

## 췌조직내 Nitric Oxide의 생합성

김용기 · 남석우 · 박승희 · 유세근 · 홍성렬\* · 이향우#

성균관대학교 약학대학, \*성균관대학교 유전공학과

(Received January 21 1994)

### Biosynthesis of Nitric Oxide in Pancreatic Tissues

Yong-kee Kim, Suk Woo Nam, Seung Hee Park, Se-geun Yoo,

Sung Youl Hong and Hyang Woo Lee<sup>o</sup> #

Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

\*Department of Genetic Engineering, College of Life Science and Natural Resources, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

**Abstract**—Nitric oxide(NO) synthase was identified and characterized by determining the L-citrulline formed in the NO-Arg pathway in pancreatic tissues. NO synthase activities in chicken pancreas were dependent upon the concentration of L-Arg which is the substrate molecule for the NO synthase, the amount of the enzyme protein used, and linearly on the incubation time. NO synthase in mouse pancreas was found to be constitutive, not induced by lipopolysaccharide treatment. *In vitro* NO synthase activities of chicken pancreas were inhibited 36%, 21%, 12% and 44% by 200  $\mu$ M of MMA, DMA, D'MA and NAME respectively. These results suggest the presence of NO and NO synthase in the pancreas.

**Keyword** □ Nitric oxide synthase, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine.

Nitric Oxide (NO)는 NO synthase의 작용에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, 혈관이완작용,<sup>1,2)</sup> 신경 전달물질로서의 작용<sup>3)</sup> 그리고 macrophage에서의 세포독성 등<sup>4)</sup> 다양한 생물학적 기능을 가지고 있다. NO synthase는 생합성경로, cofactor 그리고 Ca<sup>2+</sup>-calmodulin 의존성 등에 따라 2가지 isoform 즉, constitutive NO synthase(cNOS)와 inducible NO synthase (iNOS)로 분류할 수 있으며,<sup>5)</sup> 이와같은 NO synthase inhibitor는 기질인 arginine analogue로서 aminoguanidine,<sup>6)</sup> N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (NOARG),<sup>7)</sup> N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (NAME),<sup>8)</sup> N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (MMA),<sup>9)</sup> N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine (DMA)<sup>9)</sup> 등이 알려져 있다. 또한 corticosteroid와 interleukin 8 (IL-8) 등은 iNOS의 induction을 억제한

다고 보고<sup>10)</sup>되어있다.

NO의 췌조직에서의 역할은 주로 내분비기능과의 관계에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 즉, IL-1 $\beta$ ,<sup>11)</sup> TNF $\alpha$ <sup>12)</sup>에 의해  $\beta$  cell의 insulin secretion이 억제 되는데, 이는 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 NO synthase의 작용<sup>13)</sup>에 의해 생성된 NO가 glucose 투여에 의한 insulin secretion을 억제한다고 보고되었다. 이러한 결과는 NO synthase inhibitor인 MMA<sup>14,15)</sup>와 protein synthesis inhibitor인 cycloheximide에 의해 차단<sup>16)</sup>되고, tyrosine kinase inhibitor인 genistein에 의해 차단 되는것<sup>14)</sup>으로 보아, 이러한 과정이 inducible NO synthase에 의해 매개되고, tyrosine kinase의 활성화가 관여할 것으로 추정된다. 또한 췌 외분비에 관한 연구는 거의 되어있지 않았으나, 최근 NO가 직접 외분비 기능에 관여하는것이 아니라, 췌조직에서의

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

blood flow를 조절함으로써 외분비에 관여한다는 보고<sup>26)</sup>가 있다. 그러나 정확한 기전에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 skelet muscle의 기능과 NO와의 관계를 연구하기 위한 일환으로, skelet muscle 조직내에 NO synthase의 존재를 확인하고, skelet muscle 조직내에 존재하는 NO synthase가 어떠한 isoform인가를 알아보려고 하였다.

**실험방법**

**실험재료 및 기기**—N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine (DMA), N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (MMA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (NAME)는 Bachem사에서, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine (DMA)는 Calbiochem사에서, Phenylisothiocyanate (PITC)는 Pierce사에서, Triethylamine (TEA)은 Aldrich사에서 구입하여 실험에 사용하였다. [2,3,4,5-<sup>3</sup>H]-L-arginine (57 mCi/mmol)은 Amersham Life Science에서 구입하여 실험에 사용하였고, 기타 실험에 사용된 시약은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

HPLC system(501 pump, 680 gradient controller, 480 absorbance detector, U6K injector, Waters, U.S.A.), Liquid Scintillation Counter (Pharmacia 1209 Rackbeta, U.S.A.) 그리고 Lyophilizer(Labconco Lyph Lock 6, U.S.A.) 등을 실험에 사용하였다.

**Nitric Oxide Synthase 활성도 측정**—NO synthase에 의해 L-arginine으로부터 NO가 생성될 때 함께 생성되는 citrulline을 측정함으로써 NO synthase 활성도를 측정하였다.<sup>17)</sup> 효소원으로 skelet muscle 조직을 50 mM Tris buffer (0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 μM leupeptin, 1 μM pepstatin A 포함; pH 7.4) 4 volume으로 균질화하고, skelet muscle 조직내에 존재하고 있는 arginine을 제거하기 위하여 Dowex suspension I(Dowex-50W, Na<sup>+</sup> form, 200~400 mesh : 50 mM Tris buffer, pH 7.4 = 1 : 1)을 1/4 volume 가하고 15,000 g에서 20분간 원심분리한 상등액을 사용하였다. 효소원 (단백질 양 1.0~1.5 mg), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NADPH, 1 μg calmodulin, 33 μM [2,3,4,5-<sup>3</sup>H]-arginine을 total incubation mixture를 150 μl로하고, 37°C에서 10분간 incubation한 후 Dowex suspension II (Dowex-50W, Na<sup>+</sup> form, 200~400 mesh : 20 mM sodium acetate buf-

fer, pH 5.5, 1 mM citrulline, 2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA 포함=2 : 1) 1 ml을 가해 반응을 종결시켰다. 11,000 g에서 5분간 원심분리한 후 그 상등액 400 μl를 취해 scintillation vial에 넣고 scintillation cocktail 10 ml을 가한 후 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다. Blank는 incubation mixture에서 효소원 대신 50 mM Tris buffer(pH 7.4)를 사용하였다. NO synthase의 specific activity는 1 mg protein에서 1분당 생성되는 citrulline의 pmole로 나타내었다.

**skelet muscle 조직내 NO synthase**

**1. Arginine 농도에 따른 NO synthase 활성도 변화**— skelet muscle 조직을 효소원으로 사용하였으며, arginine의 농도 17.2 μM, 33.3 μM, 62.5 μM에서 효소활성도를 측정하였다.

**2. 효소원의 단백질 양에 따른 NO synthase 활성도 변화**— skelet muscle 조직을 효소원으로 사용하였으며, incubation mixture 내 효소원의 단백질양이 0.63 mg, 1.27 mg, 2.53 mg이 되도록 하여 활성도를 측정하였다. Arginine의 농도는 33.3 μM 이었다.

**3. Incubation time에 따른 NO synthase 활성도 변화**— skelet muscle 조직을 효소원으로 사용하였으며, incubation time을 각각 5 min, 10 min, 20 min으로 하여 활성도를 측정하였다. Incubation mixture 내의 효소원의 단백질양은 1.3 mg, arginine의 농도는 33.3 μM 이었다.

**4. skelet muscle 조직내의 NO synthase에 의해 생성된 citrulline의 확인**— 위의 방법에 의해 NO synthase의 활성도를 측정한 후 incubation mixture를 단백질을 제거하기 위하여 100°C에서 5분간 방치한 후 병목상에서 냉각하였다. 11,000 g에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 동결 건조하였다. 여기에 100 μl의 재건조 시약 (EtOH : DW : TEA = 2 : 2 : 1)을 가한 후 감압건조하고, 50 μl의 PITC 유도체화 시약(EtOH : 증류수 : TEA : PITC = 7 : 1 : 1 : 1)을 가한 후 감압건조하였다. 100 μl의 Solvent A (2.5% acetonitrile을 함유하는 70 mM Sod. acetate buffer : pH 6.5)에 용해시킨 후 25 μl를 HPLC로 분석하였다. Solvent A와 Solvent B(15% methanol을 함유하는 45% acetonitrile)를 Table I의 gradient 조건으로 elution 하였으며, 유속은 1.2 ml/min 이었다. 검출기의 a.u.f.s.는 0.01

이었고, 254 nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 30초마다 분획을 받아 liquid scintillation counting cocktail 5 ml을 넣은 후 radioactivity를 측정하였다.

#### 단백질 정량

Bovine serum albumin (fraction IV)를 표준 단백질로 사용하여 Bradford법에 의해 정량하였다.<sup>18)</sup>

#### 닭 췌 조직 NO synthase에 대한 methylarginines의 저해효과

Incubation mixture에 NO synthase의 상경적 억제제인 MMA, DMA, NAME 및 D'MA를 각각 200  $\mu$ M씩 첨가한 후 NO synthase 활성도를 측정하였다. 효소원으로 닭 췌조직의 whole homogenate를 사용하였다.

#### NO synthase의 induction

약 30~40 g의 ICR계 마우스에 lipopolysaccharide를 4 mg/kg의 용량으로 복강내 투여하고 3, 6, 12, 24, 36시간 후에 단두 치사하여 폐장과 췌장을 적출하여 상기의 NO synthase 활성도 측정법에 의하여 NO synthase의 활성도를 조사하였다.

#### 실험결과

##### 췌 조직내 NO synthase

**1. Arginine 농도에 대한 NO synthase 활성도 변화**—닭 췌 조직을 효소원으로 사용하여 arginine 농도변화 (17.2  $\mu$ M, 33.3  $\mu$ M, 62.5  $\mu$ M)에 따라 NO synthase 활성도를 측정했을때, 일직선상의 활성도 증가를 볼 수 있었다(Fig. 1).

**2. 효소원의 단백질 양에 대한 NO synthase 활성도 변화**—닭 췌 조직을 효소원으로 사용하여 각 assay tube당 효소원의 단백질 양이 0.63 mg, 1.27 mg, 2.53 mg이 되게하여 NO synthase의 활성도를 측정할 결과, 효소의 활성도는 단백질 양에 의존적이었다(Fig. 2).

**3. Incubation 시간에 따른 NO synthase 활성도 변화**—닭 췌 조직을 효소원으로 사용하여 5분, 10분, 20분간 incubation한 결과 incubation time에 의존적인 결과를 얻었다(Fig. 3).

**4. 췌 조직 NO synthase에 의해 생성된 [2,3,4,5-**

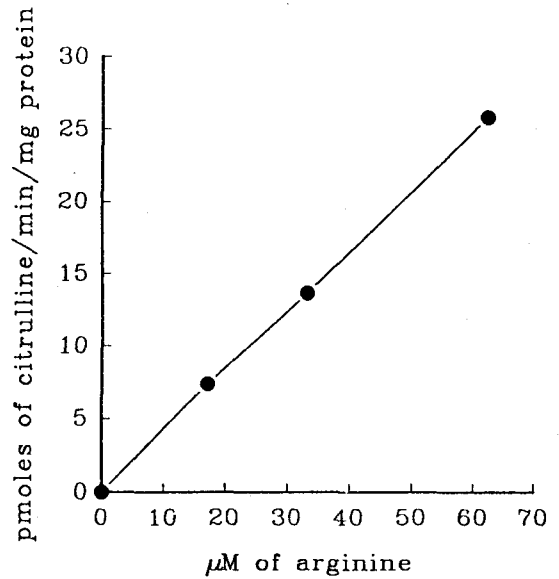


Fig. 1—Effect of the arginine concentration on the NO synthase activity in chicken pancreas.

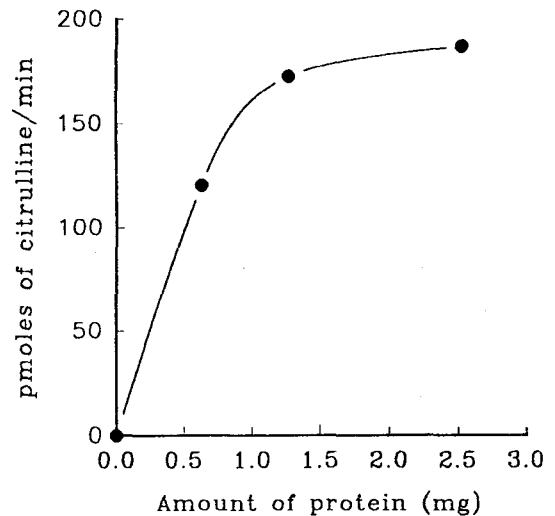


Fig. 2—Effect of the amount of protein on the NO synthase activity in chicken pancreas.

**<sup>3</sup>H]-L-citrulline의 확인**—닭 췌 조직을 효소원으로 사용하여 NO synthase 활성도 측정 방법에 따라 incubation한 후, 반응된 incubation mixture 내에 생성된 [2,3,4,5-<sup>3</sup>H]-L-citrulline을 HPLC로 확인하였다. Fig. 4는 citrulline과 arginine 표준품을 분석하여 얻은 chromatogram이며, Fig. 5는 incubation mixture를

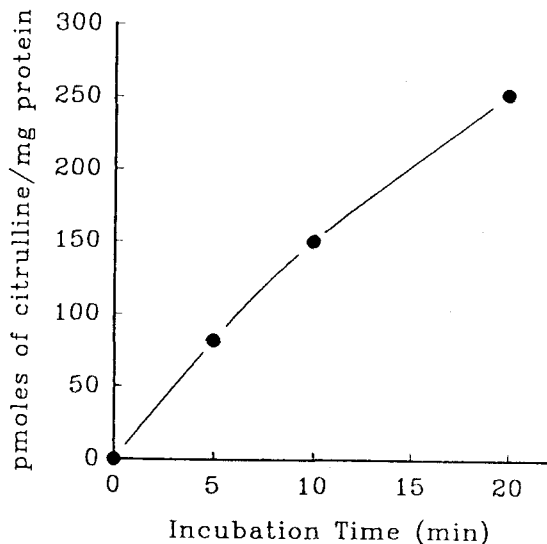


Fig. 3—Effect of incubation time on the NO synthase activity in chicken pancreas.

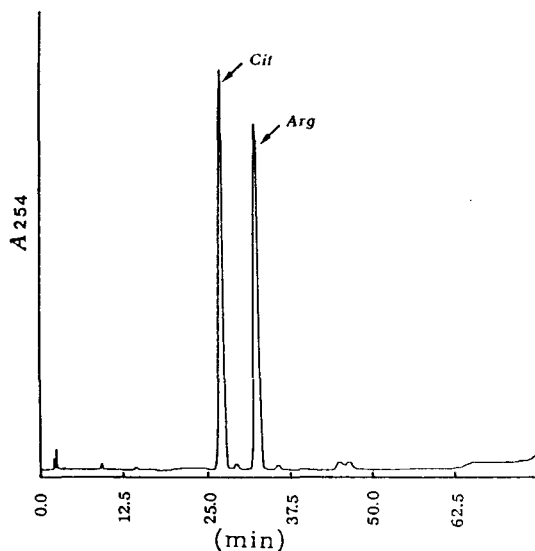


Fig. 4—Chromatogram of PTC-derivatized standard amino acids.

Arginine : 500 pmole      Citrulline : 2.0 nmole

HPLC로 분석하여 얻은 radiogram이다. Citrulline 표준품의 retention time인 27분에서 radioactive peak가 나타나는 것을 확인함으로써 돼 조직내의 NO synthase에 의해 citrulline이 생성됨을 확인할 수 있었다.

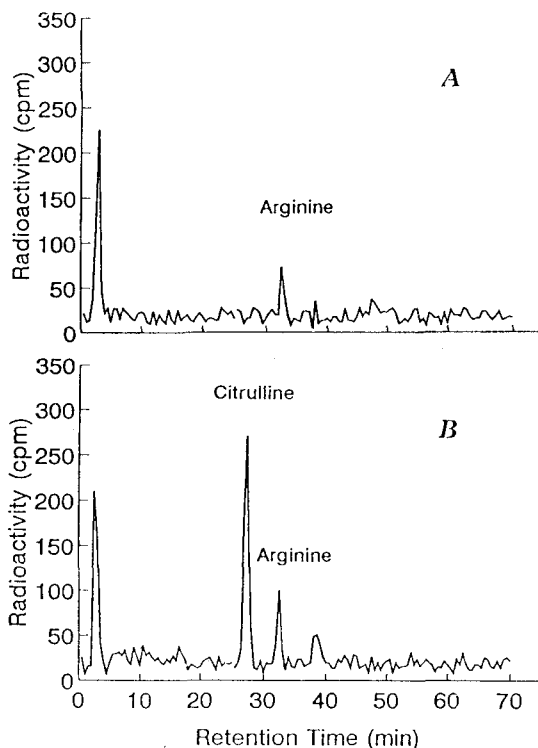


Fig. 5—Identification of <sup>3</sup>H-citrulline formed by NO synthase in chicken pancreas.

A : (-) Enzyme source      B : (+) Enzyme source

### 돼 조직내 NO synthase 활성도에 대한 methyl-arginines의 저해효과

200 μM의 MMA, DMA, D'MA와 NAME를 첨가하여 NO synthase의 활성을 검색한 결과 돼 조직내의 NO synthase 활성도가 각각 36%, 21%, 12%, 44% 억제되었다(Table I).

### NO synthase의 induction

마우스에 lipopolysaccharide(4 mg/kg) 투여 후 3, 6, 12, 24, 36시간 후에 폐조직과 돼조직을 적출하여 NO synthase 활성도를 측정된 결과, 폐조직에서는 6시간과 12시간에서 활성도 증가를 보였다. 그러나 돼장의 경우 전 시간대에서 활성도의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 6).

### 고 찰

NO는 L-Arg으로부터 NO synthase의 활성에 의해

생성되어 생체내에서 여러가지 중요한 기능을 한다. NO는 반감기가 매우 짧고, 생체내에 미량 존재하기 때문에 직접 그 양을 측정하기가 곤란하다. Electron paramagnetic resonance(EPR) spectroscopy를 이용하여 NO를 직접 측정하는 방법<sup>19)</sup>이 있으나, EPR을 구비하지 못한 곳에서는 사용할 수가 없다. 따라서 NO와 반응하여 일어나는 여러가지 현상에 의해 NO를 측정하는 방법이 많이 이용되고 있다. 즉, NO와 oxyhemoglobin이 반응하여 methemoglobin과 NO<sub>3</sub>이 생성되는 원리를 이용한 Spectrophotometry 법,<sup>20)</sup> NO와 O<sub>3</sub>이 반응하여 빛을 내는 원리를 이용한 Chemoluminescence 법,<sup>21)</sup> sulfanilic acid의 deazotation 반응을 이용한 방법<sup>22)</sup> 그리고 NO에 의해 활성화된 guanylate cyclase에 의해 생성되는 cGMP의 양을 측정하는 방법<sup>16)</sup> 등이 있다. 또한 NO synthase에 의해 NO와 citrulline이 equimolar하게 생성되는 원리를 이용해 citrulline을 정량함으로써 NO synthase의 활성도를 측정하는 방법<sup>17)</sup>이 있다.

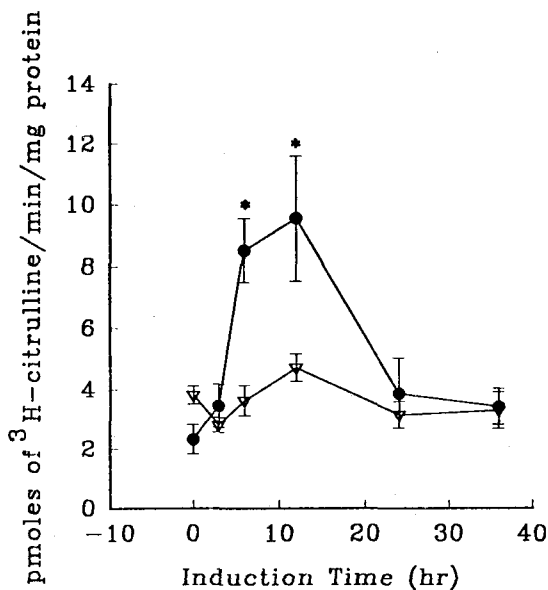


Fig. 6—Inducible NO synthase activities in lung(●) and pancreas(▽) treated with lipopolysaccharide. Results are the means±S.E. of NO synthase activities from 6 mice. Statistically significant (\* $p < 0.001$ ) induction of NO synthase in lung treated with LPS was determined by Student's t-test.

Citrulline formation법을 이용한 NO synthase 활성도 측정은 뇌, 간, 폐조직 그리고 혈관내의 endothelial cell 등에서 많이 이용되어 왔다.<sup>23,24)</sup> 본 연구에서는 체조직의 외분비 기능과 NO와의 관계를 규명하기 위한 기본단계로 체 조직내 NO synthase의 존재를 확인하기 위하여 citrulline formation법을 이용하여 알아 보았다. NO synthase의 기질인 arginine 농도 변화, 효소원의 단백질량의 변화, incubation time의 변화에 따른 의존적인 활성도 변화로 보아 체 조직내에 NO synthase가 존재한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 NO synthase의 활성에 의해 생성된

Table I—Gradient program for reverse-phase HPLC for the separation of PTC-derivatized amino acids

Time (min)	Gradient solvent A(%)	Column Temp. (°C)
Initial	100	43
10.00	100	
10.01	97	
20.00		
40.00	95	
45.00		37
45.20		43
55.00	95	
65.00	85	
69.00	70	
70.00	0	
80.00	0	
85.00	100	
95.00	next injection	

Table II—Inhibitory effects of methylarginines on the NO synthase activity in chicken pancreas

Methylarginines [200 μM]	Degree of inhibition %
Control	—
MMA	36
DMA	21
D'MA	12
NAME	44

Results are expressed as the percentage decrease in activity compared to the control test assayed in the absence of methylarginines.

citrulline을 HPLC로 확인 함으로써 본 연구에서 이 용된 citrulline formation법을 이용한 NO synthase 활성도 측정법의 정확성을 확인하였다.

보문에 의하면 소의 endothelial cell, 뇌 등에 존재하는 NO synthase에 대한 MMA의 Ki치는 약 1.5  $\mu\text{M}$  이었으며,<sup>17,24,25)</sup> 또한 MMA 300  $\mu\text{M}$  농도에서 뇌조직에 존재하는 NO synthase를 약 95%, 간장조직에 존재하는 효소를 약 90% 억제시켰다.<sup>23)</sup> 본 연구에서는 NO synthase 억제제들(MMA, DMA, NAME 및 D'MA)을 각각 200  $\mu\text{M}$ 을 사용하였을 때 닭 체조직의 NO synthase 활성도를 36%, 21%, 44%, 12% 억제되었다. 이러한 결과는 보문에 의한 NO synthase 억제정도 농도보다 고농도였으며, 이러한 결과는 효소원 자체가 너무 crude하여 정확한 억제력을 측정하기 어렵기 때문이라 사료된다. 그리고 보다 정확한 결과를 위해서는 체조직내의 NO synthase를 순수 분리정제하여 각각의 inhibitor에 대한 Ki값을 측정해 보아야 할 것이다.

NO synthase는 생합성경로, cofactor,  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 의존도 등에 따라 cNOS와 iNOS의 isoform으로 나뉘는데, iNOS는 세포배양시  $\text{INF } \gamma$ ,  $\text{IL } 1\beta$  등과 같은 cytokines에 의해 induction 되지만 cNOS는 induction되지 않는다. 장기별로 볼 때 간장과 폐장조직은 lipopolysaccharide에 의해 induction되는 iNOS가 존재하고, 뇌에서는 induction 되지않는 cNOS가 존재한다고 보고 되었다.<sup>23)</sup> Corbett 등은 체 조직의  $\beta$  cell을 배양할 때  $\text{IL } 1\beta$ 를 처치하면  $\text{NO}^{2-}$ 와 cGMP의 양이 증가하며, 이러한 현상은 NO synthase 억제제인 MMA를 처치할 때 억제되는 것으로 보아 체조직내의  $\beta$  cell에는 iNOS가 존재할 것으로 추정하였다.<sup>14,15,16)</sup> 본 연구에서는 체조직내에 존재하는 NO synthase의 isoform을 확인하기 위하여 lipopolysaccharide를 mouse에 복강내 투여후 시간별로 NO synthase 활성도를 측정하였는데 lipopolysaccharide에 의해서는 induction 되지않는 것으로 보아 cNOS가 존재하리라 사료된다. 그러나 다른 cytokines 등에 의해 induction되는지의 여부는 앞으로 더 많은 실험이 수행되어야 할 것이다.

### 결 론

이상의 실험에서 다음과 같은 실험결과를 얻을 수

있었다.

1. NO synthase의 기질인 arginine의 농도변화, 효소원의 단백질 양 변화 및 incubation time에 따른 의존적인 활성도 증가로 보아 체조직내에 NO synthase가 존재함을 확인 할 수 있었다.
2. NO synthase의 활성에 의해 생성되는 citrulline을 HPLC로 확인하였다.
3. 닭 체조직의 NO synthase는 상경적 억제제인 MMA, DMA, NAME 및 D'MA 각각 200  $\mu\text{M}$  처치했을 때, 36%, 21%, 44%, 12% 억제되었다.
4. 체조직에 존재하는 NO synthase는 LPS에의해서는 induction 되지않는 constitutive NO synthase 이었다.

### 문 헌

- 1) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524 (1987).
- 2) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664 (1988).
- 3) Bredt, D. S. and Snyder, S. H.: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9030 (1989).
- 4) Forstermann, U., Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M., and Murad, F.: Isoforms of nitric oxide synthase: Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1849 (1991).
- 5) Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten, T. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R. and Currie, M. G.: Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.* **233**, 119 (1993).
- 6) Moore P. K., al-Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Evans, E. A. and Gibson, A.: L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 408 (1990).

- 7) Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schultz, R., Hodson, H. F. and Moncada, S.: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 746 (1990).
- 8) Vallance, P., Leone, A., Valver, A., Collier, J. and Moncada, S.: Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**, S60 (1992).
- 9) McCall, T. B., Palmer, R. M. J., and Moncada, S.: Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**, 680 (1992).
- 10) Corbett, J. A., Lancaster, J. R., Sweetland, M. A. and McDaniel, M. L.: Interleukin-1 $\beta$ -induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islets of langerhans. *J. Biol. Chem.* **266**, 21351 (1991).
- 11) Southern, C., Schulster, D. and Green, I. C.: Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 $\beta$ -and tumor necrosis factor- $\alpha$  via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS lett.* **276**, 42 (1990).
- 12) Eizirik, D. L., Cagliero, E., Bjorklund, A. and Welsh, N.: Interleukin-1 $\beta$  induces the expression of an isoform of nitric oxide synthase in insulin-producing cells, which is similar to that observed in activated macrophages. *FEBS lett.* **308**, 249 (1992).
- 13) Corbett, J. A., Sweetland, M. A., Lancaster, J. R., and McDaniel, M. L.: A 1-hour pulse with IL- $\beta$  induces formation of nitric oxide and inhibits insulin secretion by rats islets of Langerhans: evidence for a tyrosine kinase signaling mechanism. *FASEB J.* **7**, 369 (1993).
- 14) Corbett, J. A., Wang, J. L., B. A., Sweetland, M. A., Lancaster, L. R., and McDaniel, M. L.: Interleukin 1 $\beta$  induces the formation of nitric oxide by  $\beta$ -cells purified from rodent islets of langerhans. *Clin. Invest.* **90**, 2384 (1992).
- 15) Corbett, J. A., Wang, J. L., Hughes, J. H., Wolf, B. A., Sweetland, M. A., Lancaster, L. R., and McDaniel, M. L.: Nitric oxide and cyclic GMP formation induced interleukin 1 $\beta$  in islets of langerhans: evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction. *Biochem. J.* **287**, 229 (1992).
- 16) Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Nakane, M., Gorsky, L. D., Forstermann, U. and Murad, F.: Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 360 (1991).
- 17) Bradford, M. E.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **42**, 248 (1976).
- 18) Henry, Y., Lepoivre, M., Drapier, J., Ducrocq, C., Boucher, J. and Guissazni, A.: EPR characterization of molecules targets for NO in mammalian cells and organells. *FASEB J.* **7**, 1124 (1993).
- 19) Feelisch, M. and Noack, E. A.: Correlation of between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **139**, 19 (1987).
- 20) Bush, P. A., Gonzalez, N. E., Griscavage, J. M. and Ignarro, L. J.: Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **185**, 960 (1992).
- 21) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowaski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R.: Analysis of nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$ ] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131 (1982).
- 22) Knowles, R. G., Merrett, M., Salter, M. and Moncada, S.: Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem. J.* **70**, 833 (1990).
- 23) Pollock, J. S., Forstermann, U., Mitchell, J. S. Warner, T. D., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M. and Murad, F.: Purification of characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 10480 (1991).
- 24) Bredt, D. S. and Snyder, S. H.: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 682 (1990).
- 25) Konturek, S. J., Bilski, J., Kontrek, P. K., Cieszkowski, M. and Pawlik, W.: Role of endogenous nitric oxide in the control of canine pancreatic secretion and blood flow. *Gastroenterology* **104**, 896 (1993).