

# ニトログアノシンを検出したい

## 使用製品

- Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody [AB01]
- Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO<sub>2</sub>G52) [AB02]

## 解析装置



## I はじめに

8-ニトログアノシンは、一酸化窒素(NO)とスーパーオキシドラジカルとの反応から生じる過酸化亜硝酸(パーオキシナイトライト)や、ミエロパーオキシダーゼ/亜硝酸イオン/過酸化水素、等によってグアノシンがニトロ化されて生成する修飾核酸である。これまでに、ウイルス感染<sup>1,2)</sup>、細菌感染<sup>3,4)</sup>、炎症性疾患<sup>5)</sup>、がん<sup>5)</sup>、喫煙<sup>6)</sup>、などでグアニンのニトロ化が亢進していることが明らかになり、酸化ストレスの新しいバイオマーカーとして注目されている。また最近では、シグナル伝達物質として知られているサイクリックGMP(cGMP)がニトロ化された8-ニトロcGMPの生体内での生成が同定され<sup>3)</sup>、活性酸素シグナルの新しいメディエーターとしての機能が示唆されている<sup>3,7-9)</sup>。

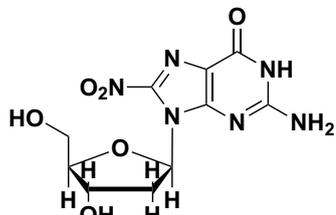


図1 8-ニトログアノシンの構造

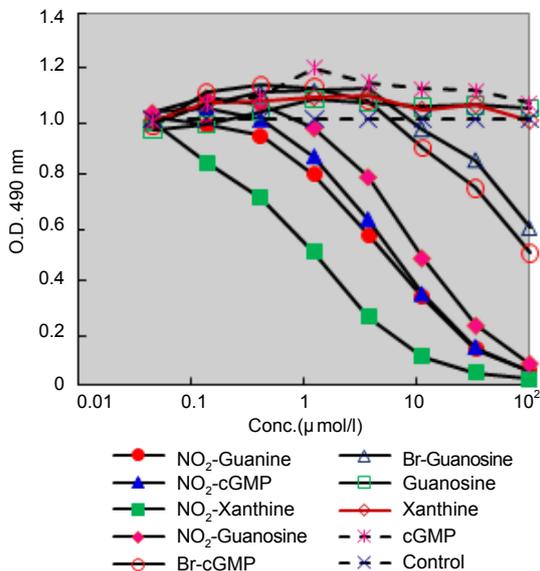


図2 モノクローナル抗体 NO<sub>2</sub>G52 の反応性

## 2. Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody (Code: AB01)

- 動物種：ウサギ(日本白色種)

ポリクローナル抗体も8-ニトログアノシンと8-ニトログアニンにのみ反応し、正常なグアノシン、グアニンには反応しない。また8-ヒドロキシグアニンや、3-ニトロチロシンとも交差反応を示さない。ウサギ由来であるためマウスなどげっ歯類の組織染色に適用できる。

### (1) 使用濃度例

- ELISA：5 μg/ml
- 免疫組織染色：10 μg/ml

### (2) ポリクローナル抗体の反応性 (IC<sub>50</sub>(μmol/l))

- 強く反応する (1 μmol/l)  
8-NO<sub>2</sub>-guanosine, 8-NO<sub>2</sub>-guanine
- 交差反応なし  
guanosine, guanine, 8-OH-guanine, 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine

図3 に主な化合物の反応性の例を示す。

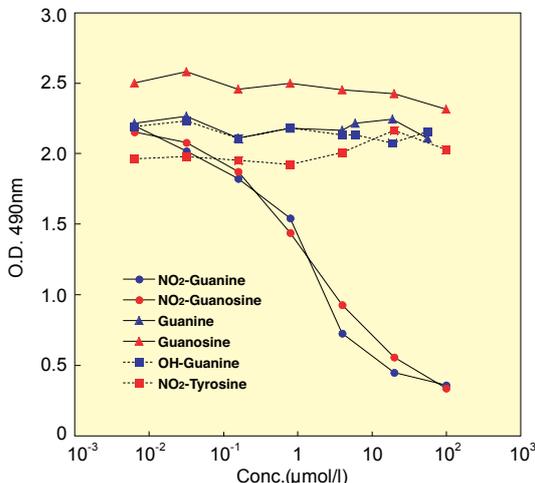


図3 ポリクローナル抗体の反応性

## II 性質

### 1. Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone# NO<sub>2</sub>G52) (Code: AB02)

- 動物種：マウス (BALB/c)
- モノクローナル抗体サブタイプ：IgG1

本抗体は、正常な核酸塩基は認識しないが、ニトロ化核酸に対しては、ニトログアノシンのみならずニトログアニン、ニトロキサンチンといったニトロ化塩基や、それらのヌクレオチドであるニトロcGMP、ニトロGMP、ニトロGTPなどに対して優れた反応性を示す。このため、本抗体は、グアニンの8位がニトロ化されたものを幅広く認識する、グアニンニトロ化のユニバーサルな抗体である。本抗体は、免疫組織染色法に加え、本抗体を樹脂へ固定化して、ニトログアニン誘導体のアフィニティー精製<sup>3,6)</sup>への利用も可能である。

本抗体は熊本大学医学部赤池孝章先生との共同開発によるものである。

#### (1) 使用濃度例

- ELISA：1 μg/ml
- 免疫組織染色：10 μg/ml

#### (2) モノクローナル抗体 NO<sub>2</sub>G52 の反応性 (IC<sub>50</sub> (μmol/l))

- 強く反応する (10 μmol/l)  
8-NO<sub>2</sub>-guanosine, 8-NO<sub>2</sub>-guanine, 8-NO<sub>2</sub>-cGMP, 8-NO<sub>2</sub>-Xanthine
- わずかに交差反応あり (> 1 mmol/l)  
8-Br-guanosine, 8-Br-guanine, 8-Cl-guanine
- 交差反応なし  
guanosine, guanine, 8-OH-guanine, 8-OH-deoxyguanosine, xanthine, adenine, adenosine, thymine, deoxythymidine, uracil, uridine, 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine, 2-NO<sub>2</sub>-imidazole, cytosine

図2 に主な化合物の反応性の例を示す。

### III 使用例

インフルエンザ感染マウスの肺上皮細胞の染色例である(図5)<sup>1)</sup>。

- 1) インフルエンザ感染マウスの肺の凍結切片(6 μm)を2% PLP(periodate-lysine-paraformaldehyde)で固定する。
- 2) 抗ニトログアノシン抗体(10 μg/ml)と反応させる。
- 3) Alkaline phosphatase 標識の2次抗体と反応させる。
- 4) Vector red substrate kit Iにて発色させる。

### IV 注意事項

- 1) 抗体は冷凍品であるが、解凍後は冷蔵にて保管して下さい。凍結-融解の繰り返しは品質の低下を招きます。
- 2) ポリクローナル抗体で染まった場合、下記のような確認を行なって下さい。
  - ① 標準の8-ニトログアニンと競合させて染色されなくなる
  - ② ジチオナイト(Sodium hydrosulfite)などの還元剤で試料切片を処理して染色性が消失すること。  
また、ヒトのサンプルなどでは特異性、力価の高いモノクローナル抗体をご使用下さい。

### 参考文献

1) T. Akaike, S. Okamoto, T. Sawa, J. Yoshitake, F. Tamura, K. Ichimori, K. Miyazaki, K. Sasamoto and H. Maeda, "8-nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 685.  
2) J. Yoshitake, T. Akaike, T. Akuta, F. Tamura, T. Ogura, H. Esumi and

H. Maeda, "Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity", *J. Virol.*, **2004**, *78*, 8709.  
3) T. Sawa, M. H. Zaki, T. Okamoto, T. Akuta, Y. Tokutomi, S. Kim-Mitsuyama, H. Ihara, A. Kobayashi, M. Yamamoto, S. Fujii, H. Arimoto and T. Akaike, "Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate", *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 727.  
4) M. H. Zaki, S. Fujii, T. Okamoto, S. Islam, S. Khan, K. A. Ahmed, T. Sawa and T. Akaike, "Cytoprotective function of heme oxygenase 1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis", *J. Immunol.*, **2009**, *182*, 3746.  
5) Y. Terasaki, T. Akuta, M. Terasaki, T. Sawa, T. Mori, T. Okamoto, M. Ozaki, M. Takeya and T. Akaike, "Guanine nitration in idiopathic pulmonary fibrosis and its implication for carcinogenesis", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2006**, *174*, 665.  
6) T. Sawa, M. Tatemichi, T. Akaike, A. Barbin and H. Ohshima, "Analysis of urinary 8-nitroguanine, a marker of nitrative nucleic acid damage, by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with immunoaffinity purification: association with cigarette smoking", *Free Radic. Biol. Med.*, **2006**, *40*, 711.  
7) M. Feilisch, "Nitrated cyclic GMP as a new cellular signal", *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 687.  
8) K. A. Ahmed, T. Sawa, T. Akaike, "Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides", *Amino Acids*, **2011**, *41*(1), 123.  
9) T. Sawa, H. Arimoto and T. Akaike, "Regulation of redox signaling involving chemical conjugation of protein thiols by nitric oxide and electrophiles", *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*(7), 1121.

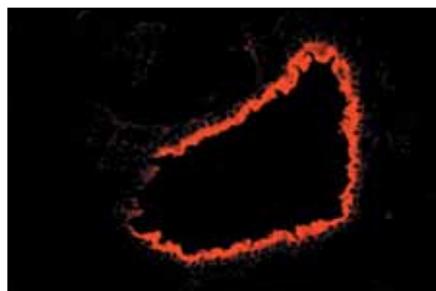
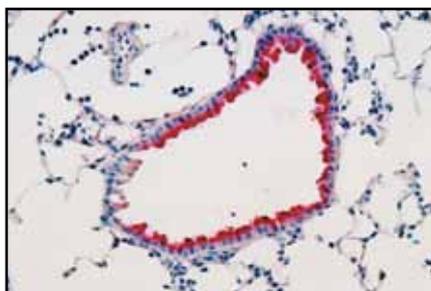


図5 インフルエンザ感染マウスの肺上皮細胞の染色例  
蛍光標識した Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody にて検出  
(データ提供: 熊本大学医学部教授赤池孝章先生)

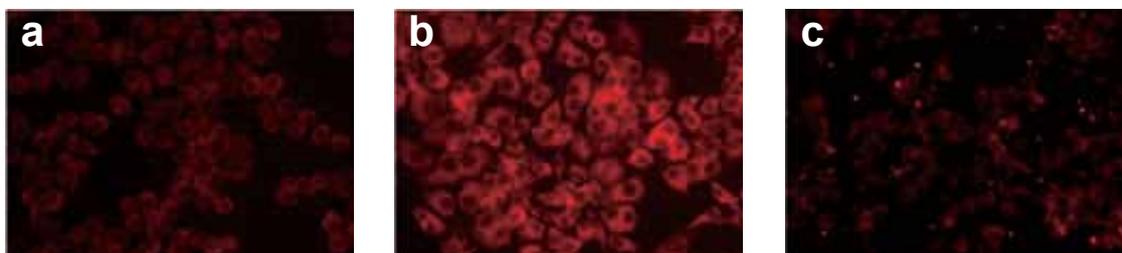


図6 RAW264.7細胞(murine macrophage cell line)における内因性のグアニンのニトロ化  
a) 無刺激 b) LPS + INF- $\gamma$  刺激 c) L-NMMA 投与  
蛍光標識した Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(clone#NO<sub>2</sub>G52)にて検出  
(データ提供: 熊本大学医学部教授赤池孝章先生)

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料