

ニワトリの発生、発育に伴うグアニジノ化合物の 変動に関する研究

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)

角 谷 隆 司

(昭和61年9月9日受稿)

Key words : グアニジノ化合物,
鶏胚,
ニワトリ脳, 肝臓, 腎臓

緒 言

グアニジン基を有する化合物を総称して、グアニジノ化合物と呼ぶが、現在までに動植物界に100種以上のグアニジノ化合物が存在することが明らかになっている^{1),2)}。なかでも arginine (Arg) は蛋白構成アミノ酸であると同時に、尿素排泄動物では尿素生成の中間代謝産物として、また、筋肉、脳ではエネルギー代謝に参与する creatine 生成の前駆物質として、生体で重要な役割を担っていることはよく知られている。

一方、guanidosuccinic acid (GSA), methylguanidine (MG) などが尿毒症患者尿あるいは血清中に著しく増加することが観察されたのをはじめ^{3),4)}、高アルギニン血症では α -keto- δ -guanidinovaleric acid などのグアニジノ化合物が増加することが報告され⁵⁾、窒素代謝異常時におけるグアニジノ化合物の動態が注目されている。また、1966年に Jinnai ら⁶⁾ が γ -guanidinobutyric acid (GBA) の痙攣誘発作用を報告して以来、多くのグアニジノ化合物が痙攣誘発作用を有することが明らかにされ、グアニジノ化合物が、てんかん及び尿毒症における痙攣発現機構に関与する可能性が示唆された⁷⁾。

しかし、動物生体内には、正常時においても数多くのグアニジノ化合物が存在する。特に、近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による、グアニジノ化合物の系統的微量分析法^{8),9)} が開発されて以来、哺乳動物組織内に存在する

グアニジノ化合物については、詳細に検討され、Arg, creatine, creatinine (CRN), guanidinoacetic acid (GAA) の他、その生理機能は明らかでないが、GSA, GBA, β -guanidinopropionic acid (GPA), homoarginine (HArg) guanidine (G), MG などが正常時においても存在することが明らかになっている¹⁰⁾⁻¹²⁾。しかし、鳥類のグアニジノ化合物については今までに、系統的に分析研究された報告はない。鳥類は卵生であるので、胚の発生初期より物質の動態を調べることが容易であり、また、窒素排泄のほとんどを尿酸の形で行うことから、哺乳動物とは異なるグアニジノ化合物の代謝系、生理的役割があることが予想される。従って、本研究においては、ニワトリの胚、卵黄、卵白及び諸臓器内グアニジノ化合物を HPLC により系統的に分析し、胚の発生及びニワトリの発育に伴うグアニジノ化合物の動態を検討した。

方 法

1. 動物

動物はホワイトレグホン種のニワトリを用いた。有精卵及び無精卵を神奈川県畜産試験場 (神奈川県厚木市) より入手し、湿度 70%、温度 37°C に調整した孵卵器にて孵卵を行った。孵化後は、標準飼料 (オリエンタル酵母 PL) 及び水を自由に摂取させ、成鶏になるまで飼育した。

卵黄及び卵白は、孵卵前及び孵卵開始後 2 日～20 日経過した有精卵及び無精卵より得た。胚

Table 1. Guanidino compounds in whole embryo

Day of incubation	6		20		
	n=8		n=7		
GAA	2.18	± 0.33	60.8	± 10.4	**
GPA	ND		0.23	± 0.02	
CRN	27.5	± 8.8	165	± 17	**
Arg	525	± 24	630	± 29	*
HArg	ND		1.48	± 0.25	
G	ND		0.76	± 0.22	
MG	ND		0.06	± 0.01	

nmol/g wet weight (mean ± SEM).

*p<0.05, **p<0.01 (the day 6 v.s. the day 20).

は、孵卵開始後6日～20日経過した有精卵より得た。脳、肝臓、腎臓、心臓の各組織は孵化前7日、5日、3日、1日(孵卵開始後14、16、18、20日後)の胚、及び孵化後3、7、11、15、19、29、39、59、99日及び6ヵ月後(成鶏)のニワトリを断頭した後、これらの組織を採取し、グアニジノ化合物の抽出操作を行うまで、-20°Cで保存した。

2. グアニジノ化合物の抽出操作

卵黄及び卵白は、半解凍された段階でホモゲナイズし、その一部を用いた。胚、脳、腎臓及び心臓は全組織を用い、肝臓は適量一部を用いた。これらの組織は、10倍量の1%ピクリン酸でホモゲナイズした後、3000 rpmで、20分間遠沈し除蛋白を行った。この除蛋白操作を2回繰り返した後、上清を合せてDowex 2×8 (Cl⁻型) カラムに通し、過剰のピクリン酸を除いた。カラム流出液は減圧乾固し、残渣を希塩酸(pH 2.2)に溶解し、分析試料とした。

3. グアニジノ化合物の測定

グアニジノ化合物の定量分析は、9,10-phenanthrenequinone 反応に基づく、HPLC法¹³⁾により行った。装置は、JASCO G-520型グアニジノ化合物分析装置を用いた。HPLCの条件は次の通りである。カラム、Guanidinopak (JASCO) φ4.6×125 mm; カラム温度、60°C; 溶離液、0.4 M クエン酸ナトリウム緩衝液(1) pH 3.0, 20分間(カラム安定化), (2) pH 3.5, 10分間, (3) pH 5.25, 10分間, (4) pH 10.0, 15分間, (5) 1 M NaOH, 10分間; 反応試薬, 2 M NaOH 及び0.05% phenan-

threnequinone/dimethylformamide 溶液; 反応温度、60°C; 溶離液流量1.0 ml/min; 反応液流量、0.5 ml/min. 検出には JASCO FP-110 型蛍光光度計を用い、Ex=365, Em>460 nm で測定した。

グアニジノ化合物量は、nmol/g wet weight で示した。有意差検定は、t-検定を用いた。

結 果

1. 全鶏胚内のグアニジノ化合物

ニワトリ全胚中には、GAA, GPA, CRN, Arg, HArg, G, MG が検出された(表1)。胚では Arg が最も多く次いで CRN, GAA であった。この3種類のグアニジノ化合物は、胚の発生初期、すなわち、測定を行った孵卵6日目の胚から検出された。GPA, HArg, G および MG は、孵卵6日目の胚では検出されず、孵卵8日の胚から検出された。

図1に、胚の発達に伴うグアニジノ化合物量の変化を示した。Arg は孵卵8日目に著しい低下(p<0.01, day 6 v.s. day 8)を示し、その後は、発達に伴い増加を示した。GAA は孵卵14日目の胚まで、増加の程度はわずかであるが、16日に著しい増加(p<0.05, day 14 v.s. day 16)を示した。HArg は孵卵10日に増加のピークを示した後、やや減少し、14日から20日にかけて再び増加した。GPA, G, MG も、その量はわずかであるが、胚の発達に伴い漸時増加を示した。

2. 卵黄及び卵白内のグアニジノ化合物

卵黄中には全期間を通じて GAA, GPA, CRN,

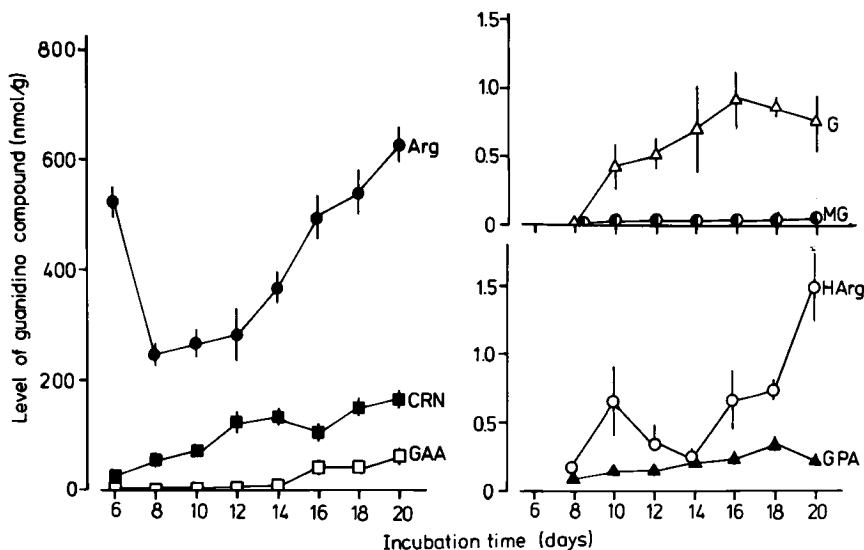


Fig. 1. Embryogenic changes of guanidino compounds in whole embryo (mean \pm SEM, n=7-8).

Table 2. Guanidino compounds in yolk

Day of incubation	Unfertile egg		Fertile egg	
	0	20	0	20
	n=4	n=8	n=4	n=7
GAA	0.09 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	9.10 \pm 1.42**
GPA	0.21 \pm 0.02	0.24 \pm 0.02	0.23 \pm 0.03	0.21 \pm 0.05
CRN	23.1 \pm 2.3	29.0 \pm 1.1 *	26.2 \pm 2.6	68.4 \pm 6.3 **
Arg	780 \pm 22	1361 \pm 48 **	944 \pm 66	1944 \pm 160 **
HArg	0.44 \pm 0.09	0.46 \pm 0.04	0.29 \pm 0.09	15.5 \pm 2.0 **
G	<0.9	2.53 \pm 0.29	<1.0	6.68 \pm 0.46
MG	0.14 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	0.33 \pm 0.03**

nmol/g wet weight (mean \pm SEM).

*p<0.05, **p<0.01 (the day 0 v.s. the day 20).

Table 3. Guanidino compounds in albumen

Day of incubation	Unfertile egg		Fertile egg	
	0	20	0	20
	n=4	n=8	n=4	n=7
GAA	<0.03	0.03 \pm 0.01	<0.05	0.84 \pm 0.33
GPA	ND	ND	ND	ND
CRN	4.17 \pm 0.43	6.96 \pm 0.40**	3.53 \pm 0.35	16.1 \pm 0.9 **
Arg	16.4 \pm 2.1	134 \pm 9 **	13.0 \pm 1.0	460 \pm 48 **
HArg	ND	ND	ND	ND
G	<0.9	1.81 \pm 0.05	<1.0	1.54 \pm 0.11
MG	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02

nmol/g wet weight (mean \pm SEM).

*p<0.05, **p<0.01 (the day 0 v.s. the day 20).

Arg, HArg, G, MG が検出された(表2)。卵黄中には Arg が著しく多く、全グアニジノ化合物の95%以上を占めており、次いで CRN が

多く検出された。有精卵においては、GPA を除くすべてのグアニジノ化合物で、孵卵20日には、著しい増加を示していた。無精卵において

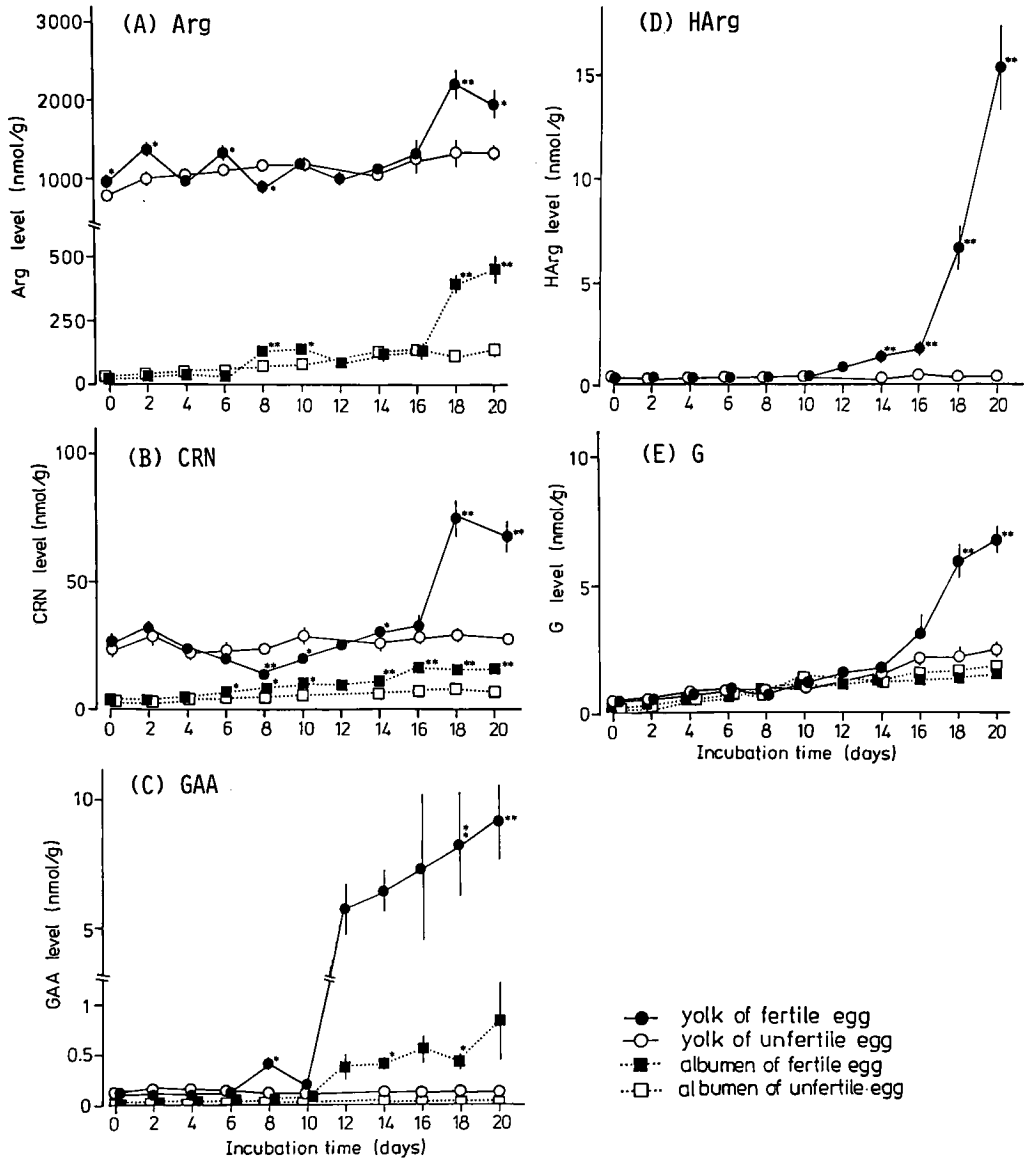


Fig. 2. Embryogenic changes of guanidino compounds in yolk and albumen (mean \pm SEM, $n=4-8$).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unfertilized egg v.s. fertilized egg).

も Arg, CRN, G が孵卵により、わずかではあるが有意な増加を示していた。

卵白中には、GAA, CRN, Arg, G, MG が検出され、GPA, HArg は検出されなかった (表 3)。卵白中においても Arg が最も多く検出された。有精卵卵白で検出されたグアニジノ化合物も、孵卵 20 日では、MG を除いて増加しており、無精卵卵白においても、CRN, Arg, G が孵卵によ

り増加を示していた。

図 2 に、卵黄、卵白内グアニジノ化合物の、孵卵による変化を示した。有精卵卵白、卵黄内 Arg は、孵卵 18、20 日に著しい増加 ($p < 0.01$, day 16 v.s. day 18) を示した (図 2 A)。有精卵卵黄中の CRN は孵卵 2 日～8 日にかけて減少したのち、その後漸増し、18 日～20 日に著しい増加 ($p < 0.01$, day 16 v.s. day 18) を示した。有

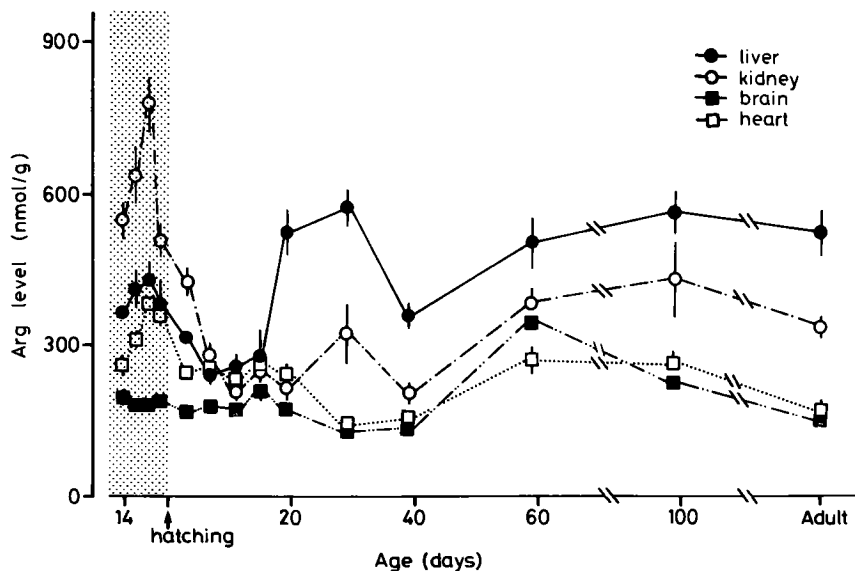


Fig. 3. Developmental changes of arginine in organs (mean \pm SEM, $n = 5 - 15$).

精卵卵白内CRNは、孵卵により漸時増加していた(図2B)。GAAは、有精卵卵黄、卵白で、孵卵12日目に著しく増加($p < 0.01$, day 10 v.s. day 12)し、その後も漸時増加していた(図2C)。有精卵卵黄内HArgは孵卵12~16日にかけて漸時増加し、18日~20日で著しく増加($p < 0.01$, day 16 v.s. day 18)した(図2D)。有精卵卵黄中のGは、孵卵18~20日に著明に増加($p < 0.05$, day 16 v.s. day 18)していた。卵白内Gも、孵卵により漸時増加しているが、増加の程度は、有精卵、無精卵で同じであった(図2E)。

3. 脳、肝臓、腎臓及び心臓内のグアニジノ化合物

脳、肝臓、腎臓及び心臓内では、GAA、GPA、CRN、Arg、HArg、及びMGが検出された。肝臓、腎臓ではArgが最も多く、次いでCRN、GAAの順で多く存在した。脳、心臓ではCRNが最も多く、次いでArgが多く存在した。GAAは肝臓、腎臓に比べると少量であった。

図3に発育に伴う諸臓器内Argの変化を示した。脳内Argは孵化後59日目の脳で、一時的な増加($p < 0.01$, day 39 v.s. day 59)を示した他は、ほぼ一定な値を維持した。その他の臓器では、孵化後15日頃まで類似した変化を示した。すなわち、孵卵14日から18日にかけて増加した

のち、孵化直前より減少し始め、孵化後7日~15日にかけて低値を示した。その後、肝臓及び腎臓でArgの増加($p < 0.05$, day 15 v.s. day 19 in liver; $p < 0.01$, day 19 v.s. day 29 in kidney)がみられ、孵化後39日で一時的な減少($p < 0.01$, day 29 v.s. day 39)を示す他は、成鶏まではほぼ一定した値を示した。一方、心臓ではその後も低値を維持した。

図4にGAAの発育に伴う変化を示した。脳内GAAは、孵化後漸時増加し、孵化後29~39日の脳で最高値となった。その後減少し59日以後では成鶏値となった。肝臓、腎臓では、GAA量が多く、しかも発育に伴う変化は著しいものがあつた。すなわち、孵化前後の時期は低値を示し、孵化後11~15日にかけて、一時的に増加($p < 0.01$, day 7 v.s. day 15 in kidney)した後、漸時減少し、孵化後59日目に再び著しい増加($p < 0.01$, day 39 v.s. day 59)を示した。心臓においても、緩やかではあるが、肝臓、腎臓に類似した変化を示した。

図5にCRNの変化を示した。脳内CRNは孵化前に比べ孵化3日に著明に増加($p < 0.01$)し成鶏になるまで多少の変動を示しながらも高値を維持した。心臓では孵化前よりCRN量が多く、孵化後は増減を繰り返しながら成鶏値まで

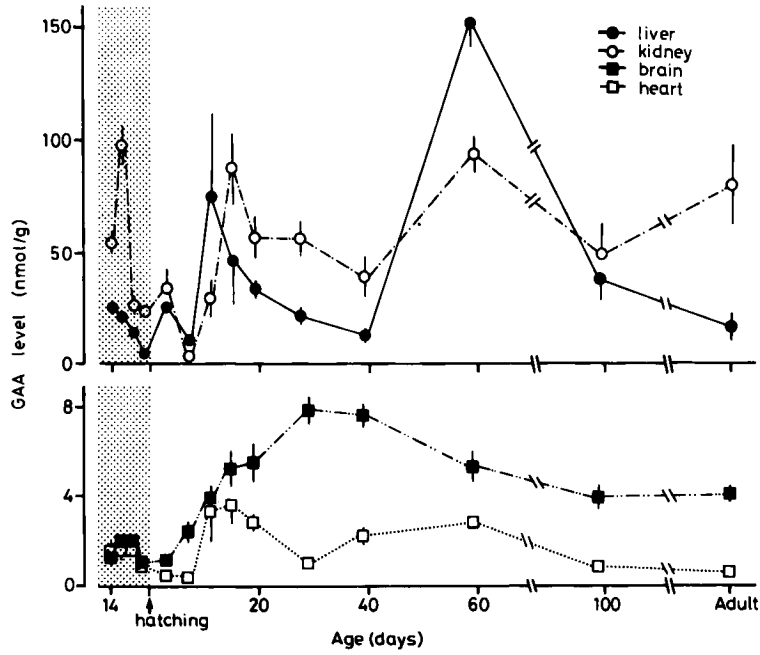


Fig. 4 Developmental changes of guanidinoacetic acid in organs (mean \pm SEM, n = 5-15).

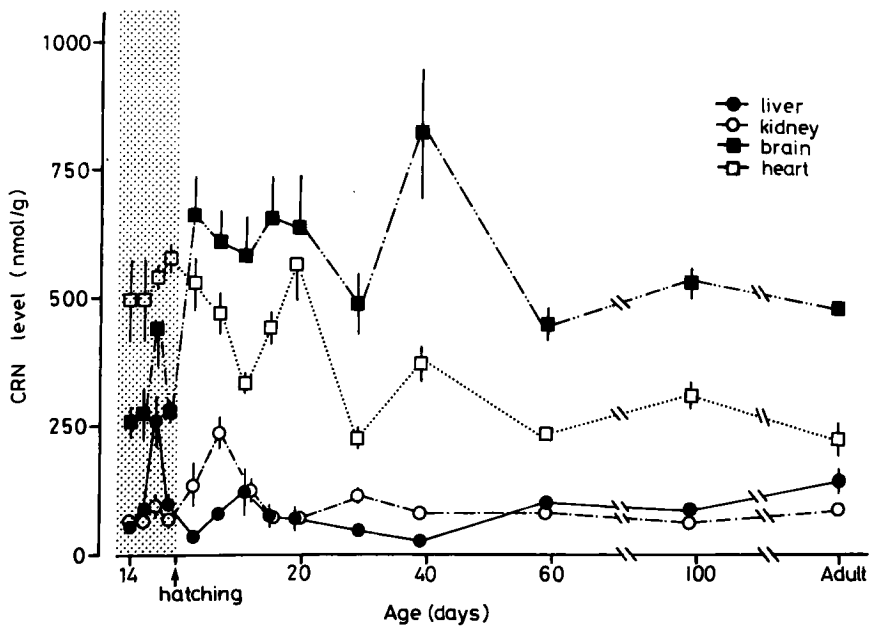


Fig. 5 Developmental changes of creatinine in organs (mean \pm SEM, n = 5-15).

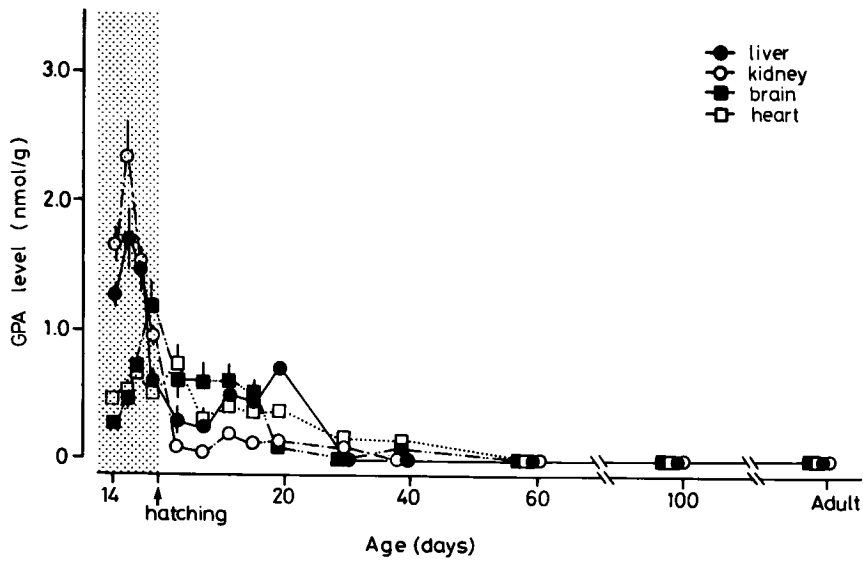


Fig. 6 Developmental changes of β -guanidinopropionic acid in organs (mean \pm SEM, $n = 5-15$).

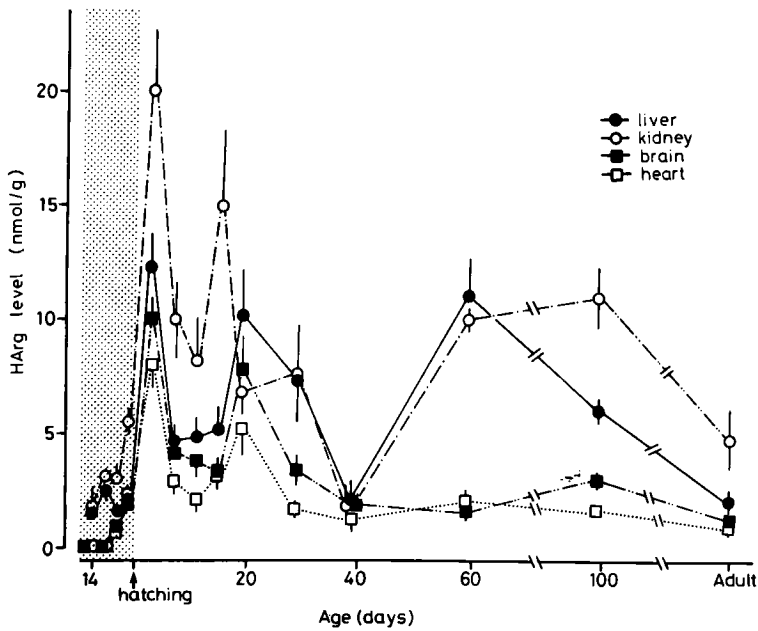


Fig. 7 Developmental changes of homoarginine in organs (mean \pm SEM, $n = 5-15$).

やや減少を示した。肝臓では、孵卵18日目及び孵化後11日目に一時的に増加した他は、あまり大きな変化はみられなかった。腎臓でも、孵化後7日目に一時的な増加があった他は、ほぼ成

鶏値を維持していた。

図6にGPAの発育に伴う変化を示した。GPAは、いずれの臓器においても、孵化直前期より減少し、孵化後59日目の臓器からは全く検出されなかった。

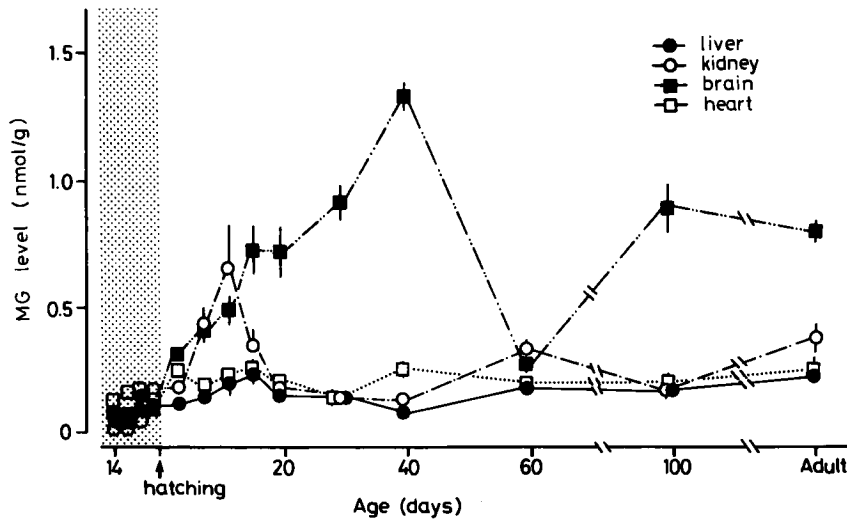


Fig. 8 Developmental changes of methylguanidine in organs (mean \pm SEM, $n = 5-15$).

図7にHArgの発育に伴う変化を示した。HArgも孵化後39日頃まで諸臓器で類似した変動を示した。すなわち、孵化後3日目は、孵化前に比べ著しく増加 ($p < 0.01$) し、その後減少、孵化後15~29日に再び増加のピークを示した。脳、心臓では、その後減少し成鶏値となったが、肝臓、腎臓では59~99日にかけ再び高い値 ($p < 0.01$, day 39 v.s. day 59) を示した。

図8に、発育に伴うMGの変化を示した。脳内MGは、孵化後漸時増加し、39日に最大となった。その後59日に一時的な著しい減少 ($p < 0.01$, day 39 v.s. day 59) を示した後、成鶏値となった。腎臓では、孵化前より漸時増加し、孵化後11日で最大値となり、以後は減少してほぼ成鶏値を維持した。肝臓、心臓内MGは、発育に伴う大きな変動はみられなかった。

考 察

ニワトリの諸組織内グアニジノ化合物を、HPLCにより初めて系統的に分析し、発生・発育に伴う変化を調べた。いずれの組織内においても、Arg, CRN, GAAが主なグアニジノ化合物であったが、微量成分として、胚及び卵黄ではGPA, HArg, G, MGが、卵白内ではG, MGが、諸臓器内ではGPA, HArg, MGが存在すること

が明らかとなった。哺乳類の肝臓、脳で通常観察されるGSA, GBA¹⁰⁾⁻¹²⁾はニワトリ組織内では検出されず、哺乳動物とは異なるグアニジノ化合物代謝系が示唆された。

鶏胚が孵卵開始後、孵化までに要する時間はほぼ21日であるが、鶏胚の発生過程についてはHamburgerら¹⁴⁾により詳細に記述がなされている。受精された卵は約24時間を要して輸卵管を降下し、その間にもかなり胚発生が進む。放卵後胚発生は一時停止し、適当な温度、湿度条件下で孵卵すると再び胚発生は開始される。放卵時には原条 (primitive streak) はまだ形成されていないが、孵卵18-19時間で原条が完成し、さらに孵卵3-4日で胚の軀幹が完成する。孵卵6日目頃には、各種の器官の原形ができあがり、以後は成長分化の過程に入る。

胚の発生過程に必要な栄養、エネルギー源は、酸素を除いてすべて卵内に含まれており、血管系を通して利用される。無精卵卵白、卵黄内には、Arg以外にもCRN, GAA, GPA, HArg, G, MGが検出され、胚の発生過程でみられるすべてのグアニジノ化合物が、卵内構成成分として存在することがわかった。初期胚発生の過程で、これらのグアニジノ化合物が利用される可能性が示唆された。

全胚に含まれるグアニジノ化合物は、その分離測定が可能となった孵卵6日目からの胚について調べたが、Arg, CRN, GAAはすでにこの時期から検出され、発生初期の段階で取り込まれるか、あるいは胚内で生合成されていることが推測される。その他の微量グアニジノ化合物は、孵卵8日目の胚から検出され、胚の発生分化が進んだ後にその生成系が活性化されるものと思われる。胚のArg量が孵卵8日で著しく減少する理由は明らかではないが、この時期における活発なArg代謝を反映しているものとして興味深いものがある。その後のArgの増加、またその他のグアニジノ化合物の増加は、胚の各器官の発育成長と関係しているものと考えられる。

卵黄内及び卵白内Arg, CRN, Gは、無精卵においても孵卵により増加することが観察された。卵白及び卵黄の水分含量はそれぞれ約90%及び50%であり、貯蔵中にも気孔を通じての水分蒸散が認められ、28°Cで1ヵ月保存した時、5%以上の水分蒸散による卵重量の減少が報告されている¹⁵⁾。しかし、これらグアニジノ化合物の増加は、かなり高い増加率を示しており、水分の蒸散のみでは説明できない。蛋白の分解によるArgの増加、creatine phosphateからのCRNの非酵素的生成が、無精卵においても孵卵中におこっている可能性が考えられる。Gの生成経路については、今なお明らかでないが、適当な湿度、温度条件下で生成する機構が卵内に存在することが推定される。有精卵においては、胚の発育に伴い、卵黄内CRN, Arg, GAA, HArg, G及び卵白内Arg, CRN, GAAの増加がみられる。特に、胚の成長が著しい発生後期にその増加が著しく、胚が卵白卵黄内の物質を利用していく過程で、血管系を通して、逆に卵白卵黄内へのグアニジノ化合物の移行が行われていることが考えられる。

脳、肝臓、腎臓及び心臓内グアニジノ化合物の存在パターンは、測定を行った孵卵14日目の胚の臓器ですでに確立されているが、その含有量は成鶏になるまでに著しい変化を示す。特に孵化前から、孵化後19日までの間の変化は著しい。孵化前には胚が尿膜呼吸から肺呼吸へ変換する時期があり¹⁵⁾、孵化後も諸器官の機能が著

しく発達し、生理的にも外形的にも大きな変化がみられる時期がある。孵化後の著しい発育の特徴としては、孵化2～3日後からの摂食の開始、1週間後には羽変り、2週間後にはトサカの成長などがみられる。また、孵化後59日目にも、肝臓、腎臓のGAA, HArgの著しい増加、脳内MGの著明な減少がみられるなど、発育過程でグアニジノ化合物の代謝系に著しい影響を及ぼす要因が存在することが推測される。

鳥類では、Arg生成系の最初の段階の酵素であるcarbamoylphosphate synthetaseが存在せず¹⁶⁾、Argは必須アミノ酸である。孵化後肝臓、腎臓でArg量が減少するのは、孵化後の著しい発育に伴う、急速なArgの利用の反映と考えられる。鳥類においても腎臓及び肝臓にarginaseが存在する^{16), 17)}が、食餌により摂取された過剰Argの分解に関与し、urea生成は哺乳類に比べ非常に少ない。GSAの生成経路としてureaを前駆物質とするguanidine cycle^{18), 19)}が提示されているが、哺乳動物の肝臓で通常検出されるGSAが鳥類では検出されないのは、urea生成が少ないことと関連するかもしれない。

また、GAA生成酵素であるglycine amidinotransferase活性については、鳥類においてもかなり詳細に検討されており^{20)~22)}肝臓で孵卵5日目の胚ですでにその活性が明らかに認められている。胚の発育に伴いその活性は増加するが、孵化直前期には低下する。Ramírezら²²⁾は、さらに孵化後50日までの肝amidinotransferase活性を調べ、孵化後活性が著しく増加し、10日目に最高となり、孵化後50日のニワトリでは再び減少することを報告している。この肝amidinotransferase活性の変動は、本研究の肝臓内GAAの変動によく一致している。GAA量の変化は、amidinotransferase活性の変化に起因するものと考えられる。腎臓及び心臓でのGAAの変化は肝臓のGAAの変化に類似しているが、脳では異なる変化を示している。哺乳動物脳内には活性は低いが、amidinotransferase活性が存在することが証明されている²³⁾。脳内に独自のGAA生成系をもつのか、特異的にGAAを取り込むのかは明らかでないが、鳥類においても、脳内に、他の組織とは異なるGAA

代謝様式が存在する可能性は否定できない。

GAAは、肝臓でさらに creatine に変わり、その後血流により、他の組織に運ばれ、エネルギー代謝に関与する²⁴⁾。CRNは creatine phosphate から非酵素的反応により生成され、排泄されるが、脳、心臓でCRN濃度が高いのは、これら臓器内で creatine phosphate の利用が活発であるためと考えられる。

GPA, HArg, MGの生理機能は不明であるが、これら微量グアニジノ化合物も、窒素代謝と密接に関係し、窒素代謝異常時に著明に増加することが報告されるとともに、そのtoxicな性質について、いくつか明らかにされている。GPA²⁵⁾及びMG⁴⁾は尿毒症患者血中に増加し、GPAは溶血現象と²⁵⁾、MGは痙攣発現と関係することが示唆されている⁷⁾。またHArgはhyperargininemia⁵⁾、hyperlysinemia²⁶⁾、などで、血液、尿中に増加していることが報告されている。一方、HArgは哺乳類、鳥類でalkaline phosphataseの強力な抑制剤であることが報告されている^{27), 28)}。しかし、これらグアニジノ化合物が、正常動物体内にも存在し、しかも、発育に伴いそれぞれ特異な変動を示すことは正常時においても何らかの生理的役割を担っていることがうかがわれる。特に、成鶏に比べ胚及び幼鶏で多く存在するHArg, GPAの動態は興味深いものがある。また、これらグアニジノ化合物の生成系についてもいくつかの報告がなされているが²⁹⁾⁻³²⁾、現在のところ確認されているものはない。

発育に伴う諸組織内グアニジノ化合物の変動をもたらず要因について、多少の考察を試みたが、これらグアニジノ化合物の代謝系路、生理機能については、いまだ不明の点が多く、生成経路、生理機能の解明とともに、今後の課題になるものと思われる。

結 語

ニワトリの諸組織内グアニジノ化合物をHPLCにより系統的に分析し、発生、発育に伴う変動を調べた結果を得た。

1. 鶏胚内には、孵卵6日目以後の胚から Arg, CRN, GAA が検出され、孵卵8日目以後で

は、GPA, HArg, G及びMGも検出された。Argは孵卵8日目に著しい減少を示したが、その後はその他のグアニジノ化合物とともに、胚の発育に伴い著しく増加した。

2. 卵黄内には、Arg, CRN, GAA, HArg, G, MG及びGPAが検出された。有精卵では、卵黄内のほとんどのグアニジノ化合物濃度が、孵卵後期に著しく増加した。無精卵でもArg, CRN, Gは孵卵によりわずかに増加した。
3. 卵白内には、Arg, CRN, GAA, G, MGが検出された。有精卵卵白のArg, CRN, GAA, Gは孵卵後期に増加していた。無精卵においても、CRN, Arg及びGが孵卵によりわずかに増加した。
4. 脳、肝臓、腎臓及び心臓内には、Arg, CRN, GAAのほか、GPA, HArg, MGが検出された。哺乳動物の肝臓、脳に通常検出されるGSA, GBAはニワトリ臓器内には検出されなかった。また、臓器内グアニジノ化合物は、発育に伴い著しい変動を示すことが明らかになった。特にGPAは胚及び、幼鶏臓器内に存在し、成鶏では検出されなかった。

以上の結果から、鳥類は哺乳類とは異なるグアニジノ化合物代謝系を有すること、また、この代謝系は胚の発育に伴い活性化されることが示唆された。また、孵化後においても、種々の生理的要因がグアニジノ化合物の代謝に影響することが示唆されるとともに、微量グアニジノ化合物も、さまざまな発育段階で、何らかの生理的役割を有することが示唆された。

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枝松 礼嬢をはじめ、研究室の皆様から御礼申し上げます。また、実験動物入手にあたり、終始御助言と御協力を賜りました、神奈川県大学口腔生理学教室、関 園子教授ならびに研究室の皆様へ厚く御礼申し上げます。

文 献

1. 森 昭胤：天然界における Guanidino 化合物の存在とその測定方法。臨床化学，**9**，232-246，1980。
2. Robin, Y. and Marescau, B.: Natural guanidino compounds. In *Guanidines*, ed. Mori, A., Cohen, B. D. and Lowenthal, A., Plenum Publishing Corp., New York, pp. 383-438, 1985.
3. Natelson, S., Stein, I. and Bonus, 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.
4. Giovannetti, S., Balestri, P.L. and Barsotti, G.: Methylguanidine in uremia. *Arch. Intern. Med.* **131**, 709-713, 1973.
5. Marescau, B., Qureshi, I.A., De Deyn, P., Letarte, J., Yoshino, M. and Loenthal, A.: Determination of guanidino compounds in plasma and urine of patients with argininemia before and during therapy. In *Guanidines*, ed. Mori, A., Cohen, B.D. and Lowenthal, A., Plenum Publishing Corp., New York, pp. 171-180, 1985.
6. Jinnai, D., Sawai, A. and Mori, A.: γ -guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* **212**, 617, 1966.
7. Mori, A.: Guanidino compounds and neurological disorders. *Neurosciences* **9**, 149-157, 1983.
8. Yamamoto, Y., Manji, T., Saito, A., Maeda, K. and Ohta, K.: Ion-exchange chromatographic separation and fluorometric determination of guanidino compounds in physiologic fluids. *J. Chromatogr.* **162**, 327-340, 1979.
9. Hiraga, Y. and Kinoshita, T.: Post-column derivatization of guanidino compounds in high performance liquid chromatography using ninhydrin. *J. Chromatogr.* **226**, 43-51, 1981.
10. Watanabe, Y., Shindo, S. and Mori, A.: Developmental changes in guanidino compounds levels in mouse organs. In *Guanidines*, ed. Mori, A., Cohen, B.D. and Lowenthal, A., Plenum Publishing Corp., New York, pp. 49-58, 1985.
11. Marescau, B., De Deyn, P., Wiechert, P., Van Gorp, L. and Lowenthal, A.: Comparative study of guanidino compounds in serum and brain of mouse, rat, rabbit and man. *J. Neurochem.* **46**, 717-720, 1986.
12. Yokoi, I., Edaki, A., Watanabe, Y., Shiraga, H., Fujii, T. and Mori, A.: Guanidino compounds in rabbit brain, serum and other organs. *Neurosciences* **12**, 27-32, 1986.
13. Mori, A., Katayama, Y., Higashidate, S. and Kimura, S.: Fluorometrical analysis of guanidino compounds in mouse brain. *J. Neurochem.* **32**, 643-644, 1979.
14. Hamburger, V. and Hamilton, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92, 1951.
15. 田先威和夫, 山田行雄, 森田琢磨, 田中克英編：養鶏ハンドブック，養賢堂，東京，1982。
16. Tamir, H. and Ratner, S.: Enzyme of arginine metabolism in chicks. *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 249-258, 1963.
17. Tramello, S., Barsacchi, R., Magri, E. and Grazi, E.: Molecular characteristics of chicken kidney arginase. *Biochem. J.* **145**, 153-157, 1975.
18. 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.
19. Cohen, B.D. and Patel, H.: Guanidinosuccinic acid and the alternate urea cycle. In *Urea Cycle*

- Disease*, ed. Lowenthal, A., Mori, A. and Marescau, B., Plenum Press, New York, pp. 435-441, 1983.
20. Walker, J.B.: Metabolic control of creatine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **235**, 2357-2361, 1960.
 21. Walker, M.S. and Walker, J.B.: Repression of transamidinase activity during embryonic development. *J. Biol. Chem.* **237**, 473-476, 1961.
 22. Ramírez, O., Calva, E. and Trejo, A.: Creatine regulation in the embryo and growing chick. *Biochem. J.* **119**, 757-763, 1970.
 23. 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.
 24. Walker, J.B. and Wang, S.: Tissue repressor concentration and target enzyme level. *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 435-411, 1964.
 25. Shaikin, R., Giatt, Y. and Berlyne, G.: The presence and toxicity of guanidinopropionic acid in uremia. *Kidney Internat.* **7**, 302-305, 1975.
 26. Woody, N.C. and Ong E.B.: Path of lysine degradation in patients with hyperlysinemia. *Pediatrics* **40**, 986-992, 1967.
 27. Fishman, W.H. and Sie, H.: L-Homoarginine: an inhibitor of serum "bone and liver" alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta* **29**, 339-341, 1970.
 28. Garlich, J.D.: Chicken serum alkaline phosphatase. *Poult. Sci.* **53**, 957-963, 1974.
 29. Pisano, J.J., Mitoma, C. and Udenfriend, S.: Biosynthesis of γ -guanidinobutyric acid from γ -aminobutyric acid and arginine. *Nature* **23**, 1125-1126, 1957.
 30. Perez, G. and Faluotico, R.: Creatinine: A precursor of methylguanidine. *Experientia* **29**, 1473-1474, 1973.
 31. Ryan, W.L. and Wells, I.C.: Homocitrulline and homoarginine synthesis from lysine. *Science* **144**, 1126-1127, 1964.
 32. Ryan, W.L., Johnson, R.J. and Dimari, S.: Homoarginine synthesis by rat kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 521-526, 1969.

**The embryogenic and developmental changes of guanidino compounds
in various chick tissues**

Takashi KADOYA

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

(Director: Prof. A. Mori)

Guanidino compounds in various chick tissues were systematically analyzed by high performance liquid chromatography, and the changes in guanidino compound levels were studied during chick embryogenesis and development.

In the whole chick embryo, arginine (Arg), creatinine (CRN), guanidinoacetic acid (GAA), β -guanidinopropionic acid (GPA), homoarginine (HArg), guanidine (G) and methylguanidine (MG) were detected. Arg, CRN and GAA appeared after the sixth day of incubation, and the other compounds appeared after the eighth day of incubation. All of the compounds, except for Arg which temporarily decreased on the eighth day of incubation, increased as embryogenesis progressed.

In the yolk, Arg, CRN, GAA, GPA, HArg, G and MG were detected. Most of them dramatically increased at the late stage of embryogenesis. A slight increase in Arg, CRN and G in unfertile eggs was also observed after incubation.

In the albumen, Arg, CRN, GAA, G and MG were detected. Arg, CRN, GAA, G and MG increased during embryogenesis. A slight increase in Arg, CRN and G in unfertile eggs was also observed after incubation.

In the chick brain, liver, kidney and heart, Arg, CRN, GAA, GPA, HArg and MG were detected. Guanidinosuccinic acid and γ -guanidinobutyric acid, which are commonly detectable in the mammalian liver and brain, were not detectable in the chick organs. All guanidino compounds in the chick organs fluctuated greatly during development. GPA decreased as the chicks developed and was not detected in the adult organs.

These observations suggest that birds have a different metabolic system of guanidino compounds from that of mammals, and that this system is activated during embryogenesis and affected by various physiological factors after hatching. It was also suggested that guanidino compounds, even at very low levels, might have some important roles in animal tissues during development.