

グアニジノコハク酸生合成経路に関する実験的研究

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室 (主任：小坂二度見教授)

松 田 力 哉

(昭和63年3月28日受稿)

Key Words : guanidinosuccinic acid, enzyme activity, metabolic pathway, urea, Guanidine Cycle

緒 言

グアニジノコハク酸 (以下 GSA) は、腎不全患者でその血中濃度^{1),2)}、尿中排泄量が著明に増加し³⁾⁻⁵⁾、*in vitro* において種々の毒性を示すことから⁶⁾⁻¹¹⁾、尿毒症起因物質の一つと考えられている。しかし、その合成経路の詳細は未だ不明であるため、本研究はこの解明を目的として

行った。

GSA 合成経路に関して Cohen 等は、アルギニンとアスパラギン酸を基質とする、アミジン基転移反応による経路 (図 1 . a) を提唱した⁵⁾。一方 Natelson 等は、尿素が Guanidine Cycle (図 2) を經由して、カナバニコハク酸が合成され、この分解 (図 1 . b) により GSA が合成される経路を提唱した¹²⁾。Cohen 等、および Natelson

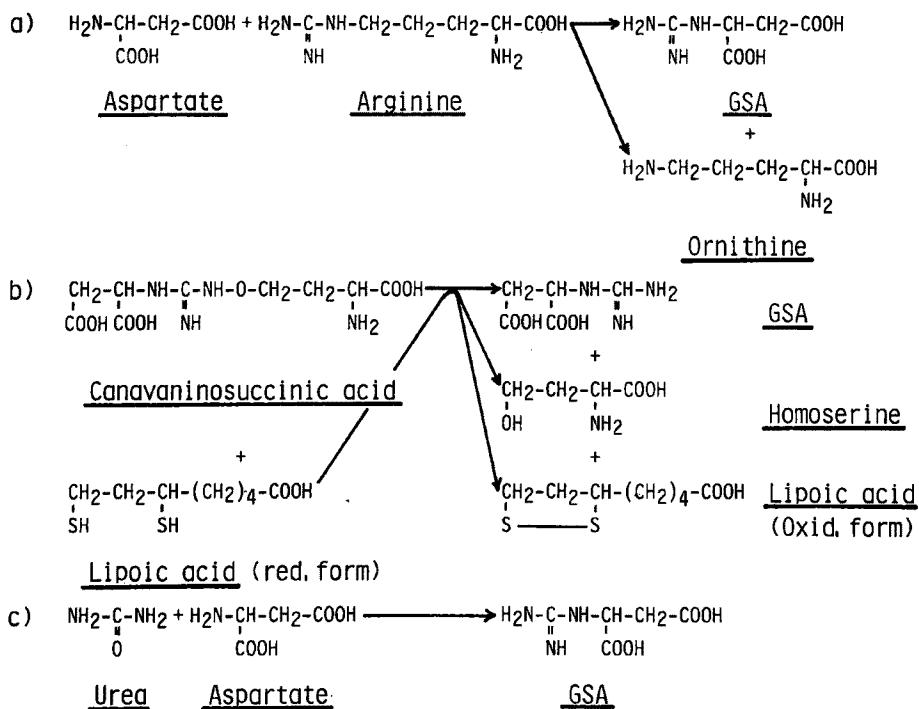


図 1 GSA 生合成経路

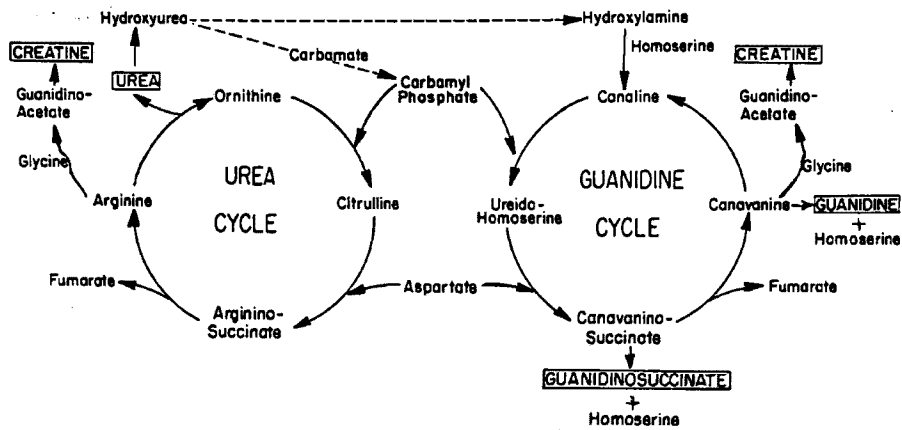


図2 Natelson等により提唱された Guanidine Cycle (文献12)より引用)

等の説の、真偽に関する報告は多いが^{1),13)-21)}, これらの説はいずれも酵素学的証明が不完全であるため、推論にすぎない。しかし、尿素がGSA合成を促進することは、単離肝細胞の系を用いた青柳らの研究によっても確認されており^{22),23)}, 尿素がGSAの前駆物質である可能性が示唆される。

著者は、従来の報告およびGSAの化学構造から、尿素とアスパラギン酸を基質として、GSAが合成される可能性を考え(図1.c), この反応を触媒する酵素の存在を証明するため研究を進めていくうち、正常ラット肝より、GSA合成酵素活性の高い画分を抽出することに成功した。

本論文では、酵素液の抽出過程、著者が用いた反応系および活性測定法を提示し、これらを確立するため検討した、種々の実験結果を示すとともに、以前に提唱されたGSA合成経路との関連についても検討を加え、報告する。

対象と方法

1. 動物および酵素液の調整

蛋白質含量24%の固形飼料(オリエンタル酵母)を自由摂食させた、Sprague Dawley系正常雄ラット(体重350-400g)を用いた。無麻酔下で、断頭により屠殺、脱血したのち、すばやく開腹し、肝を摘出した。さらに、氷冷生理食塩水中で洗浄、脱血を行った摘出肝の、湿重量を測定した。なお、以後の酵素液調整過程はす

べて、0-4℃の低温下で行った。

新鮮ラット肝をハサミで細片にし、湿重量の9倍量の0.02Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4, 0.25Mショ糖含有)を加え、Potter型ホモジナイザーで均質化した。さらにこのホモジネートを、100,000×g, 60分間遠心し、上清(可溶性画分)を採取した。その液量を測定したのち、ゆっくりかき混ぜながら、硫酸アンモニウムを30%飽和となるまで加え、30分間放置後、10,000×g, 30分間遠心した。この上清に同様の方法で、硫酸アンモニウムを40%飽和となるまで加え、30分間放置後、同様に遠心した。上清を除いて得られた沈殿物を、少量の0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)で溶解し、同一の緩衝液で平衡化した。Sephadex G-25(脱塩用ミニカラムPD-10®, ファーマシア社製)によりゲル濾過したのち、酵素液とした。

2. 標準的酵素反応系および活性測定法

標準的反応系は、上述の酵素液、リン酸カリウム緩衝液(0.1M, pH7.4)の他、尿素(30mM)、アスパラギン酸ナトリウム(30mM)、ATP(2mM)、MnCl₂(1mM)およびATP濃度を維持するため、ホスホエノールピルビン酸(10mM)、ピルビン酸キナーゼ(EC2.7.1.40; 3単位)、ミオキナーゼ(EC2.7.4.3; 0.8単位)、無機ピロホスファターゼ(EC3.6.1.1; 0.4単位)より成り、全量を0.5mlとした。37℃の恒温槽の中で、5分間温度平衡を保った基質混合液と酵素液を混和

し、5分間反応させたのち、50%トリクロル酢酸 (TCA) 0.125ml (終濃度10%) を加えて反応を停止した。また、反応前に同量の TCA を加えたものを対照とした。これら TCA 混和液を、3000 rpm, 10分間遠心し、その上清をマイクロフィルター (ポアサイズ0.45 μ m, 日本ミリポア工業社製) で濾過したのち、GSA 濃度測定のための試料とした。

GSA 濃度の測定は、グアニジノ化合物自動分析装置 (島津製作所製 LC-3A) を用いて行った。この装置は、ニンヒドリン蛍光法でグアニジノ化合物を検出する、高速液体クロマトグラフィーであり、その測定原理、装置の概要は、Hiraga 等により報告されている²⁴⁾。しかし、溶出条件については一部改変してあるため、著者の条件を以下に示す。溶出液の流速は0.7ml/min で、1液:0.1N クエン酸ナトリウム, pH3.0(12分), 2液:0.15N クエン酸ナトリウム, pH3.5 (7分), 3液:0.35N クエン酸ナトリウム, pH4.8(6分), 4液:0.35N クエン酸ナトリウム, pH6.0 (3分), 5液:0.7N クエン酸ナトリウム, 0.5N 塩化ナトリウム, 0.1N ホウ酸, pH12(9分), 6液:0.2N 水酸化ナトリウム(5分) とし、6液終了後、再び1液によりカラムの平衡化を行った。反応液である、0.6%ニンヒドリンと0.5N 水酸化ナトリウムの流速は、各々0.4ml/min, 0.7ml/min であり、カラムおよび反応槽の温度は55 $^{\circ}$ Cとした。また、既知の濃度の GSA 標準液を、試料に加えて分析することにより、GSA ピークの確認を行った。

酵素液の蛋白質濃度は、Bradford 法により、Bio-Rad 社製蛋白定量用試薬を用いて測定し、酵素活性は、単位蛋白、単位時間あたりに合成された、GSA のモル数で表示した。

なお、標準的反応系を基にして種々の検討を行ったが、その個々の方法については、結果とともに後述した。

3. 試薬

本研究で使用した、主な試薬を以下に示す: GSA, ATP, L-カナリン (free base), Hydroxyurea (シグマ社製): ホスホエノールピルビン酸 (カリウム塩), ピルビン酸キナーゼ, ミオキナーゼ, 無機ピロホスファターゼ (ペーリング

マンハイム社製): 硫酸アンモニウム, L-アルギニン, アスパラギン酸 (ナトリウム塩), L-カナニン (硫酸塩), 塩化マンガン (半井化学薬品社製): 尿素, 各種グアニジノ化合物標準液, ニンヒドリン (和光純薬工業社製)。

なお、上記以外の試薬については、通常の生化学実験に用いられる純度のものを使用した。

結 果

1. 硫酸アンモニウム分画

正常ラット肝ホモジネートを、100,000 \times g, 60分間遠心後の上清 (可溶性画分) に、硫酸アンモニウム分画を行った。各画分より得られた酵素液を用いて、GSA 合成酵素活性を測定した結果、その30-40%飽和画分で、最も高い比活性が得られた (表1)。この画分での、正常ラット肝における GSA 合成酵素活性は、7.98 \pm 0.53 (nmol/hr/mg protein, mean \pm SD) であった。

2. 反応時間、反応温度、反応系の酵素蛋白質濃度について

37 $^{\circ}$ C, pH7.4, 反応系の酵素蛋白質濃度10mg/mlにおいて、反応時間と GSA 合成量との関係を検討した。図3に示したごとく、反応開始後7-8分間は、直線的に GSA 合成量が増加した。

反応系に加える酵素蛋白質量を変化させ、反応開始後、5分、10分での GSA 合成量を測定した。反応系の酵素蛋白質濃度が低いほど、直線的に GSA 合成量が増加する時間が、短い傾向にあった (図4)。しかし、反応時間5分における検討では、GSA 合成量が、反応系に加えた酵素蛋白質量に、比例することが確認された (図5)。

反応槽の温度を変化させ、反応時間、および GSA 合成酵素活性に及ぼす影響を検討した (図

表1 硫酸アンモニウム分画

Ammonium sulfate fraction (%)	Specific activity (n mol/hr/mg protein)
0-30	—
30-40	7.68
40-50	0.98
50-60	1.38

6). 反応温度が低い場合、直線的に GSA 合成量が増加する時間は延長する傾向にあったが、酵素活性は低値を示した。逆に反応温度が高い場合、酵素活性は高値を示し、直線的に GSA 合成量が増加する時間は短縮した。

種々の条件において、反応開始後少なくとも 5 分間は、直線的に GSA 合成量が増加することが確認されたため、前述（標準的活性測定法）のごとく、反応時間は 5 分とした。また、反応温度は 37°C、反応系の酵素蛋白質濃度は 10-15

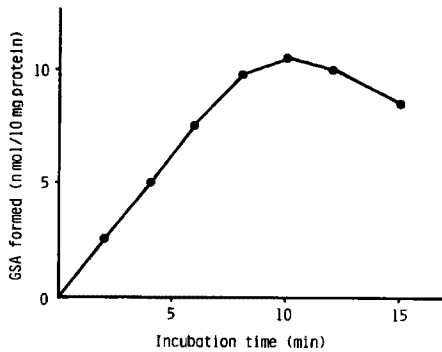


図3 標準的反応系における反応時間と GSA 合成量との関係

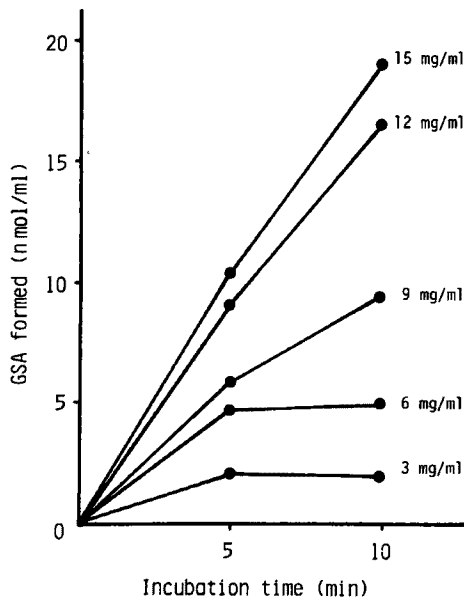


図4 反応系の酵素蛋白質濃度と反応時間との関係

mg/mlで行った。

3. 至適 pH の検討

反応系の pH を変化させ、GSA 合成酵素活性に及ぼす影響を検討した結果、pH7.4で最も高い比活性が得られた（図7）。

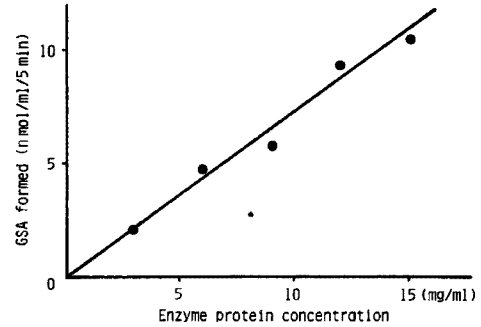


図5 標準的反応系における酵素蛋白質濃度と GSA 合成量との関係

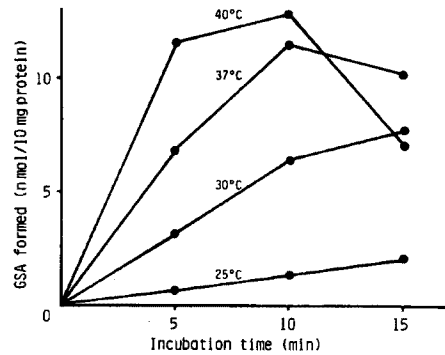


図6 温度の影響

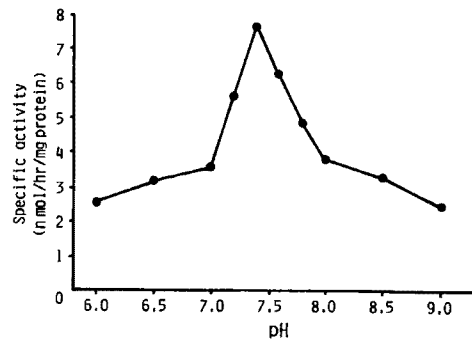


図7 pH の影響

4. 金属イオンの影響

Mn²⁺の代わりに、反応系に各種金属イオン、またはキレート剤であるEDTAを加えて反応させ、得られた結果を表2に示した。Mn²⁺の存在下で比活性が最も高く、Cu²⁺の存在下でも、これに匹敵する高い比活性が得られた。これに対しFe²⁺の存在下では、GSA合成酵素活性は完全に抑制された。他のイオンのうち、EDTAを加えた時より高い比活性を示したのは、Zn²⁺のみであり、他のイオンの影響は顕著でなかった。

5. 反応系の検討、および以前に提唱された経路との関連

標準的酵素反応系に加えた各物質を、反応系から除外して酵素活性を測定し、これを比較することにより、GSA合成における各物質の必要性を検討した。また、尿素(30mM)の代わりに、

Hydroxyurea (30mM), L-カナリン (2 mM), L-カナバニン (2 mM), L-アルギニン (30mM) を、各々加えて酵素活性を測定し、この反応系において、Guanidine Cycle (図2) またはアミジン基転移反応 (図1.a) により、GSAが合成されている可能性についても検討した。

表3に示したごとく、各物質を反応系から除外すると、GSA合成酵素活性は低下した。その中でも特に、Mn²⁺を反応系から除外した時の、活性低下が顕著であった。これに対し、尿素またはアスパラギン酸を、反応系から除外した時の活性低下は軽度であった。しかし、尿素の代わりに、Hydroxyurea, L-カナリン, L-カナバニン, L-アルギニンを加えても、この活性低下は回復せず、比活性はむしろ低値を示した。

考 察

GSAは、腎不全患者において、その血中濃度^{1),2)}、尿中排泄量が著明に増加する³⁾⁻⁵⁾ことから、腎不全時、その産生が亢進することが示唆される。また、腎摘患者においてもGSA産生は持続し、重症肝障害の合併した尿毒症患者で、その産生が低下することから、主要産生臓器は肝臓であると考えられている²⁾。

Cohen等は、GSAの化学構造から、アルギニンとアスパラギン酸を基質として、アミジン基転移反応によりGSAが合成される経路(図1.a)を提唱した⁵⁾。先天的に尿素サイクルの構成酵素の活性が低く、アルギニン合成低下のある臨床例において、尿中GSA排泄量が正常人より低値であること¹⁾、また、ラット灌流肝を用いた実験で、¹⁴C-アルギニンがGSA合成に利用されること¹⁸⁾などは、この説を支持している。しかし、アルギニンを尿素とオルニチンに分解する酵素であるアルギナーゼ(EC3.5.3.1)の活性が、先天的に低下している患者において、血中アルギニン濃度が増加しているにもかかわらず、GSAの尿中排泄量は正常人より低値であることが報告されている^{25),26)}。また、種々の動物、臓器を用いて、アルギニンとアスパラギン酸から、酵素反応によりGSAを合成することができなかったとする報告もある¹³⁾。これらはいずれも、Cohen等の説を疑問視する根拠であり、別の経路の存

表2 金属イオンの影響

Metal ion	Specific activity (n mol/hr/mg protein)	Activity (%)
Mn ²⁺ (1mM)	8.10	100
Cu ²⁺ (1mM)	7.29	90
Mg ²⁺ (1mM)	0.70	8.6
Zn ²⁺ (1mM)	1.09	13.5
Ca ²⁺ (1mM)	0.54	6.7
Co ²⁺ (1mM)	0.55	6.8
Ni ²⁺ (1mM)	0.47	5.8
Fe ²⁺ (1mM)	—	0
EDTA (2mM)	0.84	10.4

表3 反応系の検討および以前に提唱された経路との関連

Assay system	Specific activity (n mol/hr/mg protein)	Activity (%)
Complete system	7.64	100
-Aspartate	4.80	63
-ATP and ATP-generating system	3.97	52
-Mn ²⁺	0.16	2
-Urea	5.65	74
-Urea + Hydroxyurea	3.97	52
-Urea + L-canaline	4.20	55
-Urea + L-canavanine	3.59	47
-Urea + L-arginine	4.74	62

在を示唆するものである。

一方、Natelson等は、Cohen等の説に対する疑問点を指摘するとともに、尿素がGSAの前駆物質である可能性を主張した^{12),20)}。Natelson等の説は、彼らが提唱したGuanidine Cycle (図2)を経由して、尿素からカナバニノコハク酸が合成され、この分解(図1.b)によりGSAが合成されるとするものである¹²⁾。この経路のうち、カナリンからカナバニノコハク酸が、尿素サイクルの構成酵素により合成されることが証明されている¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。また、カナバニノコハク酸からGSAが合成されることも、Takahara等により証明されている^{13),14)}。しかし、Guanidine Cycleの構成物質は生理的に存在しないため、その由来が問題となる。Natelson等は、尿素からカナリンに至る経路(図2)を推定しているが¹²⁾、この経路については、酵素学的証明が行われていない。

青柳らは、単離肝細胞の系を用いて、尿素がGSA合成を促進することを確認している²²⁾。また、この系に尿素サイクルの関連物質、または尿素サイクル構成酵素の阻害物質を添加して検討を加え、GSAが尿素サイクル構成酵素の働きで、合成される可能性を推定している²³⁾。しかし、同じくこの系を用いた実験で、Guanidine Cycleの中間代謝産物を添加しても、GSA合成が促進されないことを認めている²¹⁾。

以上、GSA合成経路に関する従来の報告から、尿素がGSAの前駆物質である可能性は示唆されるが、Guanidine Cycleを経由して、GSAが合成されるかどうかは不明である。著者は、従来の報告およびGSAの化学構造から、尿素とアスパラギン酸より、直接GSAが合成される可能性を考え(図1.c)。この仮説に基づき、正常ラット肝を用いて検索を行ううち、GSA合成酵素活性の高い画分を抽出することに成功した。すなわち前述したごとく、ラット肝の可溶性画分に硫酸アンモニウム画分を行い、その30-40%飽和画分で、最も高い比活性が得られた。また、反応系に加える酵素蛋白量に比例して、GSA合成量が増加することから、著者の扱った反応系では、酵素反応によりGSAが合成されていることが確認された。酵素活性に影響する種々の因

子を検討した結果は、前述したとおりであり、標準的反応系から各物質を除外すると、酵素活性が低下することから、GSA合成における各物質の必要性が確認された。

これらの結果は、著者が最初に仮定したGSA合成経路(図1.c)が存在する可能性を示唆している。しかし、GSA合成量がnmolオーダーと低く、尿素またはアスパラギン酸を反応系に加えなくても、ある程度のGSAが合成されることも認められた。すなわち、本研究では、GSAが尿素とアスパラギン酸を基質として合成されるかどうかは証明できていない。このため、以前に提唱されたGSA合成経路との関連を、検討する必要があるものと考えられる。

従来の報告の中で、酵素反応によるGSA合成を確認したものは、Takahara等の報告^{13),14)}のみである。Takahara等は、カナバニノコハク酸を基質とし、リポイック酸の還元作用により、GSAが合成される(図1.b)ことを証明している¹³⁾。この反応の至適pHは8.7-8.8であり¹³⁾、Fe⁺⁺はこの反応を促進し、Fe⁺⁺が存在すれば、肝抽出液が存在しなくても、GSAが合成されることが確認されている¹⁴⁾。本研究の結果では、至適pHは中性付近にあり、Mn⁺⁺、Cu⁺⁺はGSA合成を強く促進するが、Fe⁺⁺は完全にこれを抑制した。また、カナバニノコハク酸は生理的に存在せず、本研究の反応系には、これを加えていない。これらの相異点は、著者の反応系でのGSA合成が、図1.bで示した経路とは、異なる経路を介して行われることを示唆している。ただ、Natelson等が提唱した¹²⁾Guanidine Cycle(図2)が、著者の扱った反応系に存在すると仮定すると、尿素からウレイドホモセリンが合成され、これがアスパラギン酸と反応してカナバニノコハク酸となり、この分解によりGSAが合成される可能性も否定できない。このため本研究では、尿素の代わりに、Hydroxyurea、L-カナリン、L-カナバニンを反応系に加えて検討した。結果に示したごとく、これらGuanidine Cycleの中間代謝産物を、尿素の代わりに反応系に加えた時、GSA合成酵素活性が低下することから、著者の反応系におけるGSA合成は、Guanidine Cycleを介するものではないと考えられる。また同様

に、尿素の代わりにアルギニンを反応系に加えても、比活性が低下することから、Cohen 等が提唱した⁵⁾経路(図 1. a)によるものでもないと考えられる。

青柳らは、ラット単離肝細胞系における、GSA 合成速度は、10nmol/g wet liver/hr 程度であり、この合成速度は、腎不全患者で増加した GSA 排泄量を、説明するのに十分であるとしている²³⁾。この合成速度と酵素反応による合成速度を比べることに、異論があるかもしれないが、著者の反応系における GSA 合成速度は、酵素液調整過程での、酵素蛋白質、および酵素活性の損失を無視しても、青柳らの系の合成速度の数倍の値を示している。すなわち、著者の反応系における GSA 合成が、主たる GSA 合成経路を介して行われているものと考えられる。

本研究の結果、および上述の考察から、GSA は主に、以前に提唱された、アミジン基転移反応や Guanidine Cycle によらず、尿素とアスパラギン酸を直接の前駆体として、合成されている可能性が示唆された。しかし、未知の経路であるため、本研究で扱った標準的酵素反応系、および酵素活性測定法が、最良の条件であるかどうかは、現時点では不明である。このため、本研究で存在が確認された GSA 合成酵素の基質が、尿素とアスパラギン酸であることを証明し、酵素反応系および活性測定法を確立することが、今後の課題と考えられる。

結 語

尿毒症起因物質の一つと考えられている、GSA の生合成経路を解明することを目的として、研究を行った。

正常ラット肝ホモジネートを、100,000×g、60分間遠心後の上清(可溶性画分)に、硫酸アンモニウム画分を行い、その30-40%飽和画分中に、GSA 合成酵素活性が存在することを発見した。

本研究での反応系には、尿素、アスパラギン酸、ATP、Mn⁺⁺を加えた。酵素活性の至適 pH は7.4であり、Mn⁺⁺、Cu⁺⁺は活性を強く促進し、Fe⁺⁺は活性を完全に抑制した。また尿素の代わりに、Hydroxyurea、カナリン、カナバニン、およびアルギニンを加えると、GSA 合成酵素活性は低下した。

これらの結果から、以前に提唱されている、アミジン基転移反応や Guanidine Cycle によらず、尿素とアスパラギン酸を直接の前駆体として、GSA が合成される可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました恩師小坂二度見教授に謹んで感謝の意を表します。また御助言、御協力をいただいた板野義太郎先生、山田輝夫先生、広野泰子女史に深謝いたします。

文 献

- 1) Stein IM, Cohen BD and Kornhauser RS : Guanidinosuccinic acid in renal failure, experimental azotemia and inborn errors of the urea cycle. *N Eng J Med* (1969) **280**, 926-930.
- 2) Cohen BD and Bronx NY : Guanidinosuccinic acid in uremia. *Arch Intern Med* (1970) **126**, 846-850.
- 3) Bonas JE, Cohen BD and Natelson S : Separation and estimation of certain guanidino compounds. Application to human urine. *Microchem J* (1963) **7**, 63-77.
- 4) Natelson S, Stein I and Bonas JE : Improvements in the method of separation of guanidino organic acids by column chromatography. Isolation and identification of guanidinosuccinic acid from human urine. *Microchem J* (1964) **8**, 371-382.
- 5) Cohen BD, Stein IM and Bonas JE : Guanidinosuccinic aciduria in uremia. A possible alternate pathway for urea synthesis. *Am J Med* (1968) **45**, 63-68.
- 6) Horowitz HI, Cohen BD, Martinez P and Papayouanou M : Defective ADP-induced platelet factor

- 3 activation in uremia. *Blood* (1967) **30**, 331—340.
- 7) Stein IM, Cohen BD and Horowitz HI : Guanidinosuccinic acid : The "X" factor in uremic bleeding? *Clin Res* (1968) **16**, 397.
 - 8) Giovannetti S, Cioni L, Balestri PL and Biagini M : Evidence that guanidines and some related compounds cause hemolysis in chronic uremia. *Clin Sci* (1968) **34**, 141—148.
 - 9) Horowitz HI, Stein IM and Cohen BD : Further studies on the platelet inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. *Am J Med* (1971) **49**, 336—345.
 - 10) Slavin RG and Fitch CD : Inhibition of lymphocyte transformation by guanidinosuccinic acid, a surplus metabolite in uremia. *Experientia* (1971) **27**, 1340—1341.
 - 11) Ingerowski RM, Ingerowski GH and Dunn MJ : The effects of guanidinosuccinic acid and methylguanidine on erythrocyte cation transport. *Proc Soc Exp Biol Med* (1972) **139**, 80—83.
 - 12) Natelson S and Sherwin JE : Proposed mechanism for urea nitrogen re-utilization : Relationship between urea and proposed guanidine cycles. *Clin Chem* (1979) **25**, 1343—1344.
 - 13) Takahara K, Nakanishi S and Natelson S : Cleavage of canavaninosuccinic acid by human liver to form guanidinosuccinic acid, a substance found in the urine of uremic patients. *Clin Chem* (1969) **15**, 397—418.
 - 14) Takahara K, Nakanishi S and Natelson S : Studies on the reductive cleavage of canavanine and canavaninosuccinic acid. *Arch Biochem Biophys* (1971) **145**, 85—95.
 - 15) Koller A, Comess JD and Natelson S : Evidence supporting a proposed mechanism explaining the inverse relationship between guanidinoacetate and guanidinosuccinate in human urine. *Clin Chem* (1975) **21**, 235—242.
 - 16) Koller A, Aldwin L and Natelson S : Hepatic synthesis of canavaninosuccinate from ureidohomoserine and aspartate, and its conversion to guanidinosuccinate. *Clin Chem* (1975) **21**, 1777—1782.
 - 17) Natelson S, Koller A, Tseng H-Y and Dods RF : Canaline carbamoyltransferase in human liver as part of a metabolic cycle in which guanidino compounds are formed. *Clin Chem* (1977) **23**, 960—966.
 - 18) Perez G, Rey A and Schiff E : The biosynthesis of guanidinosuccinic acid by perfused rat liver. *J Clin Invest* (1976) **57**, 807—809.
 - 19) Natelson S, Tseng H-Y and Sherwin JE : On the biosynthesis of guanidinosuccinate. *Clin Chem* (1978) **24**, 2108—2114.
 - 20) Natelson S : Metabolic relationship between urea and guanidino compounds as studied by automated fluorimetry of guanidino compounds in urine. *Clin Chem* (1984) **30**, 252—258.
 - 21) Aoyagi K, Ohba S, Miyazaki M, Nagase S, Iida S, Narita M and Tojo S : Biosynthesis of guanidinosuccinic acid in isolated rat hepatocytes : Evaluation of guanidine cycle and acidosis ; in *Guanidines*, Mori A, Cohen BD and Lowenthal A eds, Plenum Press, New York and London, (1985) pp277—285.
 - 22) 青柳一正, 大場正二, 宮崎三弘, 飯田恵実, 渡辺孝太郎, 成田光陽, 東條静夫 : ラット単離肝細胞におけるグアニジノコハク酸の生合成について. I. 尿素によるその合成促進. *日腎誌* (1982) **24**, 345—351.
 - 23) Aoyagi K, Ohba S, Narita M and Tojo S : Regulation of biosynthesis of guanidinosuccinic acid in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Kidney Int* (1983) **24**, s-224-s-228.
 - 24) Hiraga Y and Kinoshita T : Post-column derivatization of guanidino compounds in high-performance liquid chromatography using ninhydrin. *J Chromatogr* (1981) **226**, 43—51.
 - 25) Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F and Colombo JP : Familial hyperarginaemia. *Arch Dis*

- Child (1975) **50**, 57—62.
- 26) Marescau B and Lowenthal A : Isolation and identification of some guanidino compounds in the urine of patients with hyperargininaemia by liquid chromatography, thin layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* (1981) **224**, 185—195.

**Metabolic pathway of guanidinosuccinic
acid biosynthesis**

Rikiya MATSUDA

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. F. Kosaka)

In order to understand the metabolic abnormalities occurring with renal failure, the biosynthetic pathway of guanidinosuccinic acid (GSA) was investigated in normal rat liver, because GSA is known as a uremic toxin and its synthetic pathway is unclear.

After fresh liver was homogenized and centrifuged for 60 min at $100,000\times g$, the supernatant was fractionated by precipitation with ammonium sulfate. It was found that the activity of GSA biosynthetic enzymes was highest in the fraction between 30% and 40% saturation of ammonium sulfate. The reaction mixture contained potassium phosphate buffer (pH7.4), aspartate, urea, ATP and an ATP-generating system, $MnCl_2$, and enzyme solution. The optimum pH was 7.4. The activity was strongly accelerated by Mn^{++} and Cu^{++} , while it was completely inhibited by Fe^{++} . Hydroxyurea, L-canaline, L-canavanine, and L-arginine could not substitute for urea.

These results suggest that GSA is not formed by the transamidation of arginine to aspartate as proposed by Cohen, or by way of the guanidine cycles proposed by Natelson. It is possible that GSA is mainly synthesized from urea and aspartate directly in rat liver.