

수종동물의 췌장조직내 NO Synthase 활성도 및 Methylarginines 함량

김용기 · 박승희 · 남석우 · 서동완 · 홍성렬* · 이향우#

성균관대학교 약학대학, *성균관대학교 유전공학과

(Received January 21, 1994)

NO Synthase Activities and Methylarginines Contents in the Pancreatic Tissues of Various Animals

Yong-kee Kim, Seung Hee Park, Suk Woo Nam, Dong-wan Seo,

Sung Youl Hong and Hyang Woo Lee

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—The activities of nitric oxide synthase and the contents of methylarginines were investigated in the pancreatic tissues of various animals by citrulline-forming method and HPLC, respectively. The high level of in vitro NO synthase activity was detected in chicken pancreas whereas MMA, the strong competitive inhibitor for NO synthase, was detected as trace in the same tissue. On the other hand, the low level of NO synthase activity was observed in the porcine pancreas while the contents of MMA were high. However, it was not possible to find any relationship between NO synthase activities and the contents of dimethylarginines at present time. D'MA was equally distributed among the pancreatic tissues of various animals but DMA was not.

Keywords □ Nitric oxide synthase, N^G-monomethyl-L-arginine, N^G,N^G-dimethyl-L-arginine, N^G,N^G-dimethyl-L-arginine.

Nitric oxide (NO)는 NO synthase에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 물질로^{1,2)} 혈관이완작용,^{3,4)} 신경전달물질로서의 작용⁵⁾ 그리고 macrophage에서의 세포독성효과⁶⁾ 등 다양한 생물학적 기능을 갖는다. NO synthase는 생합성경로, cofactor 그리고 Ca²⁺-calmodulin 의존성등에 따라 2 가지 isoforms 즉, constitutive NO synthase (cNOS)와 inducible NO synthase (iNOS)로 분류된다.⁷⁾ NO synthase 억제제로는 calmodulin binder인 calcineurin, calmidazolol 등이 cNOS 억제제로 알려져 있으며, corticosteroid, interleukin 8 (IL-8) 등은 iNOS의 특이적 억제제로 알려져 있다.^{9,10)} 그리고 NO synthase의 기질인 L-Arg의 analogue로서 aminoguanidine,¹¹⁾ N^G-nitro-L-arginine

(NOARG),¹²⁾ N^G-nitro-L-arginine methyl ester (NAME)¹³⁾ 등이 NO synthase 억제제로 보고되어 있다.

또한 생체내에 존재하고 있는 methylarginines 중 N^G-monomethyl-L-arginine (MMA),¹³⁾ N^G,N^G-dimethyl-L-arginine (DMA)¹⁴⁾ 등이 NO synthase 억제제로 알려져 있다. 이중 MMA는 NO로 인한 혈관이완,¹⁵⁾ insulin secretion 억제¹⁶⁾ 및 macrophage의 세포독성 효과¹⁷⁾ 등을 억제한다. 최근 보고에 의하면 N^G,N^G-dimethyl-L-arginine (DMA)도 혈관이완 억제 작용¹⁸⁾이 있고 macrophage에서의 NO synthase 활성을 억제¹⁴⁾ 한다고 보고되었으며, 만성 신부전증 환자에서, 뇨로 배설되는 DMA양이 감소하여 plasma내에 축적됨으로써 고혈압의 원인이 될 수 있다는 보고¹⁹⁾가 있다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

생체내에 존재하는 DMA와 MMA는 N^G, N^G -dimethylarginine dimethylaminohydrolase(DDAH)에 의해 citrulline과 dimethylamine으로 대사되며,²⁰⁾ 이 system에 의해 NO synthase 활성이 생체내에서 조절될 수 있다. 즉, 생체내의 methylarginine의 농도에 의해 NO synthase 활성이 조절되며, 이로 인해 NO의 작용이 조절될 것으로 추정된다.

본 연구에서는 생체내, 특히 체조직내 NO synthase 활성도와 methylarginines과의 관계를 밝히기 위하여, 수중 동물 (흰쥐, 마우스, 소, 돼지, 개, 몰모트, 닭)에서의 NO synthase 활성도를 비교검토 하였으며, NO synthase의 억제제로 알려진 methylarginine (MMA, DMA, D'MA)의 함량을 정량하여 체액 분비 작용에 대한 상관관계 유무를 밝히고자 본 실험에 착수하였다.

실험방법

실험재료 및 기기

N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (DMA), N^G -monomethyl-L-arginine (MMA), N^G -nitro-L-arginine methyl ester (NAME)는 Bachem사에서, N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (D'MA)는 Calbiochem사에서, Phenylisothiocyanate (PITC)는 Pierce사에서, Triethylamine (TEA)는 Aldrich사에서 구입하여 실험에 사용하였다. [2,3,4,5- 3H]-L-arginine (57 mCi/mmole)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-arginine으로 부터 NO가 생성될 때 함께 생성되는 citrulline을 측정함으로써 NO synthase 활성도를 측정하였다.²¹⁾ 효소원으로 체장 조직을 50 mM Tris buffer(0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin A 포함; pH 7.4) 4 vo-

lume으로 균질화하고, 체 조직내에 존재하고 있는 arginine을 제거하기 위하여 Dowex suspension I (Dowex-50W, Na⁺ 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 (단백질양 1.0~1.5 mg), 2 mM CaCl₂, 1 mM NADPH, 1 μ g calmodulin, 33 μ M [2,3,4,5- 3H]-arginine을 가하여 total incubation mixture를 150 μ l로하고, 37°C에서 10분간 incubation한 후 Dowex suspension II (Dowex-50W, Na⁺ form, 200~400 mesh: 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 1 mM citrulline, 2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA 포함=2:1) 1 ml을 가해 반응을 종결 시켰다. 11,000 g에서 5분간 원심분리한 후 그 상등액 400 μ l를 취해 scintillation vial에 넣고 scintillation cocktail 10 ml을 가한후 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다. Blank는 incubation mixture에서 효소원 대신 50 mM Tris buffer (pH 7.4)를 사용 하였다. NO synthase의 specific activity는 1 mg protein에서 1분당 생성되는 citrulline의 pmole로 나타내었다.

단백질 정량

Bovine serum albumin (fraction IV)를 표준 단백질로 사용하여 Bradford법에 의해 정량하였다.²²⁾

수중동물의 체 조직내 NO synthase 활성도 분포

흰쥐, 마우스, 닭, 소, 돼지, 개, 몰모트의 체 조직을 4 volume의 50 mM Tris buffer (pH 7.4)로 균질화한 후 효소원으로 사용하였다. 상기의 NO synthase 활성도 측정법에 의하여 실험하였다.

수중동물의 체 조직내 methylarginines의 함량 측정—흰쥐, 마우스, 닭, 소, 돼지, 개, 몰모트의 체 조직 약 0.5 g을 취하여 단백질 제거 과정 및 ion exchange chromatography를 통한 염기성 아미노산 분획과정을 통해 조직내에서 methylarginines를 분리한 후 PTC 유도체화 시킨후 HPLC로 정량하였다.²³⁾

Methylarginines분획의 조제—수중동물의 체 조직 약 0.5 g을 10 volume의 냉각된 5% (wt/vol) trichloroacetic acid 용액으로 균질화 하였다. Homogenate를 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 Dowex-50 W(H⁺ form, 100~200 mesh, 0.4×6 cm)에 통과하였다. Column을 10 ml의 증류수로 세척하고, 10 ml의

1 M pyridine으로 세척 하였다. 염기성 amino acid 분획을 3 M ammonia water로 elution 하였다. 이것을 감압 건조하여 증류수 1 ml에 녹인 후 다시 동결 건조하여 HPLC 시료로 사용하였다.

Methylarginines의 유도체화— 위에서 얻은 시료에 재건조 시약 (TEA:EtOH:증류수=2:2:1)을 100 μ l를 가한후 완전 건조 시켰다. 유도체화 시약 (EtOH:TEA:DW:PITC=7:1:1:1)을 50 μ l 가한후 20분 동안 실온에서 반응 시켰다. 반응액을 완전히 건조시킨 후 solvent A [2.5%(v/v) acetonitrile을 함유하는 70 mM sodium acetate buffer, pH 6.5] 100 μ l에 녹여 그중 10 μ l를 HPLC로 분석하였다.

HPLC 조건— HPLC system은 Waters solvent delivery system (Waters 501 pumps와 Waters 680 gradient controller), Shodex C₁₈ 5B column(4.6×250 mm, 5 μ m), Waters 480 absorbance detector 그리고 Young-in D520B integrator를 사용하였다. 용매는 solvent A와 solvent B [15%(v/v) methanol을 함유하는 45% (v/v) acetonitrile]를 gradient 조건으로 elution 하였다. 유속은 1.2 ml/min 이었으며, 검출기의 a.u.f.s.는 0.01 이었고, 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Methylarginines peak의 확인— MMA, DMA, D' MA를 각각 500 pmole을 PTC 유도체화한 후 sample에 첨가하여 HPLC로 분석하여 같은 retention time에서의 peak area의 증가로 확인 하였다.

Methylarginines의 회수율— 약 1g의 채조직을 5% TCA로 균질화한 후 원심분리한 상등액을 이등분하여 한 시료에는 standard methylarginines 넣지않고, 또 다른 시료에는 standard methylarginines 각각 500 pmole 첨가한 후에 Dowex resin을 통과한 후 PTC 유도체화 하였다. HPLC 분석하여 methylarginines peak의 peak area의 차이로 회수율(%)을 구하였다.

Methylarginines의 검량선 작성— MMA, DMA, D' MA 각각 0.125 nmole, 0.25 nmole, 0.5 nmole, 1.5 nmole을 PTC 유도체화한 후 HPLC로 분석하여 peak area로 검량선을 작성하였다.

실험결과

수종 동물의 채 조직내 NO synthase 활성도 분포
 흰쥐, 마우스, 닭, 소, 돼지, 개, 물모트의 채장 조직을 적출하여 앞에서 기술한 NO synthase 활성도

Table I—Nitric oxide synthase activities in the pancreatic tissues of various animals

Animals	Specific Activity (pmoles of ³ H-citrulline/min/mg protein)
Bovine	5.29± 0.71
Canine	4.40± 0.11
Chicken	11.65± 1.15
Guinea pig	4.08± 0.25
Mouse	3.12± 0.11
Porcine	1.87± 0.15
Rat	2.14± 0.17

Results are the means± S.E.(n=4).

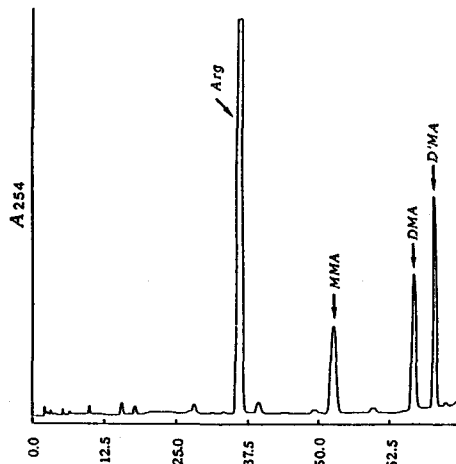


Fig. 1—HPLC chromatogram of PTC-derivatized standard amino acids.

Arg: 2.5 nmole MMA: 500 pmole DMA: 500 pmole D' MA: 500 pmole

측정법에 따라 측정된 결과 조류인 닭에서 가장 높은 활성도를 보였다. 포유류에서는 비슷한 활성도를 나타내었으나, 돼지와 흰쥐의 경우는 활성도가 다른 동물에 비하여 비교적 낮았다. 설치류는 다른 포유 동물보다 비교적 낮은 활성도를 보였다(Table I).

수종동물의 채 조직내 methylarginines의 함량 측정

Methylarginines peak의 확인—Arginine (2.5 nmol) 과 methylarginines (MMA, DMA, D' MA:500 pmole) 표준품을 PTC 유도체화한 후 HPLC로 분석하여 Fig. 1과 같은 chromatogram을 얻었다. MMA의 retention time은 52.57분, DMA는 67.08분, D' MA는 70.79 분이었다. Methylarginines 각각을 0.125~1.50 nmole의

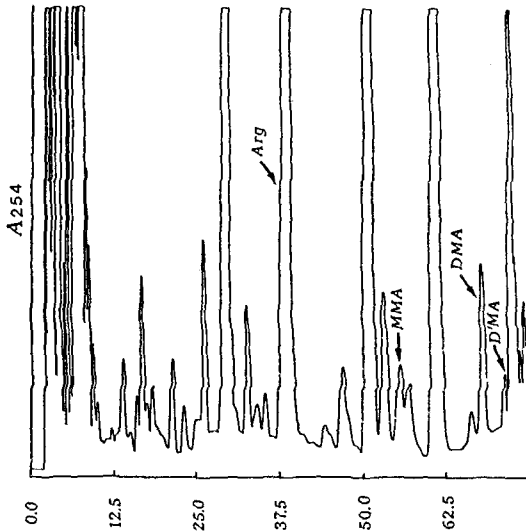


Fig. 2—HPLC chromatogram of PTC-derivatized amino acids in bovine pancreas.

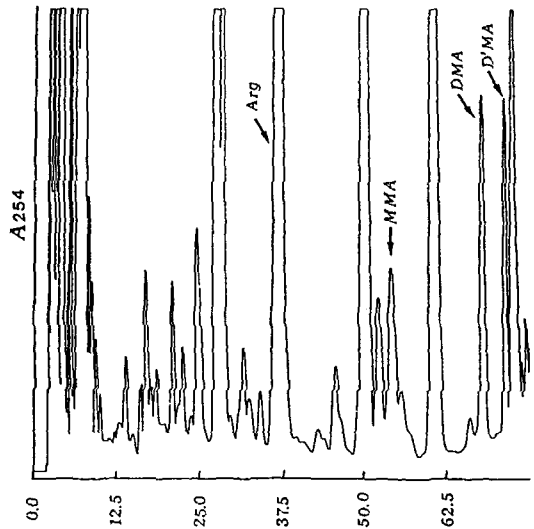


Fig. 3—HPLC chromatogram of PTC-derivatized amino acids fortified with standard methylarginines in bovine pancreas.

Arg: 2.5 nmole MMA: 500 pmole DMA: 500 pmole D'MA: 500 pmole

농도 범위에서 HPLC하여 얻은 peak area와 농도와의 관계로 검량선을 작성하였다. 각 검량선의 회귀방정식은 MMA가 $Y=523.2X-2115.5$ ($r=0.9997$), DMA가 $Y=511.1X-420.8$ ($r=0.9997$), D'MA가 $Y=523.5X-1455.5$ ($r=0.9997$)이었다. 췌 조직내 methylarginine peak를 확인하기 위하여 췌 조직 sample 내에 methylarginines을 500 pmole씩 가한 후 HPLC 하여 분석한 결과, 각각의 peak area의 증가로 확인할 수 있었다. Fig. 2는 소 췌조직에서 얻은 methylarginines 분획을 HPLC 분석하여 얻은 chromatogram이며, Fig. 3은 Fig. 2의 sample에 methylarginine 표준품 500 pmole을 첨가하여 HPLC로 분석한 chromatogram이다. 상기의 방법에 의해 회수실험을 한 결과 MMA의 회수율은 약 70%, DMA는 약 60%, D'MA는

약 60% 이었다.

수종동물의 췌 조직내 methylarginines의 함량—원 쥐, 마우스, 닭, 소, 돼지, 개, 물모트의 췌장 조직을 적출하여 상기의 방법으로 methylarginines의 함량을 조사한 결과, MMA의 경우 돼지 췌조직내에 11.86 ± 1.20 nmole/g wet tissue로 가장 많이 함유되어 있었고, 닭의 경우는 양이 적어 정량이 곤란하였다. DMA의 경우는 동물 종 차이에 따른 함량 차이가 심하였다. 개의 경우 22.32 ± 1.01 nmole/g wet tissue로 가장 많았으며, 닭의 경우 0.77 ± 0.15 nmole/g wet tissue로 가장 적게 함유되어 있었다. D'MA의 경우는 동물 종

Table II—Contents of methylarginines in the pancreatic tissues of various animals

Animals	Arg	MMA	DMA	D'MA
Bovine	244.77± 36.10	4.45± 0.28	9.60± 0.70	1.39± 0.24
Canine	27.92± 1.43	6.55± 0.87	22.32± 1.01	3.87± 0.19
Chicken	238.65± 36.47	ND*	0.77± 0.15	1.32± 0.15
Guinea pig	120.87± 1.90	4.67± 0.23	2.77± 0.38	2.43± 0.06
Mouse	115.77± 16.08	4.50± 0.80	3.77± 0.78	1.67± 0.38
Porcine	860.15± 121.13	11.86± 1.20	11.88± 1.80	1.88± 0.43
Rat	133.43± 19.69	3.83± 1.03	2.33± 0.38	2.57± 0.23

Results are the means± S.E. (n=4) in nmole/g wet tissue About 0.5 g of each pancreas was used.

*ND: Not detectable.

차이에 따라 1.50~3.0 nmole/g wet tissue 정도로 비교적 고른 함량 분포를 나타내었다 (Table II).

고 찰

Methylated amino acid에 관해서는 수년간 많은 연구가 진행되어 왔다. 이들의 생성 기전은 protein methylation에 의해 생성된 methylated protein이 생체내에서 분해되어 생성된다고 알려져 있으나, 정확한 경로에 대해서는 아직 논란의 여지가 많다.

Methylated amino acid의 생물학적 중요성은 아직 많이 알려져 있지 않으나, N^ε-trimethyl-L-lysine (TML)이 mitochondria내로 acyl group을 운반하는 carnithine 생합성의 전구체로 작용한다고 보고^{24,25)}되어 있고, 또한 최근에는 MMA, DMA 등 methylarginine이 NO synthase에 대해 특이적인 억제제로 알려져 그 생물학적 기능이 중요시 되고있다.^{13,14)}

Methylated amino acid를 분리 정량하는 방법으로는 paper electro-phoresis,²⁶⁾ chemical degradation^{26,27,28)} 및 아미노산 분석기²⁹⁾ 등이 사용되어 왔으나, 정확도가 낮고 검출 한계가 1 μmole 정도로 제한된다는 단점이 있기 때문에 최근에는 HPLC 분석법이 많이 이용되고 있다. 특히 reverse phase HPLC를 이용한 방법이 효과적으로 이용되고 있다. 가장 많이 이용되는 방법은 OPA 유도체화에 의한 형광분석법³⁰⁾ 그리고 본 연구에서 사용한 PTC 유도체화에 의한 UV분석법²³⁾이었다.

본 연구에서는 췌조직내의 NO synthase 활성도와 그 inhibitor인 methylarginine과의 관계를 알아 보기 위하여, 수종동물의 췌조직내 NO synthase 활성도를 측정하고 methylarginine의 함량을 PTC 유도체화 방법에 의해 HPLC로 정량하였다. 닭 췌조직의 경우 NO synthase 활성도는 가장 높았으나, MMA는 미량존재하여 정량이 불가능하였고, DMA 및 D'MA의 함량도 다른동물의 췌조직에 비하여 적었다. 흥미롭게도 돼지 췌조직은 NO synthase의 활성도가 가장 낮는데 비해 MMA의 함량은 가장 높았고, DMA도 다량 측정되었다. 다른동물의 췌조직의 경우 NO synthase 활성도변화와 MMA의 함량 변화가 크게 나타나지 않았으며, 이로서 NO synthase 활성도와 그 inhibitor인 MMA의 양이 생체 췌조직내에서 반비례하는 경향을 관찰하였다. 그러나 또다른 inhibitor인

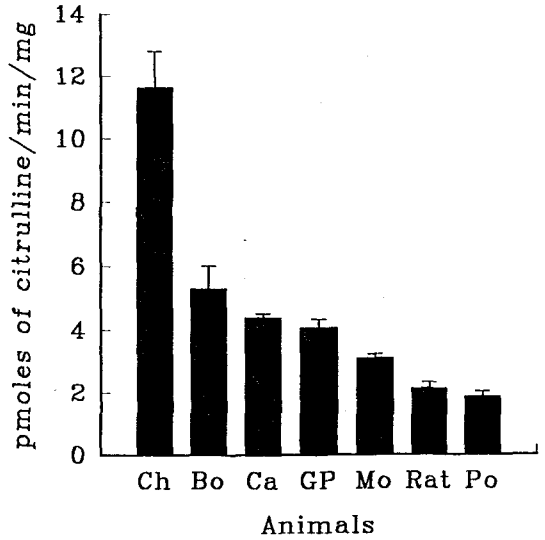


Fig. 4—Nitric oxide synthase activities in the pancreatic tissues of various animals. Ch: chicken Bo: bovine Ca: canine GP: guinea pig Mo: mouse Po: porcine

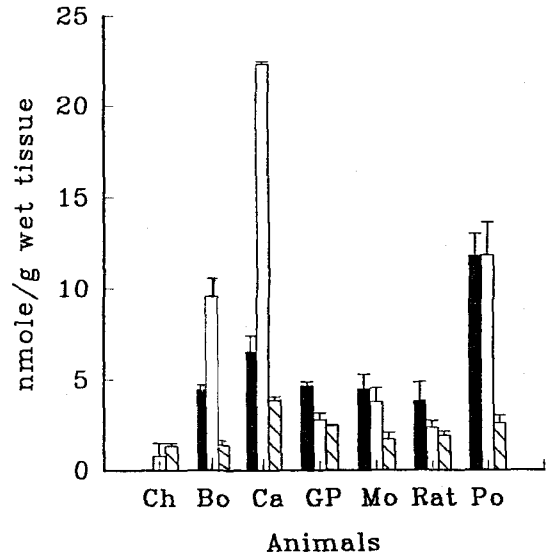


Fig. 5—Contents of methylarginines in the pancreatic tissues of various animals. Ch: chicken Bo: bovine Ca: canine GP: guinea pig Mo: mouse Po: porcine

DMA와 D'MA의 함량과 NO synthase 활성도와와의 관계는 연관성을 찾기가 곤란하였다(Fig. 4,5). DMA의 함량은 동물의 종에 따라 차이가 컸으나, D'MA는

거의 차이가 없었다. 이상의 결과에서 NO synthase의 활성은 그 inhibitor인 MMA의 생체내 함량에 의해 조절될 것으로 추정되어지며, DMA 및 D'MA와의 상관관계를 정확히 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

이상의 실험결과에서 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 조류인 닭 체조직에서 NO synthase 활성도가 11.65 ± 1.15 (pmol of ^3H -citrulline/min/mg protein)으로 가장 높았으며, 돼지 체조직은 1.87 ± 0.15 로 닭 > 소 > 개 > 기니아 피 > 생쥐 > 흰쥐 > 돼지의 순서였으며, 가장 낮은 활성도를 보였다.

2. NO synthase의 활성도가 가장 높은 닭 체조직에서는 MMA의 함량이 적어 정량할 수 없었던 반면, 활성도가 가장 낮은 돼지 체조직에서는 가장 많은 함량을 나타내었다.

3. D'MA는 동물 종차에 따른 함량 변화가 없었으나, DMA는 동물별 종차가 심하게 나타났다.

문 헌

- Schmidt, H. H. H. W., Nau, H., Wittfoth, W., Gerlach, J., Prescher, K. E., Klein, M. M., Niroomand, F. and Bohme, E.: Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eup. J. Pharmacol.* **154**, 213 (1988).
- Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S., and Moncada, S.: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **153**, 1251 (1988).
- 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).
- Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* **333**, 664 (1988).
- 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).
- Hibbs, J. B., Tainor, R. R., Vavrin, E. and Rachlin, E. M.: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **157**, 87 (1988).
- 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. *Biochemical Pharmacology.* **42**, 1849 (1991).
- Illiano, S., Nagao, T. and Vanhoutte, P. M.: Calmidazolol, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 387 (1992).
- Geller, D. A., Nussler, A. K., Silvio, M. D., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Wang, S. C., Simmons, R. L. and Billiar, T. R.: Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 522 (1993).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).

- 14) 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).
- 15) Aisaka, K., Gross, S. S., Griffith, D. W. and Levi, R.: N^G-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig. Does nitric oxide regulate blood pressure *in vivo*? *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **160**, 881 (1989).
- 16) Corbett, J. A., Sweetland, M. A., Lancaster, J. R., and McDaniel, M. L.: A 1-hour pulse with IL- β 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).
- 17) Olken, N. M., Ruche, K. M., Richards, M. K. and Marletta, M. A.: Inactivation of macrophage nitric oxide synthase activity by N^G-methyl-L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **177**, 828 (1991).
- 18) Park, Y. H., Park, S. M., Kim, Y. K. and Lee, H. W.: *In vitro* effects of mono- and dimethylarginines on the contractility of rat thoracic aorta. *Yakhak Hoeji* **37**, 163 (1993).
- 19) Vallance, P., Leone, A., Valver, A., Collier, J. and Moncada, S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339**, 572 (1992).
- 20) Kimoto, M., Tsuji, H., Ogawa, T. and Sasaoka, K.: Detection of N^G,N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 657 (1993).
- 21) Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Nakane, M., Gorsky, L. D., Förstermann, U. and Murad, F.: Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 360 (1991).
- 22) 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).
- 23) Ueno, S., Sano, A., Kotani, K., Kondoh, K. and Kakimoto, Y.: Distribution of free methylarginines in rat tissues and in the bovine brain. *J. Neurochem.* **59**, 2012 (1992).
- 24) Tanphaichtr, V. and Broquist, H. P.: Role of lysine and ϵ -N-tri-methyl-lysine in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **248**, 2176 (1973).
- 25) Hulse, J. D. and Hendeson, L. M.: Carnitine biosynthesis: purification of 4-N-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase from beef liver. *J. Biol. Chem.* **255**, 1146 (1980).
- 26) Nakajima, T., Matsuoka, Y. and Kakimoto, Y.: Isolation and identification of N^G-monomethyl, N^G,N^G-dimethyl- and N^G,N^G-dimethyl-arginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **230**, 212 (1971).
- 27) Kakimoto, Y. and Akazawa, S.: Isolation and identification of N^G,N^G- and N^G,N^G-dimethylarginine, N^G-mono, di, and trimethyllysine and glucosylgalactosyl- and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine. *J. Biol. Chem.* **245**, 5751 (1970).
- 28) Eylar, E. H. and Brosroff, S.: Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 765 (1971).
- 29) Delibler, G. E. and Martenson, R. E.: Determination of methylated basic amino acids with the amino acid analyzer. *J. Biol. Chem.* **248**, 2387 (1973).
- 30) Park, K. S., Lee, H. W., Hong, S. Y., Shin, S., Kim, S. and Paik, W. K.: Determination of methylated amino acids in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **440**, 225 (1988).