

## 흰쥐에서 N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine으로부터 methylamine의 생성

연세대학교 보건과학대학 산업환경학과 · (재)아주산업환경\* · 연세대학교 보건대학원\*\*

조영봉 · 안영곤\* · 최홍순\* · 김춘성\*\*

— Abstract —

### Formation of methylamine from N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine in Rat

Young Bong Cho, Young Kon Ahn, Hong Soon Choi and Choon Sung Kim

*Department of Industrial Environmental & Health, College of Health Science, Yonsei University  
A-joo Institute for Enviro. & Occup. Safety & Health.\*  
Graduate School of Health Science and Management, Yonsei University\*\**

After oral administration of 14C-labelled N<sup>G</sup>-mono[methyl-14C]-L-arginine into rats, 38.2 % and 14.7 % of the administered radioactivity had been recovered in the urine and stool during 10 days. In the urine, 59.4 % of the radioactivity was recovered in the first 24-hours and used for the identification of the formation of methylamine. The strong cation-exchange resin column chromatography showed 6.3 %, 7.4 %, 4.9 %, and 81.5 % of the distributions of radioactivity of the neutral, monomethylamine, basic, and uneluted portions, respectively. The radioactivity of monomethylamine portion reeluted into the column chromatography was 39.5 %. The radioactivities corresponding monomethylamine in the column chromatography, thin-layer chromatography, and thin-layer electrophoresis were 39.5 %, 37.3 %, and 28.8 % of the recovered radioactivity, respectively.

**Key words :** monomethylamine, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, column chromatography, thin-layer chromatography, thin-layer electrophoresis

#### I. 서 론

발암물질로 알려진 formaldehyde, methyl

halide, dimethylsulfate, methylene chloride, dimethylformamide, dimethylamine 등은 생체 내로 들어와 대사되면서 일부는 암발생 물질과 관련된 생체고분자의 methylation을 일으키고 그 결과 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine과 같은 많은 대사물

\* 본 연구의 일부는 1989년도 연세대학교 학술연구비로 이루어졌음.

질이 배설되고 있다.

1984년 인도 Bhopal시 참사를 일으켰던 methyl isocyanate의 분해 (Verma, 1987), 발암성물질인 dimethylnitrosoamine의 분해 (Larry 등, 1987), choline과 lecithin의 대사 (Zeisel 등, 1983), sarcosone과 creatinine의 대사 (Davis와 De Ropp, 1961), trimethylamine의 대사 (Asatoor와 Simenhoff, 1965) 등으로 배설되는 monomethylamine은 산해리상수 (pKa)가 10.73인 알칼리성물질로서 생체내에서는 semicarbazide oxidase (Lyles와 McDougall, 1989)와 plasma amine oxidase에 의하여 산화되며, 이때 형성된 formaldehyde는 다시 생체 고분자를 hydroxymethylation하든가 methylation한 후 대사되어 배설되는 화합물 중에도  $N^G$ -monomethyl-L-arginine등이 발견 되었다 (Paik와 Kim, 1980). 이외에도 mono-methylamine은 생체의 내외적인 원인 화학물질로부터 생성되기도 하며 (Simenhoff 등, 1963; Zeisel 등, 1983), trimethylamine과 반응하여 dimethylamine으로 대사되기도 한다 (Asatoor와 Simenhoff, 1965).

Monomethylamine은 농약, 의약품원료, 고무의 가황촉진제, 프라스틱경화제, 로켓추진액체연료 등의 합성원료로서 다량 소비되는 것으로 공업적으로 메탄올과 암모니아로부터 합성하여 사용하고 있으며, 식품 특히 어류에 다량 함유되어 있고 (Lin 등, 1983), fibroblast cell surface의  $\alpha_2$ -macroglobuline 작용억제, epidermal growth factor (EGF)의 작용억제 (Maxfield 등, 1979), lysosome mediated protein degradation억제 (Seglen 등, 1979), insulin분비저해 (Gomis 등, 1984), rRNA합성억제 (Shiokawa 등, 1986) 등의 여러 작용이 보고되었다.

Methylation에 의해서 생성된  $N^G$ -monomethyl-L-arginine은 대사되어 methylurea가 생성되고 (조영봉, 1986), 작용이 알려지지 않았지만, 강한 염기성을 나타내는  $N^G$ -methylagmatine의 생성 (조영봉과 고준명, 1988)만이 알려져 있을 뿐 다른 대사물질은 알려져 있지 않다.

본 연구에서는  $N^G$ -monomethyl-L-arginine의 일련의 대사과정을 규명하는 과정 중 처음으로 monomethylamine의 생성이 확인되었기에 보고 하는 바

이며, 본 연구의 구체적인 목적으로는, 첫째, 원취에 경구투여한  $N^G$ -mono(methyl- $^{14}C$ )-L-arginine의 방사능을 요와 변에서 측정하고, 둘째, 요시료의 column chromatography로 대사물질 확인하고, 셋째, 요시료의 thin-layer chromatography로 대사물질을 확인하고, 넷째, 요시료의 thin-layer electrophoresis로 대사물질을 확인한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

Dowex 50(x8; H<sup>+</sup>form; 200~400 mesh), flavianic acid, methyl iodide, ethyl chloroformate는 Sigma사에서, mono(methyl- $^{14}C$ )amine · HCl (specific activity 46.0 mCi/mmmole)은 New England Nuclear에서, thin-layer chromatography를 위한 silicagel판은 Merck사에서, 기타 시약은 특급품을 구입하여 사용하였다. 그리고 실험동물은 Sprague-Dawley계통의 체중 200~210 g의 숫컷 원취를 사용하였다.

### 2. $N^G$ -mono(methyl- $^{14}C$ )-L-arginine 및 $N^G$ -monomethyl-L-arginine의 합성

$N^G$ -mono(methyl- $^{14}C$ )-L-arginine 및  $N^G$ -monomethyl-L-arginine은 각각 mono(methyl- $^{14}C$ )amine과 monomethylamine으로부터 조영봉 (1986)의 방법에 따라 합성하고, ion-exchange resin column chromatography로 분획·채취하였다. 그다음 flavianic acid을 사용하여 염으로 하고 침전시킨 것을 증류수로 재결정하였다.

그리고 flavianic acid를 강염기성 이온교환수지(OH-형)로 처리하여 flavianic acid를 흡착시키고 여과 과정을 거친 다음 증류수로 희석하여 방사능이  $2.0 \times 10^6$  cpm/ml가 되도록 희석하여 경구투여용 시료로 하였다.

### 3. 대사시료의 채취 및 방사능 측정방법

실험동물은 대사용상자에서 1주일 사육한 후,  $N^G$ -mono(methyl- $^{14}C$ )-L-arginine(0.5 ml;  $1.1 \times 10^6$  dpm)을 경구투여한 다음 24시간간격으로 10일동안 요와 변을 분리하여 채취하였다. 요는 0.1 ml에 대하여, 변은 24시간 채취량에 증류수 10 ml를

가하고 충분히 용해시킨 다음 0.1 ml에 대하여 각각 cocktail solution 10 ml를 가하여 방사능을 측정하였다.

#### 4. 요시료의 Column chromatography

Dowex 50(x8; H<sup>+</sup>form; 200 ~ 400 mesh) 2 ml를 채운 플라스틱 미니컬럼을 증류수로 세척하고 최초 24시간에 채취한 요시료 중 0.4 ml (164,000 dpm)를 넣고 증류수 10 ml로 용출한 후, 3M-NH<sub>4</sub>OH로 계속 용출하면서 2 ml씩 분획·채취하였다. 매 분획 2 ml중 1 ml에 cocktail solution 10 ml를 가하고 방사능을 측정하였다. 또한 methylamine부분은 다시 위와 동일한 방법으로 분리하여 방사능을 측정하였다.

그리고 다른 동일컬럼에서 mono(methyl-<sup>14</sup>C)amine·HCl 수용액 0.1 ml (5,500 dpm)를 넣고 요시료와 같은 방법으로 방사능을 측정하였다.

#### 5. 요시료의 Thin-layer chromatography

silicagel 판(10 cm × 20 cm)의 동일 위치에, 최초 24시간 요시료 200 l (8,200 dpm)와 40 % methylamine 수용액 5 ml를 점적한 후, 상온에서 건조시킨다. 그리고 전개용매로 n-butanol:H<sub>2</sub>O:pyridine:HAc(4:2:1:2)를 사용하여 전개하고 건조시킨 후, 0.3 % ninhydrine ethanol용액으로

발색시켜 methylamine부위를 표시 한 후 origin 으로부터 solvent front까지 0.5 cm씩 끊어 증류수 1 ml가 들어 있는 counting vial에 넣고 cocktail solution 10 ml를 넣고 방사능을 측정하였다.

#### 6. 요시료의 Thin-layer electrophoresis

silicagel 판(10 cm × 20 cm)의 origin부위에 최초 24시간 요시료 150 μl (6,050 dpm)를 점적하고 건조한 부위를 양극(+)으로 하여 0.1M-Na-citrate buffer(pH 3.6)을 사용, 30 mA (500 Volt)에서 55 분간 전기영동 후 건조시킨 다음 I-5항과 같은 방법으로 방사능을 측정하였다.

### III. 실험 성적

#### 1. 대사시료의 방사능

I-3항의 방법에 따라 10일간 채취한 요와 변에 대하여 각각 24시간별 총방사능을 측정하였다. 10일간 회수한 총방사능은 요와 변에서 각각 430,284 dpm과 166,068 dpm이 측정되었으며 투여량 1,126,400 dpm에 비하여 38.2 %, 14.7%가 회수되었고 총회수율은 52.94 %이었다(Table 1).

#### 2. 요시료의 column chromatography

I-4항의 방법에 따라 채취한 45개의 fraction에

Table 1. Radioactivity in the urine and stool after oral administration of N<sup>c</sup>-mono[methyl-<sup>14</sup>C]-L-arginine

Days	Urine			Stool		
	urine (ml)	dpm/0.1 ml	total dpm	stool (g)	dpm/0.1 g	total dpm
1	6.2	4,122	255,564	0.5	105	11,025
2	12.8	283	36,224	8.4	219	40,296
3	13.3	196	25,872	5.2	91	13,832
4	12.2	187	21,814	6.1	123	19,803
5	12.1	95	11,495	9.4	101	19,594
6	11.6	98	11,368	9.3	99	9,207
7	9.3	179	16,647	2.5	97	12,125
8	16.0	111	17,760	7.4	71	12,354
9	17.0	101	17,170	8.0	85	15,300
10	14.8	103	15,244	9.0	68	12,920
Total			430,284			166,068
recovery (%)			38.20			14.74

대하여 방사능을 측정된 결과, 총회수량은 30,500 dpm으로서 투입량(164,000 dpm)의 18.6%이며, 이중 산성 내지 중성부분(초기 4 fractions)이 10,400 dpm으로 투입량의 6.3%, methylamine 부분이 12,056 dpm으로서 투입량의 7.35%이었다. 대조 실험에서는 투입량(5,500 dpm)에 비하여 회수율은 98%이었다(Figure 1). 그리고 methylamine부분을 재분리한 결과, methylamine부

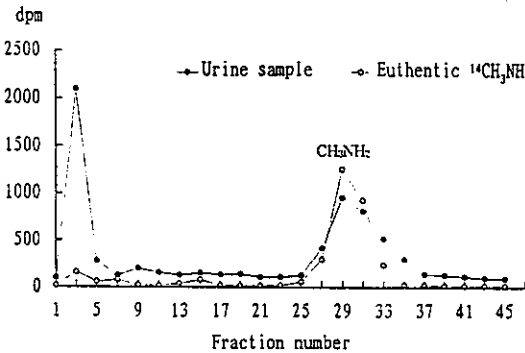


Fig. 1. The elution pattern of column chromatography

분의 방사능은 39.5%를 나타내었다.

### 3. 요시료의 Thin-layer chromatography

II-5항의 방법에 따라 측정된 총방사능은 7,309 dpm으로서 시료량(8,200 dpm)에 비하여 89.1%이었으며 methylamine부위의 발색부위(5-7 cm)의 방사능은 회수 방사능의 37.3%를 나타내고 있다

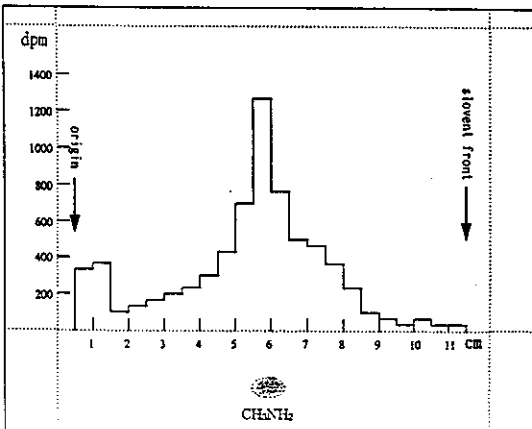


Fig. 2. Thin-layer chromatography

(Figure 2).

### 4. 요시료의 Thin-layer electrophoresis

II-6항의 방법에 측정된 총방사능은 4,950 dpm으로서 시료량(6,150 dpm)의 80.5%이었으며 methylamine의 발색부위(2 ~ 3.5 cm)의 방사능이 총회수 방사능의 28.8%인 1,425 dpm을 나타냈으며 이웃보다 3배이상의 방사능을 나타내었다

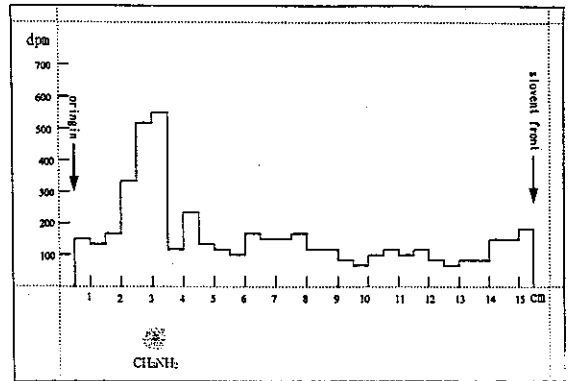


Fig. 3. Thin-layer electrophoresis

(Figure 3).

## IV. 고찰

Mono(methyl-<sup>14</sup>C)-amine으로 부터 합성한 N<sup>G</sup>-Mono(methyl-<sup>14</sup>C)-L-arginine은 미량의 출발 물질을 함유할 가능성이 높으므로 주의하여 정제를 하여야 한다.

원주에 방사능시료를 경구투여한 후, 최초 24시간 동안 채취한 요와 변의 방사능을 비교하면, 전자는 10일간 채취한 요시료에 있어서 총방사능의 59.4%이었으며, 한편 후자는 일별 변화가 크지 않았다. 10일간 채취한 요와 변에 있어서 총방사능비는 2.6:1로서 전자가 많았으며 총방사능의 합계는 투여량의 52.9%이었다. 그리고 6일째부터는 요와 변을 통한 방사능 배설이 극히 완만하며 양자의 방사능량이 점차 같아지는 경향을 보여 주었다.

최초 24시간 채취한 뇨시료의 column chromatography에 의한 용출액의 총 방사능중에서 methylamine에 해당하는 방사능량은 7.4%이었으며, methylamine부분만을 재분리한 결과,

methylamine에 해당하는 방사능량은 39.5 %이며 중성 내지 산성부분의  $N^G$ -monomethyl-L-arginine 방사능은 34.1 %로 methylurea (조영봉, 1986) 등이 함유되어 있을 것이며, column에 용출되지 않고 잔존하고 있는 방사능량은 column에 주입한 방사능량(164,000 dpm)의 22.2 %로 3M- $NH_4OH$ 에 의해서도 용출되지 않는  $N^G$ -monomethyl-agsmatine (조영봉, 1988)과 같은 강염기성 polyamine일 것이다.

Thin-layer chromatography에서는 총회수방사능중 methylamine부위의 방사능이 37.3 %를 나타내고 있으나 발색부위 주변에 방사능이 넓게 퍼져있는 한편, thin-layer electrophoresis에서는 총회수방사능중 28.8 %가 methylamine발색부위에 집중되어 나타나고 있으므로 thin-layer chromatography보다 우수한 분석조건으로 판단할 수 있다.

Column chromatography, thin-layer chromatography, thin-layer electrophoresis에서 methylamine부위에 모두 방사능이 보인 점으로 보아  $N^G$ -monomethyl-L-arginine으로부터 monomethylamine의 생성이 본 연구에서 확인되었다. 따라서 향후에 column에 잔류하고 있는 염기성 물질에 대한 연구가 수행되어야 함은 물론, formaldehyde, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, methylhalide, dimethylsulfate, methylene chloride, dimethylformamide 등의 C1화합물에 대한 집중연구가 이루어짐으로서 새로운 생물학적 지표의 개발은 물론 장애와 질병의 예방과 치료약품의 개발을 가져올 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Methylation에 의해서 생성되는  $N^G$ -monomethyl-L-arginine의 방사선 표지물질을 흰쥐에 투여하여 배설되는 요중에서 monomethylamine이 처음으로 ion-exchange resin column chromatography, thin-layer chromatography, 그리고 thin-layer electrophoresis를 통하여 확인하였다.

10일동안 채취한 총방사능은 요와 변에서 각각 구조투여한 방사능의 38.2 %와 14.7 %이며, 양자의 비는 2.6:1이었다.

column chromatography에서의 방사능 회수율은 중성부분, monomethylamine부분, 염기부분, 그리고 용출되지 않은 부분은 각각 6.3 %, 7.4 %, 4.9 %, 그리고 81.5%이었다. 그리고 methylamine부분만을 재분리하여 방사능을 측정 한 결과, 39.5 %의 방사능을 나타내었다.

Monomethylamine에 해당하는 방사능은 column chromatography에서 총 용출액의 39.5 %, thin-layer chromatography에서는 총방사능의 37.3 %, thin-layer electrophoresis에서는 총 방사능의 28.8 %를 각각 보여 주고 있다.

## 참 고 문 헌

- 조영봉 :  $N^G$ -monomethyl-L-arginine의 대사:흰쥐에서 N-monomethylurea의 생성. 한국독성학회지 1986;1(1):81-86
- 조영봉 과 고춘명 : Klebsiella pneumoniae에 의한  $N^G$ -monomethyl-L-arginine의 대사 :  $N^G$ -monomethylagmatine의 생성. 원주의대논문집 1988;1(1):1-6
- Asatoor AM and Simenhoff ML : *the origin of urinary dimethylamine. Biochem Biophys Acta* 1965;111:383-392
- Davis EJ and De Ropp RS : *Metabolic origin of urinary methylamine in rat. Nature(London)* 1961; 190:636-637
- Gomis R, Deleers M, Malaisse-Lagae F, Sener A, Garcia-Morales P, Rovira A, Valverde I, Malasse J : *Metabolic and secretory effects of methylamine in pancreatic islets. Cell Biochem* 1984;Function 2:161-166
- Larry KK, Takako A, and David W, Tianyuan W, Chung SY : *Cancer Research* 1987;47:447-452
- Lin JK, Lee YJ, and Chang HW : *High concentration of dimethylamine and methylamine in squid and octopus and their implications in tumor aetiology. Fd Chem Toxic* 1983;21(2):143-149
- Lyles GA and Mcdougall SA : *The enhanced daily excretion of urinary methylamine in rats treated with semicarbazide or hydrazine may be related to the inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities. J Pharm Pharmacol* 1989;41:97-100
- Maxfield FR, Willingham MC, Davies PJA, Pastan I : *Amines inhibit clustering of  $\alpha_2$ -macroglobuline and EGF on the fibroblast cell surface. Nature(London)* 1979;277:661-663
- Paik WK and Kim SD : *Protein methylation.*

*Biochemistry: A series of monography.* Vol 1, 1980, John Wiley and sons, New York

Seglen PO, Grinde B, and Solheim AE : *Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquin and leupeptin.* *Eur J Biochem* 1979;95:215-225

Shiokawa K, Kawazoe Y, Tashiro K, Yamana K : *Effects of various ammonium salts, amines, polyamines and  $\alpha$ -methylornithine on rRNA synthesis in neutral cells of *Xenopus laevis* and *Xenopus borealis*.* *Cell Differ* 1986;18:101-108

Simonhoff ML, Asatoor AM, Milne MD, Zilva JF : *Retention of aliphatic amines in uremia.* *Clin Sci* 1963;25:65-77

Tubeville C and Craddock VM : *Methylation of nuclear proteins by dimethylnitrosoamine and by methionine in the rat in vivo.* *Biochem J* 1971;124:725-739

Verma : *Anatomy of the methyl isocyanate leak in Bhopal.* *Health Hazards of Chemicals*, ed. J Saxena 1987;Vol. 5, pp 233-239. New York:Hemisphere

Zeisel SH, Wishnok JS, and Blustain JK : *Formation*