

NO を消去したい

使用製品

Carboxy-PTIO	[C348]	L-NMMA	[N411]
		L-NAME	[N412]

I はじめに

NO は一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって L-アルギニンのグアニジノ基と、分子状酸素を基質として生成される。NOS は、発現様式や誘導因子などで数種のアイソフォームに分けられ、細胞内に常に構成的に発現する cNOS (constitutive NOS) と誘導因子によって発現する iNOS (inducible NOS) である。また cNOS は神経型 NOS (nNOS、bNOS)、血管内皮型 NOS (eNOS) の 2 つに大別できる。NOS は NADPH、FMN、FAD、テトラヒドロピオブテリン (BH4) を補酵素として、L-アルギニンから N⁶-ヒドロキシ-L-アルギニン (L-NOHA) を経て、L-シトルリンと NO を生成する。

NOS の基質が L-アルギニンであることが報告された後、その誘導体が阻害活性を示すことが確認されている。これらを用いた薬理実験により、cNOS が生理的恒常性維持に深く関与し、iNOS は種々の疾患の発症に関与しているなど NO の生理学的、病態的意義が明らかにされている。これらの NOS inhibitor は現在では NO の生理作用を検討する重要なツールになっている。

しかしながら、NO は放出されたのち様々な物質に変化していくので、NO 反応カスケード全てを消去してしまう NOS 阻害剤や、NO をトラップして最終生成物である NO₂⁻ や NO₃⁻ にしてしまうヘモグロビン類縁体では多様な生理活性を有する NO 関連物群 (NO 代謝系) そのものを消去してしまうことになる。そこで開発されたのが NO 消去剤としての Carboxy-PTIO である。Carboxy-PTIO は前田、赤池らにより開発された水溶性の安定な有機ラジカルである。

のシグナルとは区別できるので、簡単な系では ESR スペクトルの変化から、反応した NO 量 (系中の NO 量) を見積もることも可能である。

2. Carboxy-PTIO の安定性

小社の Carboxy-PTIO は Na 塩の形をとっているため、そのまま、純水や pH6 以上のバッファー等に溶解して用いることができる。しかしながら pH4 以下では不可逆的な分解を受ける。また、アスコルビン酸により可逆的に還元されてラジカルを消失する。この状態では NO 消去能はないので、特に *in vivo* に適用する場合には、投与した濃度と有効 Carboxy-PTIO 濃度は異なることもありうる。その他のチオールによっても速度は遅いが可逆的還元を受ける。還元速度はチオールの種類によって異なり、DTT では数十分のオーダーで消失するが、*N*-アセチルペニシリンでは還元は非常に遅い。

3. Carboxy-PTIO 1 mmol/l 溶液 (10 ml) の調製法

- (1) Carboxy-PTIO 3.0 mg を量り取り、10 mmol/l PBS 緩衝液 10 ml に溶解する。(1 mmol/l ストック溶液)
- (2) 希望濃度になるように、ストック溶液の一定量を試料に添加する。

※ ストック溶液は用時調製し、その日のうちに使い切る。緩衝液としては PBS 以外に HEPES などのグッド緩衝液も使用できる。

参考文献

L-NAME

- 1) C.Szabo, J. A. Mitchell and C. Thiemermann, "Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock", *Br. J. Pharmacol.*, **1993**, *108*, 786.

L-NMMA

- 2) S. Moncada and R. M. J. Palmer, "Biosynthesis of Nitric Oxide From L-Arginine", *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, *38*, 1709 ; D. D. Rees, R. M. J. Palmer, H. F. Hodson and S. Moncada, *Br. J. Pharmacol.*, **1989**, *96*, 418.
- 3) J. Collier and P. Vallance, "Endothelium-derived relaxing factor is an endogenous vasodilator in man", *Br. J. Pharmacol.*, **1989**, *97*, 639.
- 4) K. Shibuki and D. Okada, "Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum", *Nature*, **1991**, *349*, 326.

Carboxy-PTIO

- 5) T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto, K. Sato, M. Kohno, K. Sasamoto, K. Miyazaki, S. Ueda and H. Maeda, "Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction", *Biochemistry*, **1993**, *32*, 827.

II NO 合成酵素阻害剤

ここでは各阻害剤の溶解性を紹介する。

1. L-NAME(Code: N412)

《使用法》生理食塩水、緩衝溶液に溶解して使用する。

水溶性 (> 10 mg/ml (37 mmol/l))。

《取り扱い》冷蔵保存

2. L-NMMA(Code: N411)

《使用法》生理食塩水、緩衝溶液に溶解して使用する。

水溶性 (> 10 mg/ml (40 mmol/l))。

《取り扱い》冷蔵保存

III NO 消去剤 : Carboxy-PTIO(Code: C348)

1. Carboxy-PTIO の特長

(1) NO のみを消去できる

系中の他の NO 関連物には影響を及ぼすことなく NO のみを消去できる新しいタイプの NO 消去剤である。

(2) 高水溶性、低毒性

カルボキシル基のない PTIO も同様に NO を消去するが、水溶性に乏しく、高濃度の水溶液を調製することができない。Carboxy-PTIO は高水溶性であり、数 10 mmol/l オーダーの水溶液を作ることも可能である。*in vivo* ではその毒性が低いことも特徴の一つであり、これも NOS 阻害剤との違いである。

(3) ESR による NO 定量

それ自身有機ラジカルであるから ESR により特有のシグナルとして検出することが可能である。NO と反応してできる生成物 (Carboxy-PTI) の ESR シグナルは Carboxy-PTIO