液 (pH7.5) を流して 50ml ずつ採取した (画分 1~3)。さらに 250ml の 100mM NaCl, 2mM EDTA 及び  $25\mu\text{M}$  PMSF を含む 100mM Tris-Cl 緩衝液 (pH7.5) を流して各々 50ml ずつ採取した (画分 4~8)。最後に 100ml の 500mM NaCl, 2mM EDTA 及び  $25\mu\text{M}$  PMSF を含む 100mM Tris-Cl 緩衝液 (pH7.5) を流して各々 50ml ずつ採取した (画分 9~10)。得られた各画分液につき、タンパク質の定量及び  $\text{Ni}^{2+}$  添加と非添加における CN 活性を測定した。 $\text{Ni}^{2+}$  依存性が最も高い画分 8 と画分 9 を混合した。混合画分 100 ml を氷水中で冷却攪拌しながら、70%飽和硫酸アンモニウム溶液になるように 47.2g の硫酸アンモニウムをゆっくり加えて溶解させた。30 分後、 $10,000\times g$  で 30 分間遠心を行い、得られた沈殿物を緩衝液 A [1mM イミダゾール, 1mM 酢酸アンモニウム, 0.1mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA),

20mM Tris-Cl 緩衝液 (pH7.0), 10mM  $\beta$ -メルカプトフェノール, 25 $\mu$ M PMSF, 20% (v/v) グリセリン] に溶かした. この溶液を緩衝液 A (800ml) 中で約 9 時間, 更に新しい緩衝液 A (500ml) 中で約 3 時間の透析を行った. 透析後の溶液を 10,000 $\times$ g で 30 分間遠心を行い, 得られた上清を以下の様に Blue Sepharose カラムクロマトグラフィー精製に供した.

緩衝液 A で平衡化した 25ml の Blue Sepharose (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Blue Sepharose CL-6B) カラム ( $\phi$ 1.7 $\times$ 12cm) に透析後の上清液 (8 ml) をアプライした. 次に緩衝液 A (33ml) により溶出して画分 1~11 を得た. 流速は 0.6ml/min で行った. 次に 0.1M NaCl を含む緩衝液 A (15ml) を流して画分 12~16 を得た. 次に 0.25M NaCl を含む緩衝液 A (12ml) で溶出して画分 17~20 を得た. 更に 0.5M NaCl を含む緩衝液 A (9 ml) で溶出して画分 21~23 を得た. 最後に 2M NaCl を含む緩衝液 A (27 ml) で溶出して画分 24~32 を得た. 得られた画分のタンパク質の定量及び Ni<sup>2+</sup> 添加と非添加における CN 活性の差を測定した (図 2). 最も Ni<sup>2+</sup> 依存性の高い画分 9~11 を混合し, メンブラン濃縮 (Amicon Ultra-15, 遠心式フィルターユニット Ultracel-30 メンブラン装着, MW 30,000) を行った. 得られた濃縮液 (2.6mg) における CN の比活性は 812mU/mg であった.

#### 4. CN に対するアルキルベンゼンスルホン酸の阻害様式

CN に対するアルキルベンゼンスルホン酸の阻害様式を決定するため, 阻害剤濃度 [C<sub>12</sub>-LAS] を固定し, 様々

な基質濃度 [pNPP] 存在下における CN 活性の測定を行った. 固定した阻害剤濃度は 0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M 及び 15 $\mu$ M の 3 点を用い, 基質濃度 [pNPP] を変化させた時に得られた速度  $V_0$  (formed pNP nmol/min) と基質濃度 [pNPP] の両逆数プロット解析から阻害様式を決定した.<sup>10</sup>

#### 5. 免疫沈降反応

ラット脳から精製した酵素が CN であることを確認するために, 抗 CN PP2B (B) 抗体を用いた以下の免疫化学的方法で確認を行った. 抗原抗体反応溶液は, 20mM Tris-Cl (pH8.0), 50mM NaCl, 0.1% (w/v) BSA に, 抗 CN 抗体 [CN $\cdot$ PP2B (B) IgG], 又はコントロール抗体 (抗 NFATc3 IgG) を含んでおり, ここに 2.1mU の精製 CN を加えて全量を 20 $\mu$ l として, 4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた. 抗原抗体複合体を沈殿させるために, 一定量の Protein A アガロースサスペンション液 (50~100 $\mu$ l) を取り出し, アガロース洗浄液 [2mM ジチオスレイトール, 20mM Tris-Cl (pH8.0), 150mM NaCl, 0.1% (w/v) BSA 及び 0.5% (v/v) Tween 20 を含む] で 2 回洗浄した後, 再び最初に取り出した体積と同容量のアガロース洗浄液にサスペンドした. この Protein A アガロースサスペンション液 10 $\mu$ l を更に加え, 時々攪拌しながら 4 $^{\circ}$ C で 6 時間更に反応させた. 反応後, 10,000 $\times$ g で 5 分間遠心を行い, 抗原抗体複合体を沈殿させた. 上澄み液 10 $\mu$ l を用いて既述の CN の活性測定方法に従って 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後, 遊離した pNP 量を定量した.

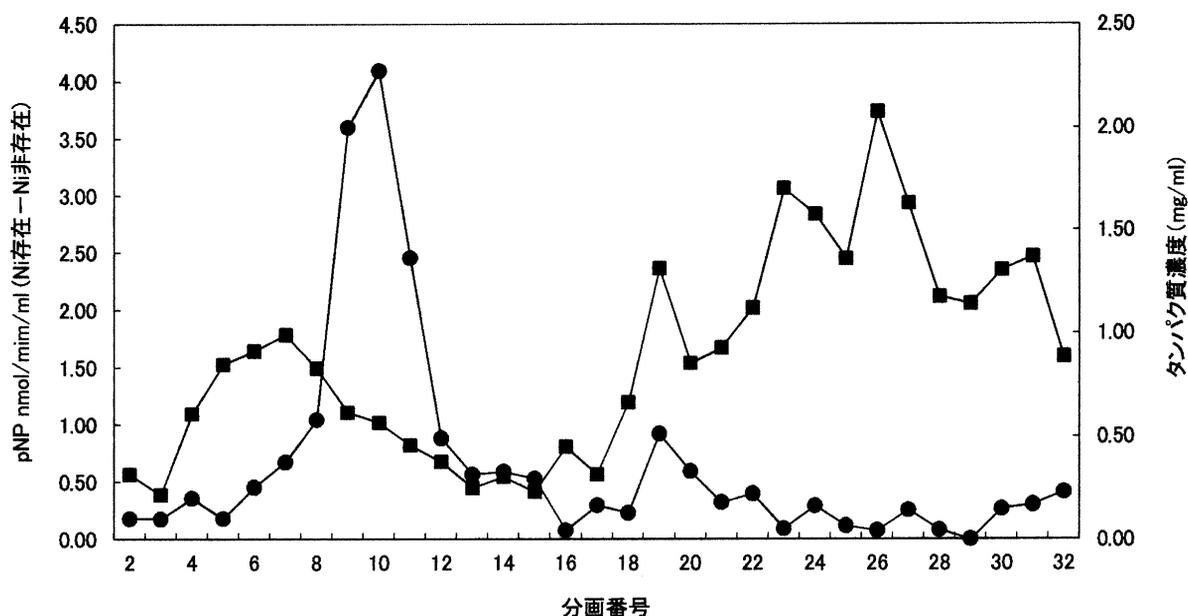


図 2 Blue Sepharose カラムクロマトグラフィー  
各画分は 3 ml ずつ集めた. CN 活性は Ni<sup>2+</sup> 存在及び非存在下で測定し, その差 (●) を求めた. Ni<sup>2+</sup> 依存性は画分 9 から徐々に上昇し, 画分 10 で最も高い値を示した. (■) はタンパク質濃度 (mg/ml) を示している. 画分 9~11 を混合してメンブラン濃縮を行い, 本研究に用いた.

## 結 果

## 1. ラット脳からの CN の精製

ラット脳からの CN の精製の報告がないので、我々はウシ脳の CN の精製に準じて精製を行った。図 2 は Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーの結果を示している。前半 (画分 9~11) に溶出されるピークは CN に特徴的な  $\text{Ni}^{2+}$  依存性の *p*NPP 分解活性を示した。<sup>11</sup> この画分が CN であることを確認するために、抗カルシニューリン抗体を用いて抗原抗体反応を行った。図 3 に示す様に  $\text{Ni}^{2+}$  依存性の *p*NPP 分解活性は、ほぼ完全に抗カルシニューリン抗体により沈降した。以上の結果より、得られた Blue Sepharose 画分 9~11 は CN であると結論し、以下の阻害実験に使用した。またデータとしては示さないが、この画分の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析を行った結果、CN のサブユニットと推定される 60kDa と 20kDa 付近に主要なバンドが検出された。しかし、この他にも CaM と思われる 10kDa のバンド、更には 30, 45, 90kDa 付近に明らかなタンパク質の混在が検出されたことより、この段階では未だ完全に精製されていない事が明らかとなった。

## 2. アルキルベンゼンスルホン酸とその類縁化合物の CN 阻害

SDS, BS,  $\text{C}_8$ -LAS 及び  $\text{C}_{12}$ -LAS を用い、前回のウシ

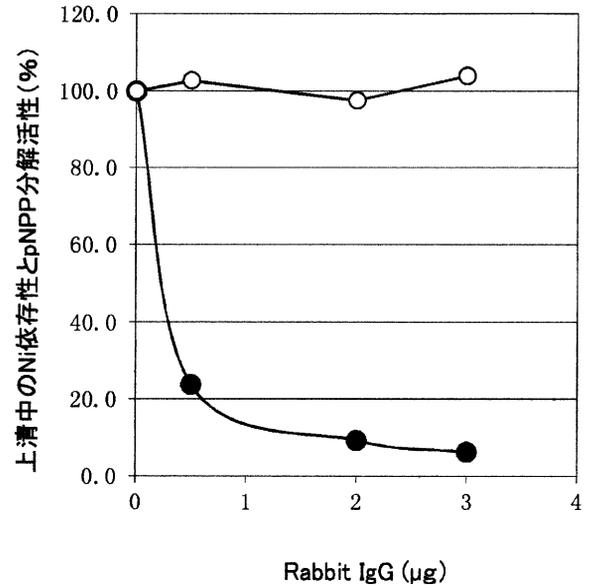


図 3 抗 CN 抗体による Blue Sepharose 画分の特異的沈降反応

図 3 に示した量の抗カルシニューリン IgG (●) 又はコントロール IgG (○) を抗原抗体反応液に加えた。抗体無添加の上清中の *p*NPP 分解活性を 100% とした。コントロール IgG は全く *p*NPP 分解活性に影響しなかったが、抗カルシニューリン IgG は、ほぼ完全に *p*NPP 分解活性を低下させた。

脳 CN への実験同様、ラット脳 CN への阻害の確認を行った (図 4)。ラット脳 CN への阻害作用は、 $\text{C}_{12}$ -LAS は阻害が  $10\mu\text{M}$  から認められ、 $40\mu\text{M}$  以上では CN を完

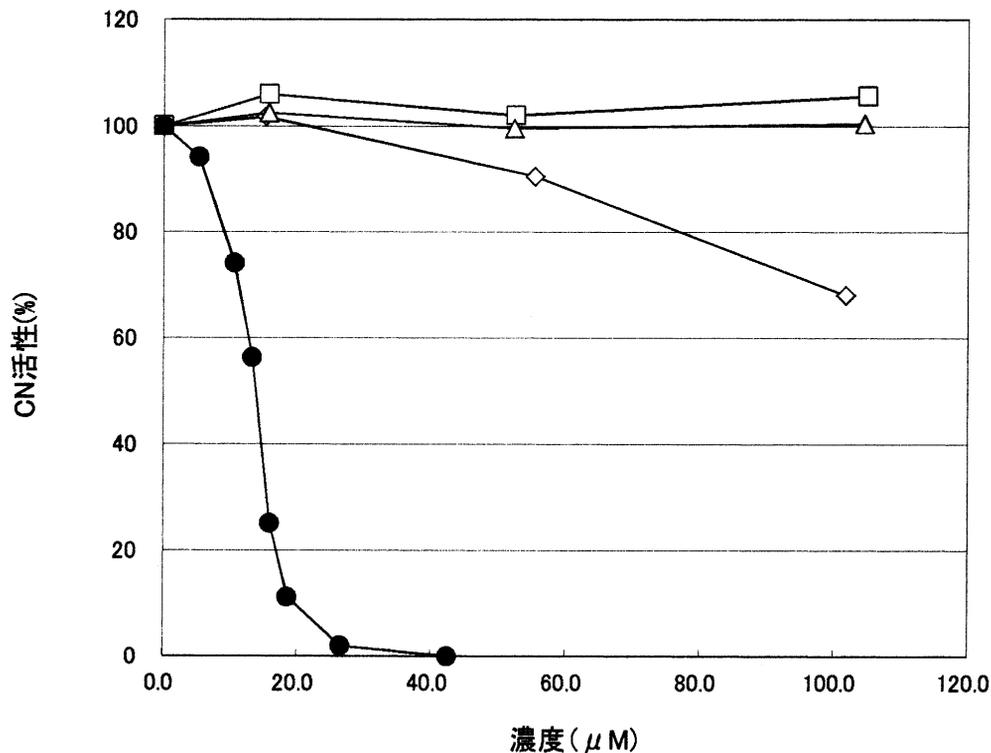


図 4 アルキルベンゼンスルホン酸とその類縁化合物の CN 活性阻害

SDS (◇), BS (□),  $\text{C}_8$ -LAS (△) 及び  $\text{C}_{12}$ -LAS (●) を用いて、材料と方法の項 2 に示した測定条件でラット脳 CN の活性を測定した。各種の阻害物質を横軸に示された濃度 ( $\mu\text{M}$ ) で加え、阻害剤無添加の活性を 100% として示した。アルキル側鎖の炭素数 12 の  $\text{C}_{12}$ -LAS に強い阻害が認められた。

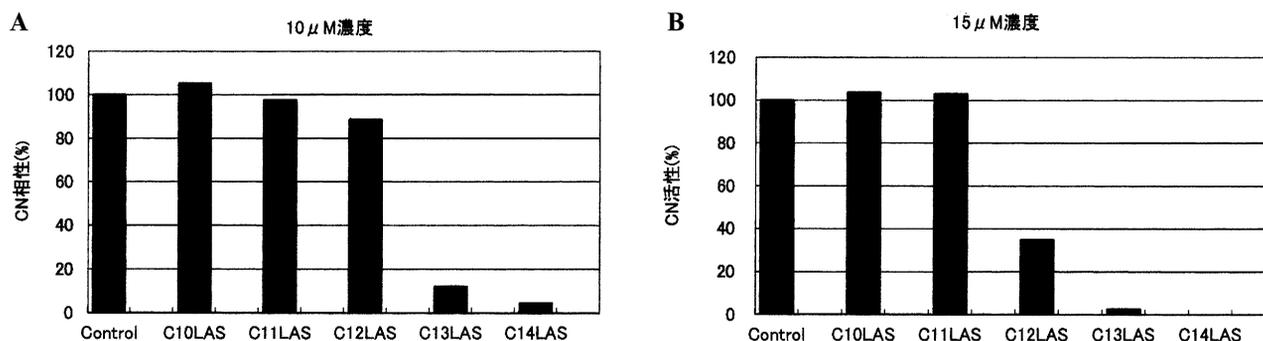


図5 LAS同族体のCN阻害

アルキル側鎖の炭素数10から14のLASを用いて、材料と方法の項2に示した測定条件でCNの活性を測定した。各種LASを10μM(A)及び15μM(B)添加し、阻害剤無添加の活性を100%として示した。アルキル側鎖の炭素数12から強い阻害が認められ、アルキル側鎖が長くなるほどCNを強く阻害した。

完全に阻害した。一方、SDSは102μMの高濃度で漸く32%の弱い阻害作用を示した。アルキル側鎖のないBS及び短い炭素数8のC<sub>8</sub>-LASは105μMでも全く阻害は認められなかった。次に、本研究では新たにアルキル側鎖の長さの違いによるCN阻害の詳細を解析した。炭素数10から14のLASを用いて、10μM及び15μMにおけるCN阻害をそれぞれ測定した。炭素数10のC<sub>10</sub>-LAS及び炭素数11のC<sub>11</sub>-LASは15μM濃度でも全く阻害を示さなかったが、炭素数12のC<sub>12</sub>-LASから強い阻害が認められ、アルキル側鎖が長くなるほどその阻害作用は強くなった(図5)。C<sub>12</sub>-LAS、C<sub>13</sub>-LAS及びC<sub>14</sub>-LASのIC<sub>50</sub>を求めると、それぞれ13.5μM、5.7μM、2.9μMであった。

### 3. C<sub>12</sub>-LASによるラット脳CNの阻害様式

C<sub>12</sub>-LASの濃度を0μM、10μM及び15μMの3点で固定し、様々な濃度の基質pNPPを用いてラット脳CN活性を測定した。得られた速度V<sub>0</sub>(formed pNPNmol/min)と基質pNPP濃度の両逆数プロットの結果を示した(図6)。3つの直線はX軸上の同一点(-2.10, 0.00)で交差した。この結果は、C<sub>12</sub>-LASによるラット脳CNの阻害は非競合阻害であることを示している。K<sub>i</sub>値は13.8μMと算出された。

### 考 察

本研究では、ラット脳から精製したCNを用いてLASの阻害様式を解析した。LASによるラット脳CNへの阻害効果は、ウシ脳CNと同様にC<sub>12</sub>-LASは10μMから認められ、40μM以上ではCNを完全に阻害した。C<sub>12</sub>-LAS、C<sub>13</sub>-LAS及びC<sub>14</sub>-LASのIC<sub>50</sub>はそれぞれ13.5μM、5.7μM、2.9μMであった。一方、アルキル側鎖のないBS及び炭素数8のC<sub>8</sub>-LASは100μMを超えても全く阻害は認められなかった。また、炭素数10のC<sub>10</sub>-LAS及び炭素数11のC<sub>11</sub>-LASは、15μMの濃度でも阻

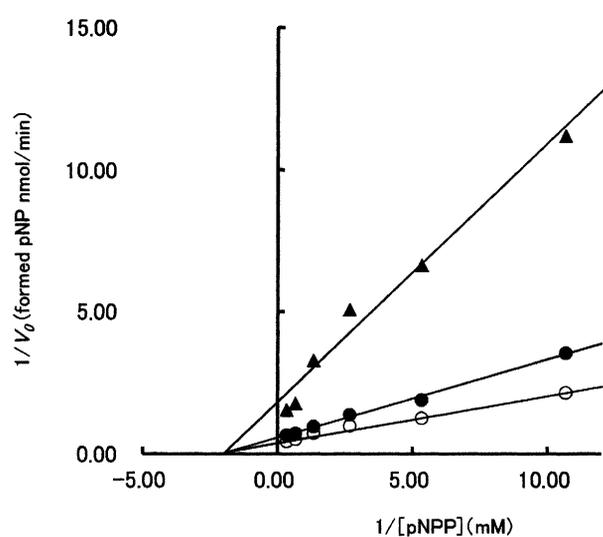


図6 逆数プロット解析

材料と方法の項4に述べた様に、C<sub>12</sub>-LASの濃度を0μM(○)、10μM(●)及び15μM(▲)の3点で固定し、基質pNPPの濃度を0.09、0.18、0.38、0.75、1.50、3.00μMと変化させてCN活性をそれぞれ測定した。得られた速度V<sub>0</sub>(formed pNPNmol/min)と基質pNPP濃度の両逆数プロットを行った。3つの直線は1点(-2.10, 0.00)で交差したことから、阻害は非競合阻害を示している。

害を示さなかった。これらの結果から、LASのCN阻害効果を強めるにはアルキル側鎖の長さが重要であることが分かった。また、C<sub>12</sub>-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。したがって、C<sub>12</sub>-LASはCNのpNPP結合部位以外の部位に作用し、その立体構造を変化させることが推定された。C<sub>12</sub>-LASの阻害定数(K<sub>i</sub>)は13.8μMと算出され、IC<sub>50</sub>値に近い値であった。

我々は研究当初、プラスチック・ゴム中に混在するCN阻害物質から既存の免疫抑制剤とは異なる新規の構造を持つ薬剤のリード化合物の発見を期待していた。しかし、意外にも陰イオン界面活性剤であるLASがCNを強力

に阻害することを発見した.<sup>7</sup> この発見は、環境生物学や環境毒性学に対して新たな課題を提起しており、今後の展開が期待されるところであるが、本稿においてはこれ以上踏み込んだ考察は行わず、免疫抑制剤のシード化合物としてアルキルベンゼン誘導体の今後の可能性を考えてみた。本研究では LAS のアルキル側鎖の炭素数が 12 より長くなると CN 阻害が強くなる事が判明したが、今後、様々な誘導体を合成し、それらの CN 阻害特性を研究することは興味深いテーマである。例えば、更に長い飽和アルキル側鎖や不飽和アルキル側鎖、イソプレノイド側鎖等の誘導体、ベンゼン骨格の代わりにナフタリンやアントラセン骨格、更にはピリジン、キノリン、イソキノリン等の複素環骨格に替えるのも興味深い。また、阻害作用が非競合型であった事より、ここに安定に結合するためのタンパク質ポケット構造を結晶解析などにより明らかにすることも大変興味深いテーマになると考えられる。

### 結 語

C<sub>12</sub>-LAS はウシ脳 CN と同様に、ラット脳 CN を低濃度で阻害した。アルキル側鎖の炭素数 12 から 14 の LAS は、側鎖が長くなるほど CN を強く阻害した。C<sub>12</sub>-LAS のラット脳 CN に対する阻害様式は非競合阻害であり、阻害定数 ( $K_i$ ) は 13.8 $\mu$ M であった。本研究で得られた知見を、新規の構造を有する免疫抑制剤のシード化合物の探索研究に広げていくことは、大変興味深いテーマになると思われる。

### 謝 辞

本研究は、その一部は日本科学技術研究費 (挑戦的萌芽研究 AS232Z01008G) の助成を受けたものです。

### 文 献

1. 経済産業省経済産業政策局調査統計部 化学工業統計年報, 2004
2. Yu L, Golbeck J, Yao J, et al. Spectroscopic and enzymatic characterization of the active site dinuclear metal center of calcineurin, implications for a mechanistic role. *Biochemistry* 1997; 36: 10727-10734.
3. Gong CX, Singh TJ, Grundke IK, Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J Neurochem* 1994; 62: 803-806.
4. Garver TD, Kincaid RL, Conn RA, et al. Reduction of calcineurin activity in brain by antisense oligo-nucleotides leads to persistent phosphorylation of tau protein Thr181 and Thr231. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 632-641.
5. Liu J, Farmer JD, Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin cyclosporin A and FKBP-PK506 complexes. *Cell* 1991; 66: 807-815.
6. Hosaka K, Takahashi K, Kubohara Y, Calcineurin inhibitors present in plastic and rubber products. *Jpn J Environ Toxicol* 2008; 11: 143-149.
7. Ito N, Tokita M, Hosaka K, et al. Identification of alkylbenzene sulfonate surfactants leaching from an novel inhibitors of calcineurin activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77: 954-960.
8. Sharma RK, Taylor WA, Wang JH. Use of calmodulin affinity chromatography for purification of specific calmodulin-dependent enzymes. *Methods Enzymol* 1983; 102: 210-219.
9. Klee CB, Krinks MH, Manalen AS, et al. Isolation and characterization of bovine brain calcineurin, a calmodulin-stimulated protein phosphatase. *Methods Enzymol* 1983; 102: 227-244.
10. Voet D, Voet JG. *Biochemistry* 4th edition. New York: John Wiley & Sons Inc., 2011: 492-496.
11. Pallen CJ, Wang JH. Regulation of calcineurin by metal ions. *J Biol Chem* 1984; 259: 6134-6141.

# Characterization of Alkylbenzene Sulfonate Inhibitors of Rat Brain Calcineurin Activity

Noboru Ito,<sup>1</sup> Kohei Hosaka,<sup>1</sup> Yoshiharu Tokita,<sup>1</sup>

Junko Nakajima-Shimada,<sup>1</sup> Chiyuki Takahashi<sup>1</sup> and Susumu Tanaka<sup>2</sup>

1 Gunma University Graduate School of Health Sciences, Showa-machi 3-39-22, Maebashi 371-8514, Japan

2 Department of Health and Nutrition, Takasaki University of Health and Welfare, Nakaorui-machi 37-1, Takasaki 370-0033, Japan

**Objective :** Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) has been found to be a specific inhibitor of bovine brain calcineurin (CN) activity ; however, the mechanism of this inhibition remains unclear. In this study, to characterize the inhibitory effects of LAS analogues, we employed an enzymatic inhibition assay of purified rat brain CN. **Design :** Using *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP) as a substrate, the inhibitory effect of LAS against rat brain CN was confirmed with an enzymatic reaction. Enzymatic kinetic analyses were also performed using this assay system. **Results :** Strong inhibitory effects were observed using C<sub>12</sub>-LAS to C<sub>14</sub>-LAS. The IC<sub>50</sub> values for C<sub>12</sub>-LAS, C<sub>13</sub>-LAS, and C<sub>14</sub>-LAS were 13.5μM, 5.7μM, and 2.9μM, respectively. Using a double-reciprocal plot, C<sub>12</sub>-LAS was determined to have noncompetitive inhibitory effects, and the inhibitory constant (*K*<sub>1</sub>) was calculated to be 13.8μM. **Conclusions :** The LAS analogues containing twelve to fourteen carbons in the alkyl side chain exhibited strong inhibitory effects against rat brain CN. Inhibition by C<sub>12</sub>-LAS was clearly noncompetitive, with estimated to be 13.8μM. It is well known that calcineurin is an intracellular target for immunosuppressant agents. The findings presented here provide justification for further studies aimed at investigating seed compounds as sources of novel immune-suppressing drugs. (Kitakanto Med J 2014 ; 64 : 23~29)

**Key words :** calcineurin, alkylbenzene sulfonates, inhibitor, immune-suppressing drug