

# L-[Amidino-<sup>15</sup>N]-arginine のグアニジノ化合物 への代謝に関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門（指導：森 昭胤教授）

進 藤 省 一 郎

（昭和58年3月8日受稿）

**Key words:** L-[amidino-<sup>15</sup>N]-arginine,  
グアニジノ化合物, 発光分光法

## 緒 言

19世紀後半に arginine (ARG) が発見されて以来<sup>1),2)</sup>, ARG 以外にも多種類のグアニジノ基を有する化合物が見い出され, 現在広く動・植物界に分布していることが明らかにされている<sup>3)</sup>. 現在知られているグアニジノ化合物のうち哺乳動物体内には, taurocyamine (GT), guanidinosuccinic acid (GSA), creatinine (CRN), guanidinoacetic acid (GAA), creatine (CR), guanidinobutyric acid (GBA), guanidinopropionic acid (GPA), ARG, homoarginine (H-AG), guanidine (G), methylguanidine (MG) などの存在が報告されている<sup>3)</sup>. これらグアニジノ化合物の生理学的機能については様々な報告があるが, なかでも, けいれん, 尿毒症などの病態生化学的立場からの報告が多い<sup>3)-9)</sup>.

グアニジノ化合物の代謝に関しては, 哺乳動物よりも無脊椎動物について詳細に研究されており, ARG の酸化過程<sup>10),11)</sup> や ARG からのアミジン基転移過程など ARG を前駆物質とする生成過程が知られている<sup>11)</sup>. 他方, 哺乳動物においては ARG の酸化過程よりもアミジン基転移過程についてより詳しく調べられているが<sup>12),13)</sup>, その動態については不明な点の多いのが現状である.

近年グアニジノ化合物の分離・分析・同定法の進歩に伴い<sup>14),15)</sup>, また病態代謝との関連においてグアニジノ化合物の代謝に関する種々の知見が得られるようになった<sup>16)-19)</sup>. それらの方法のうち, 安定同位体の利用は, Schoenheimer

らによる脂肪酸および蛋白質代謝における研究に端を発し, 様々な分野で用いられてきた<sup>20),21)</sup>. しかし, 放射性同位体の利用に比べれば, その利用度はわずかであるが, 放射能を出さないため, その生体への影響を無視できること, さらに核磁気共鳴吸収や質量分析法などの利用によって様々な情報が得られることなど, グアニジノ化合物代謝の研究に有効な手段の一つと考えられる.

著者は, マウスに重窒素 (<sup>15</sup>N) で標識化した ARG を投与し, 血漿, 脳, 腎および肝におけるグアニジノ化合物への <sup>15</sup>N の取り込みを観察し, グアニジノ化合物代謝の動態について検討した.

## 実験動物および実験方法

### 1. 実験動物

実験動物には, ddY 系雄性マウス (6週令, 体重30g, 静岡県実験動物) を用いた. 実験動物は室温25°C, 湿度55%で12時間の明暗サイクルとなるように午前7時より午後7時までを明るくした飼育室で1週間飼育し実験に用いた. 飼料はマウス用固形飼料を与え, 水は自由に摂取させた.

### 2. 分析用試料調整法

L-[Amidino-<sup>15</sup>N]-arginine (95 atom %; A-RG としては47 atom %, 以下 <sup>15</sup>N-ARG と略記する) を蒸留水に溶解し, 100mg/kg 体重となるようにマウス腹腔内に投与し, 1分, 10分, 30分, 60分, 3時間および6時間後に断頭し, あらかじめヘパリン処理をした試験管に採血し,

脳、腎および肝をすみやかに摘出した。血漿(5匹分をプールした)および各臓器は秤量後分析に用いるまで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。また生理食塩水を腹腔内に投与したものを対照群として同様に処理した。

各臓器は10倍容の1%ピクリン酸中で磨砕し、3,000r.p.m.で20分間冷凍遠沈し、除蛋白した。この操作を2回繰り返した後、この上清の過剰ピクリン酸をDowex 2×8 ( $\text{Cl}^-$ )を用いて除去し、減圧乾固後、2mlの0.01N HCl (pH2.2)に溶解し分析試料とした。また血漿については、血漿0.5mlに対し0.1N HClを0.8ml加えpH 2.2とし、アミコンセントリフローCF-25 (Amicon Corp.)を用い限外濾過法により除蛋白し、これを分析用試料とした。分析用試料の0.8mlをグアニジノ化合物の定量分析に用い、残りを $^{15}\text{N}$ 濃度(以下 $^{15}\text{N}$  atom %と表示する)測定に用いた。なお、分析するまで $-20^{\circ}\text{C}$ に凍結保存した。

### 3. グアニジノ化合物定量法

各試料のグアニジノ化合物の定量分析は、Moriらの方法<sup>22)</sup>に準拠し、9, 10-phenanthrenequinoneを用いたグアニジノ化合物分析装置G-520(日本分光工業)にて行った。

### 4. $^{15}\text{N}$ atom % の測定法

$^{15}\text{N}$  atom % の測定は、発光分光法により行った。 $^{15}\text{N}$  atom % 測定用試料をグアニジノ化合物分析装置G-520を用いて各グアニジノ化合物分画を得た(Fig. 1)。なお、単一のグアニジノ化合物のみ分画されることを各分画の再クロマトグラフィーにより確認した。これらのグアニジノ化合物分画のうち、urea および MG 分画は、micro-kjeldahl 法<sup>23)</sup>にて硫酸アンモニウムとして回収し(Kjeldahl 蒸留に際しては、各試料間に空蒸留を2回行い、前試料による汚染を防いだ)、さらにConwayの拡散法を応用し<sup>21)</sup>、0.1N HClに $0.5\mu\text{g}$  窒素/ $\mu\text{l}$ となるように $40^{\circ}\text{C}$ 、75時間濃縮した。これを外径2mm、長さ1cmのガラス管(pyrex<sup>®</sup>, 標準管)に吸収させ、乾燥した。次いで、これを外径4mm、長さ20~25cmのガラス管(pyrex<sup>®</sup>, 標準管)に入れ、窒素ガス化試薬( $\text{CuO}+\text{Cu}_2\text{O}$ とあらかじめ $900^{\circ}\text{C}$ 、3時間以上加熱し放冷したCaO粉末をよ

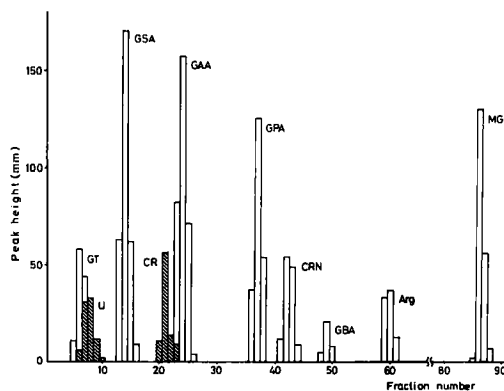


Fig. 1. Fractionation pattern of guanidino compounds by high performance liquid chromatography. GT: Taurocyamine, U: Urea, GSA: Guanidosuccinic acid, CR: Creatinine, GAA: Guanidoacetic acid, GPA: Guanidinopropionic acid, CRN: Creatinine, GBA: Guanidinobutyric acid, Arg: Arginine, MG: Methylguanidine.

く混合し、加圧整形したもの)と共に放電管作成装置(大内理化工業)にて $10^{-3}$  Torr以下に減圧し、Xe:He=2:98の混合ガスを約10 Torr導入し封管した。この際、試料量に応じて放電管の長さを調節した。次いで、これを $560^{\circ}\text{C}$ 、30分間加熱し窒素ガス化させた(Fig. 2-A)。

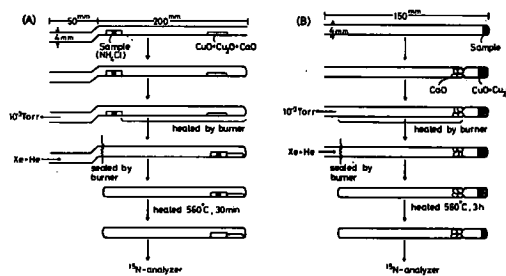


Fig. 2. The method for preparation of discharge tubes.

他のグアニジノ化合物分画は、少量のAmberlite CG-120 ( $\text{H}^+$ )を用いて脱塩し、減圧乾固後適量の蒸留水に溶解し、外径4mm、長さ15cmの一端を閉じたガラス管(pyrex<sup>®</sup>, 標準管)に注入し、凍結乾燥した。これに粉末状 $\text{CuO}+\text{Cu}_2\text{O}$ を加え、次いでCaO( $900^{\circ}\text{C}$ で熱し加圧整形したもの)を入れ、上記同様に減圧し、

混合ガスを導入し封管した。この際にも試料量に応じ放電管の長さを調節した。これを560℃、3時間加熱し窒素ガス化させた (Fig. 2-B)。以上のように作成した各放電管を放冷後、N-150型 <sup>15</sup>N 分析装置 (日本分光工業) にて <sup>15</sup>N atom % を測定した。その一例を Fig. 3 に示す。

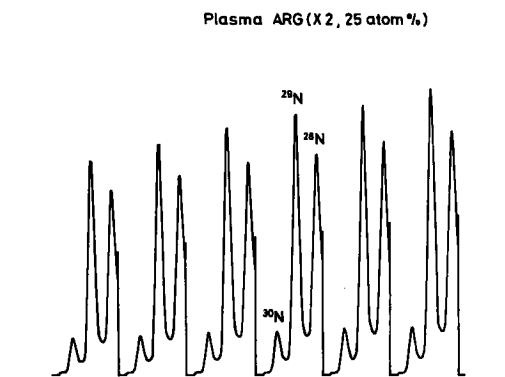


Fig. 3. An example of <sup>15</sup>N-analysis (plasma ARG, 1 min after administration).

本実験では、各グアニジノ化合物について4~6例測定した。結果には、測定値から natural abundance (<sup>15</sup>N の場合は0.37 atom %) を差し引いた値 (atom % excess) を示した。なお、0.1 atom % excess 以上の取り込みを有意な取り込みと判定した。

また、本実験における同一試料の <sup>15</sup>N atom % の誤差は5%以内であった。有意差検定は、t-検定を用いた。

## 結 果

血漿、脳、腎および肝における <sup>15</sup>N-ARG 投与後の遊離 ARG 量の変化を測定した (Fig. 4)。血漿中遊離 ARG 量は投与1分後に对照群の約2倍に達し、その後急減し3時間後には对照群との差は認められなかった (Fig. 4-A)。脳においては、遊離 ARG 量は投与1時間後に对照群に対して有意な増加が認められたが、3時間後には对照群値まで戻っていることが認められた (Fig. 4-B)。腎においては、遊離 ARG 量は血漿と同様な変化が認められ、投与1分後には対

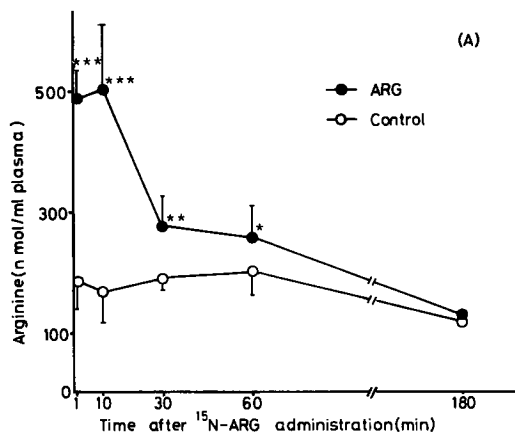


Fig. 4-A. The change of arginine level in plasma after <sup>15</sup>N-ARG administration (Mean  $\pm$  S.D., N = 5). \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01, \*\*\*: P < 0.001

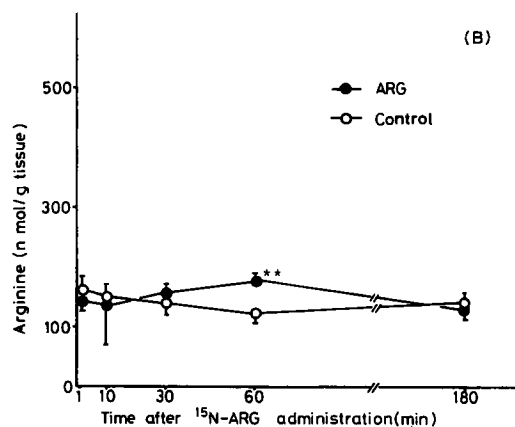


Fig. 4-B. The change of arginine level in brain after <sup>15</sup>N-ARG administration (Mean  $\pm$  S.D., N = 5). \*\*: P < 0.01

照群の約2倍に達し、その後急減し、1時間後には对照群との差は認められなかった (Fig. 4-C)。肝においては、遊離 ARG 量は、血漿、脳および腎にくらべ約1/10にすぎず、投与1分後にわずかに増加するのが認められたが、それ以後は对照群との間に差は認められなかった (Fig. 4-D)。本実験と平行して血漿、脳、腎および肝における ARG 以外の遊離グアニジノ化合物量を測定したが、いずれのグアニジノ化合物とも <sup>15</sup>N-ARG 投与群と对照群との間に有意な差は認められなかった。つぎに <sup>15</sup>N-ARG 投

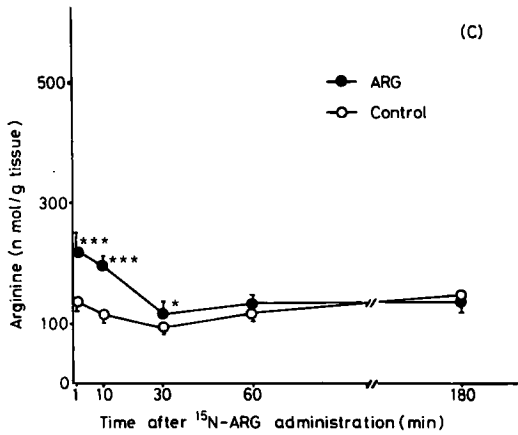


Fig. 4-C. The change of arginine level in kidney after  $^{15}\text{N}$ -ARG administration (Mean  $\pm$  S.D.,  $N=5$ ).  
\*:  $P<0.05$  \*\*\*:  $P<0.001$

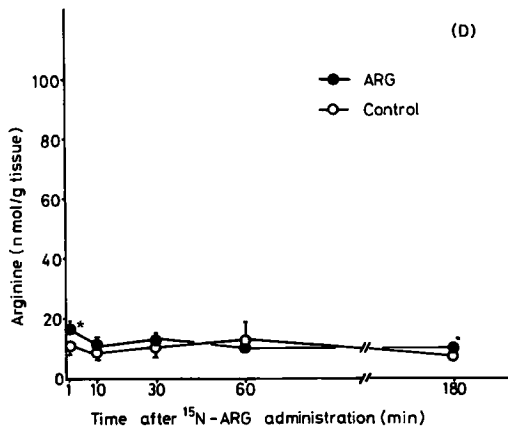


Fig. 4-D. The change of arginine level in liver after  $^{15}\text{N}$ -ARG administration (Mean  $\pm$  S.D.,  $N=5$ ). \*:  $P<0.05$

与後の血漿、脳、腎および肝におけるグアニジノ化合物中の  $^{15}\text{N}$  atom % excess を測定した。

血漿中 ARG, GAA, CR, urea および CRN について  $^{15}\text{N}$  atom % を測定し、これらグアニジノ化合物の  $^{15}\text{N}$  atom % excess の時間に対する変化を Fig. 5 に示す。ARG の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は、投与1分後に最高値を示し、60分後まで急減し、その後は徐々に減少した。このように変化は2相性で、初期相および第2相の  $^{15}\text{N}$ -ARG の半減期は約18分と約85分であった。腹腔内へ投与した  $^{15}\text{N}$ -ARG の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は47 atom % excess であり、1分後にはすでに約2倍に希釈されて

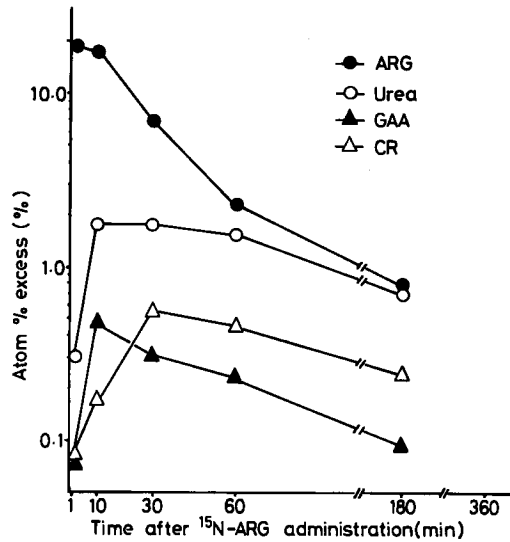


Fig. 5. The  $^{15}\text{N}$  enrichment in arginine (ARG), creatine (CR), urea (Urea), and guanidinoacetic acid (GAA) in plasma after  $^{15}\text{N}$ -ARG administration (Mean,  $N=4-6$ )

いた。GAA および CR へは、投与10分後に有意な  $^{15}\text{N}$  の取り込みが認められた。GAA の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は以後減少して行くが、CR の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は増加し、投与30分後に最高値を示し以後徐々に減少した。この減少に際して、 $^{15}\text{N}$ -GAA および  $^{15}\text{N}$ -CR の半減期は46分および約20分であった。また urea へは投与1分後に有意な  $^{15}\text{N}$  の取り込みが認められ、投与10分後に最高値を示し、以後徐々に減少した。他方 CRN への  $^{15}\text{N}$  の取り込みは認められなかった。

脳内グアニジノ化合物への  $^{15}\text{N}$  の取り込みの時間に対する変化を Fig. 6 に示す。脳内グアニジノ化合物の  $^{15}\text{N}$  atom % は、ARG, GAA, urea, CRN および CR について測定した。ARG の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は投与10分後に最高値を示し、30分後以後減少した。GAA へは投与10分後に有意に取り込まれ、urea へは投与1分後に有意な取り込みが認められた。GAA および urea の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は投与60分後に最高値となり以後減少した。CRN への  $^{15}\text{N}$  の取り込みは認められなかった。また、CR については、バックグラウンドが高く測定できなかった。

腎内グアニジノ化合物への  $^{15}\text{N}$  の取り込みの時間に対する変化を Fig. 7 に示す。腎内グア

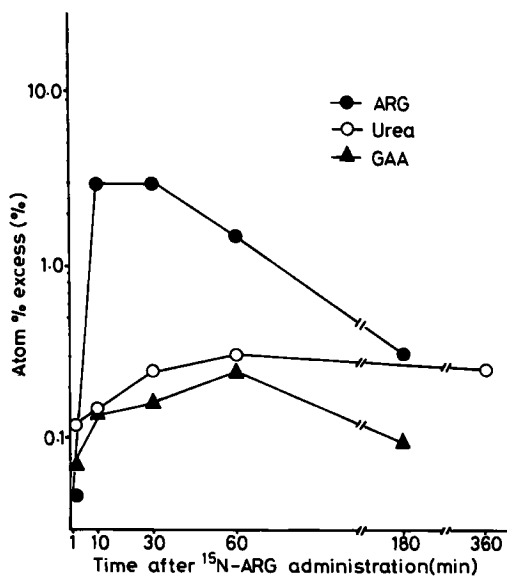


Fig. 6. The change of <sup>15</sup>N enrichment in arginine (ARG), urea (Urea), and guanidinoacetic acid (GAA) in brain after <sup>15</sup>N-ARG administration (Mean, N=4-6).

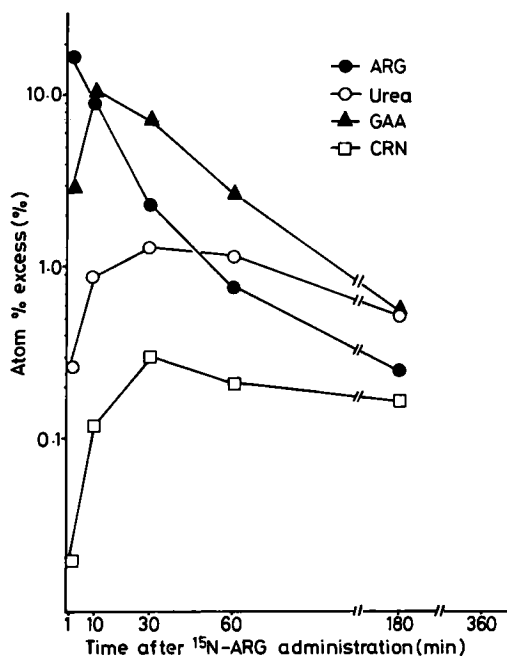


Fig. 7. The change of <sup>15</sup>N enrichment in arginine (ARG), urea (Urea), guanidinoacetic acid (GAA) and creatinine (CRN) in kidney after <sup>15</sup>N-ARG administration (Mean, N=4-6).

ニジノ化合物の <sup>15</sup>N atom %は, ARG, GAA, CRN および urea について測定した. ARG の <sup>15</sup>N atom % excess は投与 1 分後に最高値を示し, 以後急減した. ARG の 1 分後の <sup>15</sup>N atom % excess は, 投与 <sup>15</sup>N-ARG の約 2 倍に稀釈され, 血漿同様に減少は 2 相性を示し, 初期相および第 2 相の各々の <sup>15</sup>N-ARG の半減期は約 10 分および約 70 分であった. GAA への取り込みはすみやかにわれ, 10 分後に最高値を示し以後急減した. <sup>15</sup>N-GAA の半減期は約 20 分および約 50 分と ARG 同様の 2 相性の変化を示した. また, urea には投与 1 分後に有意な <sup>15</sup>N の取り込みが認められ, 30 分後に最高値となり以後徐々に減少した.

肝内グアニジノ化合物への <sup>15</sup>N の取り込みの時間に対する変化を Fig. 8 に示す. 肝内グアニジノ化合物の <sup>15</sup>N atom %は, ARG, GAA, CR (Fig. 8-A), urea, MG, CRN, GSA (Fig. 8-B), GPA および GBA について測定した. ARG の <sup>15</sup>N atom % excess は投与 1 分後に最高値を示し, その後急減した. この減少速度は血漿および腎にくらべはるかに速く, 血漿および腎同様 2 相性の変化が見られた. 初期相ならびに第 2 相の <sup>15</sup>N-ARG の半減期は, それぞれ約 3 分と約 60 分

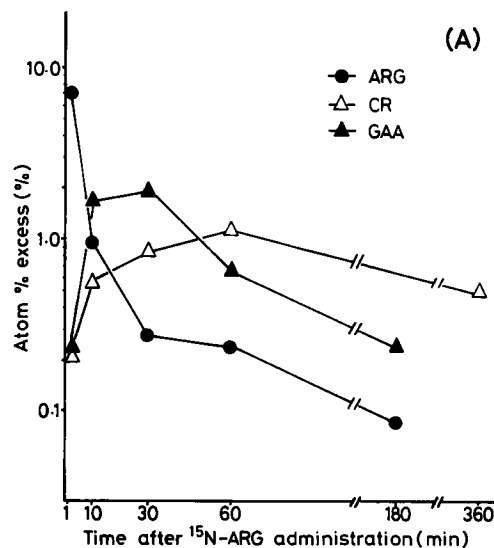


Fig. 8-A. The change of <sup>15</sup>N enrichment in arginine (ARG), guanidinoacetic acid (GAA) and ceatine (CR) in liver after <sup>15</sup>N-ARG administration (Mean, N=4-6).

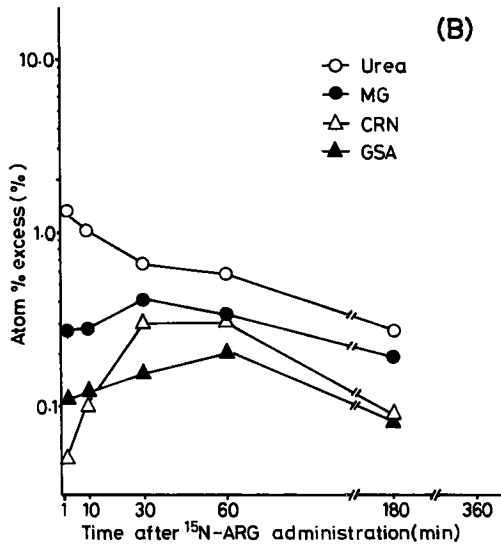


Fig 8-B. The change of  $^{15}\text{N}$  enrichment in urea (Urea), methylguanidine (MG), creatinine (CRN) and guanidinosuccinic acid (GSA) in liver after  $^{15}\text{N}$ -ARG administration (Mean. N=4-6).

であった。GAA および CR へは投与1分後に有意な  $^{15}\text{N}$  の取り込みが認められた。GAA の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は10~30分後に最高値を示し以後減少した。また CR の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は、60分後に最高値となり、その時の値は GAA の値よりも高く、以後徐々に減少した。Urea の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は、脳、腎および血漿とは異なり、1分後に最高値を示し以後徐々に減少した。MG には投与1分後に有意な  $^{15}\text{N}$  の取り込みが見られ、30分後に最高値を示し以後徐々に減少した。CRN には投与30分後に有意な  $^{15}\text{N}$  の取り込みが見られ、30~60分後に最高値を示し以後徐々に減少した。GSA へは投与1分後に有意な  $^{15}\text{N}$  の取り込みが認められ、60分後に最高値を示し以後徐々に減少した。しかし、GPA および GB-A への  $^{15}\text{N}$  の取り込みは認められなかった。

### 考 察

これまで、 $^{15}\text{N}$  atom % は主として質量分析法で測定されてきたが、さらに微量分析の可能な発光分光法が開発された<sup>21),24),25)</sup>。この方法は、硬質ガラス管(例えば pyrex®)あるいは石英ガラス管に窒素ガスを封入し高周波で励起させ、

その発光スペクトルの分析により  $^{15}\text{N}$  atom % を測定するものである。著者は発光分光法のうち Dumas-希ガス法<sup>21)</sup>(窒素ガス以外に Xe, He などの希ガスを同時に封入し、発光の安定化と発光時間を延長させる)を用いたが、この方法によると窒素量にして  $0.2\ \mu\text{g}$  程度であっても分析可能であるとされている<sup>21)</sup>。この方法を用いる場合注意しなければならないことは、 $^{14}\text{N}$  による稀釈はもちろんのことであるが、その他、 $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  などが混入すると、バックグラウンドが高くなり、分光精度を著しく低下させるため、これらを完全に除去することである<sup>21)</sup>。特に、 $^{15}\text{N}$  atom % の低い試料については注意が必要である。近年、この方法はアミノ酸の代謝研究など種々の分野に応用されている<sup>21)</sup>。本研究では、ARG のアミジン基の  $^{15}\text{N}$  の諸種グアニジノ化合物への取り込みからマウス体内グアニジノ化合物代謝の動態について検討した。

マウスの腹腔内へ投与された  $^{15}\text{N}$ -ARG は、すみやかに吸収され諸臓器および体液中に分布するが、本実験では ARG を投与しても ARG 以外のグアニジノ化合物に量的変化を認めず、ARG は生体内で活発に代謝されていることが推定される。しかし、ARG を3日間連続投与した場合や<sup>26)</sup>、さらに長期間経口投与した場合<sup>27)</sup>には ARG 以外のグアニジノ化合物にも変化が認められており、長期投与した場合には、ARG からグアニジノ化合物への代謝に変化が生じると考えられ、グアニジノ化合物の動きも活発で、1回投与のみでは量的変化にまで至らないと推定される。

本実験では  $^{15}\text{N}$ -ARG の半減期は、約18分であったが、6~8分という報告もある<sup>28)</sup>。この違いは、本実験では  $^{15}\text{N}$ -ARG の投与量が比較的多いため、再循環されたものもあり、実際の測定半減期の値が長くなったものと考えられる。

脳においては、ARG の  $^{15}\text{N}$  atom % excess は肝および腎に比べてやや遅れて最高値になること、さらに投与1時間後に脳内遊離 ARG 量が有意に増加することから、脳への  $^{15}\text{N}$ -ARG の取り込みが示唆される。脳への ARG の取り込みは、血液-脳関門に carrier を介した能動輸送系が知られており<sup>29)</sup>、脳内へは容易に取り込まれず、

ある程度制御されていると考えられる。

腎においては、ARG の変化は非常に迅速で、ほとんど蓄積されず GAA 合成や、蛋白質合成に用いられるか、あるいは腎外へ搬出されるものと推定される。このことから、腎の ARG の代謝回転速度は非常に速いと推定される。

肝での <sup>15</sup>N-ARG の半減期は著明に短かく(約 3 分)、外部から取り込まれた ARG は、すみやかに arginase (EC 3.5.3.1.)によって urea に代謝されることが推定され、肝 urea の <sup>15</sup>N atom % excess が他臓器と異なり、1 分後に最高値を示すことからこのことがうかがえる。さらに、ARG を投与しても肝の遊離 ARG 量は、わずかに増加するのみであることから、肝の ARG プールは小さく且つ非常に代謝回転速度が速いと考えられる。

脳でのグアニジノ化合物の代謝は全く不明である。脳には活性は低いが amidinotransferase 活性が証明されており<sup>30),31)</sup>、GAA および GBA 生成も報告されている<sup>31)</sup>。しかし、脳内に存在する GAA および urea の <sup>15</sup>N が脳に取り込まれた ARG に由来するのか、あるいは、血中より血液-脳関門を通して取り込まれた GAA および urea を測定したのかは、本実験のみからは明らかではない。なぜならば、血中の <sup>15</sup>N atom % excess よりも低く、ある程度血中の ARG, urea, および GAA の変化を反映しているものと推定されるからである。

GAA および CR の代謝に関しては、Bloch らにより <sup>15</sup>N-ARG を用い詳細な検討がなされ<sup>32)</sup>、また Walker らも GAA 合成酵素である Arg-Gly amidinotransferase (EC 2.1.4.1.)について詳細な報告をしている<sup>12),33)</sup>。しかし、Arg-Gly amidinotransferase は主に腎に存在し<sup>34)</sup>、CR 合成酵素である GAA-methyltransferase (EC 2.1.1.2.)は主に肝に分布することが報告されており<sup>35)</sup>、肝-腎相関の 1 つの例として近年注目されている<sup>36)</sup>。本実験の血漿、腎および肝の GAA, CR の <sup>15</sup>N atom % excess の時間経過に伴った変化をまとめて Fig. 9 に示す。これらの変化は非常に迅速で 1 分後にはすでに腎 GAA, 肝 GAA および CR に有意な <sup>15</sup>N の取り込みが見られ、腎 GAA の <sup>15</sup>N atom % excess は、10

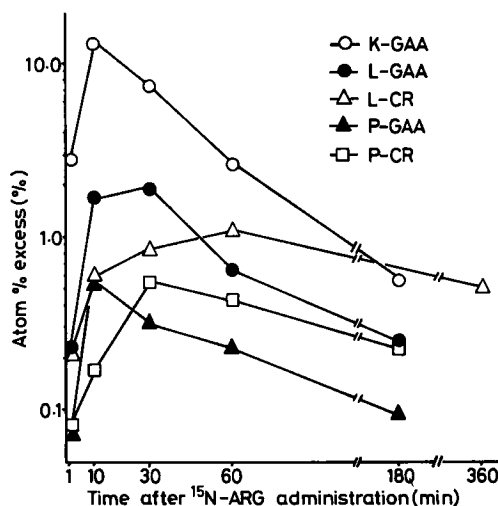


Fig. 9. The change of <sup>15</sup>N enrichment in guanidinoacetic acid (GAA) and creatine (CR) after <sup>15</sup>N-ARG

K-GAA : kidney-GAA  
L-GAA : liver-GAA  
P-GAA : plasma-GAA  
L-CR : liver-CR  
P-CR : plasma-CR

分後に約13 atom % excessにも達した。この上昇に伴い血漿 GAA および腎 GAA の <sup>15</sup>N atom % excess は、その後急減したが、肝 GAA および CR はさらに上昇し、この変化に伴って血漿 CR の <sup>15</sup>N atom % excess が上昇した。このことは、腎で合成された GAA が血液によって肝へ運ばれ肝で CR が合成され、その CR が血中に出、諸臓器へ分布するという可能性を示唆している (Fig. 10)。腎における GAA の合成は非常に活発であることがうかがえ、ARG から urea が生成されるよりも GAA 合成にその代謝が傾いていることが示唆され、腎が生体内 GAA 合成の主臓器であることが示唆される。このことは、肝と比較してみると興味深い。

GSA は、1963年 Bonas ら<sup>37),38)</sup>が尿毒症患者尿中より最初に分離・同定して以来 uremic toxin の 1 つとして注目され、尿毒症における病態代謝と関連して多くの報告がある<sup>7),39)</sup>。また近年、ヒト正常尿などにも存在することが報告されている<sup>3),7)</sup>。本実験においては、GSA に有意な <sup>15</sup>N の取り込みが認められることから、GSA に ARG のアミジン基に由来する N が存在

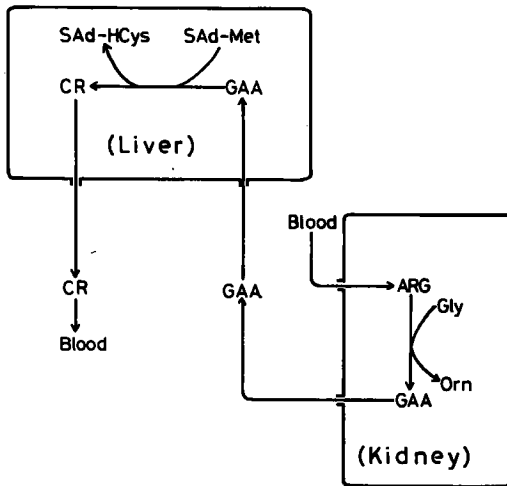


Fig. 10. The movement of  $^{15}\text{N}$  of amidino group of arginine to kidney-guanidinoacetic acid (GAA) and liver-creatine (CR). ARG: arginine, Gly: glycine, Orn: ornithine, SAd-HCys: S-adenosylhomocysteine, SAd-Met: S-adenosylmethionine.

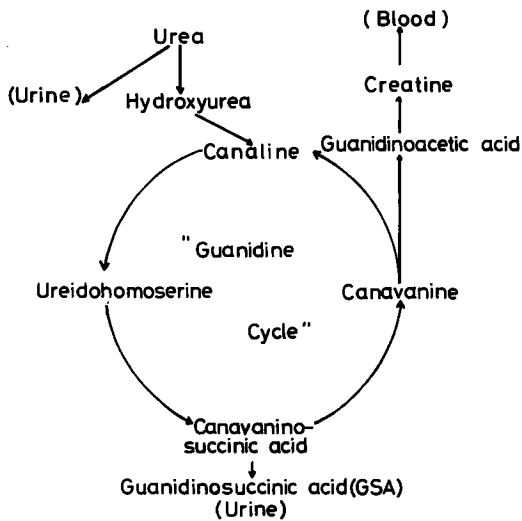


Fig. 11. Guanidine cycle presented by Cohen, B.D.<sup>18)</sup>

することが示唆される。1968年 Cohen ら<sup>40)</sup>は、Arg-Asp amidinotransferase による合成経路を推定したが、近年、その経路については否定的な知見が得られ<sup>7),16),19)</sup>、“guanidine cycle” (Fig. 11)により生成されることが提示され注目を集めている<sup>7),18),41)</sup>。本実験によっては、その詳細な経路を明確化しえなかったが、比較的短

時間のうちに ARG のアミジン基の N が GSA に取り込まれて行くことが推定される。GSA は正常成分としては量的に少ない部類に入る Guanidino 化合物であり、その代謝の検討は比較的困難である。しかし、尿毒症発症に伴い爆発的に増加するが、その際の生成過程は正常時の場合とは異なる可能性もあり、尿毒症時における GSA の代謝研究から重要な知見が得られることが期待され、今後の検討が待たれる。

MG の毒性は良く知られており<sup>3),7)</sup>、けいれん発作誘発作用をもつことなど、その生理学的作用について多くの報告がある<sup>7),9),42)</sup>。また、その代謝に関しても種々の報告があり、これらには CRN からの生成<sup>19),43)</sup>とか、ARG からの直接生成<sup>7)</sup>や、また methylamine へのアミジン基転移過程<sup>44)</sup>などがある。現在、これらのうち CRN からの生成説が支持されているが、この反応を触媒する酵素は証明されていない。本実験では、肝 MG への  $^{15}\text{N}$  の取り込みは非常に速く、また CRN より  $^{15}\text{N}$  atom % excess が高く、MG は ARG より直接合成される可能性が示唆される。MG は GSA と同様に正常成分としては微量で、また尿毒症時に爆発的に増加することから、尿毒症時におけるその代謝の詳細な検討が待たれる。

GBA は、昆虫、哺乳動物などに存在することが報告され<sup>45)</sup>、その後 pentamethylenetetrazole によりけいれん発作を誘発されたウサギ脳から分離・同定されている<sup>46)</sup>。また GPA は肝に存在することが報告されている<sup>47)</sup>。GBA および GPA の代謝経路としては、無脊椎動物では ARG の酸化過程が知られているが<sup>10)</sup>、哺乳動物では  $\gamma$ -aminobutyric acid および  $\beta$ -alanine へのアミジン基転移過程が知られている<sup>48)</sup>。本実験では、GBA および GPA へは ARG の  $^{15}\text{N}$  は取り込まれず、ARG からの生成は否定的であるが、稀釈度が高いか、あるいは合成活性が非常に低いため検出できなかった可能性もある。Perez らは、guanidino- $^{14}\text{C}$ -ARG を用い、その GBA および GPA への取り込みを検討し、GBA にわずか  $^{14}\text{C}$  を検出したが、GPA に検出できないことを報告している<sup>49)</sup>。GPA に関しては、本実験結果と一致し、GBA および GPA



について今後の詳細な検討が必要と思われる。

このように、ARG は生体内でグアニジノ基が de novo 合成される唯一のアミノ酸であると考えられ、そのアミジン基が種々のグアニジノ化合物の合成に利用されるものと考えられる。最近、ARG は、ネコおよび幼若ラットにおいては必須アミノ酸の1つと考えられており<sup>50)</sup>、蛋白質合成に利用されるだけでなく、他の代謝、すなわち urea cycle やグアニジノ化合物代謝を介し、生理学的に重要な機能を発揮していると考えられる。

グアニジノ化合物の生体内での機能およびその代謝に関する研究は、まだ緒についたばかりで様々な疑問点を内包している。すなわち、生体内で重要な機能を有する化合物であるのか、あるいは窒素代謝の終末産物であるのかなど今だ不明な点が多い。しかし、近年グアニジノ化合物の微量分析が可能になり、これら諸問題も今後解決されることが期待される。

この分野における<sup>15</sup>Nの利用は、今後さらに発展すると思われるが、現在のところ放射性同位体と比べると、操作が幾分煩雑であり、その改善が待たれる。

## 結 論

<sup>15</sup>N-ARG をマウスの腹腔内に投与し、<sup>15</sup>N のグアニジノ化合物への取り込みを検討し、以下の結果を得た (Fig. 12)。

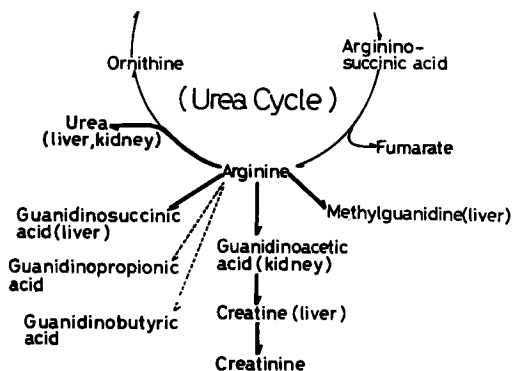


Fig. 12. The movement of <sup>15</sup>N of amidino group in arginine to guanidino compounds examined.

1. 投与された <sup>15</sup>N-ARG は、すみやかにマウス体内に分布し、生体内 ARG によって高度に稀釈されることが認められた。
2. 投与された <sup>15</sup>N-ARG は、腎および肝では、すみやかに代謝され、腎においては GAA 合成に肝においては urea 合成に主として利用されることが認められた。
3. 脳への <sup>15</sup>N-ARG の取り込み速度は腎および肝よりも遅いことが認められ、血液-脳関門を ARG が容易に透過せず、脳内への取り込みは制御されていることが示唆された。
4. 腎における GAA の活発な合成と肝での CR の活発な合成が認められ、GAA と CR の動態が明らかとなった。
5. GSA, MG の生合成経路に ARG が関与していることが認められ、特に MG へはすみやかに <sup>15</sup>N が取り込まれ、ARG から直接生成される可能性が示唆された。

終わりにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授ならびに御指導御協力いただきました片山泰人講師、渡辺洋子助手に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたり終始快く御協力下さいました研究室の皆様へ心から御礼申し上げます。

## 文 献

1. Schluzer, E. und Steiger, E.: Ueber einen neuen stickstoffhaltigen Bestandtheil der Keimlinge von *Lupinus luteus*. *Ber. D. Deutsch. Chem. Ges.* **19**, 1177—1180, 1886.
2. Hedin, S.G.: Eine methode, das lysin zu isoliren, nebst einigen bemerkungen uber das Lysatinin. *Physiol. Chem.* **21**, 297—305, 1895.
3. 森 昭胤: 天然界における Guanidino 化合物の存在とその測定法. *臨床化学* **9**, 232—246, 1980.
4. Kirsch, G.E., Yeh, J.Z., Farley, J.M. and Narahashi, T.: Interaction of n-alkylguanidines with the sodium channels of squid axon membrane. *J. Gen. Physiol.* **76**, 315—335, 1980.
5. Matsumoto, M., Yokoi, I., Takeuchi, H. and Mori, A.: Effects of guanidido compounds on the electrical activity of giant neurones identified in subesophageal ganglia of the african giant snail, *Achatina fulica* Ferrussac. *Comp. Biochem. Physiol.* **54C**, 123—125, 1976.
6. Alsever, R.N., Georg, R.H. and Sussman, K.E.: Stimulation of insuline secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. *Endocrinology* **86**, 332—336, 1970.
7. 安東明夫, 中田一洋, 椿原美治, 田中敏博, 阿部 裕: 尿毒症の病態と Uremic Toxin-Guanidine 誘導体. *最新医学* **31**, 1695—1706, 1976.
8. Mizuno, A., Mukawa, J., Kobayashi, K. and Mori, A.: Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits. *IRCS Med. Sci.* **3**, 385, 1975.
9. Matsumoto, M., Kobayashi, K., Kishikawa, H. and Mori, A.: Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits. *IRCS Med. Sci.* **4**, 65, 1976.
10. 湯川 卓: Arginine 及びその他の Guanido- 化合物に関する研究 第1報「につぼんざりがに」“Cambaloides Japonicus” 浸出液中の Guanido- 化合物について. *大阪医科大学雑誌* **18**, 551—557, 1958.
11. Robin, Y.: Metabolism of arginine in invertebrates: relation to urea cycle and to other guanidino derivatives. In *Urea Cycle Disease*, ed. A. Lowenthal, A. Mori and B. Marescau, Plenum Press, New York, pp. 407—417, 1983.
12. Walker, J.B.: Metabolic control of creatine biosynthesis II. Restriction of transaminase activity following creatine repression. *J. Biol. Chem.* **236**, 493—498, 1961.
13. Ratner, S. and Rochovansky, O.: Biosynthesis of guanidinoacetic acid. I. Purification and properties of transaminase. *Arch. Biochem. Biophys.* **63**, 277—295, 1956.
14. 大倉洋甫, 甲斐雅亮: 生体グアニジン化合物の液体クロマトグラフィー. *化学の領域*, 増刊 **133**, 113—128, 1981.
15. Mori, A., Ichimura, T. and Matsumoto, H.: Gas chromatography-mass spectrometry of guanidino compounds in brain. *Anal. Biochem.* **89**, 393—399, 1978.
16. Marescau, B., Lowenthal, A., Terheggen, H.G., Esmans, E. and Alderweireldt, F.: Guanidino compounds in hyperargininemia. In *Urea Cycle Disease*, ed. A. Lowenthal, A. Mori, B. Marescau, Plenum Press, New York, pp. 427—434, 1983.
17. Mori, A., Watanabe, Y., Shindo, S., Akagi, M. and Hiramatsu, M.:  $\alpha$ -Guanidinoglutaric acid and epilepsy. In *Urea Cycle Disease*, ed. A. Lowenthal, A. Mori and B. Marescau, Plenum Press, New York, pp. 419—426, 1983.
18. Cohen, B.D. and Patel, H.: Guanidinosuccinic acid and the alternate urea cycle. In *Urea Cycle Disease*, ed. A. Lowenthal, A. Mori and B. Marescau, Plenum Press, New York, pp. 435—441, 1983.
19. Mikami, M., Orita, Y., Ando, A., Fujii, M., Kikuchi, T., Yoshihara, K., Okada, A. and Abe, H.: Metabolic pathway of guanidino compounds in chronic renal failure. In *Urea Cycle Disease*, ed. A. Lowen-

- thal, A. Mori and B. Marescau, Plenum Press, New York, pp. 449—457, 1983.
20. Schoenheimer, R.: *The Dynamic State of Body Constituents*, Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 1942.
  21. 三井進午, 中根良平, 吉川春寿, 熊沢喜久雄編: 重窒素利用研究法, 学会出版センター, 東京, 1980.
  22. Mori, A., Katayama, Y., Higashidate, S. and Kimura, S.: Fluorometrical analysis of guanidino compounds in mouse brain. *J. Neurochem.* **32**, 643—644, 1979.
  23. 山川民夫編: 生体構成成分 I, 医化学実験法講座, 中山書店, 東京, pp. 170—172, 1971.
  24. Kano, H., Yoneyama, T. and Kumazawa, K.: Emmission spectrometric <sup>15</sup>N analysis of the amino acids and amides in plant tissues separated by thin layer chromatography. *Anal. Biochem.* **67**, 327—331, 1975.
  25. 山室成一, 河野通佳: 発光分光分析法による重窒素定量法の改良. 北陸農試報, **20**, 45—57, 1977.
  26. 片山泰人, 進藤省一郎, 沢木 惇, 渡辺洋子, 平松千明, 森 昭胤: Taurocyamine の生合成に関する研究. 含硫アミノ酸, **2**, 297—304, 1979.
  27. 洲脇貞吉: 実験的高アルギニン血症ウサギに関する研究 第1編, アルギニン大量負荷ウサギの血清, 尿および脳組織中のアミノ酸並びにグアニジノ化合物について. 岡山医学会雑誌 **90**, 1093—1104, 1978.
  28. Rogers, Q. R., Freedland, R.A. and Symmons, R.A.: In vivo synthesis and utilization of arginine in the rat. *Am. J. Physiol.* **233**, 236—240, 1972.
  29. Pardridge, W.M. and Oldendorf, W.H.: Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.* **401**, 128—136, 1975.
  30. 喜多富太郎, 神谷大雄: 脳トランスアミジネースについて—中枢抑制剤の薬理学的研究—Ⅳ. 日薬理誌 **58**, 411—416, 1962.
  31. 沢井愛次郎, 森 昭胤, 陣内伝之助:  $\gamma$ -グアニジノ酪酸の代謝について. 条件反射 **110**, 51—57, 1970.
  32. Bloch, K. and Schoenheimer, R.: The biological precursors of creatine. *J. Biol. Chem.* **138**, 167—194, 1941.
  33. Walker, J.B.: Studies on the mechanism of action of kidney transaminidase. *J. Biol. Chem.* **224**, 57—66, 1957.
  34. Borsook, H. and Dubnoff, J. W.: The formation of glycoxyamine in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **138**, 389—403, 1941.
  35. Cantoni, G.L. and Vignos, P.J., Jr.: Enzymatic mechanism of creatine synthesis. *J. Biol. Chem.* **209**, 647—659, 1954.
  36. Funahashi, M., Kato, H., Shiosaka, S. and Nakagawa, H.: Formation of arginine and guanidinoacetic acid in the kidney *in vivo*. Their relations with the liver and their regulation. *J. Biochem. (Tokyo)* **89**, 1347—1356, 1981.
  37. Bonas, J.E., Cohen, B.D. and Natelson, S.: Sepalation and estimation of certain guanidino compounds. Application to human urine. *Microchem. J.* **7**, 63—77, 1963.
  38. Natelson, S., Stein, I.M. and Bonas, J.E.: Improvements in the method of separation of guanidino organic acids by column chromatography. Isolation and identification of guanidinosuccinic acid from human urine. *Microchem. J.* **8**, 371—382, 1964.
  39. Cohen, B.D.: Guanidinosuccinic acid in uremia. *Arch. Intern. Med.* **26**, 846—850, 1970.
  40. Cohen, B.D., Stein, I.M. and Bonas, J.E.: Guanidinosuccinic aciduria in uremia. A possible alternate pathway for urea synthesis. *Am. J. Med.* **45**, 63—68, 1968.
  41. Natelson, S., Koller, A., Tseng, H-Yu and Dods, R.F.: Canaline carbamoyltransferase in human liver as part of a metabolic cycle in which guanidino compounds are formed. *Clin. Chem.* **23**, 960—966, 1977.

42. 松本路子, 藤原正昭, 森 昭胤: ウサギ脳アセチルコリン系酵素に及ぼすグアニジノ化合物の影響. 脳研究会誌 3, 128—129, 1977.
43. Perez, G. and Faluotico, R.: Creatinine: A precursor of methylguanidine. *Experientia* 29, 1473—1474, 1973.
44. 横井 馨: Arginine 及びその他の Guanido- 化合物に関する研究, 豚及びモルモット腎臓 Transamidinase に依る Methylguanidine 生成について. 大阪医科大学雑誌 21, 123—129, 1962.
45. Irreverre, F., Evans, R.L., Hayden, A.R. and Silber, R.: Occurrence of gamma-guanidinobutyric acid. *Nature* 180, 704—705, 1957.
46. Jinnai, D., Sawai, A. and Mori, A.:  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* 212, 617, 1966.
47. Rosenberg, H.: The occurrence of guanidinoacetic acid and other substituted guanidines in mammalian liver. *Biochem. J.* 72, 582—585, 1959.
48. 下山 誠: Arginine 及びその他の Guanido- 化合物に関する研究 第10報 家兎及び豚腎臓の Transamidinase による  $\gamma$ -Guanido- 酪酸並びに  $\beta$ -Guanidopropion- 酸の Amidine 転移反応. 大阪医科大学雑誌 19, 943—950, 1960.
49. Perez, G.O., Rietberg, B., Owens, B. and Schiff, E.R.: Effect of acute uremia on arginine metabolism and urea and guanidino acid production by perfused liver. *Pflugers Arch.* 372, 275—278, 1978.
50. Morris, J.G. and Rogers, Q.R.: Arginine: An essential amino acid for the cat. *J. Nutr.* 108, 1944—1953, 1978.

**The metabolism of L-(amidino-<sup>15</sup>N)-arginine to guanidino compounds.****Shoichiro SHINDO****Institute for Neurobiol., Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan**

The metabolism of guanidino compounds was determined by analysing the incorporation of <sup>15</sup>N from L-(amidino-<sup>15</sup>N)-arginine (<sup>15</sup>N-ARG) into guanidino compounds. <sup>15</sup>N enrichment of guanidino compounds in the plasma, brain, kidney and liver was determined spectroscopically.

<sup>15</sup>N-ARG administered intraperitoneally to mice was rapidly distributed to the plasma, kidney and liver, but was highly diluted by ordinary arginine (ARG) in both the plasma and organs. It was found that the rate of uptake of <sup>15</sup>N-ARG into the brain was slower than into the kidney or liver, which suggests that ARG could not pass easily through, or was regulated by the blood-brain barrier.

It was also found that <sup>15</sup>N-ARG was metabolized mainly to guanidinoacetic acid (GAA) in the kidney and to urea in the liver. It was further suggested that creatine was synthesized actively in the liver from GAA which was synthesized in the kidney, and then creatine was distributed to the plasma and other organs.

The <sup>15</sup>N of <sup>15</sup>N-ARG was incorporated significantly into guanidinosuccinic acid (GSA) and methylguanidine (MG), which indicates that ARG is involved in the synthesis of MG and GSA. MG might be synthesized directly from ARG in the liver, because <sup>15</sup>N in MG was significant 1 min after <sup>15</sup>N-ARG administration. <sup>15</sup>N, however, was not incorporated significantly into guanidinopropionic acid and guanidinobutyric acid.