

## 総 説

# 内因性一酸化窒素産生制御因子としてのメチル化アルギニンとその代謝機構 —翻訳後修飾を受けたアミノ酸残基に由来する異常アミノ酸の生理機能—

小 川 正

徳島大学医学部食品学講座

## *Endogenous regulator for nitric oxide synthesis, methylated arginines and its metabolism —physiological function of unusual amino acids derived from proteins methylated posttranslationally—*

Tadashi Ogawa

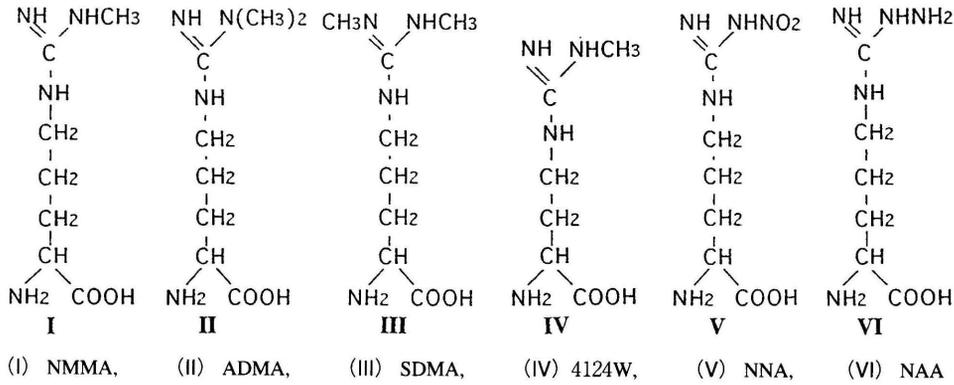
Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima

### はじめに

生体中に見いだされるタンパク質は全て遺伝子にコードされたアミノ酸配列に従ってその一次構造が構築された後も、アミノ酸残基は翻訳後修飾と呼ばれる複雑多岐にわたる修飾を受けて初めて生理的に意味を持つタンパク質として機能するようになる<sup>1)</sup>。その修飾の発現機構や修飾の意義については不明な部分が多い。生体におけるタンパク質アミノ酸残基の修飾の複雑さは一例として動物尿中に排泄される修飾タンパク質由来と考えられるアミノ酸誘導体の多彩さからも窺い知ることが出来る<sup>2)</sup>。タンパク質の翻訳後修飾の最も普遍的なものの一つにメチル化修飾がある。タンパク質のメチル化は、修飾を受けるタンパク質あるいはアミノ酸残基に特異的なメチル化酵素群によって触媒される<sup>3)</sup>。メチル化の生理的意義については解明されている1,2の例<sup>4,5)</sup>を除いて推定の域を出ないのが現状である。一般にこれらのメチル化タンパク質の代謝回転に伴って遊離するメチル化アミノ酸類は、高等動物にとっては再利用出来ない最終代謝産物として尿中に排泄されると考えられ、 $N^G$ -メチルヒスチジンのように体タンパク質の代謝回転速度を推定する指標化合物として利用されているものもある<sup>6)</sup>。しかしながら、高等動物において脂肪酸のミトコンドリア内への輸送に必須成分であるカルニチンの生合成において、修飾タンパク質由来の $N^G$ -トリメチルリジンが唯一の前駆体として利用されている事実は、高等動物において遊離リジンのトリメチル化反応が存在しないことを考えると興

味ある現象である。1987年 Moncada らのグループによって内皮細胞由来血管弛緩因子 (EDRF) が、全く新しいケミカルメデイエーターとしての一酸化窒素: nitric oxide (NO) であることが証明された<sup>7)</sup>。NO は発見の契機となった生体における血液循環機能の維持を始め広範囲わたり生理機能の調節に深く関与しており、その異常は心筋梗塞や高血圧等を初めとする多くの病態の成因となっている可能性がある。NO は一酸化窒素合成酵素 (NOS) によってアルギニンのグアニジノ窒素を前駆体 (基質) として合成される。NOS は構成型酵素群 (cNOS) と誘導型酵素群 (iNOS) に大別され、更に cNOS は (1) endothelial NOS (eNOS), (2) neuronal NOS (nNOS) に分類される。iNOS は macrophage 等に存在し mNOS とも呼ばれ、このような3つのイソフォームが存在することが知られている。NO や NOS の生理的意義を研究し、NO 関連疾患を治療するには NO 産生に関わる個々の酵素イソフォームに特異的な或いは共通の阻害剤の利用が不可欠であり、精力的に阻害剤の開発が行われている<sup>8)</sup>。NOS 研究の初期段階において、Moncada らはこの NO 産生系の特異的ブロッカー (阻害剤) として化学合成されたメチル化アルギニン類を利用してきた。近年、数多くの NO 産生系の一般的合成阻害剤の開発が進み、その種類、機能も豊富かつ複雑である。これらについては紙面の都合もあり他の総説<sup>9)</sup>を参照されたい。本稿では生体内で産生される唯一の内因性阻害物質である  $N^G$ -モノメチルアルギニン ( $N^G$ -monomethyl-L-arginine; NMMA, 1) および  $N^G$ ,  $N^G$ -ジメチルアルギニ

図-1 阻害物質及びその関連化合物の構造



ン (asymmetric  $N^G$ ,  $N^G$ -dimethyl-L-arginine; ADMA, II) について解説する (図-1 参照)。これら生体内阻害物質の存在及びその代謝機構の存在は、NO 産生調節 (制御) 機構が十分解明されていない現在、直接 NO 産生に影響を持つ可能性のある機構としても注目されている。

内因性阻害剤としてのメチル化アルギニン

1987年 Hibbs ら<sup>10)</sup>は lipopolysaccharide (LPS) により活性化されたマクロファージが示す細胞毒性発現機構の研究において、アルギニンからの毒性成分 (NO) の産生を阻害する化合物として、アルギニンのグアニジノ窒素がメチル基で修飾された NMMA, ADMA を報告した。NMMA, ADMA は ADMA の構造異性体である  $N^G$ ,  $N^{G^*}$ -dimethyl-L-arginine; SDMA, III) とともに、1970年 柿本ら<sup>11)</sup>によってヒトの尿中より単離・同定されたアミノ酸類である。その由来が詳細に検討され、生体内タンパク質の代謝回転に伴って体液中に遊離するアミノ酸類であることが立証された。Paik と Kim は<sup>12)</sup>タンパク質の生合成の過程で、タンパク質中の塩基性アミノ酸残基の内、アルギニン残基に特異的なプロテインメチラーゼ I [EC 2.1.1.23] によってメチル化を受けて生成する事を明らかにしている。微生物から高等動物まで全ての生物のタンパク質中に見受けられる。タンパク質のメチル化を受ける部位はタンパク質の構造や機能にも依存し、核や核小体タンパク質、スクレオデルマ (scleroderma) 抗原、ミエリン塩基性タンパク質等の解析から、グリシンクラスター (-Gly-Arg-Gly-) と呼ばれる構造が同定されている<sup>13)</sup>。哺乳動物においては核タンパク質中に比較的多く存在し、タンパク質中の NMMA, ADMA, SDMA の分布をみると ADMA が優位を占めている。体タンパク質中での平均的存在量は、哺乳動物で体タンパク質 1g 当

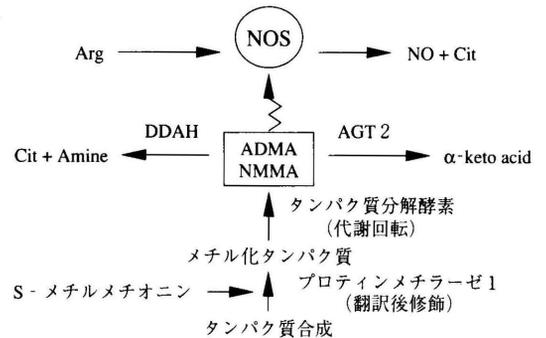
たり NMMA が 0.5-1.0, NDMA が 0.5-3.0, SDMA が 0.1-0.5 $\mu$ mol 程度と報告されている<sup>14)</sup>。高等動物に関する限り、遊離のアルギニンのグアニジノ窒素がメチル化される証拠は見つかっていない。NMMA, ADMA はともに生体内タンパク質の代謝回転によって絶えず体液中に遊離する NO

産生系の内因性阻害剤である。また、動物にとって摂取タンパク質の消化吸収によっても絶えず体内に取り込まれる化合物でもある。

メチル化アルギニン代謝酵素

体タンパク質の代謝回転に伴ってメチル化アルギニン類は体液中に遊離してくるが、全て尿中に排泄されるのではなく、図-2 に示される経路で活発に代謝される<sup>15)</sup>。

図-2 内因性 NO 産生阻害物質の生成・代謝機構と NO 産生阻害の様式



3種のメチルアルギニン類は全てが alanine : glyoxylate aminotransferase 2 (AGT 2) [EC2.6.1.44] によって対応するケト酸へと代謝される。しかしながら、内因性阻害剤として働く NMMA と ADMA のみが dimethylarginine dimethylaminohydrolase (dimethylargininase, DDAH) [EC3.5.3.18] により、グアニジン部の C-N 結合が加水分解的に切断されることによって対応するアミンとシトルリンに分解される。DDAH は分子量33,000の単純タンパク質である。本酵素は SDMA や強力なアルギニン誘導体型合成阻害剤として知られる  $N^G$ -ニトロアルギニン ( $N^G$ -nitro-L-arginine; NNA, V),  $N^G$ -アミノアルギニン ( $N^G$ -amino-L-arginine; NAA, VI) 等には全く作用せず、

本酵素の基質特異性は極めて高く、 $K_m$  値は ADMA (0.18mM), NMMA (0.36mM) である<sup>16)</sup>。この反応で生成したシトルリンは再び尿素サイクルを経てアルギニンが再生され、再度 NOS の基質となる。DDAH の反応によってジメチルアルギニンからはジメチルアミンが遊離するが、これも謎とされてきた発ガン性物質ニトロソジメチルアミン生成の前駆体としての内因性ジメチルアミンの起源を解明するきっかけともなった<sup>17)</sup>。これに関連して、日本人における胃ガンの原因とされる漬物(野菜)の亜硝酸イオンと焼き魚由来のアミンから生成するニトロソアミンの生成は、胃液等の酸性条件下においてのみ可能であるとする既成概念が存在したが、後にも触れるように、NOS によって生成する NO は非常に反応性の高いラジカルであり、2級アミンが存在すれば中性条件下でも直ちにニトロソ化が進行する<sup>18)</sup>ことも判明し、感染時におけるマクロファージによる大量の NO 産生(この時感染者の尿中には大量の亜硝酸、硝酸イオンが排泄される)と DDAH のジメチルアミン生成の現象は別の意味で追求されなければならない研究課題として残されている。もし、これらのメチル化アルギニンが不要な最終産物であるならば速やか尿中へ排泄する事で問題がないと考えられるが、この活発な分解機構が作動する背景には、メチル化アルギニン類が示す強力な NOS 阻害の作用機構について理解する必要がある。

DDAH による NMMA, ADMA の代謝および DDAH の分布

著者らは DDAH に対するモノクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロット法によってラットにおける本酵素の分布を検討した。ラットにおいては殆ど全ての臓器、NO 産性組織、細胞(マクロファージ、好中球等)等に酵素タンパク質が広く分布する<sup>19)</sup>。特に腎、肝、脾、脳など主要臓器において高い活性の分布を認めた。また、本酵素は広く哺乳動物の種間、臓器間を越えて普遍的に分布すると考えられる。特にラットの酵素については遺伝子のクローニングに成功し、全アミノ酸配列を明らかにした<sup>20)</sup>。ノーザンブロットにより本酵素が各種臓器で発現していることが確認された。コンピューター検索によっても相同性を示すタンパク質の報告は見当たらない。最近ヒトの遺伝子のクローニングにも成功して、ラットの酵素との比較を行っている。一方、メチル-<sup>14</sup>C 標識 NMMA, ADMA を投与したラットにおいて臓器中に放射性モノあるいはジメチルアミンが速やかに出現し、続いて尿中に排泄されることを認め、ラット体内で ADMA,

NMMA の DDAH による代謝系が活発に作動していることを示した<sup>17)</sup>。Hecker ら<sup>21)</sup>はウシ血管内皮細胞において NMMA からシトルリンが生成する事実を認め、DDAH 様酵素の存在を認めると同時に、本酵素が *in vivo* での NMMA, ADMA の NOS 阻害活性を NNA, NAA などより弱める要因になっていると推察した。一方、Fickling ら<sup>22)</sup>は培養ヒト血管内皮細胞がその培養液中に ADMA を蓄積すること、その濃度(培養7日目で2.8μM, 5.1μg/10<sup>7</sup>細胞)で LPS 活性化 J774マクロファージの NO 産生を40%阻害することを明らかにしている。生体中では速やかに分解されるが、DDAH による分解と体タンパク質からの遊離が平衡に達する定常状態における生体内濃度(プール)は正確には測定しがたいが、表-1に示す各種組織における値が報告されている。

表-1 ラット組織中の遊離 NMMA 及び ADMA

組 織	NMMA (nmol/g 新鮮組織重)	ADMA
(a)		
脳	0.16	0.30
腎臓	0.38	2.25
脾臓	1.13	7.03
筋肉	1.04	0.23
血液	0.03	0.14
(b)		
大動脈	4.46	5.04
好中球	0.90 <sup>c)</sup>	1.25 <sup>c)</sup>
マクロファージ	1.18 <sup>c)</sup>	7.76 <sup>c)</sup>

- a) 文献24) から引用
- b) 文献9) から引用
- c) nmol/10<sup>8</sup>cells

NMMA, ADMA による NOS の阻害

NMMA, ADMA の特徴は強度の差こそあれ全ての NOS イソフォームを阻害することである。マクロファージの NOS に対して、基質(アルギニン)存在下では可逆的な拮抗阻害( $K_i$ : 13μM)を示し、基質非存在下では、時間依存的、濃度依存的に不可逆的阻害が擬一次反応( $K_{inact}$ : 0.07min<sup>-1</sup>,  $K_i$ : 2.7μM)で進行する。NMMA による DDAH の阻害は酵素反応に必須の補酵素の存在が必要であり、NMMA はいわゆる mechanism-

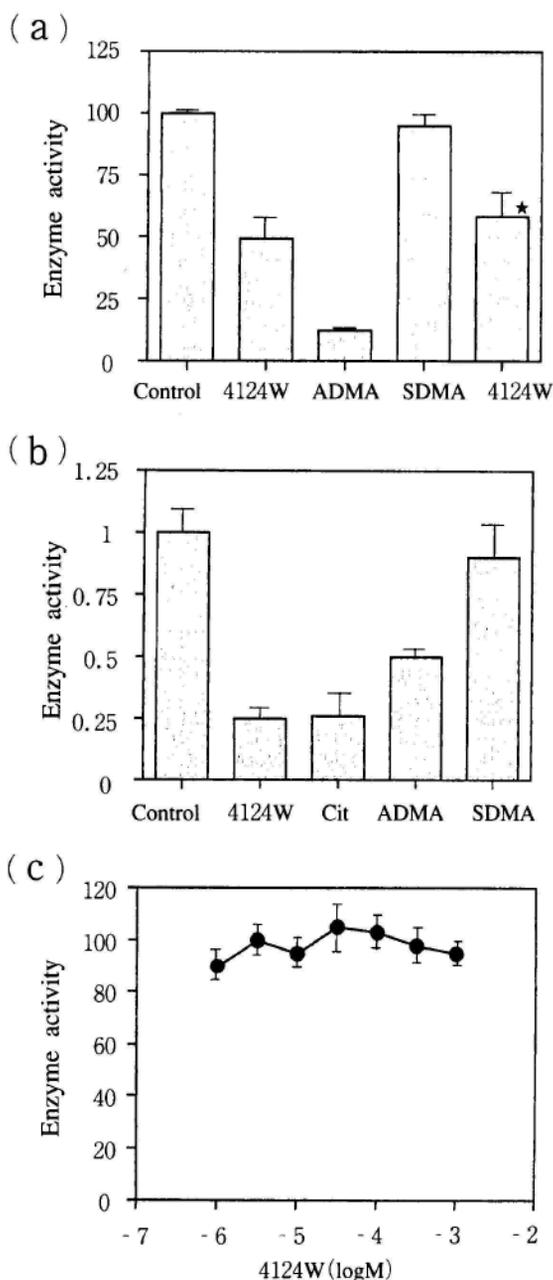
based enzyme inhibitor であり, enzyme-activated irreversible inhibitor=suicide inhibitor (自殺基質)として働くことが推定されている<sup>23)</sup>。NMMA は一旦基質結合部位に結合し, 酵素反応中間体としてのヒドロキシ中間体を生成する。この中間体から生成したラジカルが基質結合部位から離脱する前に, 酵素タンパク質を共有結合的に修飾し, 不可逆的に不活性化すると説明がなされている。ちなみに, マクロファージや中枢神経系培養細胞にたいする *in vivo* 実験で, NO 産生に対する NMMA の IC<sub>50</sub> はそれぞれ 11.8 μM 及び 8.9 μM である。しかしながら, NMMA より強力な阻害剤とされる NNA ではそれぞれ 212 μM 及び 0.05 μM と極端な差が認められ, これらを使い分けることで *in vivo* での選択的阻害効果を期待できると考えられている。

#### NMMA, ADMA 及び DDAH による NO 産生の制御

既に, Vallance や Moncada らのグループによって, 実験的 ADMA の投与が末梢血管収縮に伴う血圧上昇を導くことが明らかにされ, ヒトにおける ADMA の動脈投与は前腕の血流を低下させること, ヒトの血漿中には ADMA が NMMA に比べて 10 倍も多いことがなどが示されている<sup>24)</sup>。ADMA 分解酵素の分布, 尿中への排泄を考慮すると, ADMA 量をコントロールしているのは腎臓でないかと疑われ, 事実, 腎疾患患者において ADMA の蓄積, 排泄異常も報告されている<sup>25)</sup>。

近年, DDAH や ADMA が実際に *in vivo* で NO 産生系の制御に関与している証拠が, MacAllister らと著者らの共同研究において DDAH の特異的阻害剤を利用した研究によって明らかにされた<sup>26)</sup>。もし DDAH によって細胞や組織における NMMA, ADMA 量が調節されているなら, DDAH の作用を抑制すると, NMMA や ADMA の蓄積がおり, 濃度がある程度上昇すれば NO 産生系は全身的に阻害を受けることになる。もし, 阻害が血管内皮細胞で起これば NO 産生の阻害に伴って血管収縮を誘導し, 血圧上昇をもたらすこととなる。DDAH を阻害はするが NO 産生系に直接影響を与えない化合物の検索を行い, NMMA のメチレン基の 1 個短い L-2-アミノ-4-(3-メチルグアニジノ)-酪酸 (L-2-amino-4-(3-methylguanidino)butyric acid; 4124W, IV) が有効であることを見いだした (図-3 (a), (b), (c))。ラット肝臓のホモジネートにおいて NMMA からシトルリン生成阻害が IC<sub>50</sub>: 416 μM, ヒト培養血管内皮細胞 (SGHEC-7) における NMMA からシトルリンへの細

図-3 ラットの肝臓ホモジネート中の DDAH 及び精製 DDAH 活性 (★) に及ぼす各種阻害剤の影響 (a) と血管内皮細胞由来培養細胞 (SGHEC-7) 中の DDAH 活性に対する各種阻害剤の影響 (b), およびヒト胎盤内皮細胞由来 NO 産生酵素活性に及ぼす 4124W の影響 (c)



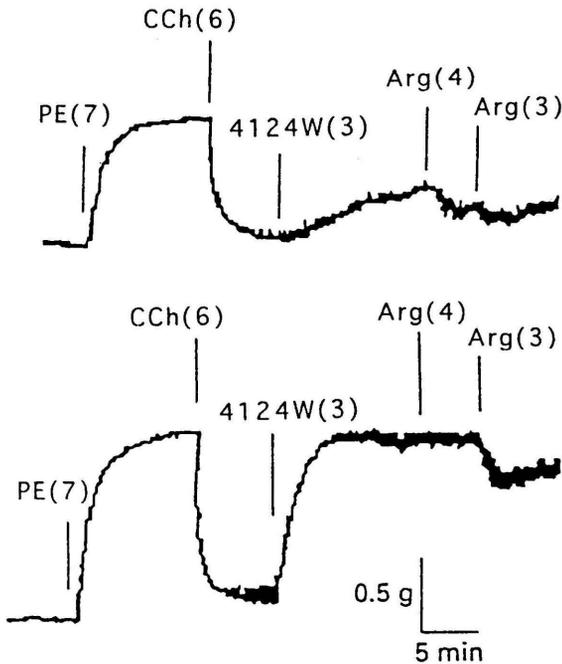
(a) の活性は control に対する%, (b) の活性は細胞内の放射性 NMMA (DDAH の基質) に対する放射性 Cit (シトルリン: 酵素反応生成物) の放射能の比 (文献<sup>26</sup>より引用)

4124W: L-2-アミノ-4-(3-メチルグアニジノ)-酪酸, Cit: シトルリン

注: (a), (b) において 4124W は強く DDAH を阻害していることを示している。SDMA 以外は全て DDAH を拮抗的に阻害する。使用した阻害剤の濃度はすべて 1 mM (4124W, ADMA, Cit において有意に差が認められる。n = 6 ~ 9, p < 0.005)。 (c) において 4124W は NO 産生酵素に影響を与えないことを示している。活性は control に対する%。(4124W の 1 μM ~ 1 mM の濃度において有為な差が認められない。n = 6)

胞内における転換阻害の IC<sub>50</sub>が250μMである。ヒト血管内皮細胞由来培養細胞 SGHEC-7 の培養液への4124Wの添加によって培養液中に遊離する ADMA 濃度は3.1 μM から5.0μM に増加する(n=15, P<0.005)。一方で, ADMA の構造異性体で NO 合成を阻害しない SDMA の蓄積は認められない。この事実は著者らが明らかにした DDAH の基質特異性 (SDMA は全く基質とならない), あるいは SDMA の代謝系である AGT 2 によるトランスアミノーションによる消去反応を裏付けている。また, ラット大動脈リングを用いた実験で, 1 mM の4124W の添加によって内皮細胞依存性収縮 (100nM 濃度エピネフリンによる収縮に換算してその約80%に相当) が観察された (図-4)。この収縮効果は100μM アルギンの

図-4 フェニレフリン前処理収縮ラット大動脈のカルバコールに対する内皮依存性弛緩反応に及ぼす4124W(a) 及びNMMA(b) の効果 (文献26より引用)。



(a) の4124W は微量で穏和な収縮を惹起し、この反応はアルギンの投与により回復するが、4124W の場合は (b) のNMMA の場合に比べて鋭敏に应答する。  
PE: フェニレフリン、CCh: カルバコール、Arg: L-アルギニン;  
( ) 内の数字は各試薬の濃度 (-logM)

添加によって回復する。また, 4124W 1 mM の添加によってヒト伏在静脈を用いたブラジキニンによる血管弛緩の約20%回復が観察された。このことは, DDAH の阻害によって NO 産生系を阻害するに十分な内因性阻害物質 ADMA あるいは NMMA が蓄積する事を示唆している。これらの事実は DDAH 活性に何らかの異常が生じれば NO 産生に影響が出ることを示唆するとともに, それに

伴い何らかの病理的生理的異常による病態発現への関与を予想させる。

Bogle ら<sup>27)</sup> の実験によれば, SGHEC-7 の ADMA, NMMA の取り込みは担体に依存した吸収機構によるもので, NO 産生誘導と同調して活性化され (誘導され) 吸収が増強される。アルギニンや他のアルギニン誘導体もこの吸収機構で取り込まれる。また, この活性化は細胞によって異なることが期待され, NO 産生系の選択的制御を可能にすると期待される。

Matsuoka ら<sup>28)</sup> は実験的に高血圧を発症するモデル動物を用いて内因性阻害物質 NMMA, ADMA の作用機構を検討している。Dahl 食塩感受性ラット (DS) においては慢性的アルギニン投与が血圧上昇を抑制し得ること, 基礎的 NO 産生が低い事実に基づいて, 内因性阻害物質 ADMA がアルギニンと競合して阻害作用を示し高血圧発症を導いているのではないかと仮説に基づいて実験を行っている。DS に高食塩食を与えると血圧が上昇し, 同時に尿中 NOx の排泄が低下し, ADMA の排泄量が増加する。これに対して食塩耐性ラット (DR) は食塩投与においても血圧の変化を示さず, 尿中 ADMA, NOx の排泄増加も観察されなかった。しかし, DS における ADMA の増加はその分解に関わる酵素系 DDAH の存在量や活性とは無関係に増加することが示された。平均血圧と尿中 ADMA 排泄量の間には正の相関が認められたことから, 内因性阻害物質 ADMA が DS の高血圧発症に深く関与していることを示唆している。また, 自然発症高血圧ラット (SHR) においては正常なラットに比べて有意に多量の NOx を排泄しており, ADMA については正常ラットの排泄量よりも低い値を示すことを明らかにしている。従って, 現在のところ SHR の高血圧発症と ADMA の間には直接的な関係はないものと考えられている。

Faraci ら<sup>29)</sup> は脳中の ADMA 濃度が高いことに注目し, 脳血管系に及ぼす内因性阻害物質の影響について検討している。ラットと兎の頭蓋窓から ADMA を投与して NO 合成の50%阻害濃度を検討した結果, それぞれ大脳で ADMA ; 2.3μM, 小脳で ADMA ; 1.3μM であること, 基底動脈において10および100μM の ADMA で9および19%の収縮が生じることを認めた。またアセチルコリンによる弛緩は抑制されるが, ニトロプルシッドによる弛緩は影響を受けない。これらの事実から ADMA が脳中の NO 合成のモジュレーターとして機能している可能性を強く示唆した。

神経系と血圧の関係に及ぼす内因性阻害剤の影響に関する Jin ら<sup>30)</sup>の研究では、阻害剤の脳室内投与は、合成阻害剤 NAME (NNA のメチルエステル) が動脈血圧を上昇させ、心拍数を減少する方向に作用するのに対して、内因性阻害剤 ADMA は血圧、心拍数の両方を下げる。この時、顕著に圧受容反射 (心拍数の変化量/血圧の変化量) が阻害されることを示した。このことは、圧受容反射機能の制御に中枢 NO が何らかの関わりを持つことを示唆するものとして注目される。一方、ADMA は静脈投与の実験から、血管内皮性の cNOS を阻害し、心循環機能の制御に関与するが、さらに NO 合成阻害の機構以外の別の機構によっても制御に関与していることを示した。

近年アテローム性動脈硬化症の病態に ADMA が関与する可能性が指摘されている。Bode-Boger ら<sup>31)</sup>は高コレステロール食で飼育したウサギにおいて血漿 ADMA 濃度は約  $9\mu\text{mol/l}$  と正常ウサギの 9 倍にも増加し、血中におけるアルギニン/ADMA 比が減少することが病態発現に関係があると示唆している。事実、アルギニンの投与はこの比を改善し、NO 産生を正常化し、動脈硬化症状の組織学的改善に有効に働くことが示されている。この他、ADMA の増加 (蓄積) を伴う疾患として、子癩前症の患者 (血中濃度; 正常の 2 倍)<sup>32)</sup> や末期的慢性腎不全患者 (透析中の患者血漿中濃度  $4.5\mu\text{mol/l}$ , 正常;  $0.6\mu\text{mol/l}$ )<sup>25)</sup> 等の例が挙げられる。実験的腎不全ラットでは血液中 ADMA 濃度の上昇により、NO の産生が抑制されていることも報告されている。

(おわりに)

内因性 NOS 阻害物質である NMMA, ADMA とその生体内濃度調節に深く関係する DDAH の存在は、正常な NO 産生機能を維持する上で重要であり、あらゆる組織、細胞において NO 産生調節機構の一翼を担っていると考えられる証拠が蓄積されつつある。従って、内因性 NOS 阻害物質の代謝異常は、NO を介した生体のホメオスタシスに異常をもたらし、種々の病態の発現につながるものとして注目され、今後更なる詳細な検討が期待される。

## 文 献

1. Wold, F. : In vivo chemical modification of proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 50 : 783-814, 1981
2. Holakova, H. and Dely, Z. : Chromatographic and electrophoretic behaviour of amino acids arising from post-translational reactions in proteins. *J. Chromatogr.*, 159 : 227-314, 1978
3. Paik, W.K. and Kim, S. : The enzymology of post-translational modification of proteins (Freedman, R. B. and Hawkins, H.C. eds.), vol. 2, Academic Press, N.Y. 1985, pp. 187
4. Clarke, S. : Protein carboxyl methyltransferases : two distinct classes of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 54 : 479-506, 1985
5. Frost, B., Syed, S.K., Kim, S., and Paik, W.K. : Effect of enzymatic methylation of cytochrome-c on its function and synthesis. *Int. J. Biochem.*, 22 : 1069-1074, 1990
6. Young, V.R., Alexis, S.D., Baliga, B.S., and Munro, H. N. : Metabolism of administered 3-methylhistidine. *J. Biol. Chem.*, 247 : 3592-3600, 1972
7. Palmer, R.M. J., Ferridge, A.G., and Moncada, S. : Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327 : 524-526, 1987
8. Ogden, J.E. and Moore, P.K. : Inhibition of nitric oxide synthase-potential for a novel class of therapeutic agent? *Trends in Biotechnol.*, 13 : 70-78, 1995
9. 平田結喜緒編 : 別冊医学のあゆみ「NO のすべて」, 医歯薬出版, 東京, 1996
10. Hibbs, J.B., Vabrin, Z. and Taintor, R.R. : L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.*, 138 : 550-565, 1987
11. Kakimoto, Y., and Akazawa, S. : Isolation and identification of  $N^G$ ,  $N^G$  and  $N^G$ ,  $N'^G$ -dimethylarginine,  $N^{\epsilon}$ -mono, di, trimethyllysine and glucosyl-galactosyl and galactosyl- $\delta$ -hydroxylysine from human urine. *J. Biol. Chem.*, 245 : 5751-5758, 1970
12. Paik, W.K. and Kim, S. :  $N^G$ -Methylarginine : Biosynthesis, biochemical function and metabolism. *Amino acids*, 4 : 267-286, 1993
13. Lishwe, M.A., Cook, R. G., Ahn, Y. S., Yeoman, L. C., et al. : Clustering glycine and  $N^G$ ,  $N^G$ -dimethylarginine in nucleolar protein-C23. *Biochemistry*, 24 : 6025-6030, 1985
14. 松岡征夫 : タンパク質の  $\epsilon$ -N-メチル化リジン体お

- よびグアニジノ-*N*-メチル化アルギニン体。III. 自然界, 哺乳動物での存在と分布. 生化学: 44, 364-370, 1972
15. Ogawa, T., Kimoto, M., Watanabe, H. and Sasaoka, K. : Metabolism of  $N^G, N^G$ - and  $N^G, N^G$ - dimethyl arginine in rats. Arch. Biochem. Biophys. , 252 : 526-537, 1987
  16. Ogawa, T., Kimoto, and Sasaoka, K. : Purification and properties of new enzyme,  $N^G, N^G$ - dimethyl - arginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. J. Biol. Chem. , 264 : 10205-10209, 1989
  17. Kimoto, M., Ogawa, T. and Sasaoka, K. :  $N^G, N^G$ - Dimethyl-L-arginine, a dominant precursor of endogenous dimethylamine in rats. Amino acids, 6 : 273-282. 1994
  18. Miwa, M., Stuehr, D. J., Marletta, M.A., Wishnok, J.S., et al. : Nitrosation of amines by stimulated macrophages. Carcinogene, 8 : 955-958, 1987
  19. 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 : 657-663, 1993
  20. Kimoto, M., Sasakawa, T., Tsuji, H., Miyatake, S. et al. : Cloning and sequencing of cDNA encoding  $N^G, N^G$ -dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. Biochem. Biophys. Acta, 1337 : 6-10, 1997
  21. Hecker, M., Mitchell, J. A., Harris, H. T. and Katsura, M. : Endothelial cells metabolize  $N^G$ -monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 167 : 1037-1043, 1990
  22. Fickling, S.A., Leone, A., Nussey, S. S., Vallance, P., et al. : Synthesis of  $N^G, N^G$ -dimethylarginine by human endothelial cells. Endothelium, 1 : 137-140, 1993
  23. Olken, N.M. and Marletta, M.A. :  $N^G$ -Methyl-L-arginine function as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. Biochemistry, 32 : 9677-9685, 1993
  24. Moncada, S. and Higgs, A. : The L-arginine-nitric oxide pathway. New Eng. J. Med. , 329:2002-2012, 1993
  25. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J. and Moncada, S. : Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet, 339 : 572-575, 1992
  26. MacAllister, R.J., Parry, H., Kimoto, M., Ogawa, T., et al. : Regulation of nitric oxide synthesis by dimethyl arginine dimethylaminohydrolase. Br. J. Pharmacol. , 119 : 1533-1540, 1996
  27. Bogle, R.G., MacAllister, R.J., Whitely, G.S. and Vallance, P. : Induction of  $N^G$ - monomethyl - L - arginine uptake : a mechanism for differential inhibition of NO syntheses? Am. J. Physiol. , 269 : C750-C756, 1995
  28. Matsuoka, H., Itho, S., Kimoto, M., Kohno, K., et al. : Asymmetrical dimethylarginine , an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. Hypertension, 29 : 242-247, 1997
  29. Fraci, F. M., Brain, J. F. and Heistad, D. D. : Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. Am. J. Physiol. , 269 : H1522-H1527, 1995.
  30. Jin, J-S. and D'Alecy, L.G. : Central and peripheral effects of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthetase inhibitor. J. Cardiovascular Pharmacol. , 28 : 439-446, 1996
  31. Bode-Boger, S.M., Boger, R. H., Kienke, S., Junger, W., et al. : Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contribute to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 219 : 598-603, 1996
  32. Fickling, S.A., Williams, D., Vallance, P. and Nussey, S. S. : Plasma concentration of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in normal pregnancy and pre-eclampsia. Lancet, 342 : 242-243, 1993

## SUMMARY

Nitric oxide is synthesized in various tissues and plays a role in wide and diverse range of physiological process such as vasodilation at cardiovascular system, inhibition of platelet aggregation, cytotoxic effect of phagocytic cells, and so on. Remarkable progress in the studies on a biological function of nitric oxide have been made by the technical use of various inhibitor of nitric oxide synthase. Now the interest in the possibility, that the inhibitors of nitric oxide synthase may be the important drugs for the various diseases, is growing in the field of clinical investigation of nitric oxide. In this review, the properties of the endogenous inhibitors,  $N^G$ -monomethyl-L-arginine and  $N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginine which are derived from the proteins methylated post-translationally, and their metabolic significance including the enzyme, dimethylarginine dimethylaminohydrolase as a possible regulatory system of nitric oxide function in tissues.

Key words : nitric oxide, nitric oxide synthase, methylated arginines, post-translational modification, endogenous inhibitors