

魚介類におけるホルムアルデヒドと ジメチルアミンを生成する酵素に 関する研究*

原 田 勝 彦

Studies on Enzyme Catalyzing the Formation of Formaldehyde and
Dimethylamine in Tissues of Fishes and Shells

By
Katsuhiko HARADA

目 次

| | |
|----------------------------|-----|
| 緒 論 | 165 |
| 本 論 | |
| 第1章 ホルムアルデヒドならびにジメチルアミンの検出 | |
| 第1節 ホルムアルデヒドの検出..... | 167 |
| 第2節 ジメチルアミンの検出..... | 169 |
| 小 括..... | 170 |
| 第2章 トリメチルアミンオキサイドの分布 | |
| 第1節 軟体動物 頭足類..... | 171 |
| 第2節 軟体動物 二枚貝類..... | 172 |
| 第3節 軟体動物 腹足類..... | 174 |
| 第4節 節足動物, 棘皮動物および原索動物..... | 176 |
| 第5節 脊椎動物 魚類..... | 178 |
| 小 括..... | 181 |

*水産大学校研究業績 第736号, 1975年1月20日受理.
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 736.
Received Jan. 20, 1975.
本報告は九州大学に提出した学位請求論文である。

| | |
|---|-----|
| 第3章 トリメチリアミンオキシドからホルムアルデヒド とジメチルアミンの生成 | |
| 第1節 軟体動物 頭足類 | 181 |
| 第2節 軟体動物 二枚貝類 | 187 |
| 第3節 軟体動物 腹足類 | 187 |
| 第4節 節足動物, 棘皮動物および原索動物 | 189 |
| 第5節 脊椎動物 魚類 | 194 |
| 小 括 | 198 |
| 第4章 ホルムアルデヒドとジメチルアミンを生成する酵素 の精製と性質 | |
| 第1節 酵素の精製 | 199 |
| 第2節 補助因子の分離と分画 | 202 |
| 第3節 酵素蛋白質の分画 | 205 |
| 小 括 | 207 |
| 第5章 ホルムアルデヒドとジメチルアミンの生成機構 | |
| 第1節 酵素反応における速度論的解析 | 208 |
| 第2節 酵素モデルによる酸・塩基触媒反応における速度 論的解析 | 216 |
| 小 括 | 224 |
| 第6章 総 括 | 224 |
| 結 語 | 227 |
| 文 献 | 227 |
| Appendix | 232 |
| Summary | 236 |
| Zusammenfassung | 239 |

緒 論

生鮮魚介類および加工魚介類におけるホルムアルデヒド (FA) とジメチルアミン (DMA) の存在については、それぞれ古く石田¹⁾をはじめその他多数の報告^{2~49)}がある。しかしこれらの研究の多くはFAとDMAの存在を個々に調べたものである。

1917年、石田¹⁾はカニ缶詰中のFAをウロトロピン昇汞複塩の結晶として分離確認した。その後、多くの缶詰中にFAが含まれることが明らかとなった^{2, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 14, 16)}。一方、生鮮魚介類、塩蔵魚および冷凍魚からもFAが検出されている^{1, 3, 6~10, 12, 13, 15, 18~20, 23, 24)}。これらの研究のFAの検出は、主として検体を水蒸気蒸留または直接蒸留した留液についてFAの呈色反応を調べたものであるから^{1, 3, 6~9, 12, 13, 15, 20)}、加熱による検体成分の分解に起因するFA生成のおそれがある^{8, 9, 15)}。また、TANKARD³⁾およびREAY¹³⁾は、魚肉中に存在するトリメチルアミン (TMA) およびDMAの酸化によってFAが生成する可能性を指摘している。このため、長い間、生鮮魚介類におけるFAの存在は見過されてきたようにみえる。1961年、天野⁵⁰⁾は、北洋船上凍結マグラ肉からFAをformol dimedoneとして分離した。これにより、生鮮魚介類にもFAが存在することがはじめて明らかとなった。

一方、魚介類筋肉中にDMAが生成することが明らかとなったのは、1938年から1940年にかけてのことである。1938年、BEATTY³⁶⁾は大西洋タラでDMAの生成を認めた。その翌年、REAY³⁷⁾はBEATTYと同一魚種で、SHEWAN³⁸⁾はハドックにおいてDMAの存在を報告している。生鮮魚介類におけるDMAの存在については以上のほかに多数の業績がある^{30, 39~49, 51~61)}。調べられた種類は魚類、頭足類、二枚貝類および甲殻類100種以上におよんでいる。このうち、明らかにDMAの存在が認められた魚種は、タラ科およびこれに近縁の魚種である^{30, 34~41, 51~61)}。また、頭足類イカ類においてもDMAが存在することが明らかにされている^{46~48, 59)}。しかし、他の魚介類については明らかでない。

魚介類におけるこれら両物質すなわち、FAとDMAの生成機構の解明は、生化学上の見地ばかりでなく、食品衛生上の立場からも重要な事柄である。

FAはかなり毒性の高い物質であり、その量により異なるが、体内に入ると口腔、咽喉および腹部に刺激を与える。その症状は猛烈な苦痛、嘔吐および時には下痢をおこし、続いて目まい、人事不省、けいれんをおこして意識不明となる⁶²⁾。

一方、DMA等の低級脂肪族アミンもまた一般に有毒であるが、アンモニアの毒性より弱いという⁶³⁾。しかし、DMAと亜硝酸の相互反応により生成するジメチルニトロサミンは肝臓に特異的に作用する毒性の高い発ガン物質である^{64~66)}。ENDER⁶⁷⁾は家畜の斃死をもたらす有毒ニシン魚粉中の原因物質を検索し、この物質がジメチルニトロサミンであることを明らかにしている。

この食品衛生上問題となるFAとDMAが生鮮魚介類でトリメチルアミンオキシド(TMO)から酵素*反応により生じることを初めて明らかにしたのは天野・山田らの研究である^{50~56)}。1963年から1965年にかけて、天野・山田らはマグラ、スケトウダラおよびイソアイナメの生鮮魚類でFAが多い組織、器官にDMAもまた多いことを認め、FAとDMAとの生成に密接な関係があることを指摘した。さらに、同じ魚種の筋肉で、貯蔵中における両物質の変化を調べ、両物質の生成がともに酵素作用によることを推定し⁵¹⁾、この推定の妥当性をその後の研究によって確かめた^{53, 54)}。また、生成母体がTMOであることを明らかにした^{53~55)}。その後、CASTELL^{57, 58)}は大西洋タラ類においても、その貯蔵中にFAならびにDMAが生成することを確認した。これらの研究とは別に冷凍スケトウダラ肉におけるFAとDMAの生成は、凍結状態で活性化される酵素の作用によるという報告がある^{59~61)}。

なお、この他にTMO代謝に関する酵素反応としては、細菌酵素によるTMOからTMAの生成、魚介類組織酵素によるTMAからTMOの生成があり、これらの反応、酵素の性質についてはある程度の成果が得られている。TARR⁶⁸⁾はTMOからTMAの生成に関与する細菌酵素が $R_3\equiv N=O$ の一般式をもつトリアルキルアミン・

*TMOからFAとDMAを生成する酵素を仮りにFA-DMA生成酵素と名づけ、TMO-ase という記号を用いる。

オキシドを活性化することから、この酵素をトリアミノキシダーゼと命名している。この酵素の適応性については富沢^{69~71)} その他の研究^{72~77)} があり、水素供与体についてはWATSON⁷⁸⁾ その他の業績^{69~72, 79~81)}がある。また、阻害剤の影響についてはTARR⁷²⁾ その他の報告^{69~71, 73, 75, 82)}がある。

魚介類組織におけるTMAからTMOの生合成についてはBILINSKI およびその他の研究がある。BILINSKI⁸³⁾ はカレイ類に¹⁴C標識TMAを投与すると、この¹⁴CがTMOにとり込まれることを報告している。BAKERら^{84, 85)} はアブラツノザメ (dogfish)の肝臓ホモジネートを用いTMAからTMOを生合成する反応に関与する酵素が補酵素としてNADPを必要とすることを明らかにし、この酵素の動植物組織における分布を調べている。

これに対して、魚介類におけるTMOからFAとDMAを生成する反応機構については全く不明であり、この反応を触媒するTMO-aseの性質についてもほとんど研究が行なわれていない。よって、魚介類におけるTMO-aseの分布、その酵素の精製ならびにこの酵素が関与する反応機構の解明に着手した。

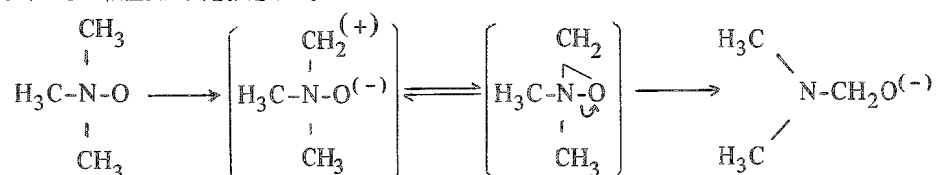
生鮮魚介類におけるTMO-aseの分布を調べるためには生成FAとDMAを検出する方法が必要である。FAとDMAの分離、検出法に関しては多数の報告がある^{1, 3, 18, 19, 21~29, 31~33, 42~45, 47, 49, 86~88)} これらの報告の大部分はクロマトグラフィーによりFAあるいはDMAを分離、検出する方法を用いているが、両物質を簡単に分離、検出する方法がみあたらない。そこで、FAについては菰田ら⁸⁷⁾、DMAについては豊沢ら⁸⁸⁾の用いた薄層クロマトグラフィーについて検討し、これら両物質を簡単に温和な条件下で分離、検出する方法を確立した。

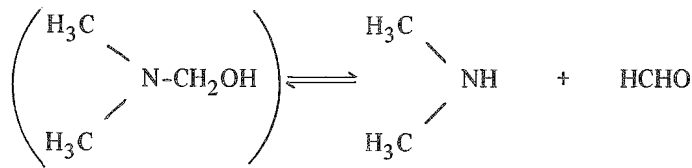
つぎにTMO-aseの基質である魚介類におけるTMOの分布を調べた。魚介類におけるTMOの存在については内外ともにかなりの報告がある^{34, 36~38, 44~47, 51, 59, 60, 77, 89~131)}。しかし、外国産水産動物については分類学上系統立った研究がかなり行なわれているが、日本産水産動物については系統立った研究が少ない。このため分類学上系統的に日本産魚介類におけるTMOの分布を調べた。

魚介類におけるTMO-aseの分布については、天野・山田ら^{51~56)} およびその他の業績^{31, 57~61)}から、タラ科およびその近縁の魚種に存在することは明らかである。しかし、これら以外の水産動物におけるTMO-aseについては明らかでない。一方、タラ科以外の魚介類すなわちイカ類にもFAあるいはDMAが存在することはすでに述べた。このことから、他の魚介類にもTMO-aseが存在する可能性がある。このため、生鮮魚介類300種近くについてTMO-aseの検索を行なった。この結果、TMO-aseはタラ類以外になお特定の魚介類に存在することが明らかとなった。特に魚類で本酵素の存在が認められたエン類はタラ類と同様、酵素活性が強いことから、特記に値するといえよう。

このエン類のワニエン肝臓を用いてTMO-aseの精製を試みた。種々の精製方法を検討し、3種の部分精製酵素標品をうることに成功した。この酵素標品を用い酵素蛋白質および補助因子とに分離し、それぞれの性質を調べて多くの知見を得ることができた。

TMOからFAとDMAの生成機構については全く不明である。しかし、酵素触媒反応における反応機構については活性の発現にメチレン青が必要であり⁵⁵⁾、特定の反応条件下でFAとDMAの生成量が共に等モルである^{55, 131)}ことが知られている。一方、非酵素触媒反応で調べた報告としてはVAISEY¹³²⁾その他の業績^{20, 133~137)}がある。TMOからFAとDMAを生成する反応においては中間代謝物としてジメチルアミノメチロールを生じることほぼ確実である^{20, 132~135)}。このため、TMOからこのメチロールが形成される反応機構を解析するため、酵素および非酵素触媒における触媒活性を調べ、あわせてシミュレーション (simulation)を行なった。この結果、還元型補酵素ならびに一般酸塩基 (pH 10~11)が触媒活性に寄与することから、反応機構に一般塩基 (general base)が関与するものと推論した。このことにもとづいてTMOからFAとDMAの生成機構としてつぎの転位反応式を推定した。





本論文は、上記の事項に関する実験および結果を記述したものである。

第1章 ホルムアルデヒドならびにジメチルアミンの検出

魚介類に含まれる揮発性カルボニル化合物の分離、検出法としては、ペーパークロマトグラフィー^{17, 23)}、カラムクロマトグラフィー²⁷⁾、薄層クロマトグラフィー^{28, 29, 32)}、ガスクロマトグラフィー^{22, 31, 33)} およびこれらの方法の併用^{21, 24~26)} とその他の方法^{18, 19)} がある。

一方、魚介類における揮発性アミンの分離、検出法としては、ペーパークロマトグラフィー^{45, 47)}、カラムクロマトグラフィー^{42, 47)} およびガスクロマトグラフィー^{43, 44, 49)} がある。

著者は生鮮魚介類におけるFAとDMAの生成を調べる目的で、薄層クロマトグラフィーによる揮発性カルボニル化合物とアミンの簡易検出法を検討した。

第1節 ホルムアルデヒドの検出

昭和45年改正前の“食品添加物等の規格基準”（厚生省告示第370号, 昭和34年）の第1項A「食品一般の成分規格」におけるFAの検出法は、リン酸または硫酸酸性下で検体を直接加熱蒸留し、その初留液についてFAの呈色反応を調べるものである。この方法では、酸性下での加熱による検体成分の分解によってFAを生じる恐れと、FA以外の物質によっても類似の呈色を示す懸念がある^{3, 86)}。このため、温和な条件でFAを抽出し、これを2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン（2,4-DNP-ヒドラゾン）として薄層クロマトグラフィーにより分離、検出する方法を検討した。

実験方法

検液の調製 組織25gに冷水25mlを加え、氷冷しつつブレンダーでホモジェナイズする。得られたホモジェネート40gに20%トリクロル酢酸10mlを加えて除蛋白する。濾液5mlを分液ロートにとり、これにn-ヘキサン10mlを加えて振とうし、静置後水溶液層を試験管に移す。これに1%飽和2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン溶液1mlを加えて沸とう水中で6分間加熱する。その後、別の分液ロートに移し、石油エーテル5mlを加えて振とうし、2,4-DNP-ヒドラゾンを石油エーテル層に移行させる。この石油エーテルによる抽出を3回繰返す。石油エーテルを蒸発乾固し、これをトルエン20μlに溶かし検液とした。

薄層クロマトグラフィー 活性シリカゲルGのクロマト・プレート（厚さ0.25mm）を加熱しつつ、その上に検液20μlをスポットし、展開を行なった。なお、同定を確実にするため、検液と同時に精製FAとアセトアルデヒドの2,4-DNP-ヒドラゾンの溶液をスポットした。

実験結果

抽出回数の検討 前述の検液の調製と同じ方法でフナ筋肉25gにFAを添加し、2,4-DNP-ヒドラゾンを石油エーテルで1~5回抽出した。この抽出液を365nmの波長で測定し、回収率を求めた。その結果、3回の抽

出で約90%のFAが回収されることがわかった。ここで使用したフナ筋肉については前もってFAの検出を行なったが、その存在は認められなかった。なお、フナ筋肉にFAを加えた場合の最小検出量を求めた結果、1スポット0.3 μ g、すなわち筋肉1gあたり0.1 μ g FAの値が得られた。

展開剤の検討 魚介類中にはときとしてアセトアルデヒドが存在する^{17, 19, 23~27, 29, 32, 33})。この物質とFAを分離、検出するために適する二成分系の展開剤をまず選択するため、精製FAとアセトアルデヒドの2,4-DNP-ヒドラゾンを検体として8種の展開剤について検討を行なった。これら展開剤につき両物質の分離能を調べた結果から、n-ヘキサン-エタノール混液(90:10)がかなりよいことがわかった。つぎにこの混液に対し15種の試薬を加えた三成分系の展開剤について分離能の検討を行なった。その結果、ヘキサン-エタノール-酢酸混液(90:10:3)が最もよい分離能を示すことがわかった。

魚介類におけるFAの検出 n-ヘキサン-エタノール-酢酸混液を展開剤として用い、魚介類(16種)の筋肉についてFAの検出を行なった。第1表に示すように、フナ筋肉を除きすべてにFAが存在することがわかった。

Table 1. Identification of formaldehyde in the muscle of fish and other aquatic animals by thin-layer chromatography.

| Species | Freshness score* | Formaldehyde |
|-------------------------|------------------|--------------|
| Cephalopoda | | |
| Madako | 1 | + |
| Surumeika | 1 | + |
| Sodeika | 1 | + |
| Gastropoda and bivalvia | | |
| Sazae | 1 | + |
| Asari | 1 | + |
| Hamaguri | 1 | + |
| Crustacea | | |
| Gazami | 2 | + |
| Janomegazami | 1 | + |
| Elasmobranchii | | |
| Hoshizame | 2 | + |
| Akaei | 2 | + |
| Teleostomi | | |
| Masaba | 2 | + |
| Maaji | 2 | + |
| Hirame | 2 | + |
| Mahata | 2 | + |
| Maiwashi | 2 | + |
| Funa | 1 | - |

* 1, Still alive; 2, Pre-rigor or during rigor.

考 察

魚介類に含まれる揮発性カルボニル化合物の捕集法としておもに蒸留法が利用され^{17~19, 21~27, 29, 31~33})、昭和45年改正前の“食品添加物等の規格基準”のFA検出の公定法においても蒸留法が採用されている。この方法では、蒸留の初留液についてFAの検出を行なうが、山田がかってマダラ肉について調べた結果では、

初留区分に捕集されるFA量は蒸留原液の17%であった¹³⁸⁾。このため、本法では、まず検体をn-ヘキサンで処理し、脂質成分を除いたのち、2,4-DNP-ヒドラジンを加えてFAを2,4-DNP-ヒドラゾンとし、これを石油エーテルで抽出する方法を採用した⁸⁷⁾。この方法により、フナ筋肉に一定量のFAを加えて検討した結果、3回の抽出でFAの約90%が石油エーテルへ移行することがわかった。

菰田⁸⁷⁾は食品中のFA検出に固定相としてシリカゲルGを、展開剤としてベンゼンを用いて薄層クロマトグラフィーを行なっている。しかし、この方法ではFAとアセトアルデヒドとの分離が十分でない。YURKOWSKIら²⁹⁾は塩蔵タラ (*Gadus morhua*) の揮発性カルボニル化合物を薄層クロマトグラフィーで検索し、FAの存在を確認している。この方法は煩雑なため、FAのみの検出を目的とする簡易法としては適当でない。しかし、プロピレングリコールでimpregnationを行なったシリカゲルGで、低分子のn-アルカナルの分離に好結果を得ている²⁸⁾。また、松任ら³²⁾は同様impregnationを行なったクロマトシートを用いn-アルカナルの分離を行なっているが、FAとアセトアルデヒドの分離能では、ジオキサン-水系のクロマトグラフィーが2-フェノキシエタノール-n-ヘキサン系のそれよりすぐれているようである。これらのimpregnationを行なった方法と著者の方法との優劣については、比較研究を行なっていないため明らかでない。しかし、n-ヘキサン-エタノール-酢酸系による本方法では、FAとアセトアルデヒドが明瞭に分離でき、展開時間がわずか30分程度であるため、魚介類中のFAの簡易検出法として十分利用できると思われる。

フナを除いた15種の検体すべてにFAが検出されたことは、TMOからFAとDMAを生成するTMO-aseが存在しない場合でも、魚介類には他の内因性のFAが存在することを意味する、このことについては第3章第3節で詳細に述べる。

第2節 ジメチルアミンの検出

豊沢ら⁸⁸⁾はシリカゲルGを固定相とした薄層クロマトグラフィーを用い、モノメチルアミン、DMAおよびTMAに対する各種展開剤の分離能を調べ、水-酢酸混液(8:2)およびリン酸緩衝液(pH 5.3)が展開剤としてすぐれ、短時間で微量のアミン類の分離、検出ができると報告している。よって、著者は魚介類における揮発性アミンの簡易検出法としてこの方法を吟味した。

実験方法

検液の調製 魚介類組織10gを乳鉢ですりつぶし、20%トリクロル酢酸20mlを加え除蛋白する。あらかじめ内室に0.01N塩酸1mlを入れてあるCONWAY装置の外室に、得られた濾液1mlを入れ、さらに30%水酸化カリウム1mlをすみやかに注入する。37℃で120分間インキュベートしたのち、内室の溶液をとり出し、減圧下で水分を蒸発乾固し、20μlの水に溶かし、検液とした。

薄層クロマトグラフィー 活性シリカゲルGのクロマト・プレート(厚さ0.1mm)上に検液を4μlスポットし、展開を行なった。なお、同定を確実にするため、検液と同時にモノメチルアミン、DMAおよびTMA塩酸塩をスポットした。展開後DRAGENDORFF試薬でアミンを分離、検出した。

実験結果

展開剤の検討 魚介類中にはモノメチルアミンおよびTMAが存在するので、これらアミンとDMAを分離、検出するために、6種の展開剤についてモノメチルアミン、DMAおよびTMAに対する分離能を調べた。その結果、エタノール-濃塩酸混液(10:1)が最もよい分離能を示すことがわかった。なお、フナ筋肉にDMAを加えた場合の最少検出量を求めた結果、1スポット4μg、すなわち筋肉1g当り1μg DMAの値が得られた。

魚介類におけるDMAの検出 エタノール-塩酸混液を用い、魚介類(27種)の組織についてDMAの検出を行なった。その結果、DMAはマダラおよびイカ類のみに存在することがわかった。第2表は結果の一部を示したものである。

Table 2. Identification of dimethylamine in the muscle of fish and other aquatic animals by thin-layer chromatography.

| Species | Freshness score* | Dimethylamine |
|----------------|------------------|---------------|
| Cephalopoda | | |
| Madako | 3 | - |
| Surumeika | 2 | - |
| Surumeika | 3 | + |
| Yariika | 2 | - |
| Yariika | 4 | + |
| Crustacea | | |
| Kurumaebi | 4 | - |
| Tarabagani | 3 | - |
| Elasmobranchii | | |
| Dochizame | 3 | - |
| Hirataei | 3 | - |
| Teleostomi | | |
| Urumeiwashi | 3 | - |
| Ginanago | 3 | - |
| Sanma | 3 | - |
| Masaba | 3 | - |
| Maaji | 3 | - |
| Mahata | 3 | - |
| Kawahagi | 3 | - |
| Madara | 3 | + |

* 2, Pre-rigor or during rigor; 3, Early stage of post rigor; 4, Latter stage of post rigor.

考 察

豊沢ら⁸⁸⁾は揮発性アミンの分離能で水-酢酸混液(8:2)およびリン酸緩衝液(pH5.3)がすぐれていると報告しているが、著者が調べた結果ではエタノール-塩酸混液(10:1)が最もよい分離能を与えた。

この展開剤を用い魚介類の揮発性アミンを分離、検出する際注意を要することは、検液中の揮発性アミンの濃度が高いとRf値が大きくなることである。したがって、検液のスポットが大きすぎる場合には検液の液量を4 μ l以下にしなければならない。しかし、本法はDRAGENDORFF試薬を用いているので、魚介類にかなりの量存在するアンモニアは揮発性アミンの検出に妨害を与えず、また展開時間が90~120分であるので魚介類揮発性アミンの簡易検出法として十分利用できる。

調べた魚介類のうち、マダラを除き鮮度がかなり低下したイカおよびヤリイカ筋肉にDMAが検出された。しかし、より鮮度のよい同一種の検体ではDMAが検出されなかった(第2表)。この原因については第3章第3節において述べる。

小 括

魚介類に含まれるFAおよびDMAの簡易検出法として薄層クロマトグラフィーを検討した。

FAの検出には固定相として活性シリカゲルGを用い、FAを2,4-DNP-ヒドラゾンとしてn-ヘキサン-エタノール

ール-酢酸混液(90:10:3)で展開した。この方法により検体中にアセトアルデヒドが存在する場合でもFAが明確に分離、検出できる。

一方、DMAの検出には、FAと同様に活性シリカゲルGを用い、展開剤としてエタノール-塩酸混液(10:1)、呈色にDRAGENDORFF試薬を使用した。この方法により、DMAは魚介類組織中に存在する他の揮発性アミンによって妨害されることなく検出できることがわかった。

第2章 トリメチルアミンオキサイドの分布

魚介類におけるTMOの含量については内外ともに多数の報告がある。これらはREEYら¹³⁹⁾、SHEWAN¹⁴⁰⁾、DYER¹⁴¹⁾、GRONINGER¹⁴²⁾ および山田¹⁴³⁾ によって総括されている。しかし、外国産水産動物については分類学上系統立った研究がかなり行なわれているが、日本産水産動物については系統立った研究は少ない。よって、分類学上系統的に、日本産魚介類180余種におけるTMOの含量を調べた。

第1節 軟体動物 頭足類

頭足類の筋肉におけるTMO含量については高橋⁹²⁾その他の報告があり^{47, 59, 93, 95, 101, 103, 108, 115, 121, 122, 141)}調べた種類は6科18種におよんでいる。著者は6科17種の頭足類について筋肉と中腸腺についてTMO含量を調べた。

実験方法

検液の調製 試料は主として吉見(下関市)近辺で入手した。これら試料の大部分は生活反応を示すものであった。これらから主として筋肉および中腸腺それぞれ25gをとり、これに等量の冷水を加えてホモジェネートを作製した。このホモジェネート40gに20%トリクロル酢酸10mlを加え、30分以上室温に放置後、冷却下で遠心分離(15,000×g, 15分間)した。上澄液を濾過し、得られたトリクロル酢酸抽出液についてTMOの定量を行なった。

TMOの定量 BYSTEDTらの方法¹⁴⁴⁾でTMOを還元し、生成TMAをCONWAYの微量拡散法¹⁴⁵⁾で定量した。

実験結果

イカ類14種およびタコ類3種におけるTMO含量を調べた結果は第3表のとおりである。外とう筋については前半部と後半部とにわけてTMO含量を調べたが、同一個体では部位差がほとんどみられなかったので、一括して外とう筋としてまとめた。また、同一種について数個体調べた試料ではその平均値を示した。第3表から明らかなように、外とう筋におけるTMO含量は腕筋のそれと比べて高い。これは腕筋では量的にかなり多い表皮を含み、外とう筋は表皮を除いた筋肉組織でTMOを定量したためと推察される。別にいくつかの種類について外とう筋表皮のTMO-N量を調べたところ、55~77mg%の値が得られ、外とう筋それ自体に比べかなり低い値であった。

一方、中腸腺のTMO含量はTMO-Nとして、0~73mg%で個体によってその含量が大きく相違した。ブドウイカおよびジンドウイカのTMO-N量は他種に比べ相当高い。しかし、これはこの種の特異性とするより、むしろ個体差によるものと思われる。すなわち、コウイカ、アオリイカおよびスルメイカを調べた結果、同一種でも個体によって中腸腺のTMO含量がかなり相違したからである。

考察

頭足綱のTMO含量は主として日本の研究者によって調べられている^{47, 59, 92, 93, 95, 101, 103, 108, 115, 121, 122, 141)}。しかし、これらの報告では採取筋肉部位についての記載がきわめて少ない。

Table 3. Trimethylamine oxide content in the species of Decapodan and Octopodan Mollusca.

| Species | Mantle | Arm | Mid-gut gland |
|--------------|-------------|------|---------------|
| | (mg N/100g) | | |
| Cephalopoda | | | |
| Decapoda | | | |
| Kaminariika | 143 | 82 | 5.7 |
| Kōika | 145 | 89 | 6.2 |
| Hyōmonkōika | 150 | 111 | 19 |
| Himekōika | 89 | 41 | 4.7 |
| Shishiika | 113 | 47 | 7.6 |
| Shiriyakeika | 205 | 44 | 4.4 |
| Dangoika | 105 | 76 | 17 |
| Aoriika | 263 | 112 | 6.6 |
| Yariika | 347 | 251 | 10 |
| Mehikariika | 286 | 197 | 9.9 |
| Budōika | 152 | 86 | 36 |
| Jindōika | 127 | 111 | 66 |
| Surumeika | 310 | 165 | 8.3 |
| Sodeika | 285 | 208 | 2.8 |
| Octopoda | | | |
| Madako | 38.0 | 30.0 | 2.0* |
| Tenagadako | 18.4 | 14.4 | 6.2* |
| Iidako | 9.2 | 7.4 | 6.0* |

* Viscera.

本研究で、外とう筋の前半部と後半部のTMO含量は、その部位による差がわずかであることを明らかにした。これに対し、外とう筋と腕筋ではTMO含量の差が著しいことが明らかである（第3表）。したがって、今後、頭足綱でTMO含量を測定する場合、外とう筋のみであるのか、あるいは腕筋を含めたものか、採取筋肉部位を明記する必要がある。

本研究によると、イカ類外とう筋のTMO-N量は種類間では大きな相連が認められず、一般的に100~200mg%内外で、海産動物中板鰓類のそれにほぼ等しい。しかし、調べた検体中でコウイカの64mg%、ヤリイカの488mg%の値が得られたが、上記の値とかなりかけ離れた含量であり、同一種でも個体による差が著しいことがわかった。とくに、400mg%以上の値は日本産板鰓類にも報告されていない値である¹⁴³⁾。タコ類については、3種調べたが、そのTMO含量は既往の報告^{93,103,115)}と大差なく、値はイカ類より低く、節足動物甲殻類（第4節参照）にほぼ匹敵した。

第2節 軟体動物 二枚貝類

日本産水産動物の頭足綱におけるTMOの含量を第1節で述べた。本節では、二枚貝類について調べた結果を記述する。

実験方法

検液の調製 検液の調製は第1節と同じ方法で行なった。採取部位は閉介筋、足および外とう筋、および内臓である。

TMOの定量 第1節と同じ方法によった。

実験結果

26種の二枚貝類組織のTMO含量を調べた結果は第4表のとおりである。筋肉部位では閉介筋も足および外とう筋とともにTMO-N量が1mg%内外で僅少であった。しかし、イタヤガイおよびザルガイにおいては閉介筋で50mg%前後、足および外とう筋で20mg%前後と調べた二枚貝中特に大きい値を示した。

Table 4. Trimethylamine oxide content in the species of Bivalvian Mollusca.

| Species | Adductor | Foot and mantle (mg N/100g) | Viscera |
|-----------------|----------|--------------------------------|---------|
| Bivalvia | | | |
| Eutaxodonta | | | |
| Kariganeegai | 0.0 | 0.0 | 0.1 |
| Akagai | 0.3 | 0.2 | 0.3 |
| Kumasarubō | 0.5 | 0.1 | 0.1 |
| Sarubō | 0.2 | 0.4 | 0.3 |
| Pteriomorpha | | | |
| Murasakiinkogai | 0.2 | 0.0 | 0.1 |
| Murasakiigai | 0.5 | 0.0 | 0.4 |
| Igai | 0.7 | 0.3 | 0.2 |
| Akoyagai | 1.5 | 0.1 | 0.2 |
| Itayagai | 50.2 | 15.3 | 2.3 |
| Iwagaki | 0.2 | 0.7 | 0.3 |
| Magaki | 0.3 | 0.1 | 0.5 |
| Heterodonta | | | |
| Yamatoshijimi | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Awajishijimi | — | 0.0 | 0.0 |
| Hamaguri | 0.0 | 0.4 | 0.5 |
| Shinahamaguri | 0.6 | 0.9 | 0.6 |
| Asari | 0.6 | 0.1 | 0.3 |
| Oniasari | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Kuchibagai | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Kagamigai | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Bakagai | 1.0 | 0.4 | 0.1 |
| Shiofukigai | 0.2 | 0.2 | 0.1 |
| Mirukui | 0.0 | 0.0 | 0.6 |
| Mategai | 1.3 | 1.4 | 0.8 |
| Akamategai | 2.8 | 0.2 | 0.9 |
| Zarugai | 55.6 | 20.4 | 16.4 |
| Adapedonta | | | |
| Ōnogai | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

一方、内臓におけるTMO含量は筋肉とほぼ同じか、またはそれより低い傾向を示した。イタヤガイおよびザルガイにおいても、内臓におけるTMO-N量は筋肉部位のそれより低い値であった。

考 察

軟体動物二枚貝綱のTMO含量に関しては内外の研究があり^{47, 92, 93, 95, 109, 111, 118, 123, 128, 141)}, 11科25種について調べられている。

真多歯目Eutaxodontaについて高木ら¹²⁸⁾の研究ではアカガイにTMOの存在を認めていない。著者はこの目のものとして4種調べたが、高木らの結果と同様、TMOは存在しないか、またはわずかであった。

翼形目Pteriomorphaのイガイ科についてはNORRISら⁹³⁾およびDYER⁹⁵⁾がそれぞれ大西洋、太平洋の*Mytilus edulis*について調べたが、TMOの存在を認めていない。これに対し、高木ら^{118, 123)}は日本産の同じ種のムラサキイガイについてかなり高い値のTMO含量を報告している。著者はムラサキイガイを含め、この科の貝類として3種のTMO含量を調べたが、その値はいずれもわずかで、NORRISらやDYERのそれに近い結果であった。本研究で調べたイタヤガイ科はイタヤガイ1種であるが、既往の研究^{95, 118, 128, 141)}と一致して筋肉、特に閉介筋に多量のTMOが存在した。この科の二枚貝は他の二枚貝と異なり、特に多量のTMOを含むものと考えられる。イタヤガイで閉介筋に足および外とう筋の数倍のTMOが含まれることからして、他の種類でも同様なことはいえると思われるが、既往の研究がないので明らかでない。しかし、内臓におけるTMO量が筋肉のそれより小さいことは、著者およびNORRISら⁹⁵⁾の結果からみて明らかである。イタボガキ科に属する二枚貝はインド産の*Ostrea cullata*¹¹¹⁾を除き、いずれも低いTMO含量を示している。本研究のイワガキおよびマガキにおいても同様な結果が得られた。インド産のカキがなぜ高いTMO含量(TMO-N, 33mg%¹¹¹⁾)を示すのか不明である。

異歯目Heterodontaに属する種類で特に高いTMO含量を示すのはザルガイであった。この科の1種についてNORRISら⁹⁵⁾も調べ、高いTMO含量を示すことを報告している。このことからザルガイ科の貝類はイタヤガイ科の貝類と同様特異的に多量のTMOを含有する二枚貝といえよう。この目に属するその他の貝類について調べた本研究の結果では、既往の研究結果^{93, 95, 109, 118, 123, 128, 141)}とほぼ一致し、一般に低いTMO含量を示した。アサリについて宮原⁴⁷⁾はかなり大きい値(TMO-N, 33mg%)を報告しているが、本研究ならびに他の研究結果^{93, 109, 118, 123, 128)}からみて、この種のTMO含量は一般に低いものと考えられる。

無面目Adapedontaについてはオオノガイ1種を調べたが、大西洋産の同じ種と同様¹⁴¹⁾, TMOの存在が認められなかった。

第3節 軟体動物 腹足類

日本産水産動物の頭足類および二枚貝類のTMO分布については、第1節および第2節で記述した。本節では、同じ軟体動物の腹足類について調べた結果を述べる。

実 験 方 法

検液の調製 検液の調製は第1節と同じ方法で行なった。採取部位は筋肉と内臓である。

TMOの定量 第1節と同じ方法によった。

実 験 結 果

19科42種の腹足類のTMO含量を調べた結果は第5表のとおりである。この結果から、筋肉と内臓のTMO含量にほとんど差異が認められず、一般にTMO-N量として僅少で1mg%以下であった。しかしながら、エビスガイは特異的でTMO-N量が筋肉で30.2mg%、内臓で8.4mg%と検体腹足類中とくに大きい値を示した。

考 察

軟体動物腹足類のTMO含量についての内外の研究は少なく^{95, 101, 117, 118, 128, 141)}, 8科10種調べられているにすぎない。

Table 5. Trimethylamine oxide content in the species of Gastropodan Mollusca.

| Species | Muscle | Viscera | Species | Muscle | Viscera |
|--------------------|--------|---------|-----------------|--------|---------|
| (mg N/100g) | | | (mg N/100g) | | |
| Gastropoda | | | Futahenatarigai | 0.2 | 0.0 |
| Archaeogastropoda | | | Tsumetagai | 0.3 | 0.3 |
| Tokobushi | 0.1 | 0.1 | Biwagai | 5.2 | 3.6 |
| Kuroawabi | 0.1 | 0.3 | Neogastropoda | | |
| Madakaawabi | 0.3 | 0.0 | Onisazae | 0.3 | 0.1 |
| Mekaiawabi | 0.1 | 0.0 | Akanishi | 0.2 | 0.2 |
| Betsukogasagai | 0.1 | 0.4 | Reishigai | 0.2 | 0.2 |
| Yomegakasagai | 0.1 | 0.1 | Ibonishi | 0.5 | 0.0 |
| Matsubagai | 0.1 | 0.5 | Bai | 0.8 | 0.1 |
| Ebisugai | 30.2 | 8.4 | Isonina | 0.2 | 0.8 |
| Kubirekurotsukegai | 0.0 | 0.4 | Mushirogai | 0.2 | 0.6 |
| Ishidatamigai | 0.3 | 0.2 | Tengunishi | 0.5 | 0.7 |
| Kubogai | 0.1 | 0.2 | Konaganishi | 0.7 | 0.4 |
| Koshitakagangara | 0.7 | 0.7 | Tsunomatagai | 1.2 | 0.4 |
| Ookoshitakagangara | 0.1 | 0.2 | Touito | 1.3 | 1.1 |
| Sazae | 0.3 | 0.1 | Cephalaspidea | | |
| Sugai | 0.9 | 0.2 | Kisewatagai | 0.0 | 2.0 |
| Amagai | 0.1 | 0.0 | Anaspidea | | |
| Mesogastropoda | | | Amefurashi | 0.5 | 0.1 |
| Marutanishi | 0.1 | 0.3 | Nudibranchia | | |
| Tamakigai | 0.0 | 0.1 | Madaraumiushi | | 0.0* |
| Oohebigai | 0.1 | 0.2 | Basommatophora | | |
| Uminina | 0.0 | 0.0 | Monoaragai | 0.1 | 0.1 |
| Kawanina | 0.0 | 0.2 | Stylommatophora | | |
| Henatarigai | 0.8 | 0.1 | Usukawamaimai | 0.0 | 0.1 |

* Combined.

原始腹足目Archaeogastropodaミミガイ科ではクロアワビ¹¹⁷⁾, エゾアワビ¹²⁸⁾ およびマダカアワビ¹⁰¹⁾ についての研究がある。このうち、マダカアワビのTMO-N量は特異的に高い。著者はこの科の4種について調べたが、TMOは存在しないか、またはわずかであった。マダカアワビ¹⁰¹⁾の高いTMO含量は、この貝の地域性または食餌性の相違によるためとも考えられる。ツタノハガイ科およびニシキウズガイ科(第5表中のベツコウガサガイからオオコシタカガンガラまでの貝類)では既往の報告がないので比較できない。エビスガイを例外として、本節の結果から一般にこの両科のTMO含量については、ミミガイ科と同様存在しないか、またはわずかであると考えられる。エビスガイの高いTMO含量は、被検個体数が66であることからして、二枚貝類のイタヤガイおよびザルガイと同様、種特異性によるものと考えられる。リュテンサザエ科では、サザエについて清水ら¹⁰¹⁾ および高木ら¹¹⁸⁾ の報告がある。著者はサザエおよびスガイの2種について調べたが、そのTMO-N量はともに1mg%以下であった。サザエについて清水らの報告によるTMO含量(20mg%)と著者の得た含量との間に著しい差が見られる。しかし、著者がこの種のTMO含量の季節的变化を調べた結果からみて¹⁴⁶⁾、サザエのTMO-N量は一般に1mg%以下と断定できる。

中腹足目Mesogastropodaのタニシ科ではマルタニシ¹¹⁸⁾について報告があり、そのTMO含量(1.3mg%)は著者の結果(0~0.4mg%)に比べてやや高い。一方、この目のタマキビガイ科では*Littorina silchana*⁹⁵⁾、またタマガイ科については*Polinices heras*¹⁴¹⁾での報告がある。しかし、両種ともTMOの存在が認められていない。著者がタマキビガイ科のタマキビについて調べた結果によると、筋肉ではTMOの存在が認められなかったが、内臓でわずかに存在が認められた。

新腹足目Neogastropodaのアクキガイ科については*Thais lamellosa*⁹⁵⁾、エゾバイ科についてはヒメエゾボラ¹²⁸⁾での報告がある。両種ともTMOの存在が認められていない。しかし、著者がこの目の5科10種について調べたところ、すべての筋肉にわずかであるが、TMOの存在を認めた。

無楯目Anaspideaのアメフラシ科では*Anisodoris nobilis*⁹⁵⁾についての報告があり、TMOの存在は認められていない。しかし、著者がアメフラシ1種について調べた結果、筋肉および内臓ともにTMOの存在が認められた。

基眼目Basommatophora および柄眼目Stylommatophoraについては既往の報告が見当たらないが、著者は前者に属する淡水産モノアラガイでTMOの存在を認め、後者に属する陸産ウスカワマイマイ筋肉ではTMOが存在しないことを認めた。

第4節 節足動物、棘皮動物および原索動物

日本産水産動物のうち、軟体動物の頭足類、二枚貝類および腹足類におけるTMO分布については第1節、第2節および第3節で述べた。本節で節足動物、棘皮動物および原索動物について調べた結果を報告する。

実験方法

検液の調製 検液の調製は第1節と同じ方法で行なった。採取部位は筋肉および内臓である。

TMOの定量 第1節と同じ方法によった。

実験結果

節足動物23種、棘皮動物10種および原索動物2種のTMO含量を調べた結果は第6表のとおりである。

節足動物では、なかに試料がわずかなため、筋肉あるいは内臓について分析を行なえない種類があったが、カプトガニを除いたすべての筋肉にTMOの存在が認められた。海産動物筋肉のTMO含量は一般に高かった。一方、淡水産動物では、アメリカザリガニが淡水産動物として特異的に高いTMO含量を示した。

棘皮動物では、内臓、一部筋肉についてTMO含量を調べたが、ともにTMOが存在しないかまたはわずかであった。

原索動物では内臓について調べたが、TMO含量はわずかであった。

考察

節足動物のTMO含量について多くの報告があり^{37, 89, 90, 93~95, 104, 114, 116, 129)}、17科31種におよんでいる。一方、棘皮動物についての報告は少なく^{93, 95, 141)}、原索動物においては報告が見当たらない。

節足動物剣尾目Xiphosuraに属し、日本における分類学上ただ1種のカプトガニについての研究は見当たらない。著者はこのものについて調べ、筋肉および内臓ともにTMOの存在を認めなかった。完胸目Thoraciaにおいて著者はカメノテおよびクロフジツボについて調べたが、カメノテ筋肉にかなりの量のTMOが存在することを認めた。これに対し、クロフジツボ内臓のTMO含量はわずかであった。NORRISら⁹⁵⁾はフジツボ類についてかなり高いTMO含量(24~99mg%)を報告している。この相違は採取部位による違いを考慮しなければならない。NORRISらはフジツボ全部位につき分析を行なっている。十脚目Decapoda および口脚目Stomatopodaについては、それぞれ18種と2種調べた。テナガエビ、サワガニ、モクズガニ、イソガニおよびアカテガニを除いた海産十脚類および口脚類の筋肉におけるTMO-N量は10mg%以上平均46mg%であった。

Table 6. Trimethylamine oxide content in the species of arthropods, echinoderms and protochords.

| Species | Muscle | Viscera | Species | Muscle | Viscera |
|--------------------|-------------|---------|---------------|-------------|---------|
| | (mg N/100g) | | | (mg N/100g) | |
| Arthropoda | | | Stomatopoda | | |
| Xiphosura | | | Shako | 52.3 | — |
| Kabutogani | 0.0 | 0.0 | Sesujishako | 62.9 | — |
| Thoracica | | | Echinodermata | | |
| Kamenote | 31.0 | — | Spinulosa | | |
| Kurofujitsubo | — | 4.2 | Itomakihitode | — | 0.0 |
| Decapoda | | | Hitode | — | 0.0 |
| Koudakakudahigeebi | 17.4 | 8.2 | Aulodonta | | |
| Akaebi | 58.0 | 16.3 | Gangaze | — | 0.9 |
| Oniteppōebi | 77.0 | 5.4 | Camarodonta | | |
| Tenagaebi | 8.1 | — | Sanshōuni | — | 0.1 |
| Amerikazarigani | 31.5 | 0.0 | Rappauni | — | 0.0 |
| Honyadokari | — | 12.2 | Akauni | — | 0.0 |
| Koshimagani | 22.6 | 4.8 | Bafununi | — | 0.3 |
| Janomegazami | 66.7 | — | Murasakiuni | — | 0.4 |
| Ishigani | 15.2 | 6.7 | Aspidochirota | | |
| Futahoshiishigani | 44.4 | 7.8 | Fujinamako | 0.1 | 0.1 |
| Akaishigani | 83.0 | 15.8 | Aomanamako | 0.1 | 0.5 |
| Benihoshimanjūgani | 56.9 | 6.4 | Akamanamako | 0.0 | 0.0 |
| Sawagani | 0.4 | 0.0 | Protochordata | | |
| Mokuzugani | 5.3 | 0.1 | Pleurogona | | |
| Iwagani | 39.8 | 3.7 | Shiroboya | — | 1.2 |
| Isogani | 4.4 | 3.4 | Eboya | — | 0.6 |
| Kefusagani | 21.1 | 2.1 | | | |
| Akatagani | 5.1 | 0.9 | | | |

テナガエビおよびモクスガニはともに汽水産である。これら汽水産動物のTMO含量は海産動物のそれより一般的に低い、同じ汽水産であるケフサガニはかなりの量のTMOを含んでいた。一方、イソガニは潮間帯、アカテガニは潮上帯動物である。しかし、これら潮上、潮間帯動物の筋肉TMO含量が重潮間帯ないし漸深帯動物のそれより低いといえない。というのは、同じ潮間帯動物のイシガニ筋肉に15mg%のTMO-Nが含まれていたし、NORRIS⁹⁵⁾も潮上帯ないし潮間帯動物とみなされる *Pagurus* sp. および *Hemigrapsus mudus* でかなりの量のTMOの存在を認めているからである。調べた淡水産十脚類はアメリカザリガニおよびサワガニの2種であった。このうち、サワガニ筋肉のTMO含量は同じ淡水産十脚類スジエビ¹¹⁴⁾のそれ以下で、SHEWAN¹⁴⁰⁾の指摘を裏付けた。SHEWANによると、淡水産甲殻類のTMO含量は零、または存在するとしてもその値は海産の同じ動物の含量以下であるという。一方、アメリカザリガニ筋肉のTMO含量は既報^{90,94)}のそれより高く、被検海産十脚類筋肉の平均含量に近かった。淡水産動物にはほとんどTMOが存在しないとされているから、このアメリカザリガニの多量のTMOは生合成によると考えられる。以上の結果から、節足動物の海産甲殻類は一般にかなりの量のTMOを含有すると推量できる。

棘皮動物のTMO含量を調べた報告の中で、*Asterias vulgaris*¹⁴¹⁾ および *Cucumaria frondosa*¹⁴¹⁾ のTMO含量は高い。しかし、著者が調べたかぎり、この種の動物のTMO含量は僅少であった。原索動物のホヤ類もまた、棘皮動物と同様、TMO含量がわずかであった。

第5節 脊椎動物 魚類

魚類におけるTMO含量については多数の報告がある^{34,36,37,44,47,51,59,61,77,89,92~100,102,105~107,110~113,115,116,119,120,124~130,139~143)}。REAY³⁷⁾ その他の研究^{36,44,106,111,113,140~143)} から、海産軟骨魚類の筋肉TMO含量が海産硬骨魚類のそれより大きいことは明らかである。しかし、海産硬骨魚類における魚種による筋肉TMO含量の相違については一致した見解が得られていない^{107,140,141)}。一方、淡水産魚類筋肉におけるTMO含量は僅少かまたは全く存在しないとの報告が多いが^{36~38,47,91,93~96,141)}、かなりの量のTMOが存在するという報告もある^{89,97,140)}。筋肉以外の組織とくに内臓諸器官のTMO含量についてはCOK¹³⁹⁾ その他の研究^{51,77,95,96)} がある。これらの研究によると、軟骨魚類では筋肉以外の組織にも多量のTMOが含まれる。しかし、硬骨魚類での含量については、研究者により値に大きな相違があり、普遍的な傾向が得られていない。よって、本節では日本産魚類62種について調べ、分類学上における魚種間の含量の相違を吟味した。

実験方法

検液の調製 検液の調製は第1節と同じ方法で行なった。採取部位は筋肉と内臓である。

TMOの定量 第1節と同じ方法によった。

実験結果

魚類12目62種のTMO含量を調べた結果は第7表のとおりである。第7表のうちから、海産魚類（広塩性魚類を含まない）筋肉のTMO含量の数値を用い、目別のTMO含量を一元配置分散分析したところ、分散比が11.79となり1%の危険率で海産魚類筋肉のTMO含量が目によって相違することがわかった。よって、2日間のTMO含量の分散比を求め第8表の結果を得た。この表から、海産魚類筋肉のTMO含量はガンギエイ目 *Rajida* が最も高く、ニシン目 *Clupeida* とフグ目 *Tetraodontida* が最低で、その中間にウナギ目 *Anguillida*、スズキ目 *Percida*、カジカ目 *Cottida* およびカレイ目 *Pleuronectida* が位置することがわかる。

淡水産魚類筋肉のTMO含量は第7表からわかるように、広塩性魚類で淡水でとれた魚種ウナギ、ボラを含め、僅少（6.4mg%以下）または零である。

魚類内臓のTMO含量は同じく第7表から、筋肉のTMO含量に比べてかなり低く、TMO-N量として大部分が10mg%以下であることがわかる。しかし、ガンギエイ目のウチワザメ内臓のそれは56.2mg%とかなり高い値であった。

考 察

魚介類筋肉のTMO含量について既往の研究結果から狭塩性魚類について目別のTMO含量を一元配置分散分析し、分散比80.23を得た。よって、2日間のTMO含量の分散比を求めて第9表の結果を得た。この表から、狭塩性魚類筋肉のTMO含量はサメ目 *Selachii*、ガンギエイ目 *Rajida* が最高で、ついでタラ目 *Gadida* が高く、これについてカジカ目 *Cottida* とカレイ目 *Pleuronectida* があり、ニシン目 *Clupeida*、ダツ目 *Belonida*、スズキ目 *Percida* およびフグ目 *Tetraodontida* が最低であることがわかる。

軟骨魚類筋肉のTMO含量が硬骨魚類のそれより高いことは著者の結果とも一致している。海産硬骨魚類中、タラ目の魚種のTMO含量が最高であることはSHEWAN¹⁴⁰⁾ およびDYER¹⁴¹⁾ の指摘と合致する。タラ目についてTMO含量の大きい目はカジカ目で、これは著者の結果およびDYER¹⁴¹⁾ の指摘と一致するが、SHEWAN¹⁴⁰⁾ の指摘と異なる。SHEWAN¹⁴⁰⁾ はカレイ・ヒラメ類筋肉のTMO含量がタラおよびニシン類のそれより低いと報告している。海産硬骨魚類中、筋肉のTMO含量が最低の魚種はニシン目、ダツ目とフグ目であるが、著者

Table 7. Trimethylamine oxide content in the species of fish.

| Species | Muscle | Viscera | Species | Muscle | Viscera |
|----------------|--------|---------|---------------------|--------|---------|
| (mg N/100g) | | | (mg N/100g) | | |
| Chondrichthyes | | | Ishidai | 71.2 | 0.5 |
| Rajida | | | Himeji | 57.3 | 6.1 |
| Shibireei | 162.0 | 0.7 | Ittenakatachi | 86.4 | — |
| Uchiwazame | 88.5 | 56.2 | Tenjikudai | 78.6 | 5.5 |
| Tobakasube | 147.5 | — | Kinnguchi | 62.8 | 9.3 |
| Osteichthyes | | | Ishimochi | 71.0 | — |
| Clupeida | | | Kisu | 50.0 | 2.5 |
| Konoshiro | 12.8 | 0.7 | Kuromejina | 72.0 | 2.2 |
| Maiwashi | 5.6 | 0.1 | Isuzumi | 33.6 | 3.6 |
| Ayu* | 1.8 | 1.1 | Kurodai | 46.4 | — |
| Myctophida | | | Madai | 65.2 | 12.3 |
| Hoshinoeso | 32.5 | 0.8 | Tobinumeri | 38.8 | 2.9 |
| Okieso | 26.7 | 0.1 | Yomegochi | 28.2 | 1.8 |
| Maeso | 48.9 | 3.3 | Shimaitachiuo | 78.1 | 9.8 |
| Cyprinida | | | Akahaze | 58.4 | 3.4 |
| Oikawa* | 0.4 | 0.0 | Tetraodontida | | |
| Funa* | 0.1 | 0.8 | Umazurahagi | 13.7 | 0.2 |
| Dojō* | 0.7 | 0.0 | Mafugu | 25.5 | 3.4 |
| Namazu* | 0.9 | 0.3 | Kusafugu** | 41.0 | — |
| Gonzui | 0.1 | 0.0 | Sabafugu | 34.3 | 0.7 |
| Anguillida | | | Cottida | | |
| Unagi** | 0.0 | 0.0 | Kasago | 81.5 | — |
| Maanago | 72.6 | — | Haokoze | 43.7 | 4.3 |
| Mongaradōshi | 40.7 | 10.8 | Ainame | 71.8 | 3.9 |
| Susoumihebi | 45.7 | — | Onigochi | 43.5 | 5.2 |
| Dainanumihebi | 44.5 | — | Megochi | 62.0 | 10.0 |
| Amiutsubo | 75.1 | — | Kanagashira | 26.7 | 12.0 |
| Cyprinodontida | | | Pleuronectida | | |
| Medaka* | | 0.6*** | Hirame | 67.0 | — |
| Zeida | | | Tamaganzōbirame | 37.8 | — |
| Matodai | 61.0 | 0.8 | Meitagarei | 22.7 | 0.8 |
| Percida | | | Makogarei | 32.0 | — |
| Bora** | 6.4 | 0.3 | Sasaushinoshita | 53.6 | 7.9 |
| Masaba | 33.0 | 8.0 | Tobisasaushinoshita | 65.6 | 12.3 |
| Tachiuo | 70.0 | 10.0 | Kuroushinoshita | 52.6 | — |
| Kaiwari | 40.5 | 1.0 | Genko | 42.4 | — |
| Hiiragi | 45.0 | — | Lophiida | | |
| Ishigakidai | 29.8 | 4.4 | Kiankō | 46.1 | 2.3 |

* Freshwater fishes, ** Euryhaline fishes, *** Entire animal.

Table 8. Statistical comparison between ordinal average contents or trimethylamine oxide in the muscle of saltwater fishes shown in Table 7.

| | B | | | | | | | |
|-----------------------|--------|----------|------------|------------|---------|---------------|---------|---------------|
| A | Rajida | Clupeida | Myctophida | Anguillida | Percida | Tetraodontida | Cottida | Pleuronectida |
| Rajida (133.7*) | + | + | + | | | + | + | |
| Clupeida (9.2*) | - | | - | - | - | - | - | - |
| Myctophida (36.0*) | - | + | | - | - | | - | - |
| Anguillida (67.9*) | - | + | + | | | + | | |
| Percida (56.4*) | | + | + | | | + | | |
| Tetraodontida (29.7*) | - | + | | - | - | | - | - |
| Cottida (54.9*) | - | + | + | | | + | | |
| Pleuronectida (53.0*) | + | + | | | | + | | |

* Average trimethylamine oxide content (TMO-N mg%).

The sign plus indicates that trimethylamine oxide content of A is significantly higher than that of B.

The sign minus indicates that trimethylamine oxide content of A is significantly lower than that of B.

The blank indicates that trimethylamine oxide content of A is equal to that of B.

Table 9. Statistical comparison between ordinal average contents of trimethylamine oxide in the muscle of saltwater fishes recorded in literature.

| | B | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|--------|----------|----------|---------|---------------|---------|---------------|--------|----------|
| A | Selachii | Rajida | Clupeida | Belonida | Percida | Tetraodontida | Cottida | Pleuronectida | Gadida | Lophiida |
| Selachii (193.2*) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Rajida (99.0*) | - | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Clupeida (31.0*) | - | - | | | | | - | - | - | - |
| Belonida (19.1*) | - | - | | | | | | | | |
| Percida (28.3*) | - | - | | + | | | | | | |
| Tetraodontida (22.6*) | - | - | | | | | - | - | - | - |
| Cottida (54.4*) | - | - | + | + | | + | | | - | |
| Pleuronectida (46.8*) | - | - | + | + | + | + | | | - | |
| Gadida (82.8*) | - | - | + | + | + | + | + | | | |
| Lophiida (47.0*) | - | | | + | | | | | | |

Signs, legend as Table 8.

の結果でもニシン目およびフグ目が最低であり、DYER¹⁴¹⁾もニシン目およびダツ目が最低であると報告している。なお、DYER¹⁴¹⁾は一般的傾向として分類学上低級な目の魚種で筋肉のTMO含量が低いと指摘しているが、これはまた著者の結果とも一致する。

著者の調べた淡水魚の種類は広塩性魚類で、淡水でとれたものを含めわずかに7種である。したがって、これから淡水魚全体の傾向を論ずることができない。一方、魚類内臓のTMO含量については51種について調べているので、筋肉のそれより一般に低いといえよう。

小 括

外国産水産動物のTMO含量については分類学上系統立った研究がかなり行なわれているが、日本産水産動物のそれについては系統立った研究が少ない。このため、日本産水産動物180余種についてTMO含量を調べた。

軟体動物頭足類17種における筋肉のTMO含量は水産動物の中で高く、ほぼ板鰓類のその含量に匹敵した。同じ軟体動物に属する二枚貝類26種および腹足類42種におけるTMO含量は筋肉、内臓とも1mg%内外を示すものが多かった。しかし、二枚貝類のイタヤガイならびにザルガイおよび腹足類のエビスガイの筋肉はかなりのTMO含量を示した。

節足動物23種におけるTMO含量はかなり高く平均46mg%であった。棘皮動物10種および原索動物2種におけるTMO含量は僅少か零であった。

脊椎動物魚類62種における筋肉のTMO含量はガンギエイ目が最も高く、ニシン目とフグ目が最低で、その間にウナギ目、スズキ目、カジカ目およびカレイ目が位置した。

第3章 トリメチルアミノキサイドからホルムアルデヒドとジメチルアミンの生成

魚介類におけるTMO-aseの検索については、タラ類およびそれら近縁の魚類における報告がある⁵¹⁻⁵⁶⁾。この報告によると、これら魚種のすべてに本酵素が存在する。しかし、これら以外の水産動物における本酵素の存在は明らかではない。このため、300種近くの魚介類について、TMO-aseの検索を行なった。

第1節 軟体動物 頭足類

頭足類におけるFAの存在については、古く島崎ら⁷⁾、衣笠ら⁸⁾および服部ら¹⁰⁾の報告がある。島崎らは蒸留法を用いてヤリイカ、ホタルイカ、コウイカおよびスルメイカ筋肉からFAを検出した。しかし、スルメイカの肝臓その他筋肉以外の組織ではFAを検出していない。一方、衣笠らおよび服部らはヤリイカについて蒸留法の相違により検出結果が異なることを報告している。

最近、徳永⁵⁹⁾は蒸留法によらない比色定量法で、冷凍スルメイカにFAとDMAが存在することを明らかにした。イカ類筋肉にDMAが存在することは、カラムクロマトグラフィーによる宮原⁴⁷⁾および日下部⁴⁸⁾の結果からみても明らかである。また、八坂ら⁴⁶⁾もポーラログラフィーによるDMAの定量でイカ類筋肉にこのアミンが存在することを確かめている。

これら既往の研究から、頭足類においてもタラ類と同様、TMO-aseの存在が考えられる。これを確かめるため一連の実験を行なった。

実験方法

分析方法 FA, DMA, KOH-アミン*, TMOおよび蛋白質の定量はそれぞれ, アセチルアセトン法¹⁴⁷⁾, ジチオカルバメート銅錯塩法⁴¹⁾, CONWAYの微量拡散法^{*145)}, BYSTEDTらの方法¹⁴⁴⁾およびFOLIN比色法¹⁴⁸⁾によった。

FAならびにDMA生成能の測定 頭足類組織のFAおよびDMA生成能の測定は山田らの方法⁵⁵⁾によった。すなわち0.1M TMO 0.5ml, 0.001 M メチレン青0.25mlおよび0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH6.1) 3.75mlをツンベルグ管の主室にとり, 検液0.5mlを副室にとって減圧脱気後, 両液を混合した。混合後, ツンベルグ管を26°Cで2時間インキュベート後, 20%トリクロル酢酸5mlを加えて濾過した。濾液についてFA, DMAおよびKOH-アミンの定量を行なった。別に検液につき蛋白質の定量を行なった。検液は組織に2倍量の冷水を加えてブレンダーにかけホモジェネートを作製し, これを二重ガーゼで濾過して調製したものである。検液作製に使用した試料は大部分生活反応を示したものである。

実験結果

貯蔵中におけるFAならびにDMAの生成 貯蔵中におけるイカ筋肉その他の組織でのFAとDMAの生成を調べた。すなわち, バカイカ *Stenoteuthis bartrami* の外とう筋または中腸腺300gに等量の冷水を加えてブレンダーにかけホモジェネートを作製した。このホモジェネートを0~1°Cに貯蔵し, 一定日数ごとに40gあてとり出し, これに20%トリクロル酢酸10mlを加えて濾過した。この濾液につきFAとDMAを定量すると同時に, TMOおよびKOH-アミン量もあわせ求めた。

第1図は外とう筋, 第2図は中腸腺ホモジェネートについて得られた結果である。これらの図から, いず

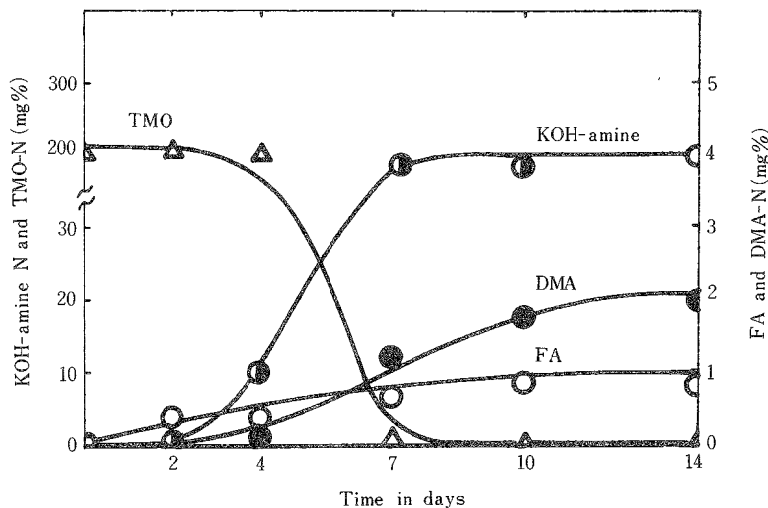


Fig. 1. Changes in amount of FA, DMA, KOH-amine and TMO in the mantle homogenate of a squid, *Stenoteuthis bartrami* at refrigerating temperatures (0 - 1°C). The symptom of spoilage in odor was noticed after seven days' storage.

* CONWAY微量拡散法による TMA の定量で, アルカリ試薬としてKOHを使用する際, ホウ酸吸収剤に捕捉される揮発性アミンをCASTELLの報告⁵⁷⁾にならってKOH-アミンという。魚介類組織に含まれる揮発性アミンは大部分がTMAである。この場合には KOH-アミンは TMAそのものと見なして差し支えない。しかし, DMAが存在すると, KOH-アミンをTMAと見なすことができなくなる。なぜなら, DMAもTMAと同様ホウ酸吸収剤に捕捉されるからである。

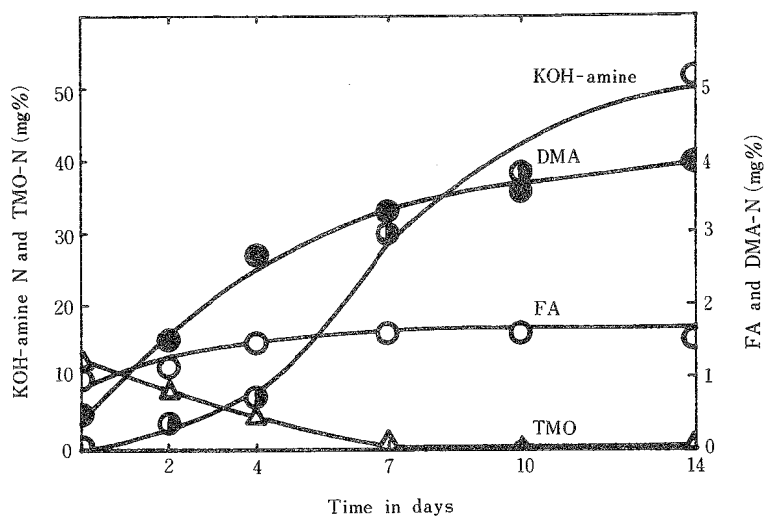


Fig. 2. Changes in amount of FA, DMA, KOH-amine and TMO in the mid-gut gland homogenate of a squid, *Stenoteuthis bartrami* at refrigerating temperatures (0 - 1°C). The symptom of spoilage in order was noticed after seven days' storage.

れも日数の増加とともにFA, DMAおよびKOH-アミンが増大し、一方、TMOが減少することがわかる。しかし、FAとDMAの増加では外とう筋より中腸腺の方が大きく、KOH-アミンの増加では逆に外とう筋の方が大きい。同様の実験をコウイカおよびミズイカについて行ない、バカイカの場合と同様の結果を得た。

防腐剤処理ホモジェネートのFAならびにDMAの生成 細菌汚染によるTMOの分解をみるため、防腐剤を加えた場合のイカ中腸腺ホモジェネートのFAとDMAの生成と、あわせてKOH-アミンとTMOの変化を調べ

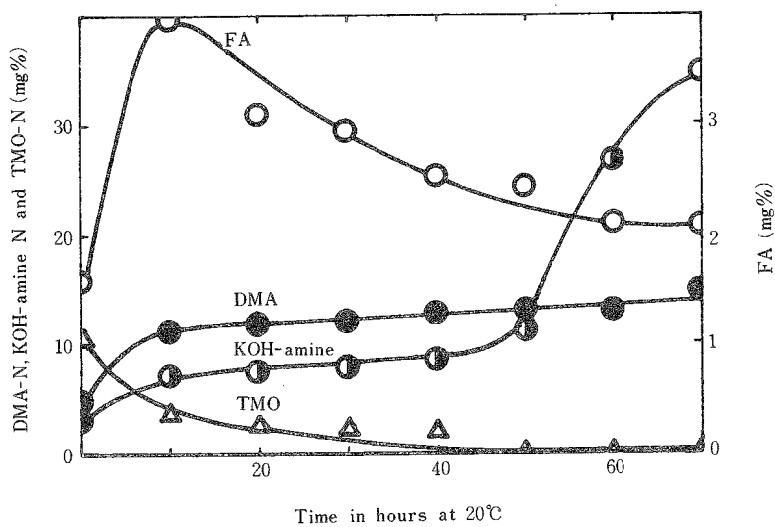


Fig. 3. Changes in amount of FA, DMA, KOH-amine and TMO in the mid-gut gland homogenate of a squid, *Todarodes pacificus*.

た。被検ホモジェネートはつぎの3種である⁵³⁾。使用した試料はスルメイカであった。

ホモジェネートA：中腸腺100gに水300mlを加えて作製した。

ホモジェネートB：ホモジェネートAにトルエン10mlおよびクロロホルム5mlを加えて作製した。

ホモジェネートC：中腸腺100gに水250mlと0.15M TMO 50mlを加えて作製したホモジェネートにトルエン10mlとクロロホルム5mlを添加した。

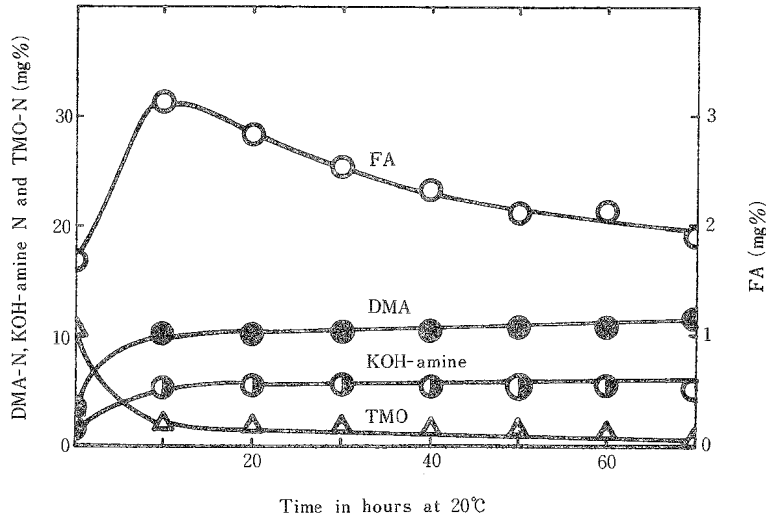


Fig. 4. Changes in amount of FA, DMA, KOH-amine and TMO in the mid-gut gland homogenate of a squid, *Todarodes pacificus* added with anti-septics.

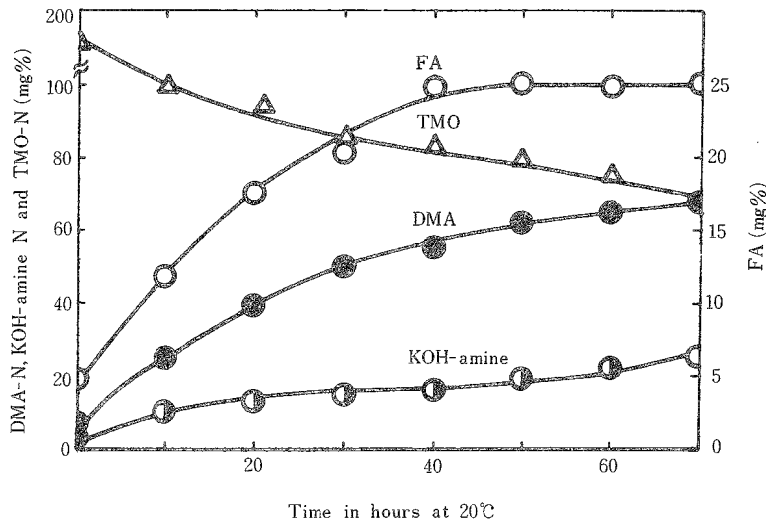


Fig. 5. Changes in amount of FA, DMA, KOH-amine and TMO in the mid-gut gland homogenate of a squid, *Todarodes pacificus* added with anti-septics and TMO.

ホモジェネートA～Cを20℃にインキュベートし、10時間ごとに20g あてとり出し、これに20%トリクロル酢酸20mlを加え、濾過した。濾液についてFA, DMA, KOH-アミンとTMOを定量した。実験結果は第3～5図のとおりである。

ホモジェネートA (第3図)ではKOH-アミンが時間の経過とともに増大する。しかし、急増は実験開始から10時間までの間と50時間以後とに認められる。一方、DMAは10時間までの間で急増して以後ほぼ一定の値を示し、FAは急増後漸減する。TMOは10時間までに急減し、以後ゆるやかに減少する。ホモジェネートB (第4図)では、KOH-アミンが10時間以後ほとんど増大しない点を除いては、ホモジェネートAの結果とほぼ同様である。ホモジェネートC (第5図)ではホモジェネートBに比べFA, DMAおよびKOH-アミンの増加が大きい。

塩析によるFAとDMA生成能の変化 塩析によるイカ中腸腺ホモジェネートのFAとDMA生成能の変化を山田ら⁵⁵⁾と同じ方法を用いて調べた。すなわち、コウイカの中腸腺に2倍量の冷水を加えてホモジェネートを作製した。このホモジェネートを16,000×gで30分間冷却器中で遠心して不溶成分を沈降させ、得られた上澄液10mlあたり硫酸アンモニウムを1～7g加え、2時間氷冷攪拌しつつ塩析を行なった。塩析後、12,000×gで冷却器中で遠心し、その上澄液をとって検液とし、FAとDMAの生成能と蛋白質濃度を調べた。結果は第6図のとおりである。この図から、上澄液のFAとDMAの生成能が上澄液の蛋白質濃度の減少とほぼ比例して低下することがわかる。

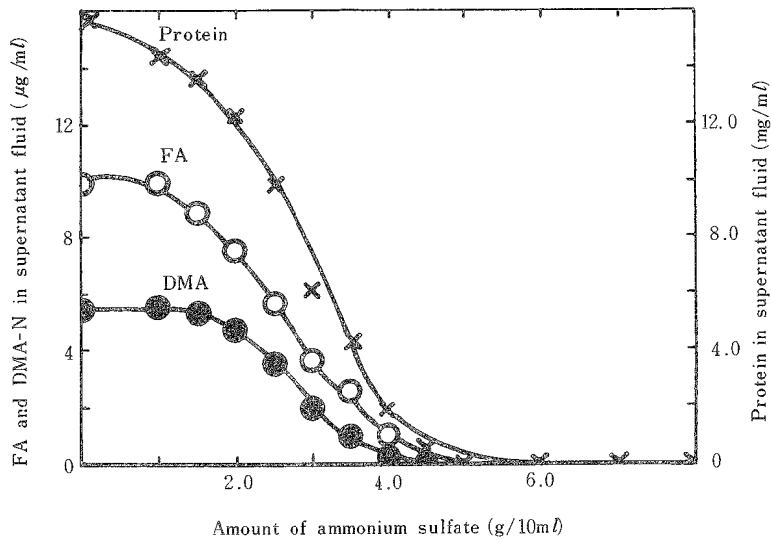


Fig. 6. Salting-out of the enzyme participating in the formation of FA and DMA from TMO in the mid-gut gland homogenate of a cuttlefish, *Sepia esculenta*.

頭足類中腸腺のFAとDMA生成能 前記の実験で、FAとDMA生成能を全く欠く個体をしばしば認めた。したがって、頭足類がTMO-aseの研究素材として適当であるかを確かめるため、頭足類中腸腺でFAとDMA生成能の恒常性を調べた。使用した試料は17種40個体であった。

被検試料の中腸腺に2倍量の冷水を加えて得たホモジェネートを検液とし、この液についてFAとDMAの生成能を測定した。結果は第10表のとおりである。第10表から、コウイカ、スルメイカおよびソデイカではFAとDMA生成能が認められるが、酵素研究の素材として適するほどの生成量が認められたのはコウイカとソデイカ中のわずか2個体であることがわかる。

Table 10. Individual differences of the formation of FA and DMA from TMO in the species of Decapodan Mollusca*.

| Species | Formation | | Species | Formation | |
|-----------------|-----------|-------|----------------|-----------|-------|
| | FA | DMA-N | | FA | DMA-N |
| | (μg/ml) | | | (μg/ml) | |
| Order Sepioidea | | | Surumeika | 4.3 | 0.0 |
| Kaminariika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Kōika | 46.6 | 17.3 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Kōika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Kōika | 0.7 | 1.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Kōika | 9.2 | 7.2 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Kōika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Hyōmonkōika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Himekōika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Shishiika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Shiriyakeika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 20.3 | 5.5 |
| Dangoika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Aoriika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Order Teuthodea | | | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Yariika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Mehikariika | 0.0 | 0.0 | Surumeika | 0.0 | 0.0 |
| Budōika | 0.0 | 0.0 | Sodeika | 70.4 | 32.6 |
| Budōika | 0.0 | 0.0 | Sodeika | 7.4 | 6.1 |
| Budōika | 0.0 | 0.0 | Order Octopoda | | |
| Budōika | 0.0 | 0.0 | Madako | 0.0 | 0.0 |
| Jindōika | 0.0 | 0.0 | Tenagakado | 0.0 | 0.0 |
| | | | Iidako | 0.0 | 0.0 |

* Mid-gut gland examined.

考 察

タラ類の筋肉において、貯蔵中KOH-アミンの生成に先行してFAとDMAが生成することがわかっている⁵²⁾。本研究のバカイカの場合、FAとDMAの生成量が少ないためか、外とう筋ではこの関係がみられない。しかし、中腸腺では、タラ類の場合と同様、FAとDMAの生成がKOH-アミンのそれに先行する。外とう筋および中腸腺におけるKOH-アミンの増大は窒素含量としてTMO量をうわまわっている。これについては、KOH-アミンの定量法として採用したConway微量拡散法がTMA以外に他の揮発性アミンをも捕捉することを考慮しなければならない。すなわち、TMAの前駆物質がTMO以外にもあるかどうか、本研究の結果だけでは明らかでない。

防腐剤処理ホモジェネートにおけるFAとDMAの生成を調べた実験で、防腐剤処理をしないホモジェネートAの場合、KOH-アミンが実験開始から10時間の間と50時間以後で急増する。この急増がTMOから、または他の前駆物質からのTMAの生成に由来するかどうか、前と同様の理由で明らかでない。

タラ類幽門垂を用いた実験によると、防腐剤を加えてもFAとDMAの生成が認められ、また、さらにTMOを加えるとその生成量が著しく増大する⁵³⁾。スルメイカ中腸腺での本研究でも同様の結果が得られた。このことは、イカ類におけるFAとDMAの生成がタラ類と同様組織中の酵素作用によることを示している。しか

し、塩析によるFAとDMA生成能の変化を調べた結果によると、イカ中腸腺ではTMO-aseがタラ類幽門垂の場合⁵⁵⁾よりも幅広い硫酸アンモニウム濃度で塩析された。

タラ類において、いままで調べた結果では、ほぼ恒常的にFAとDMA生成能が認められるが、イカ類の場合全く生成能が認められない個体が多い。このことは、イカ類がTMO-aseの研究素材として適当でないことを示すものである。イカ類でFAとDMA生成能が恒常的でない理由は不明である。

第2節 軟体動物 二枚貝類

第1節で頭足類におけるFAとDMAの生成について述べた。すなわち、イカ類においては、タラ類と同様、TMO-aseが存在することを明らかにした。しかし、この酵素の存在は恒常的でなく、TMO-aseを調べる素材としてイカ類は不適当である。

同じ軟体動物である二枚貝類におけるFAとDMAの存在については、いくつかの報告がある。衣笠ら⁶⁾は水蒸気蒸留法を用いて生鮮しじみ貝からFAを検出しているが、ほっき貝缶詰中からはFAを検出していない。また、山田ら⁵⁶⁾はマガキ、藤巻ら³⁰⁾は平貝および青柳にFAがそれぞれ存在しないことを報告している。

一方、DMAの存在については宮木ら⁴²⁾、宮原⁴⁷⁾および林⁴⁹⁾の報告がある。宮木らはイオン交換樹脂を用い、また林らはガスクロマトグラフィーで腐敗ハマグリのアミン類を調べ、ともにDMAが存在しないことを確かめている。また宮原はアンバライトCG-50を用いてアミン類の分離を行ない、生鮮アサリにはDMAが存在しないが、腐敗アサリにDMAが存在すると報告している。

しかしながら、上記の諸研究ではTMO-aseの存在に触れていない。よって、二枚貝類29種についてFAとDMA生成能を調べ、カリガネエガイ、ヌノメアカガイ、ムラサキインコガイおよびムラサキイガイに生成酵素が存在することを推定した。

実験方法

分析方法 分析方法は第1節と同じ方法で行なった。

FAならびにDMA生成能の測定 第1節と同じ方法によった。

実験結果および考察

二枚貝類29種35検体について調べた結果は第11表のとおりである。被検29種の二枚貝類のうち、FAとDMA生成能がみられたのはカリガネエガイ、ヌノメアカガイ、ムラサキインコガイとムラサキイガイの4種である。

カリガネエガイ内臓のFAとDMA生成能はタラ類幽門垂のそれ⁵⁵⁾よりいくぶん小さく、イカ類中腸腺のそれより大きい。この生成能は酵素作用によるものであるが¹⁴⁹⁾、内臓器官の組織酵素によるのか、また消化管中に存在する微生物酵素によるのか明らかでない。この酵素はすべての被検体から検出された。このことは、カリガネエガイ内臓がTMO-aseを調べる素材として十分利用できることを示している。しかし、1検体は通常50個体の内臓から成り立つので、カリガネエガイすべての個体が、この酵素を含むとは断言できない。なお、カリガネエガイにおけるFAならびにDMAの生成はタラ類⁵⁵⁾およびイカ類におけると同様、メチレン青によって促進される。このことは、魚介類のFAおよびDMA生成にある種の酸化還元反応が関与しているのであろうことを示している。

第3節 軟体動物 腹足類

著者は本章第1節のイカ類でTMO-aseが存在することを明らかにした。これらの魚介類はいずれもかなりの量のTMOを含有する水産動物である(第2章第1節参照)。一方、二枚貝類のカリガネエガイ、ヌノメアカガイ、ムラサキインコガイおよびムラサキイガイはほとんどTMOを含まない(第2章第2節参照)。それにもかかわらず、これらの貝類にもTMO-aseの存在が認められる(本章第2節参照)。ところで、腹足類の大部分

Table 11. Formation of FA, DMA and KOH-amine from TMO by the visceral homogenate of Bivalvian Mollusca.

| Species | In the presence of Methylene blue | | | In the absence of Methylene blue | | |
|---------------------|--------------------------------------|-------|-------------|-------------------------------------|-------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | ($\mu\text{g/ml}$) | | | ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| Order Eutaxodonta | | | | | | |
| Kariganeegai | 60 | 42 | 7 | 26 | 14 | 3 |
| Kariganeegai | 133 | 36 | 11 | 35 | 10 | 4 |
| Kariganeegai | 87 | 27 | 11 | 33 | 9 | 4 |
| Kariganeegai | 93 | 25 | 13 | 30 | 8 | 4 |
| Kariganeegai | 82 | 26 | 8 | 29 | 8 | 3 |
| Kariganeegai | 84 | 23 | 10 | 30 | 8 | 4 |
| Kariganeegai | 119 | 34 | 11 | 4 | 0 | 0 |
| Kariganeegai | 54 | 20 | 7 | 3 | 1 | 1 |
| Kariganeegai | 93 | 35 | 12 | 9 | 2 | 1 |
| Akagai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kumasarubō | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sarubō | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nunomeakagai | 5 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Tamakigai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Pteriomorphia | | | | | | |
| Murasakiinkogai | 39 | 14 | 5 | 17 | 5 | 2 |
| Murasakiinkogai | 37 | 8 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| Murasakiinkogai | 36 | 10 | 4 | 2 | 1 | 0 |
| Murasakiinkogai | 33 | 5 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| Murasakiinkogai | 12 | 5 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| Murasakiinkogai | 21 | 7 | 2 | 7 | 3 | 1 |
| Murasakiinkogai | 22 | 8 | 2 | 12 | 3 | 1 |
| Murasakiigai | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Igai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Azumanishikigai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kinchakugai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akoyagai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Itayagai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Iwagaki | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Magaki | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Heterodonta | | | | | | |
| Yamatoshijimi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Yamatoshijimi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Awajishijimi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hamaguri | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Shinahamaguri | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Asari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Asari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Oniasari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kuchibagai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bakagai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Shiofukigai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mirukui | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mategai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akamategai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Zarugai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Adapedonta | | | | | | |
| Onogai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

の種類もまた二枚貝と同様TMOをほとんど含有しない(第2章第3節参照)。よって、この腹足類について、TMOからFAとDMA生成能を調べるとともに、貯蔵中におけるこれら動物の組織のFAとDMAの形成を調べ、生成能と形成との関係を検討した。

実験方法

分析方法 分析方法は第1節と同じ方法で行なった。

FAならびにDMA生成能の測定 第1節と同じ方法によった。ただし、反応条件はカリガネエガイで得た条件¹⁴⁹⁾によった。すなわち、0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液のpH、インキュベート温度および時間はそれぞれ、5.0、45℃および90分である。

FAならびにDMAの検出 腹足類内臓ホモジェネートを低温貯蔵した際のFAとDMA形成は薄層クロマトグラフィーによって調べた(第1章参照)。すなわち、腹足類内臓に等量の冷水を加えて得たホモジェネートを2℃付近で貯蔵した。一定日数ごとにその一部20gをとり出し、これに20%トリクロル酢酸5m^lを加え、得られた濾液中のFAとDMAを検出した。

実験結果および考察

腹足類10目48種について、内臓ホモジェネートを用いてTMOからFAとDMA生成能、および同ホモジェネートを低温貯蔵した際の前記二物質の形成を調べた結果は第12表のとおりである。

第12表の結果からわかるように、FAとDMA生成能が認められる種類はエビスガイ、カワニナおよびバイの3種だけである。一方、薄層クロマトグラフィーによる結果では、すべての試料からFAが検出されたが、DMAはエビスガイ、カワニナおよびバイにかぎり検出された。

薄層クロマトグラフィーのFAならびにDMAの最小検出量は、第1章で述べたようにそれぞれスポットあたり0.3および4μgである。したがって、TMOからFAとDMAが等モル濃度程度で生成されるとすれば、FAが検出されてもDMAが検出されない場合があり得る。しかしながら、FAとDMA生成能のない試料ではDMAが全く検出されず、またFAがすべての試料で貯蔵当初から検出されることから推論すると、腹足類においてはTMO-aseが存在しない場合でも、他の内因性のFAが存在し、これが哺乳動物の場合¹⁵⁰⁾と同様、酸化されてフォルミル基となりメチル基への還元その他の生合成に利用されるのであろう。この機構は腹足類ばかりでなく、他の水産動物の場合にも広く存在すると思われる。なぜなら、腹足類以外に魚類その他の水産動物筋肉でもFAが検出されるからである(第1章第1節参照)。

FAとDMA生成能を有するエビスガイとバイでは、DMAがそれぞれ貯蔵2日目および4日目で検出される。一方、カワニナでは貯蔵4日目で検出される。このうち、エビスガイにおけるDMAの出現は、TMOの分解に起因すると思われる。なぜなら、エビスガイのTMO含量は大きく、この性質の種特異性と考えられるからである(第2章第3節参照)。これに対し、バイとカワニナのTMO含量は僅少である。したがって、これらの貝におけるDMAの出現は、TMOの前駆物質、またはTMOからFAとDMAが生じる過程の中間代謝物あるいはその前駆物質が母体になるためと推定される。

今まで調べたかぎり、淡水産動物にはFAとDMA生成能が認められていないが、カワニナに弱いながらFAとDMAの生成が認められたことは注目に値する。

第4節 節足動物、棘皮動物および原索動物

軟体動物頭足類、二枚貝類および腹足類におけるFAとDMAの生成については前節で記述した。その結果によると、軟体動物では少数の種類にTMO-aseが存在する。

軟体動物を除いた無脊椎動物のFAとDMAの存在については節足動物についての文献^{1, 15, 30, 56)}があるにすぎない。これらのうち、一応FAとDMA両物質が存在すると認められるのはガザミのみである⁵⁶⁾。したがって、ガザミにおいてはTMO-aseの存在が推定されるが、他の無脊椎動物における酵素の存在は不明である。

Table 12. Relation between formation of FA and DMA in vitro and their occurrence during storage of visceral organs of gastropod.

| Species | Formation | | Occurrence during storage(days) | | | | | |
|-------------------------|----------------------|-------|---------------------------------|---|---|-----|---|---|
| | FA | DMA-N | FA | | | DMA | | |
| | ($\mu\text{g/ml}$) | | 0 | 2 | 4 | 0 | 2 | 4 |
| Order Ischnochitonida | | | | | | | | |
| Hizaragai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Order Archaeogastropoda | | | | | | | | |
| Tokobushi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Kuroawabi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Madakawabi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Mekaiawabi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Betsukogasagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Yomegakasagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Matsubagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Ebisugai | 7 | 2 | + | + | + | - | + | + |
| Kubirekurotsukegai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Ishidatamigai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Kubogai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Koshitakagangara | 0 | 0 | + | - | - | - | - | - |
| Ookoshitakagangara | 1 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Sazae | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Sugai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Amagai | 1 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Order Mesogastropoda | | | | | | | | |
| Marutanishi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Tamakigai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Oohebigai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Uminina | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Kawanina | 8 | 6 | + | + | + | - | - | + |
| Henatarigai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Futahenatarigai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Shidorogai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Tsumetagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Himetsumetagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Biwagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Order Neogastropoda | | | | | | | | |
| Onisazae | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Akanishi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Reishigai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Ibonishi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Bai | 29 | 9 | + | + | + | - | + | + |
| Isonina | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Mushirogai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |
| Araregai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - |

Table 12. - (Cont'd).

| Species | Formation | | Occurrence during storage(days) | | | | | | | |
|-----------------------|-----------|-------|---------------------------------|---|---|-----|---|---|--|--|
| | FA | DMA-N | FM | | | DMA | | | | |
| | | | 0 | 2 | 4 | 0 | 2 | 4 | | |
| | (μg/ml) | | | | | | | | | |
| Tengunishi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Konaganishi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Tsunomatagai | 1 | 0.5 | + | ± | ± | - | - | - | | |
| Touito | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Order Cephalaspidea | | | | | | | | | | |
| Kisewatagai | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Order Anaspidea | | | | | | | | | | |
| Amefurashi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Order Notaspidea | | | | | | | | | | |
| Umifukuro | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Order Nudibranchia | | | | | | | | | | |
| Hikariumiushi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Nishikiumiushi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Madaraumiushi | 0 | 0 | + | + | + | - | - | - | | |
| Order Basommatophora | | | | | | | | | | |
| Monoaragai | 0 | 0 | + | - | - | - | - | - | | |
| Order Stylommatophora | | | | | | | | | | |
| Usukawamaimai | 0 | 0 | ± | ± | + | - | - | - | | |

このため、節足動物、棘皮動物、原索動物およびその他の無脊椎動物につきFAとDMAの生成を調べ、これら動物におけるTMO-aseの存在を確かめた。なお、あわせてTMOからKOH-アミンを生成する酵素系存在の可能性についても検討した。

実験方法

分析方法 分析方法は第1節と同じ方法で行なった。

FAならびにDMA生成能の測定 第1節と同じ方法によった。ただし、インキュベート時間は1時間である。

実験結果および考察

節足動物47種、棘皮動物20種、原索動物6種およびその他の無脊椎動物8種について調べた結果を第13表に示す。

第13表からわかるように、FAとDMA生成能が認められた水産動物は腔腸動物Coelenterataに属するベニウミトサカ内臓である。ベニウミトサカ内臓におけるFAとDMA生成能はタラ類幽門垂のそれ⁵⁵⁾とほぼ等しかった。この動物におけるFAとDMA生成能は内臓について調べたものであるから、TMOからこれら両物質の生成が組織中の酵素によるか、また内臓消化管中に存在する微生物の酵素によるか現在のところ不明である。

別に第13表からわかることは、アカエビおよびモグラナマコ内臓にKOH-アミンの生成が明らかに認められることである。これら動物ではDMAの生成が認められないから、生成KOH-アミンはTMAとみなして差し支えない。したがって、これらの動物にはTMOからTMAを生成する酵素系の存在が考えられる。

Table 13. Formation of FA, DMA and KOH-amine from TMO by the mediation of organs of arthropods, echinoderms and protochords.

| Species | Viscera | | | Muscle | | |
|---------------------|----------------------|-------|-------------|----------------------|-------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | ($\mu\text{g/ml}$) | | | ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| COELENTERATA | | | | | | |
| Order Alcyonacea | | | | | | |
| Beniumitosaka | 146 | 64 | 16 | — | — | — |
| Birōdotogetosaka | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| ANNELIDA | | | | | | |
| Order Errantia | | | | | | |
| Isogokai | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| Sugokaiisome | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| Iwamushi | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| Order Sedentaria | | | | | | |
| Chinchirofusagokai | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| TENTACULATA | | | | | | |
| Order Tolotremata | | | | | | |
| Tatesujihōzukigai | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Cheilostomata | | | | | | |
| Fusakokemushi | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| ARTHROPODA | | | | | | |
| Order Xiphosura | | | | | | |
| Kabutogani | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Thoracica | | | | | | |
| Kamenote | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Kurofujitsubo | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Sopoda | | | | | | |
| Funamushi | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| Order Decapoda | | | | | | |
| Koudakakudahigeebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Yoshiebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Saruebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akaebi | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| Minaminumaebi | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Oniteppōebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tenagaebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amerikazarigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Honyadokari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Togetsunoyadokari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Yokosujiyadokari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akahoshiyadokari | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hiraashikamuri | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hirakoukaikamuri | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 13. - (Cont'd).

| Species | Viscera | | | Muscle | | |
|-----------------------|---------|--------------------------------------|-------------|--------|--------------------------------------|-------------|
| | FA | DMA-N ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | KOH-amine N | FA | DMA-N ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | KOH-amine N |
| Kimengani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Jūichitogekobushigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tenagakobushi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Meganekarappa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tsunogai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Koshimagani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hishigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dorogani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Higegani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Taiwangazami | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ibogazami | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Janomegazami | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ishigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akaishigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Futahoshiishigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Futahabenitsukegani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Benihoshimanjūgani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Urokoōgigani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Enkōgani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Menagaenkōgani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sawagani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Iwagani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mokuzugani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isogani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kefusaisogani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akategani | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Stomatopoda | | | | | | |
| Shako | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sesujishako | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ECHINODERMATA | | | | | | |
| Order Comatulida | | | | | | |
| Nipponumishida | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Order Phrynophiurida | | | | | | |
| Okinotezurumozuru | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Phanerozonida | | | | | | |
| Momijigai | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Togemomijigai | 1 | 0 | 0 | — | — | — |
| Yatsudesunahitode | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Hoshihitode | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Akahitode | 0 | 0 | 0 | — | — | — |

Table 13. - (Cont'd).

| Species | Viscera | | | Muscle | | |
|---------------------|---------|-------|-------------|---------|-------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | (μg/ml) | | | (μg/ml) | | |
| Order Spinulosa | | | | | | |
| Itomakihitode | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Phorcipulata | | | | | | |
| Hitode | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Aulodonta | | | | | | |
| Gangaze | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Camarodonta | | | | | | |
| Sunshōuni | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Harisanshōuni | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Rappauni | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Akauni | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Bafununi | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Murasakiuni | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Order Clypeastroida | | | | | | |
| Takonomakura | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Order Aspidochirota | | | | | | |
| Manamako | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Dendrochirota | | | | | | |
| Okinagumimodoki | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Moguranamako | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| PROTOCHORDATA | | | | | | |
| Order Pleurogona | | | | | | |
| Itaboya | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Shiroboya | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Eboya | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Karasuboya | 0 | 0 | 0 | — | — | — |
| Mihaeruboya | 0 | 0 | 1 | — | — | — |
| Beniboya | 0 | 0 | 0 | — | — | — |

* Entire animal.

第5節 脊椎動物 魚類

脊椎動物におけるFAとDMAの存在については多数の報告^{3, 6, 12, 13, 17, 19, 23, 32, 34~41, 43, 44, 46, 47, 51~53, 56, 58, 59}があり、多種類の生鮮組織からFAとDMAが検出または定量されている^{3, 12, 23, 30, 32, 34~36, 38~41, 46, 47, 51~53, 56, 58, 59}。しかし、組織を用いてTMOからFAとDMAの生成能を調べた研究は少なく、わずかタラ類でこれら両物質の生成が認められているにすぎない^{53, 59}。

よって、各種の魚類について筋肉、肝臓または内臓のTMOからFAとDMAの生成能を調べ、これら動物におけるTMO-ase存否のスクリーニングを行なった。また、あわせてTMOからKOH-アミンを生成する酵素系存在の可能性についても検討した。

Table 14. Formation of FA, DMA and KOH-amine from TMO by the mediation of organs of fishes.

| Species | Liver | | | Muscle** | | |
|------------------|----------------------|-------|-------------|----------------------|-------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | ($\mu\text{g/ml}$) | | | ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| Order Selachii | | | | | | |
| Shirozame | 0* | 0* | 2* | 0 | 0 | 1 |
| Order Rajida | | | | | | |
| Shibireei | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Sakatazame | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Uchiwazame | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dobukasube | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hirataei | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tobiei | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Clupeida | | | | | | |
| Konoshiro | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Maiwashi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Katakuchiiwashi | 0* | 0* | 0* | — | — | — |
| Yamabe | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Nijimasu | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ayu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Myctophida | | | | | | |
| Hoshinoeso | 44* | 20* | 14* | 14 | 7 | 2 |
| Okieso | 128 | 64 | 12 | 4 | 3 | 1 |
| Maeso | 120 | 66 | 14 | 6 | 3 | 1 |
| Wanieso | 110 | 60 | 16 | 3 | 2 | 1 |
| Order Cyprinida | | | | | | |
| Zenitanago | 0* | 1* | 1* | 0 | 1 | 1 |
| Kamatsuka | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Oikawa | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kawamutsu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Koi | 0 | 4 | 2 | 0 | 4 | 3 |
| Funa | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Dojō | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Namazu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gonzui | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Gigi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Order Anguillida | | | | | | |
| Unagi | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Maanago | 0* | 0* | 2* | — | — | — |
| Mongaradōshi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Susoumihebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dainanumihebi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amiutsubo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 14. - (Cont'd).

| Species | Liver | | | Muscle** | | |
|----------------------|----------------------|-------|-------------|----------------------|-------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | ($\mu\text{g/ml}$) | | | ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| Order Cyprinodontida | | | | | | |
| Medaka | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Order Belonida | | | | | | |
| Datsu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Berycida | | | | | | |
| Matsukasauo | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Gusokudai | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Order Zeida | | | | | | |
| Matodai | 92* | 62* | 14* | 1 | 1 | 1 |
| Order Percida | | | | | | |
| Bora | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Masaba | 1* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Tachiuo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Maaji | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kaiwari | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Okihiragi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Hiiragi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ishigakidai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ishidai | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Himeji | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Akatachi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Ittenakatachi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kinnguchi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tenjikudai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Teppoishimochi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Nenbutsudai | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Mutsu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Ara | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mahata | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Ishimochi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kisu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kuromejina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mejina | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Isuzumi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Isaki | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Madai | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kurodai | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kurakakegisu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Toragisu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Wanigisu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Mishimaokoze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |

Table 14. -(Cont'd).

| Species | Liver | | | Muscle** | | |
|---------------------|----------------------|-------|-------------|----------------------|-------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | ($\mu\text{g/ml}$) | | | ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| Nezuppo | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Yomegochi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Nezumigochi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tobinumeri | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Shimaitachiuo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Yoroiitachiuo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Itohikihaze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Chagara | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Akahaze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Sasanohabera | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kyūsen | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Honbera | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Nishikibera | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Order Tetraodontida | | | | | | |
| Umazurahagi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hakofugu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sabafugu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kusafugu | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Mafugu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Komonfugu | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Higanfugu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Cottida | | | | | | |
| Usumebaru | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kasago | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hachi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Himeokoze | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Oniokoze | 0* | 0* | 1* | 1 | 0 | 0 |
| Darumaokoze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Haokoze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kujime | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Ainame | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Onigochi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Megochi | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Asahianahaze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Hōbō | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kanagashira | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Pleuronectida | | | | | | |
| Hirame | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Tamaganzōbirame | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Meitagarei | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |

Table 14. - (Cont'd).

| Species | Liver | | | Muscle** | | |
|---------------------|-------|----------------------|-------------|----------|----------------------|-------------|
| | FA | DMA-N | KOH-amine N | FA | DMA-N | KOH-amine N |
| | | ($\mu\text{g/ml}$) | | | ($\mu\text{g/ml}$) | |
| Makogarei | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Sasaushinoshita | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Tobisasaushinoshita | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Kuroushinoshita | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Genko | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Order Lophiida | | | | | | |
| Kiankō | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ankō | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |
| Hanaokoze | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 |

* All visceral organs with the alimentary contents; ** Ordinary muscle.

実験方法

分析方法 分析方法は第1節と同じ方法で行なった。

FAならびにDMA生成能の測定 第4節と同じ方法によった。

実験結果および考察

魚類114種について筋肉および肝臓または内臓のFAとDMAおよびKOH-アミンの生成能を調べた結果は第14表に示すとおりである。

第14表からわかるとおり、明らかにFAとDMAの生成が認められた魚種はホシノエソ、オキエソ、マエソ、ワニエソとマトダイの5種である。

エソ類におけるFAとDMA生成能は筋肉より肝臓または内臓で大きい。この事実はタラ類におけるこれら組織のFAとDMA含量を調べた結果^{23, 51, 56)}と一致する。いままでの研究によると、タラ科およびこれに近縁の魚種すべてが両物質の生成能を持つと推定される^{57, 58)}。しかし、エソ類においては、エソ科4種しか調べていないので、タラ類と同じことがエソ類についてもいえるか否か今のところ断定できない。また、マトダイ類についても同じことがいえる。

エソ類およびマトダイを除き、調べた魚種すべてにKOH-アミンの生成が認められなかった。エソ類およびマトダイのKOH-アミンの本体はTMAでなくDMAと考えられる。したがって調べたかぎりこれら魚類には、TMOからTMAを生成する酵素系は存在しないと推測される。

小 括

水産動物289種について筋肉および肝臓または内臓を用いた際のTMOからFAとDMAの生成を調べ、TMO-aseの検索を行なった。その結果、TMO-aseは特定の魚介類に存在することが明らかとなった。すなわち、軟体動物頭足類においては、スルメイカ、コウイカおよびソデイカの3種にFAのDMAの生成能を認めた。また、これらイカ類のTMO-aseは恒常的に存在しないことを明らかにした。頭足類と同様軟体動物に属する二枚貝類および腹足類においては、それぞれカリガネエガイ、ヌノメアカガイ、ムラサキインコガイとムラサキイガイの4種およびエビスガイ、カワニナとバイの3種にFAとDMAの生成能を認めた。

腔腸動物においては、ベニウミトサカ1種にTMO-aseの存在を認めた。

節足動物、棘皮動物、原索動物およびその他の無脊椎動物については、調べたかぎりFAとDMA生成能を認めえなかった。

一方、脊椎動物魚類については、ホシノエソ、オキエソ、マエソとワニエソのエソ類およびマトダイの5種にTMO-aseの存在を認めた。

第4章 ホルムアルデヒドと ジメチルアミンを生成する酵素の精製と性質

前章において魚介類数種にTMO-aseが存在することを記述した。しかし、本酵素が特定の魚介類に存在する生化学的な理由は明らかでない。この生化学上の問題を解明するために本酵素の化学的性質、触媒機構などを明らかにする必要がある。このためには、酵素の純度を高めて、上記の性質、機構などを調べることが重要である。

本章では、TMO-aseの精製方法の検討ならびに得られた酵素標品における補助因子および酵素本体について調べた結果を記述する。

第1節 酵素の精製

魚介類におけるTMO-aseの精製に関する研究は見当たらない。このため、種々の精製方法を検討し、本酵素の精製を試みた。その結果、純粋な酵素標品を得ることができなかったが、3標品すなわち酵素標品I、IIおよびIIIを作製することに成功した。

本節では、これら標品、特に標品IIIを中心とした精製方法についての操作の手順と結果を記述する。

実験方法

粗酵素 ワニエソ *Saurida tumbil* 肝臓に2倍量の水を加えて、ホモジェナイズした。このホモジェネートを二重ガーゼで濾過した。得られた濾液を粗酵素として用いた。

分析方法 FA, DMAおよび蛋白質の定量はそれぞれ、アセチルアセトン法¹⁴⁷⁾、ジチオカルバメート銅錯塩法⁴¹⁾およびFOLIN比色法¹⁴⁸⁾によった。

酵素活性の測定 山田ら⁵⁵⁾の方法に準拠した。すなわち0.2M TMO 0.5ml, 0.001Mメチレン青0.25ml, 0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 3.75mlをツンベルグ管の主室に入れ、検液0.5mlを副室に入れる。この両液を混合し、嫌気条件下で30℃に10分間インキュベートしたのち、直ちに20%トリクロル酢酸5mlを入れ濾過する。濾液についてFAとDMAを定量した。別に検液について蛋白質含量を求めた。比活性は蛋白質単位量 (mg) あたりの生成FA量 (μg) で示した。

実験結果

酵素標品Iの作製 粗酵素を冷却下で遠心分離 (12,000×g, 20分間) し、上澄液を得た。以降、特に明記しないかぎり精製において操作を2℃以下で行ない、遠心分離はすべて同一条件下で行なった。得られた上澄液を30%酢酸でpH4.0に調整し、0℃に2日間保った。この酢酸処理した上澄液を冷却下で遠心分離し得た上澄液10mlあたり、酸処理したカオリン1gを入れ、30分間攪拌し、不純蛋白質をカオリンに吸着させて、再び遠心分離し、得られた上澄液を酵素標品Iとした。この標品Iの比活性は粗酵素の約30倍であり、活性の取率は40%であった。しかし、この酵素標品は外観上、かなりの懸濁物質を含んでいた。これら精製の過程を第15表に示す。

酵素標品IIの作製 粗酵素を遠心分離し、上澄液にハイフロスーパーセルを加えて、濾過した。濾液に粉末の酢酸カルシウムを加え、終濃度を0.1Mとし、1時間静置したのち遠心分離した。得られた上澄液を-80℃に24時間凍結したのち溶解し、再び遠心分離した。この上澄液をpH6.5に調節し、さらに1時間静置後、遠心分離した。得られた上澄液について酵素標品Iの作製に用いたカオリン処理を行ない、再遠心分離した。

Table 15. Steps in purification process of enzyme preparation I from the liver of lizardfish *Saurida tumbil*.

| Step | Volume (ml) | FA formation (μ g) | Protein content (mg) | Specific activity (FA μ g/mg) | Yield (%) |
|--|----------------|-------------------------------|----------------------------|---|--------------|
| After homogenization (crude enzyme) | 980 | 180000 | 11600 | 16 | 100 |
| Supernatant from centrifugation | 750 | 119000 | 5950 | 20 | 66 |
| After adjustment to pH 4.0 | 650 | 82500 | 250 | 330 | 46 |
| After treatment with kaolin | 620 | 72600 | 154 | 471 | 40 |

得られた上澄液を酵素標品IIとした。この標品の比活性は約20倍、活性の収率は60%であった。懸濁物質は酵素標品Iと比べてかなり少なかった。これら精製の過程を第16表に示す。

Table 16. Steps in purification process of enzyme preparation II from the liver of lizardfish *Saurida tumbil*.

| Step | Volume (ml) | FA formation (μ g) | Protein content (mg) | Specific activity (FA μ g/mg) | Yield (%) |
|---|----------------|-------------------------------|----------------------------|---|--------------|
| After homogenization (crude enzyme) | 480 | 118000 | 9600 | 12 | 100 |
| Supernatant from centrifugation | 400 | 112000 | 8000 | 14 | 95 |
| After treatment with calcium acetate | 350 | 90000 | 4500 | 20 | 80 |
| After freezing(-80°C) | 320 | 85000 | 2000 | 40 | 75 |
| After adjustment to pH 6.5 | 300 | 80000 | 800 | 100 | 68 |
| After treatment with kaolin | 250 | 70000 | 300 | 233 | 59 |

酵素標品IIIの作製 粗酵素を遠心分離し、得られた上澄液に粉末の酢酸カルシウムを加え、終濃度を0.1Mとして水酸化ナトリウムでpH6.9に調節し、0°Cに静置した。一定日数ごとに一部をとり出し、遠心分離したのち上澄液について懸濁の有無および活性の測定を行なった。この結果を第17表に示す。第17表から明らか

Table 17. Effect of the time of incubation on activity and removal of turbidity in the enzyme preparation added with calcium acetate.

| Days of incubation | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Activity (FA μ g/ml) | 175 | 165 | 168 | 165 | 160 | 150 |
| Protein (mg) | 18 | 16 | 14 | 12 | 10 | 8 |
| Turbidity | ++++ | +++ | +++ | ++ | + | -- |

のように、6日間の静置で懸濁物質は除去され、活性の低下はほとんど認められない。よって、酵素標品Ⅲの作製では酢酸カルシウム処理を6日間行なったのち遠心分離することとした。

つぎに、得られた上澄液について非酵素蛋白質を加熱凝固させ酵素の純度を高める方法について検討を行なった。すなわち、上澄液を30℃から10℃ごと高め90℃までの温度に5分間加熱した。加熱した上澄液を急冷したのち遠心分離し、得られた上澄液の活性と蛋白質量を求めた。その結果は第7図に示すとおりである。第7図から60℃の加熱で活性が低下せず、比活性が増大することが明らかである。よって、酵素標品Ⅲの作製においては酢酸カルシウム処理液を60℃に5分間加熱して急冷後、遠心分離することとした。

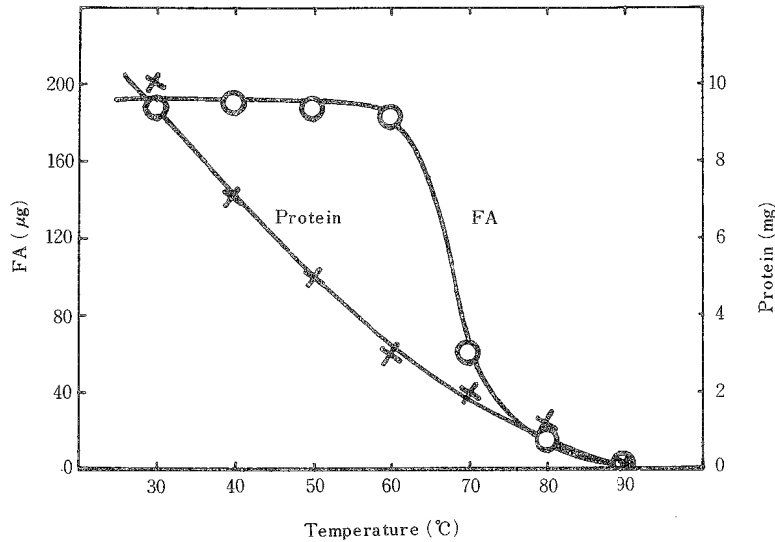


Fig. 7. Relation between FA formation and protein content of the supernatant from enzyme preparation treated with calcium acetate.

Table 18. Steps in purification process of enzyme preparation III from the liver of lizardfish *Saurida tumbil*.

| Step | Volume (ml) | FA formation (µg) | Protein content (mg) | Specific activity (FA µg/mg) | Yield (%) |
|---|----------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|--------------|
| After homogenization (crude enzyme) | 2000 | 310000 | 42000 | 7 | 100 |
| After treatment with calcium acetate | 1400 | 250000 | 25000 | 10 | 81 |
| After heating (60°C, 5 min.) | 1300 | 210000 | 4200 | 50 | 67 |
| After adjustment to pH 10 and pH 4 | 130 | 105000 | 30 | 3500 | 34 |
| After treatment with charcoal | 125 | 62000 | 15 | 4100 | 20 |
| After adjustment to pH 10 and pH 4 | 12 | 24500 | 5 | 4900 | 8 |

つぎに、得られた上澄液を濃アンモニア水でpH10.0に調節し、0℃に10分間インキュベートし、遠心分離した。この操作によって得た沈殿物を前述の上澄液1/10容量の水に懸濁溶解し、30%酢酸でpH5.0に調節し、再び遠心分離した(酸・アルカリ処理)。この上澄液10mlにつき色素を除去するため活性炭0.2gを加え、0℃で12時間攪拌したのち遠心分離を行なった。得られた上澄液はほぼ無色透明の液となった。この上澄液につ

いて上述の酸・アルカリ処理をさらに一度繰返し、活性炭処理で得た上澄液の1/10容量の水に懸濁溶解したのち遠心分離した。得られた上澄液を酵素標品Ⅲとした。この標品は透明な褐色の溶液で、比活性は約700倍となった。しかし、活性の収率は極めて低く約8%であった。精製の過程を第18表に示す。

この酵素標品、すなわち標品Ⅲにつきディスク電気泳動を試み¹⁵¹⁾、酵素純度の検定を行なった。泳動図は第8図のとおりである。さらに、第8図に示すように点線から上下にゲルを二分し、それぞれの蛋白質をpH5.0の0.1Mクエン酸—0.2Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液で抽出した。この抽出液につき酵素活性を調べた。第8図から明らかのように、酵素標品Ⅲは均一の蛋白質ではないが、ゲル上半部に TMO-ase が存在することがわかった。

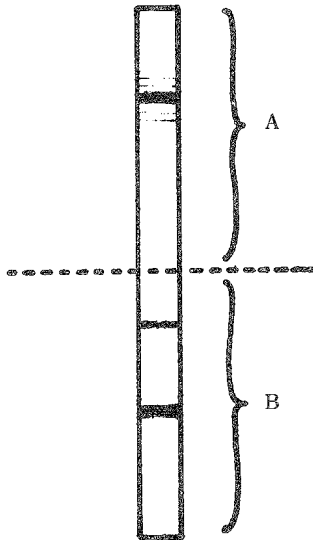


Fig. 8. Electrophoretic diagram of enzyme preparation III. FA formation of part A and B are 12 and 0 respectively.

考 察

酵素標品Ⅰの作製で見られるように、pH4.0で酸処理した酵素液にはかなり懸濁物質を含んでいた。この物質は40,000rpm、10分間の遠心分離でも完全に除去できなかったため、かなり微細な粒子と考えられる。懸濁物質の除去は自然濾過でかなり有効であるとされている¹⁵²⁾が、著者が行なった実験結果では有効でなかった。一方、水酸化アルミニウムと懸濁物質を共沈させる方法は有効であることを確認した。しかし、活性の低下が激しく本酵素の精製に用いることは不適當であることがわかった。

萩原¹⁵³⁾はタカジアスターゼを酢酸カルシウムで処理し、酵素液の清澄化に成功している。よって、酵素標品Ⅱの作製において、酢酸カルシウムを用いて懸濁物質の除去を行なったが、完全にこの物質を除去できなかった。しかし、比活性は約2倍で、活性の収率は80%となり、この処理が本酵素の精製に有効であることがわかった。

酵素標品Ⅲの作製において、酢酸カルシウム処理についてさらに検討した。その結果、0℃に6日間静置を行なうことにより、懸濁物質の除去ができることがわかった。この除去はカルシウムと蛋白質の結合物および一部の水酸化カルシウムに懸濁物質が包含されて共沈することによるものと考えられる。

第2節 補助因子の分離と分画

著者は、スケトウ魚の粗酵素を塩析すると沈殿区分が酵素活性を示さず、この区分に加熱処理した上澄区分を加えると活性が回復することを報告した¹⁵⁴⁾。しかし、カリガネエガイ内臓の粗酵素を同様に塩析しても沈殿区分は活性を失わない¹⁴⁹⁾。さらに、別の実験でバイ肝臓においてもカリガネエガイと同様の事実を確認した。この相違は試料により酵素蛋白質と補助因子との分離に難易があるためと考えられる。これに関連する問題として、細菌におけるホスホトランスアセチラーゼのCoenzyme Aは活性炭処理あるいはイオン交換クロマトグラフィーで分離されるが、アルカリ性下の塩析では分離されない例が知られている¹⁵⁵⁾。

よって、前節で作製したワニエソ肝臓の酵素標本を用い、ゲル濾過を試みたところ、補助因子の分離に成功した。さらに分離した補助因子をイオン交換クロマトグラフィーで分画を行なった結果、この因子が単一

の成分でないことが明らかとなった。その結果について記述する。

実験方法

酵素活性の測定 検液0.5mlまたは1.0mlをツンベルグ管の副室にとり、0.2 M TMO 0.5mlおよび0.001 M メチレン青0.25mlを主室に入れ、pH5.0の0.1 Mクエン酸-0.2 Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液で全量を5.0mlとした。以降の操作は前節の酵素活性の測定によった。用いた酵素は前節の酵素標品IIである。

ゲル濾過法 セファデックス (G-50 Fine) を充填したカラム (2.5×45cm) に酵素標品20ml を添加し、下降法により室温 (22°C) でゲル濾過を行ない、酵素蛋白質と補助因子とに分離した。溶出は水で行ない、5 mlあて分取した。

イオン交換クロマトグラフィー 陽イオン交換樹脂 (Dowex 50-X4, H型) を充填したカラム (0.9×30cm) にpH3.0の0.1 Mクエン酸-0.2 Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液を加えて平衡化したのち、この樹脂に分離した補助因子を吸着させ、下降法により室温で因子の分画を行なった。溶出は順次、pH5.0とpH7.0の0.1 Mクエン酸-0.2 Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液およびpH9.2の0.1 M炭酸ナトリウム-0.1 Mホウ砂緩衝液で行ない、5 mlあて分取した。

実験結果および考察

ゲル濾過による補助因子の分離 第9図に示すように、酵素標品のゲル濾過によって蛋白質はテーリングし

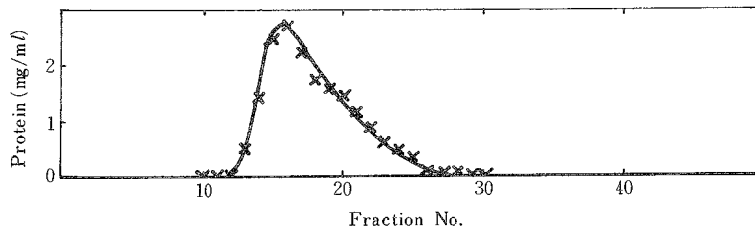


Fig. 9. Gel-filtration of enzyme preparation II. Twenty ml of enzyme preparation II was applied on the column fitted with Sephadex G-50 Fine, and then eluted with water at a flow rate of 2ml/min.

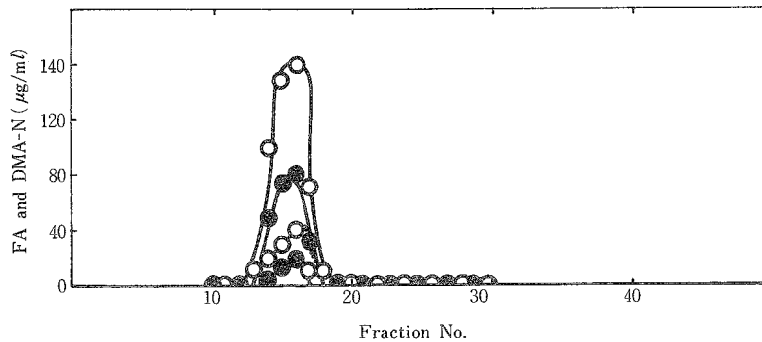


Fig. 10. Elution pattern of enzyme preparation II with respect to the ability forming FA and DMA from TMO.
 ○—○ and ●—●, Formation of FA and DMA from TMO respectively by the mediation of mixture containing effluent and cofactor.
 ○---○ and ●---●, Formation of FA and DMA from TMO respectively by the mediation of effluent. Cofactor was obtained by heating crude enzyme preparation at 100°C for 10 min.

ながらフラクシオンNo.10~30に溶出した。これらの溶出蛋白質のどの画分が酵素活性を示すかを明らかにするため、各画分の溶出液0.5ml(対照)および同量の溶出液に100℃,10分間加熱処理した酵素標品0.5mlを加えた混液それぞれを検液として、酵素活性を調べた。その結果を第10図に示す。第10図から明らかなように、

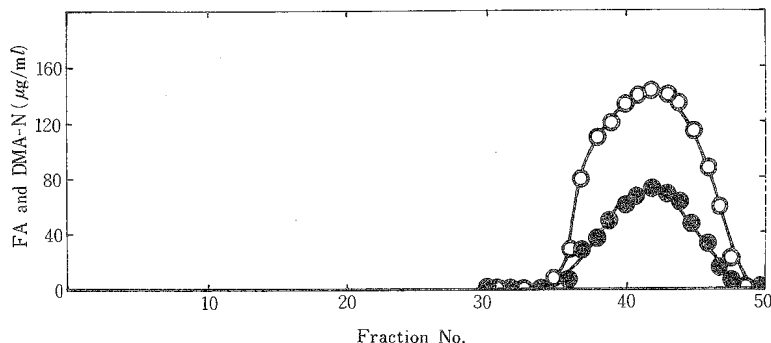


Fig. 11. Elution pattern of cofactor contained in enzyme preparation II.
○—○ and ●—●, Formation of FA and DMA from TMO respectively by the mediation of mixture containing effluent and enzyme fraction. Enzyme fraction was obtained by the elution of enzyme preparation II (cf. Fig. 10.).

酵素活性はフラクシオンNo.13から17の溶出液に認められ、TMO-aseは耐熱性補助因子を必要とすることがわかった。つぎに、この補助因子がどの溶出液に存在するのかを明らかにするため、フラクシオンNo.30以降の各画分に酵素蛋白質画分(フラクシオンNo.14から16)を1:1の容量比で加えて得られた混液1.0mlを検液として、混液の酵素活性を調べた。第11図にその結果を示す。第11図から、補助因子は酵素蛋白質の溶出範囲と比べて幅広い範囲にわたって溶出することが明らかである。

この補助因子(フラクシオンNo.39から45)は透析可能であり、pH4およびpH10の緩衝液中の加熱(沸騰水中、10分間)でも安定であることを確かめた。この性質はタラ類における補助因子のそれと一致する¹⁵⁴⁾。

魚介類における補助因子の分布 分画した酵素蛋白質(フラクシオンNo.14から16)に、魚介類の肝臓ある

Table Distribution of cofactor in liver or mid-gut gland of 9 species of marine animals.

| Species | Formation | |
|-------------------------|-----------|-------|
| | FA | DMA-N |
| | (µg/ml) | |
| Mollusca | | |
| Budōika | 149 | 90 |
| Kōika | 102 | 69 |
| Gastropoda and Bivalvia | | |
| Sazae | 80 | 48 |
| Asari | 68 | 38 |
| Teleostomi | | |
| Ainame | 111 | 60 |
| Umazurahagi | 135 | 77 |
| Maaji | 81 | 48 |
| Sabafugu | 115 | 65 |
| Hamachi | 157 | 93 |

いは中腸腺ホモジェネートを1:1の容量比で加えた混液1mlを検液として用いて、酵素活性を調べた。なお、用いた魚介類ホモジェネート自体は酵素活性を示さなかった。結果を第19表に示す。第19表から、調べたすべての魚介類組織に補助因子が存在することが明らかである。

イオン交換クロマトグラフィーによる補助因子の分画 第11図にみられたように、補助因子はかなり幅広い範囲にわたって溶出した。このことはこの因子が単一な物質でないことを示唆する。そこで、ゲル濾過で得た補助因子(フラクションNo.39から45)についてイオン交換クロマトグラフィーを行なった。得られた溶出液にゲル濾過で分離した酵素蛋白質画分(フラクションNo.14から16)を1:1の容量比で加えた混液1.0mlを検液とし、この検液について酵素活性を求め、補助因子の溶出を調べた。その結果を第12図に示す。この第12図から補助因子は大きく二つの成分に分画されることがわかる。すなわち、酸性ならびに塩基性緩衝液で溶出する成分である。

酸性の溶出液は極大吸収265nmを示したが、塩基性の溶出液は極大吸収を示さなかった。前者は核酸関連物質と考えられる。このことについては、第5章第1節で記述する。

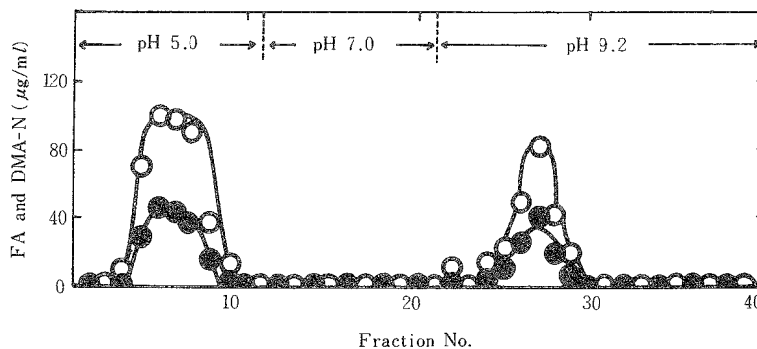


Fig. 12. Further chromatographic separation of cofactor.

Ten ml of cofactor was applied on the column fitted with Dowex 50-X4, and then eluted with buffer solutions of citrate-phosphate at pH 5.0 and pH 7.0, and sodium carbonate-borax at pH 9.2, in that order, at a flow rate of 0.3ml/min.

○—○ and ●—●, Formation of FA and DMA from TMO respectively by the mediation of mixture containing effluent and enzyme fraction. Enzyme fraction was obtained by the elution of enzyme preparation II (cf. Fig. 10.).

第3節 酵素蛋白質の分画

TMO-aseが複合酵素系であるかどうか明らかでない。前節で補助因子の分画の結果、この因子は少なくとも2種類以上の成分であることを明らかにした。このことから、FAとDMA生成がメチレン青で促進され、かつ耐熱性補助因子が必要であり、この因子が単一物質でないことからして、TMO-aseによる酵素反応は複合酵素系による可能性が考えられる。この可能性を確かめるため、酵素蛋白質の分画を試みたところ、2種類の蛋白質に分けることに成功した。分画の手順と結果について記述する。

実験方法

酵素活性の測定 本章第1節に述べた方法によった。しかし、反応混液はつぎのとおりである。すなわち、検液0.5、1.0または1.5mlをツンベルグ管の副室にとり、0.2M TMO 0.5mlおよび0.001M メチレン青0.25mlを主室に入れ、pH5.0の0.1M クエン酸-0.2Mリン酸水素二ナトリウム緩衝液で全量を5.0mlとした。

アルカリ処理による酵素蛋白質の分離 本章第1節で得た酵素標品IIにpH10の0.5M炭酸ナトリウム-0.5M

ホウ砂緩衝液を5:2の容量比で加えた混液を0℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、この混液を冷却下で遠心分離し、上澄と沈殿区分に分けた。上澄区分はそのまま、沈殿区分は上澄区分と同量のpH10の0.05M炭酸ナトリウム-0.05Mホウ砂緩衝液に懸濁溶解させて、酵素活性の測定およびゲル濾過の試料とした。

ゲル濾過による酵素蛋白質の分画 本章第2節で述べた方法に準じた。すなわち、セファデックス(G-50Fine)を充填したカラム(2.5×45cm)に分離した上澄区分および沈殿区分のそれぞれ20mlを添加し、下降法により室温(15℃)でゲル濾過を行ない蛋白質を分画した。溶出には水を用い、5ml/て分取した。

実験結果および考察

上澄区分および沈殿区分の酵素活性 酵素標品をアルカリ処理した得た上澄および沈殿区分についてそれぞれの蛋白質含量ならびに酵素活性を調べた。酵素標品、上澄区分および沈殿区分についてはそれぞれ0.5ml、上澄区分に沈殿区分を加えた混液(1:1)および一方の区分に加熱処理(100℃,10分間)した他方の区分を加えた混液(1:1)についてはそれぞれ1.0mlを用いて酵素活性の測定を行なった。これらの結果は第20表

Table 20. Enzymic activity of the supernatant, and precipitate obtained by fractionation of enzyme preparation II with alkaline treatment.

| | Protein content (mg/ml) | Formation | |
|----------------------------------|----------------------------|-----------|-------|
| | | FA | DMA-N |
| | | (μg/ml) | |
| Enzyme preparation II | 4.0 | 105 | 61 |
| Supernatant | 3.0 | 21 | 16 |
| Precipitate | 0.3 | 0 | 0 |
| Supernatant + Precipitate | — | 110 | 73 |
| Supernatant + Precipitate heated | — | 19 | 16 |
| Supernatant heated + Precipitate | — | 0 | 0 |

に示すとおりである。上澄および沈殿区分のいずれも蛋白質を含んでいることは明らかである。酵素活性は、上澄区分では元の酵素標品と比べてかなり小さく、一方沈殿区分では活性が全く認められない。しかしながら、これら両区分を合わせると、酵素活性は元の酵素標品のそれとほぼ同程度に回復することがわかる。一方の区分に加熱した他方の区分を加えたときにも酵素活性は単一区分のときとほとんど同じで、全く回復しない。TMO-aseに関する補助因子は耐熱性であるから、上述のように加熱区分を加えた場合の酵素活性が回復しない理由は上澄および沈殿の両区分に含まれる酵素蛋白質の熱変性であると考えられる。

酵素蛋白質の分画ならびに酵素活性 分離した上澄および沈殿区分についてそれぞれゲル濾過を行なった溶出液の蛋白質含量を第13図に示す。第13図にみられるように、沈殿区分の蛋白質は上澄区分の蛋白質に比べやや早く溶出する。

つぎに、上澄区分と沈殿区分の蛋白質がTMO-aseに関与する酵素蛋白質であるかどうか調べるため、これら蛋白質に補助因子を加えた時の酵素活性を調べた。検液として蛋白質I(上澄区分フラクションNo.16から18までの3フラクション)と蛋白質II(沈殿区分フラクションNo.14から16までの3フラクション)とを用い、補助因子としては本章第2節で得たフラクションNo.39から45までの7フラクションの溶出液を用いた。酵素活性は、蛋白質I、蛋白質IIおよび補助因子それぞれ0.5ml、蛋白質Iまたは蛋白質IIに補助因子を加えた混液(1:1)1.0ml、蛋白質I、IIと補助因子の混液(1:1:1)1.5mlについて調べた。これらの結果を第

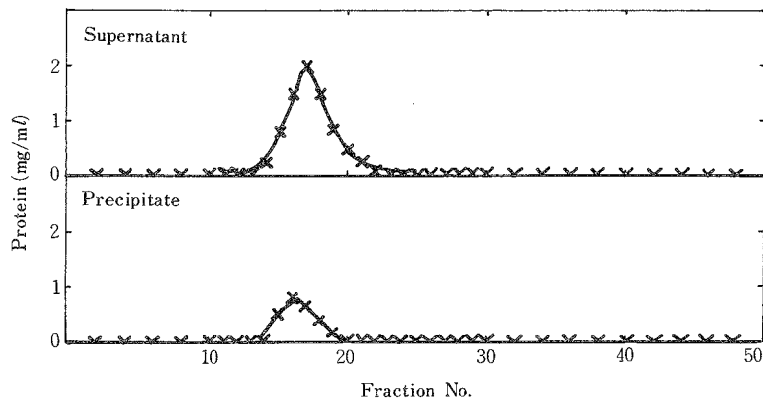


Fig. 13. Gel-filtration of the supernatant and precipitate obtained by fractionation of enzyme preparation II with alkaline treatment.

Table 21. Enzymic activity of the proteinous effluent obtained from the supernatant and precipitate by gel-filtration (cf. Fig. 13).

| | Protein content (mg/ml) | Formation | |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------|-------|
| | | FA | DMA-N |
| Protein I | 1.6 | 7 | 3 |
| Protein II | 0.2 | 4 | 2 |
| Cofactor | 0 | 0 | 0 |
| Protein I + Cofactor | — | 7 | 3 |
| Protein II + Cofactor | — | 4 | 2 |
| Protein I + Protein II | — | 25 | 14 |
| Protein I + Protein II + Cofactor | — | 62 | 35 |

21表に示す。蛋白質Ⅰおよび蛋白質Ⅱ単独または両者の混合でも酵素活性は弱いことがわかった。一方、蛋白質Ⅰあるいは蛋白質Ⅱに補助因子を添加した場合でも、前述と同様に、酵素活性は回復しなかった。しかしながら、三者すなわち、両蛋白質に補助因子が介在する場合においてのみ、酵素活性が回復した。以上の実験事実から、TMO-aseの酵素蛋白質は少なくとも2種類存在すると推定できる。

小 括

TMO-aseの精製を行ない、得られた酵素標品について補助因子および酵素蛋白質の分離、分画を行ない、両物質の性質を調べた。

ワニエソ肝臓を用いて精製を行ない、三種の酵素標品を作製した。精製では懸濁物の除去を中心として検討した。酵素標品ⅠとⅡは懸濁物質が完全に除去できなかった。しかし、酵素標品Ⅲは完全に透明で、比活性が約700倍の値を示し、かなり純度の高い酵素標品の作製に成功した。

酵素標品Ⅱについて補助因子ならびに酵素蛋白質の分離、分画を行なった。ゲル濾過によって補助因子を分離した。この因子は低分子物質で耐熱性であった。さらに、この補助因子についてイオン交換クロマトグラフィーを行ない、単一の成分でないことを明らかにした。

一方、酵素標品Ⅱをアルカリ処理して、上澄と沈殿区分に分けた。これら両区分はいずれも蛋白質を含み、耐熱性が認められなかった。さらに、両区分の蛋白質をゲル濾過で分画し、得られた両蛋白質がともにTMO-aseに関与する成分であることを明らかにした。

第5章 ホルムアルデヒドとジメチルアミンの生成機構

酵素触媒のもとでTMOからFAとDMAが生成する反応の機構についてはほとんど明らかにされていない^{55, 131)}。一方、非酵素触媒における反応機構はある程度研究されており、いくつかの報告^{20, 132~137)}がある。しかしながら、これらの報告でも単なる触媒化学的な研究が大部分であって、酵素触媒との関連において行なわれた研究はきわめて少ない。

したがって、ここでは酵素触媒あるいは非酵素触媒のもとでTMOからFAおよびDMAの生成を調べ、その結果をもとにしてシミュレーションを行なって、酵素触媒のもとづく反応機構の検討を行なった。

第1節 酵素触媒反応における速度論的解析

山田ら⁵⁵⁾は酵素触媒反応に微量のメチレン青が必要であり、この色素の存在下でFAとDMAがほぼ当量あて生成することを報告している。最近、CASTELLら¹³¹⁾もFAとDMAの生成が等モルであることを確認している。しかしながら、これらの研究は粗酵素を用い、特定の反応条件下におけるFAとDMA生成の量的関係を調べ、基質であるTMOとの関係には触れていない。

これに対し、著者は酵素活性に酵素本体ならびに補助因子が必要であり、かつこれらが単一の物質でないことを明らかにした(第4章参照)。しかし、これら物質が反応において果たす役割は明らかでない。

よって、まず速度論的にTMOとFAならびにDMAとの量的関係を調べ、あわせて色素、既知の補酵素および活性化剤ならびに酵素本体の酸化型および還元型が酵素活性の発現にどのように関与するか調べた。これらの結果をもとに、反応機構を仮定し、シミュレーションを行なった。

実験方法

分析方法 第3章第1節の方法によった。

酵素活性の測定 主として第4章第1節の方法によった。用いた酵素は第4章第1節で得た酵素標品ⅡあるいはⅢである。

実験結果

基質の減少量と生成物の生成量との関係 反応条件すなわち、酵素(標品Ⅱ)量、基質量、pH、温度ならびに時間を変えた場合のTMOの減少量ならびにFAとDMAの生成量を調べた。その結果を一括して第14図に示す。第14図から、反応条件を変えてもTMOの減少量ならびにFAとDMAの生成量は等モル関係であることがわかった。一方、第14図のうち基質量および温度を変えた場合の結果から、みかけのMICHAELIS定数(K_m)および活性化エネルギーを計算したところ、その値は0.2Mおよび20kcalとなった。

第14図のうち、基質量を変えた場合に、最適基質濃度が認められることから、基質あるいは生成物による酵素活性の阻害が考えられる。このことを確かめるため、基質量ならびに酵素量を変えた場合および反応当初に生成物(FAあるいはDMA)を添加した場合のFAとDMA生成量の時間的変化を調べた。これらの結果をそれぞれ第15図と第16図に示す。第16図の結果は添加したFAあるいはDMAを差し引いた値である。第15図と第16図から基質ならびにFAが酵素活性を阻害することがわかる。この場合、基質による阻害がFAによるそれより大きい。しかしながら、DMAの阻害は認められなかった。

酵素活性におよぼす酸化型および還元型色素の影響 メチレン青およびその他の色素9種について、これ

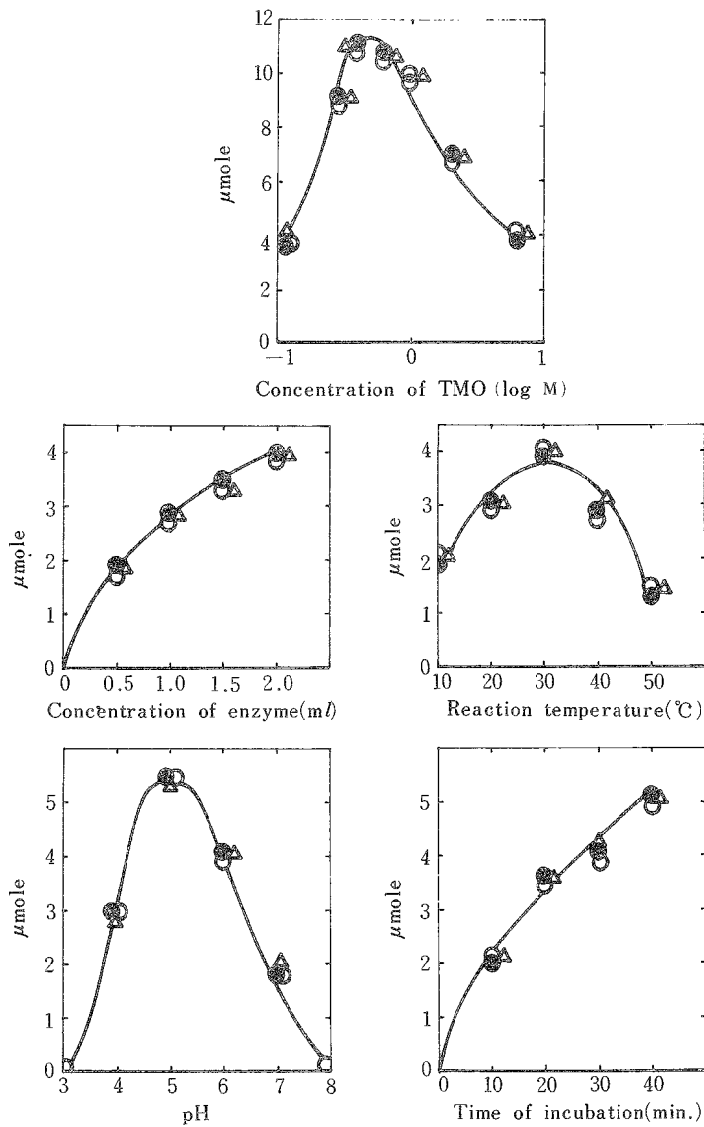


Fig. 14. Equimolecular changes of TMO, DMA and FA in different conditions.
The signs of ○—○, ●—● and △—△ indicate the amounts of FA formed,
DMA formed and TMO decreased respectively.

ら色素の酵素活性におよぼす影響を調べた。酵素標品Ⅱを用い、色素の濃度をメチレン青と同様0.001 M とした。その結果を第22表に示す。第22表からメチレン青の他トルイジン青が酵素活性の発現に役立つことがわかる。

つぎに、酸化型ならびに還元型メチレン青を用い、二つの型の酵素活性におよぼす影響を調べた。その結果を第23表に示す。還元型メチレン青は0.1M コウジ酸存在のもとで酸化型メチレン青に光(300W)を照射し

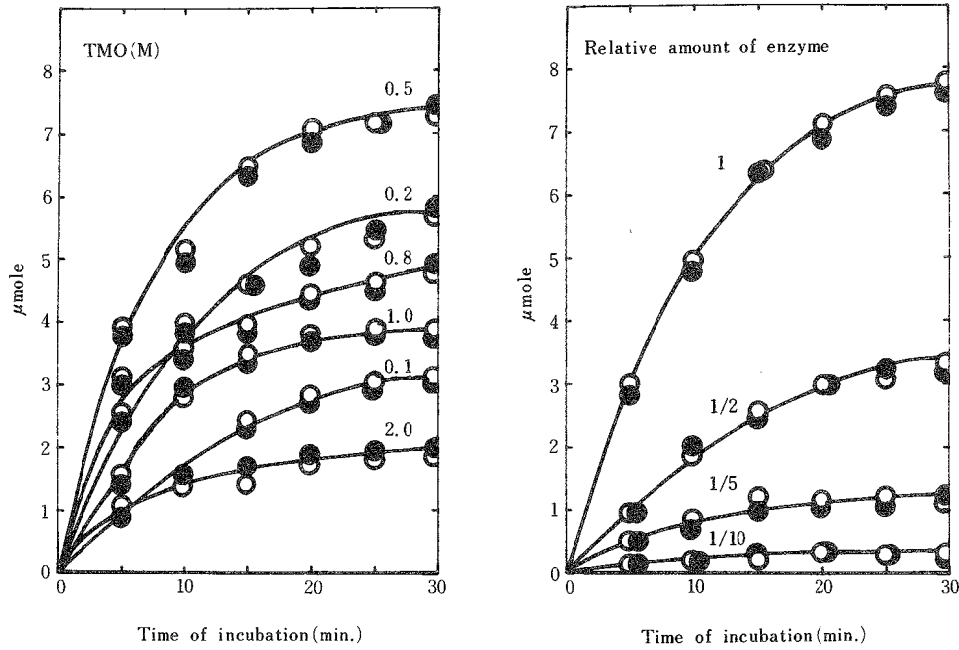


Fig. 15. Effect of concentrations of substrate and enzyme on the formation of FA and DMA. Signs, legend as Fig. 14.

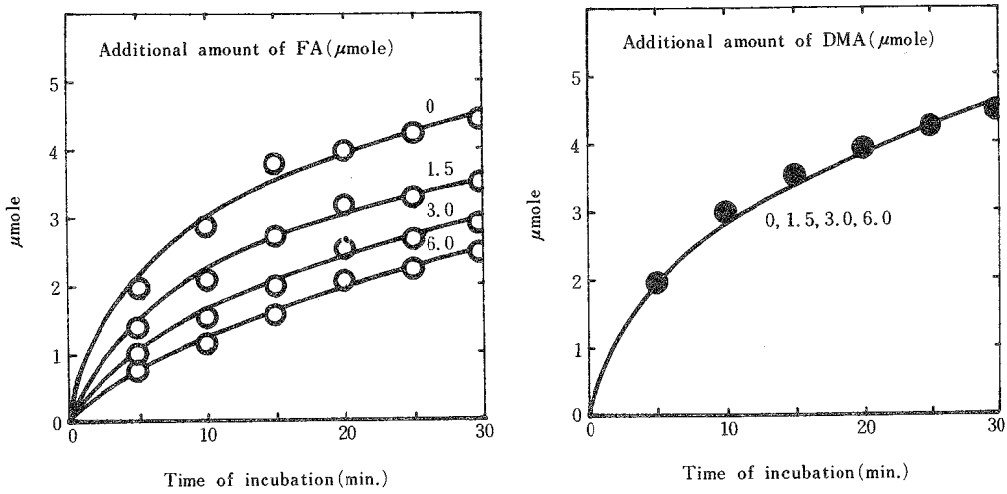


Fig. 16. Effect of additional amount of FA and DMA on the formation of FA and DMA. Signs, legend as Fig. 14.

Table 22. Effect of dyes on the enzymic activity.

| Dyes | Formation | |
|-------------------------------|---------------|-------|
| | FA | DMA-N |
| | (μ mole) | |
| Methyl viologen | 0.6 | 0.4 |
| Neutral red | 0 | 0 |
| Janus green | 0.8 | 0.7 |
| Indigo carmine | 0 | 0 |
| Nile blue | 0 | 0 |
| Toluidine blue | 6.5 | 6.6 |
| Methylene blue | 6.5 | 6.5 |
| Toluylene blue | 1.3 | 1.3 |
| 2,6-Dichlorophenol indophenol | 0 | 0 |
| Triphenyl tetrazolium | 0 | 0 |

Table 23. Effect of oxidized and reduced methylene blue on the enzymic activity.

| Methylene blue | Formation | |
|----------------|---------------|-------|
| | FA | DMA-N |
| | (μ mole) | |
| Oxidized form | 3.6 | 3.6 |
| Reduced form | 5.7 | 5.5 |

Table 24. Effect of oxidized and reduced methylene blue on the enzymic activity of supernatant and precipitate.

| Medium | Formation | |
|--|---------------|-------|
| | FA | DMA-N |
| | (μ mole) | |
| Methylene blue + Supernatant | 0.5 | 0.5 |
| Methylene blue + Precipitate | 0.5 | 0.5 |
| Methylene blue + Supernatant + Precipitate | 4.1 | 4.0 |
| Methylene blue* + Supernatant | 0.7 | 0.7 |
| Methylene blue* + Precipitate | 4.1 | 4.0 |

* Reduced form.

て作製した。第23表から明らかのように、酸化型よりも還元型メチレン青を用いた方が酵素活性が高い。この原因は酵素活性に関与する補助因子あるいは酵素蛋白質の中に、酸化されやすい基または成分が存在するためと考えられる。

これを確かめるため、10ml酵素標品に30%過酸化水素0.1mlを加え、10分間0℃に静置して得た酵素につき、酸化型あるいは還元型メチレン青存在下での酵素活性を測定した。その結果を第17図に示す。第17図から、還元型メチレン青の存在下でのみ酵素活性が発現することがわかる。

一方、酵素標品IIをアルカリ処理して得た上澄と沈殿区分（第4章第3節参照）の両区分に酸化型および還元型メチレン青を加えてどの区分に酵素活性が認められるかを調べた。結果を第24表に示す。第24表から

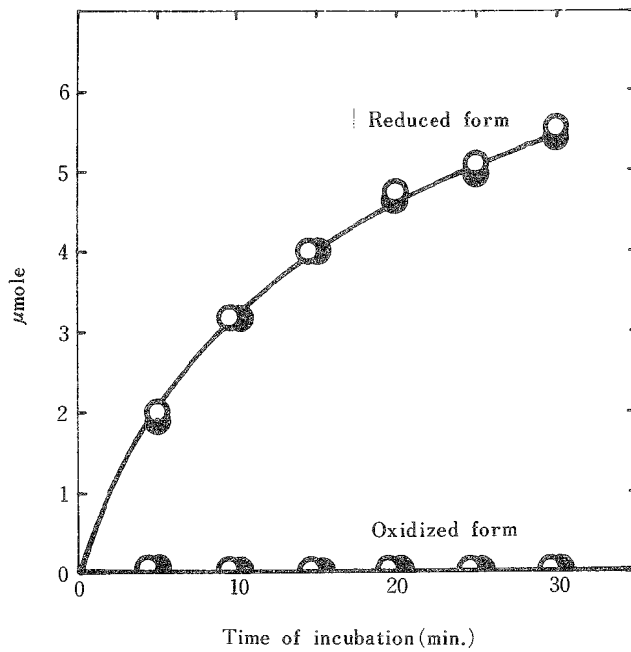


Fig. 17. Effect of reduced methylene blue on activity of enzyme treated with hydrogen peroxide. Signs, legend as Fig. 14.

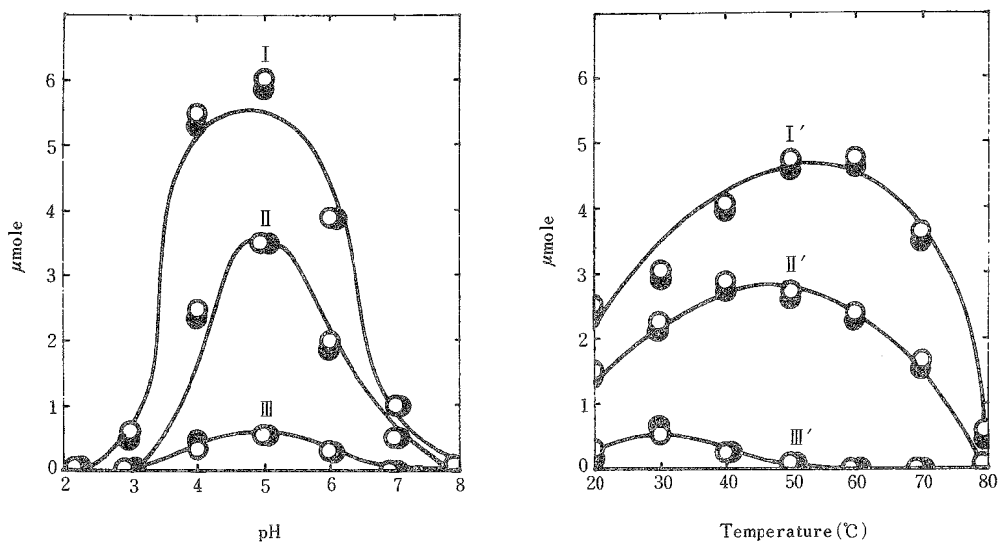


Fig. 18. Effect of oxidized and reduced methylene blue on enzymic activity in conditions varying pH values and reaction temperatures. I and I', Reduced methylene blue under light; II and II', Oxidized methylene blue under light; III and III', Oxidized methylene blue.

明らかのように還元型メチレン青は沈殿区分における酵素活性を増強した。さらに、この沈殿区分について、酸化型メチレン青存在の場合、酸化型メチレン青存在のもとで光を照射した場合および還元型メチレン青存在のもとで光を照射した場合におけるそれぞれの酵素活性に対するpHあるいは温度の影響を調べた。その結果を第18図に示す。第18図から酸化型メチレン青存在の場合、酵素活性はきわめて低いが、光の照射によってかなり活性が増強することがわかる。しかしながら、還元型メチレン青存在のもとで光を照射した場合に最も高い活性を示した。

酵素活性におよぼす既知補酵素および活性化剤の影響 酵素標品Ⅲにつきゲル濾過を行なって得た酵素蛋

Table 25. Effect of cofactors on the enzymic activity of protein obtained from enzyme preparation III by gel-filtration.

| Cofactor | Methylene blue | | | |
|--------------------------|------------------|-------|------------------|-------|
| | None | | Added | |
| | FA | DMA-N | FA | DMA-N |
| | (μ mole/ml) | | (μ mole/ml) | |
| (Cofactor) | | | | |
| NAD | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NADH ₂ | 0 | 0 | 0.7 | 0.6 |
| NADP | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NADPH ₂ | 0 | 0 | 0.7 | 0.6 |
| Lipoic acid | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vitamin B ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vitamin B ₆ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vitamin B ₁₂ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vitamin C (reduced) | 0 | 0 | 0.4 | 0.4 |
| Glutathion (oxidized) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glutathion (reduced) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cytochrome C (oxidized) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RF | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RFH ₂ * | 0.5 | 0.4 | 0.5 | 0.5 |
| FMN | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FMNH ₂ * | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| FAD | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FADH ₂ * | 0.5 | 0.4 | 0.5 | 0.5 |
| Coenzyme Q ₁₀ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (Metal) | | | | |
| Mn(II) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fe (II) | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 |
| Fe (III) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Co (II) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mg (II) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Zn (II) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cu (I) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cu (II) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mo (VI) | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Prepared by irradiation or treatment with NADH₂.

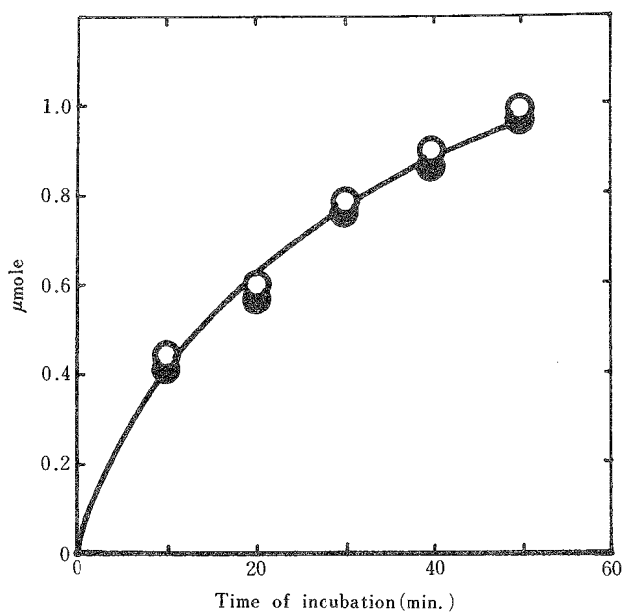
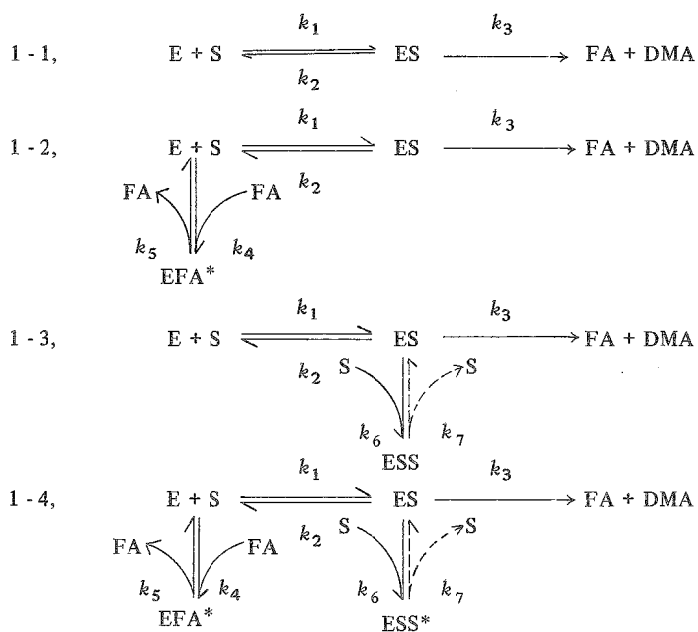


Fig. 19. Formation of FA and DMA with an increase in incubation time in the presence of FMNH₂. Signs, legend as Fig. 14.

Table 26. Assumed schemes of enzymic reaction for simulation.



* Inactive substance.

白質を用いた(第4章第2節参照)。用いた酵素標品は還元型メチレン青の存在下でしか活性を示さなかった。得られた酵素蛋白質に各種補酵素および活性化剤(補酵素13種, 金属7種) $1 \mu\text{mole}$ を加えた場合の酵素活性を調べた。その結果を第25表に示す。第25表から, メチレン青無添加の場合, 還元型フラビン類補酵素すなわち, リボフラビン (RFH_2), フラビンモノヌクレオチド (FMNH_2) およびフラビンアデニンジヌクレオチド (FADH_2) の存在下で酵素活性を示すことがわかる。一方, メチレン青添加の場合には還元型フラビン系のほか, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH_2), ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NADPH_2), ビタミンCおよび鉄(II)の存在下で酵素活性を示した。さらに, FMNH_2 について酵素活性を反応時間を変えて調べた。第19図に示すように, FMNH_2 は酵素の活性化に役立つことが

Table 27. Rate constants for presented schemes of enzymic reaction.

| Scheme | 1-1 | 1-2 | 1-3 | 1-4 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| k_1 ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$) $\times 10$ | 0.167 | 0.167 | 0.167 | 0.167 |
| k_2 (sec^{-1}) | 0.167 | 0.167 | 0.167 | 0.167 |
| k_3 (sec^{-1}) $\times 10^{-1}$ | 0.167 | 0.167 | 0.167 | 0.167 |
| k_4 ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$) $\times 10^{-1}$ | — | 0.167 | — | 0.167 |
| k_5 (sec^{-1}) $\times 10^{-2}$ | — | 0.167 | — | 0.167 |
| k_6 ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$) $\times 10^{-1}$ | — | — | 0.500 | 0.500 |

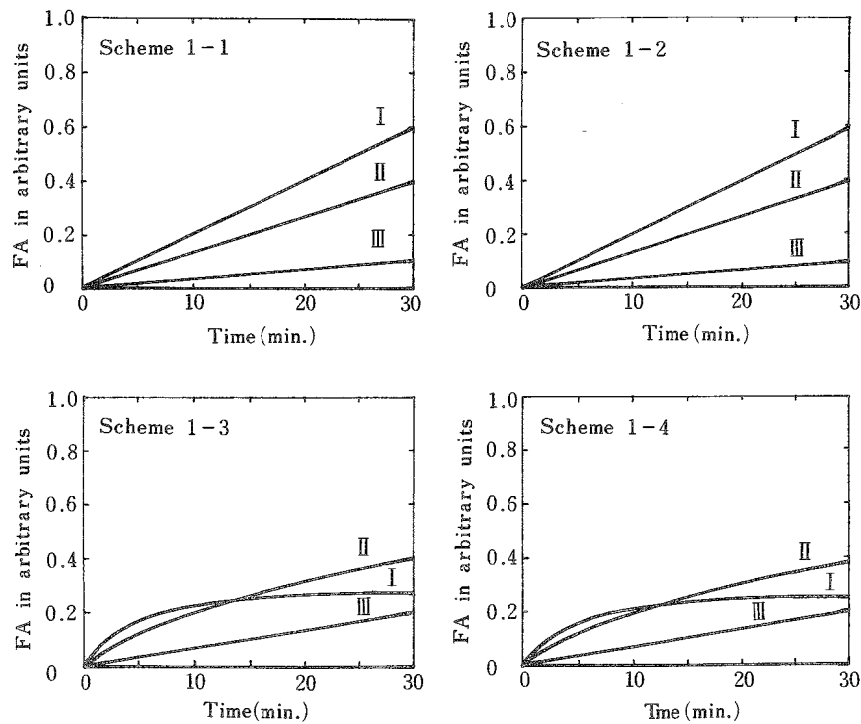


Fig. 20. Simulated time course for presented schemes in different TMO concentrations. The signs of I, II and III indicate 1, 0.5 and 0.1M TMO respectively.

明らかである。

シミュレーション 第26表に示す酵素反応系を組み立て、シミュレーションを行なった。酵素の分子量を10万と仮定した。結果を第20図に一括して示す。用いた速度定数は第27表に示すとおりである。第20図から、生成FAによる酵素活性の阻害はほとんど認められないが、基質による阻害は明らかである。

考 察

酵素反応の条件を変えても、TMOの減少量とFAならびにDMAの生成量とは等モル関係であり、この関係がインキュベート時間の長短にかかわらず認められることから、これらの生成物は並発反応で生じることが明らかである。また、TMOからDMA以外のアミンを生じる可能性はないと断定できる。この事実は、カリガネエガイ内臓における酵素反応でDMA以外のアミンを生じない結果と一致する¹⁴⁹⁾。非酵素触媒においてV AISEY¹³²⁾その他の研究者^{134, 135)}はDMA以外にTMAが生じることを報告しているが、魚介類における酵素反応ではTMAの生成が認められていない。

反応系に多量のTMO、FAならびにDMAを添加した実験から添加TMOならびにFAが酵素活性を阻害することが明らかである。この阻害効果はFAよりTMOが大きい。一方、シミュレーションの結果からも、TMOによる酵素活性の阻害は顕著にあわわれた。しかし、FAのそれは明らかでなかった。このように、FAによる酵素活性の阻害がほとんど認められない理由としては、定性的にシミュレーションを行ない、定量的に速度定数を検討しなかったためと考えられる。

メチレン青の酸化型および還元型の効果を調べた実験からFAとDMAの生成に酸化還元反応系が関与することは明らかであり、脱水素酵素の補酵素あるいは還元性物質の介在が推定される。一方、補酵素ならびに活性化剤の実験結果から、メチレン青と同様の働きを持つ天然物質は核酸関連化合物であるフラビン類であることがわかった。なお、これらの天然色素を還元するNADH₂、NADPH₂、ビタミンCおよび鉄(II)が酵素活性に対し補助的に働くことは第23表からして確かである。FAとDMAの生成量が用いた補酵素ならびに活性化剤の種類にかかわらずほぼ一定であることから、生体ではフラビン類が一時的に水素運搬体として触媒の役割を担っていると推定される。このことはアミン類とフラビン類の混合溶液に光を照射すると色素が還元される事実¹⁵⁶⁾と関連している可能性があるように思われる。

第2節 酵素モデルによる酸・塩基触媒反応における速度論的解析

TMOの非酵素的分解における反応機構についてはV AISEY¹³²⁾をはじめその他の業績がある^{20, 133~137)}。これらの研究では、触媒の存在においてTMOが転位をおこしジメチルアミノメチロールとなり、FAとDMAを生じる反応例が多い^{132~136)}。一方、TMO以外のN-オキサイドの分解についてはF I S H¹⁵⁷⁾その他の報告^{158, 159)}があり、TMOの分解と同様、これらのオキサイドもメチロール型となりFAと相当するアミン類を生成する。

以上の研究結果から、TMOはメチロール型となりFAとDMAを生じると判断される。しかしながら、これらの反応機構の中には酵素反応では考え難い反応が多い。

このため、酵素反応との関連においてジメチルアミノメチロールの転位の機構を調べるため、酵素モデル反応として酸・塩基触媒の存在におけるFAとDMA生成の量的関係を調べ、反応機構の解析を行なった。また、あわせてシミュレーションを行ない反応機構の妥当性を確かめた。

実 験 方 法

分析方法 第3章第1節の方法によった。

触媒およびその活性の測定 用いた触媒はルイス、特殊および一般酸・塩基である。ルイス酸としては三フッ化ホウ素および三塩化アルミニウムを、また特殊酸・塩基としては塩酸および水酸化ナトリウムを使用した。一方、一般酸・塩基としてはSÖ RRENSEN, M C I L V A I N E, トリスヒドロキシメチルアミノメタン (以下

トリスと略称する)–塩酸とマレートおよびRINGERの各緩衝液を使った。また、一部の実験では、トリス–マレートおよびトリス–二塩基酸の緩衝液に特殊酸あるいは塩基を加えて、pHを調節した溶液を使用した。

触媒活性の測定はルイス酸では有機溶媒5 mlに粉末のTMO 100 μ mole、特殊および一般酸・塩基では主として溶液10 mlに0.2 M TMO 1 ml (200 μ mole) を加え、80°Cに40時間インキュベートしたのちFAとDMAを定量した。

実験結果

ルイスおよび特殊酸・塩基の触媒活性 ルイスおよび特殊酸・塩基の触媒活性をそれぞれ第21図および第22図に示す。第21図から三フッ化ホウ素触媒においてのみ活性が認められることがわかる。一方、特殊酸・塩基では、第22図から明らかのようにpH2から12までの間では活性が認められないが、pH1以下およびpH13以上ではわずかに活性が認められた。

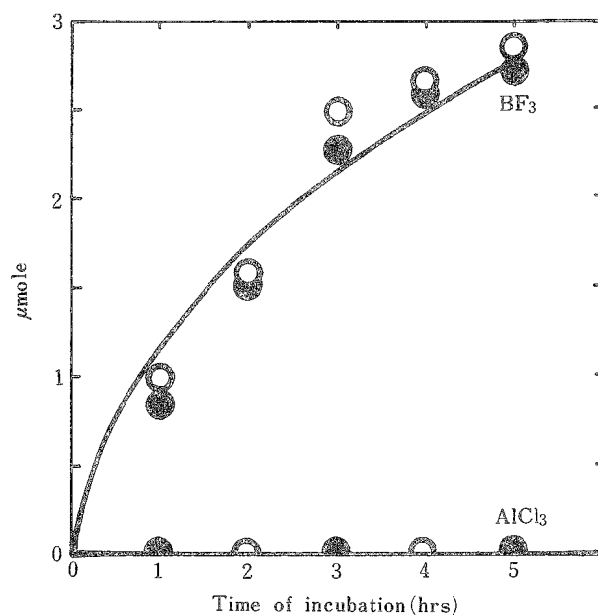


Fig. 21. Catalytic formation of FA and DMA from TMO in aluminum trichloride and boron trifluoride solutions. Signs, legend as Fig. 14.

一般酸・塩基の触媒活性 まず0.5 M 緩衝液の触媒活性を調べた。その結果を第23図に示す。第23図から、多くの緩衝液に触媒活性が認められるが、その活性は弱いことがわかる。このうち、トリス–マレート緩衝液の触媒活性はより高いpHで上昇することが期待される。

このため、この緩衝液に水酸化ナトリウムを加えてpHを調節した混合液の触媒活性を調べた。その結果、第24図に示すように、pH 11でかなり強い活性を示すことがわかった。さらにマレイン酸の代りに各種の二塩基酸を加えて同様の実験を行なった。結果は第25図に示すとおりである。第25図から、調べた二塩基酸の大部分に強い活性がpH 10~11で認められるが、中でもマロン酸の活性は他に卓越していることがわかる。

つぎに、トリス–マロン酸–水酸化ナトリウム混合液 (pH 11) を用いて、触媒濃度および基質濃度を変えた場合における触媒活性の時間的変化を調べた。その結果をそれぞれ第26図と第27図に示す。第26図と第27図

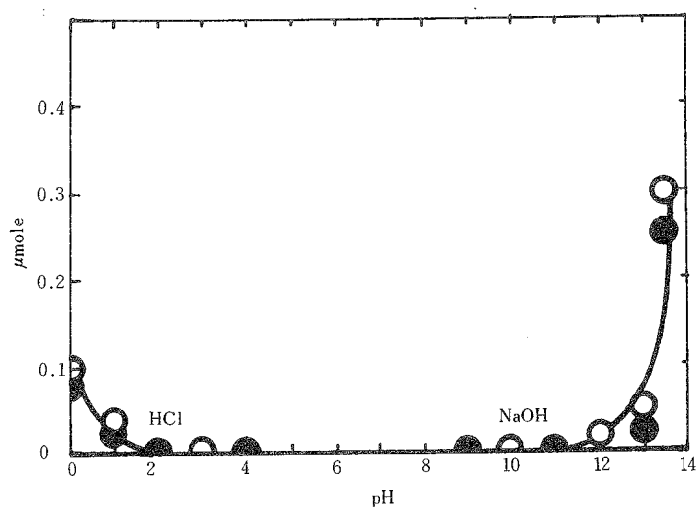


Fig. 22. Catalytic formation of FA and DMA from TMO in specific acid and base solutions. Signs, legend as Fig. 14.

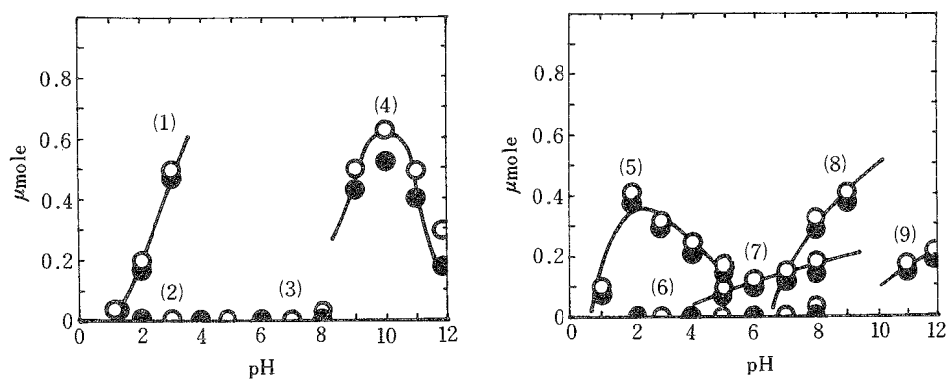


Fig. 23. Catalytic formation of FA and DMA from TMO in buffer solutions.

Sørensen buffer

(1) Glycine-sodium chloride-hydrochloric acid (pH 1.1 - 3.0)

(2) Sodium citrate-hydrochloric acid (pH 1.1 - 4.0)

(3) Sodium phosphate, dibasic-potassium phosphate, monobasic (pH 5.0 - 8.0)

(4) Glycine-sodium chloride-sodium hydroxide (pH 9.0 - 12.0)

Walpole buffer

(5) Hydrochloric acid-sodium acetate (pH 1.0 - 5.0)

McIlvaine buffer

(6) Citric acid-sodium phosphate, dibasic (pH 2.2 - 8.0)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer

(7) Tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloric acid (pH 7.0 - 9.0)

(8) Tris(hydroxymethyl)aminomethane-maleic acid-sodium hydroxide (pH 5.0 - 8.0)

Ringer buffer

(9) Sodium hydroxide-sodium phosphate, dibasic (pH 11.0 - 12.0)

Signs, legend as Fig. 14.

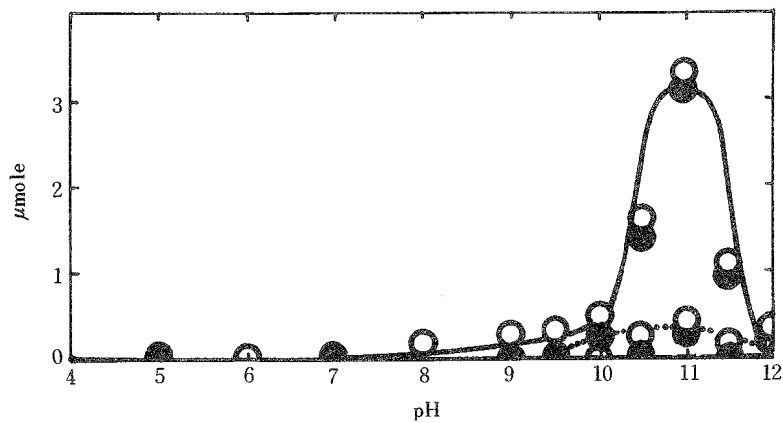


Fig. 24. Catalytic formation of FA and DMA in tris(hydroxymethyl)aminomethane-maleic acid-sodium hydroxide solution.

Signs, legend as Fig. 14.

Solid line, Tris(hydroxymethyl)aminomethane-maleic acid-sodium hydroxide; Dotted line, Tris(hydroxymethyl)aminomethane-sodium hydroxide.

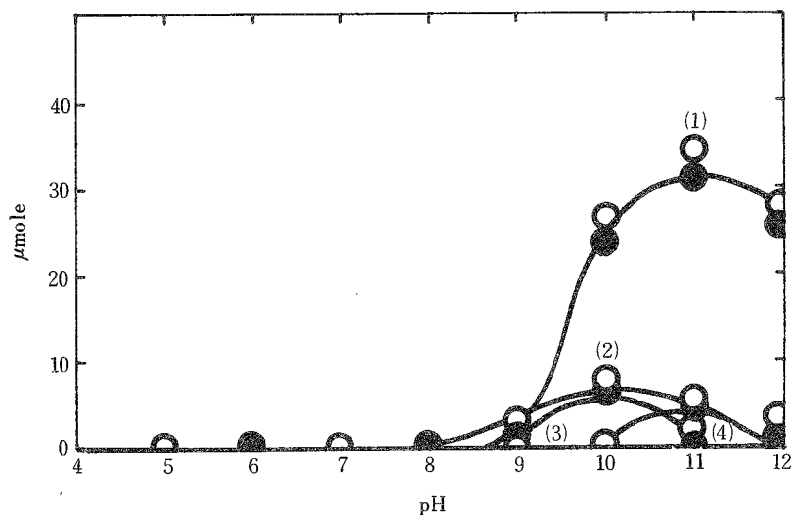


Fig. 25. Effect of dibasic acids on the catalytic formation of FA and DMA in tris(hydroxymethyl)aminomethane-sodium hydroxide solution.

(1) Malonic acid; (2) Azelaic acid; (3) Succinic acid; (4) Oxalic acid. Signs, legend as Fig. 14.

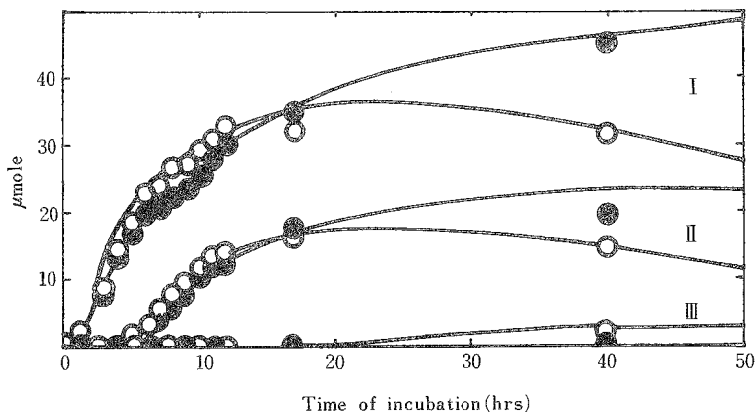


Fig. 26. Relationship between formation of FA and DMA in tris(hydroxymethyl)aminomethane-malonic acid-sodium hydroxide solution and incubation time. I, 0.5M tris(hydroxymethyl)aminomethane-0.5M malonic acid-0.5M sodium hydroxide; II, 0.3M tris(hydroxymethyl)aminomethane-0.3M malonic acid-0.3M sodium hydroxide; III, 0.1M tris(hydroxymethyl)aminomethane-0.1M malonic acid-0.1M sodium hydroxide. Signs, legend as Fig. 14.

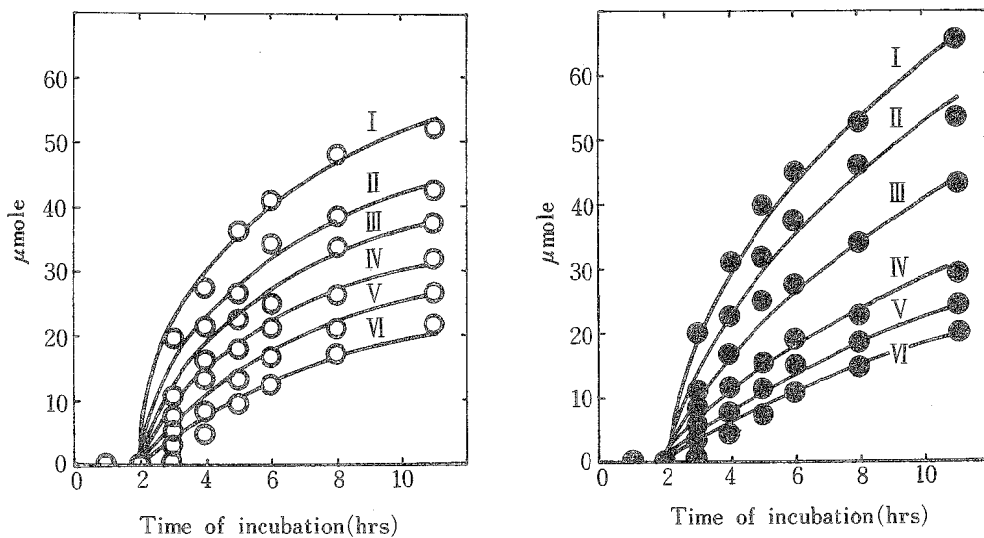


Fig. 27. Relationship between formation of FA and DMA in 0.5M tris(hydroxymethyl)aminomethane-0.5M malonic acid-0.5M sodium hydroxide solution and TMO concentration. The concentrations of TMO of I, II, III, IV, V and VI are 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 and 0.05M respectively. Signs, legend as Fig. 14.

Table 28. Assumed scheme of non-enzymic reaction for simulation.

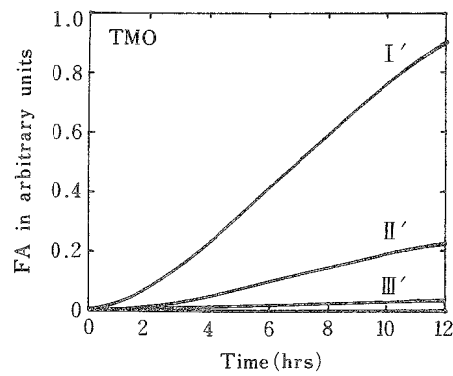
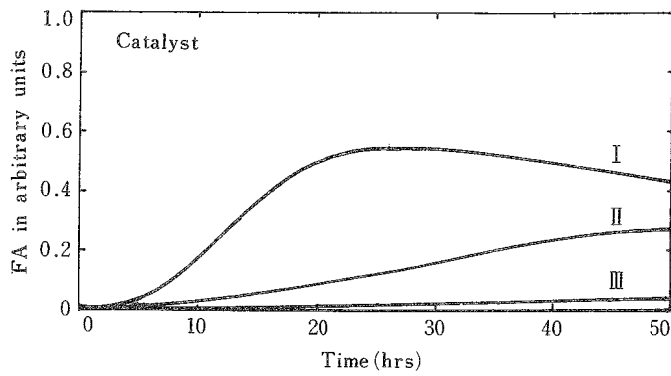
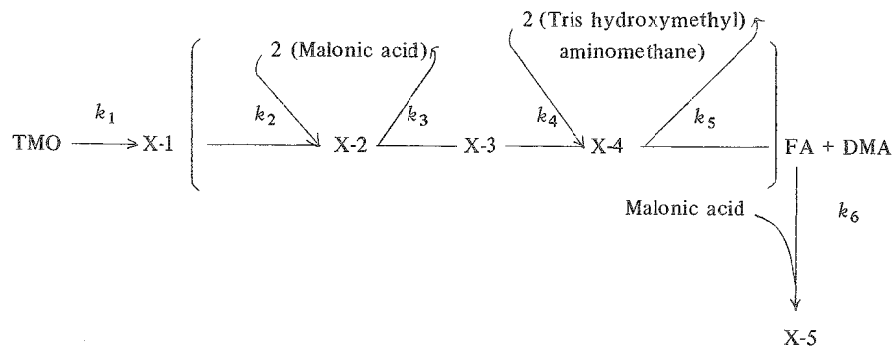


Fig. 28. Simulated time course for presented scheme in Table 28.

The sings of I, II and III indicate 0.5M, 0.3M and 0.1M of tris(hydroxymethyl) aminomethane-malonic acid-sodium hydroxide solution respectively.

The sings of I', II' and III' indicate 2.0M, 1.0M and 0.05M TMO concentration respectively.

からFAとDMAの生成に誘導期の存在および反応後期にFAの消費が認められる。また、反応初期では酵素反応の場合と同様、FAとDMAの生成量は等モル関係にあることがわかる。

シミュレーション 酸・塩基触媒における反応機構に対して第28表に示すスキームを考えて、触媒濃度および基質量を変えた場合のシミュレーションを行なった。その結果を第28図に一括して示す。また用いた速度定数は第29表に示すとおりである。第28図から明らかのように第28表のスキームが触媒反応における第26図と第27図の結果と定性的に一致することがわかる。

Table 29. Rate constants for presented scheme in Table 28.

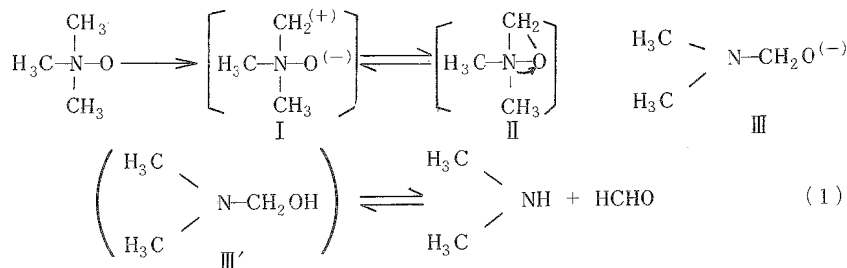
| | Catalyst | TMO |
|---|----------|-------|
| $k_1(\text{sec}^{-1}) \times 10^{-4}$ | 0.417 | 0.417 |
| $k_2(\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}) \times 10^{-3}$ | 0.417 | 0.417 |
| $k_3(\text{sec}^{-1}) \times 10^{-2}$ | 0.417 | 0.417 |
| $k_4(\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}) \times 10^{-3}$ | 0.417 | 0.417 |
| $k_5(\text{sec}^{-1}) \times 10^{-2}$ | 0.417 | 0.417 |
| $k_6(\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}) \times 10^{-2}$ | 0.417 | 0.417 |

考 察

非酵素触媒反応におけるTMOの分解機構を調べるために用いられている触媒は鉄(IIあるいはIII)化合物^{132, 134, 135} および無水酢酸^{136, 137}である。著者はこれとは別に酸・塩基についてTMOからFAとDMAの生成を促進する触媒の検索を行なった。その結果、トリス-二塩基酸-水酸化ナトリウム混合液(pH 10~11)に最も触媒活性の強いことを認めた。このことは、この反応の触媒活性の発現にはアミノ基およびカルボキシル基が必要であり、酵素反応において酵素蛋白質の果す役割が重要であることを示唆する。しかし、非酵素触媒活性のpH依存性についてはその意義が明らかでないが、トリスに存在するヒドロキシの解離すなわち、オキシアニオンが重要な働きを持つと考えられる。

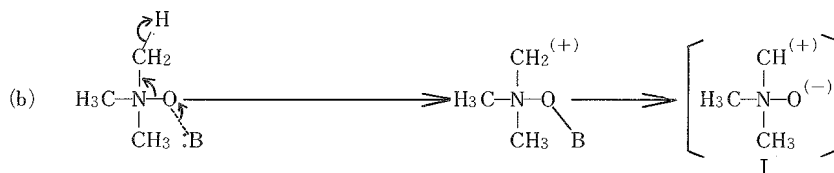
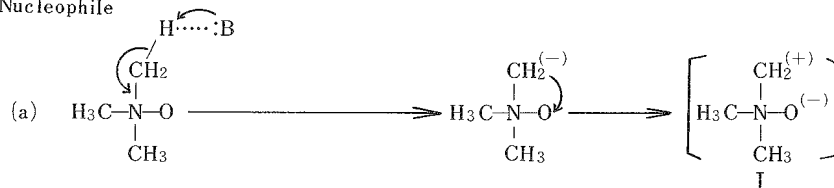
一方、非酵素触媒反応におけるFAとDMAの生成量は反応初期でほぼ等モル関係であり、酵素触媒反応における結果と一致し、FAとDMAが並発反応で生じることは確実である。大塚¹³⁷は無水酢酸を触媒として用い、FAとDMAとの量的関係を調べているが、その関係は明らかでないとしている。著者の実験でも反応後期(第26図)に同様のことが認められた。これは生成FAが触媒おそらくマロン酸と反応して¹⁶⁰、消費されていくものと考えられる。この推定の妥当性はシミュレーションの結果からも明らかである。

以上の非酵素触媒の実験結果から、一般塩基(general base)すなわち、電子供与体がTMOからFAとDMAの生成に役立つことは明らかである。一方、酵素触媒における実験で還元型補酵素ならびに活性化剤はTMO-aseの活性化に役立つことから、一般塩基と考えることができる。これらのことから、TMOからFAとDMAの生成機構はつぎのような転位反応によると推定できる。

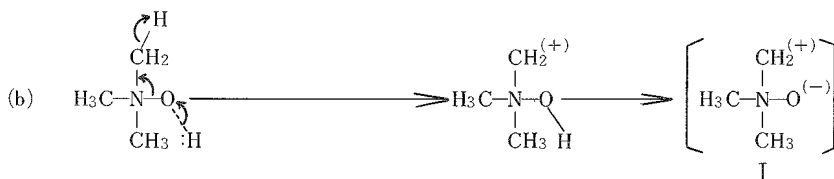
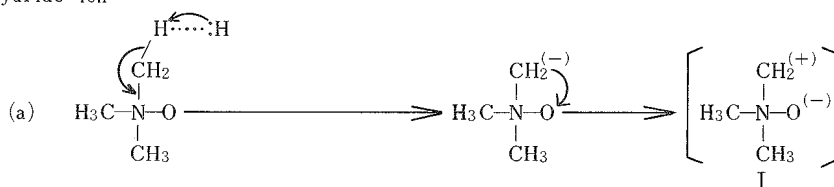


ここでIの荷電状態は希望型であり、大きく二つの作用によると考えられる。すなわち、親核置換(nucleophile)であり、一方は H^- (hydride ion)である。これらによる反応様式はつぎのように推定される。

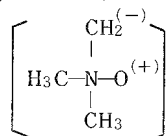
(A) Nucleophile



(B) Hydride ion



一方、Iについては逆の荷電状態、すなわち、



の可能性が考えられるが、オキシカチオン (O^+)形成に関する触媒の役割は明らかでない。

(1)の反応における酵素の触媒機構はつぎのように考えられる。

1. 酵素蛋白質そのものの一般塩基としての作用。
2. 一般塩基としてメチレン青の協同作用。
3. メチレン青は酵素蛋白質中に存在する被還元性因子を還元する。この還元型酵素蛋白質の一般塩基としての作用。

4. 補助因子が上記2あるいは3の反応を促進。

しかし、いずれにしても(1)式で示されるこのような分子内転位反応が酸・塩基中で行なわれることは特記に値する。

小 括

TMOからFAとDMAの生成機構を調べるため、酵素ならびに非酵素触媒を用いた触媒反応実験、その実験にもとづくシミュレーションを行なった。

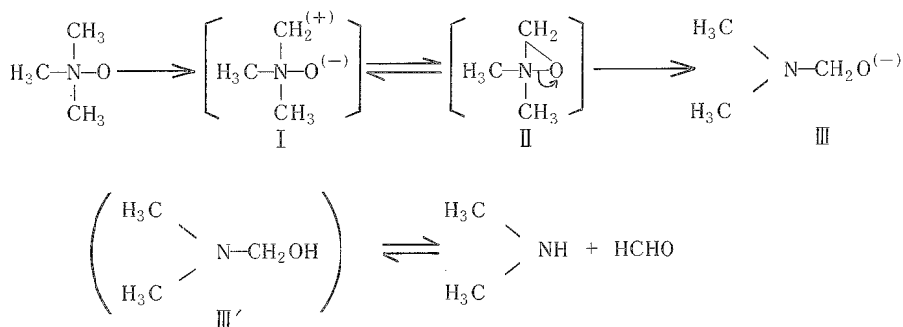
酵素触媒において、反応条件を変えてもTMOの減少量ならびにFAとDMAの生成量の間には等モル関係が成立した。

メチレン青と同様の挙動を示す天然色素はフラビン類であり、補酵素 (NADH₂, NADPH₂)、還元剤 (ビタミンC, 二価鉄) および光は補助的に酵素活性を増強した。一方、酸化型および還元型のメチレン青を用いた場合の酵素活性は後者が大きい値を示した。

非酵素触媒においてはトリスマロン酸-水酸化ナトリウム(pH11)に強い触媒活性が認められた。マロン酸以外の二塩基酸もかなりの活性を示すことがわかった。一方、酵素触媒と同様、反応初期ではFAとDMAの生成量は等モル関係であった。

シミュレーションにおいてはいくつかの反応スキームを仮定し、実験結果の妥当性を吟味した。その結果、酵素反応で認めた基質の酵素活性阻害は明らかとなった。一方、非酵素触媒反応において触媒濃度あるいは基質濃度を変えた場合のFAとDMAの生成曲線はシミュレーションの結果と定性的に一致した。

以上の実験結果から、魚介類におけるFAとDMAの生成に一般塩基が関与することが明らかである。したがって、FAとDMAの生成機構はつぎのような転位反応によると推定される。



第6章 総 括

生鮮魚介類に含まれるTMOは、死後細菌酵素によって還元され、TMAとなる。このTMAは魚介類の鮮度に関する指標物質としてかなり古くから研究され、多数の業績がある。これとは別に生鮮魚介類にTMO-aseが存在することが明らかとなったのは、1960年代のことである。この研究の歴史は浅く、魚介類におけるTMO-aseはタラ類に存在することが知られているに過ぎない。一方、TMO-aseの精製は全く行なわれておらず、酵素の化学的性質ならびに酵素反応機構についてもほとんど不明である。TMO-aseの作用によって、魚介類にFAとDMAが生成することは生化学上ならびに食品衛生上の立場から興味ある問題である。

このような観点から、日本産生鮮魚介類におけるTMOの分布を調べるとともに、TMO-aseの検索を行ない、エソ類が強い酵素活性をもつことを見出した。よって、ワニエソ肝臓を酵素源として用い、TMO-aseの精製を行ない、得られた酵素標品につき酵素の化学的性質を調べた。さらに、反応機構を解明するため、種々の面から検討を加え、新知見を提示することができた。これらについて一応の成果を得たので、本論において5章に分けて記述してきたのであるが、以下あらためてその概略を述べる。

1.ホルムアルデヒドならびにジメチルアミンの検出 魚介類中に含まれるFAとDMAの簡易検出法として薄層クロマトグラフィーにつき検討を行なった。FAの検出には固定相として活性シリカゲルを用い、FAを2,4-DNP-ヒドラゾンとしてn-ヘキサン-エタノール-酢酸混液(90:10:3)で展開した。展開時間は約30分である。フナ筋肉に加えたFAの石油エーテルへの移行率は約90%であり、最小検出量は0.3 μ g FAであった。魚介類(16種)におけるFAの存在を調べ、フナを除き調べた魚介類のすべてにFAが存在することを明らかにした。

一方、DMAの検出には、FAと同様、固定相として活性シリカゲルを用い、エタノール-塩酸混液(10:1)で展開した。展開時間は約90~120分である。呈色にはDRAGENDORFF試薬を用いた。最小検出量は1 μ g DMAであった。魚介類(27種)におけるDMAの存在を調べた結果、マダラ、イカ類以外の魚介類からDMAは検出されなかった。

2. トリメチルアミノオキシライドの分布 日本産魚介類180余種のTMO含量を調べ、分類学上系統的な研究を行なった。

軟体動物頭足類17種のTMO含量は、TMO-N量として外とう筋で9~488mg%、腕筋で7~307mg%、中腸腺で0~73mg%であり、種間の明らかな含量差は認められず、個体による相違が著しかった。同一個体のTMO含量は外とう筋、腕筋、中腸腺の順に低下した。また、二枚貝類26種についてTMO含量を調べた結果、その値は、TMO-N量として閉介筋で0~55.6mg%、足および外とう筋で0~20.4mg%、内臓で0~16.4mg%であったが、一般に1mg%以下で低かった。だが、イタヤガイおよびザルガイの筋肉は特異的に高い値を示した。腹足類42種のTMO含量は、エビスガイを例外として一般に低く、筋肉および内臓ともにTMO-N量として1mg%以下の値を示すものが多かった。

節足動物23種におけるTMO含量はかなり高く平均46mg%であった。また、アメリカザリガニは、かなり多量のTMOを含有した。棘皮動物10種および原索動物2種におけるTMO含量は僅少か零であった。

脊椎動物魚類62種についてTMO含量を調べた。海産魚類筋肉のTMO含量はガンギエイ目が最も高く、ニン目とフグ目が最低で、その中間にウナギ目、スズキ目、カジカ目およびカレイ目が位置した。これは既往の文献における統計処理結果と一致した。一方、淡水産魚類筋肉のTMO含量は僅少か零であった。

3. トリメチルアミノオキシライドからホルムアルデヒドとジメチルアミンの生成 水産動物289種について筋肉および肝臓または内臓を用い、TMO-aseの検索を行なった。その結果、TMO-aseは特定の魚介類に存在することが明らかとなった。

軟体動物頭足類17種において、スルメイカ、コウイカおよびソデイカの3種にFAとDMAの生成能を認めた。しかし、これらイカ類のTMO-aseの存在は恒常的でなかった。頭足類と同様、軟体動物に属する二枚貝類29種および腹足類48種においては、カリガネエガイ、ヌノメアカガイ、ムラサキインコガイとムラサキイガイの4種およびエビスガイ、カワニナとバイの3種にそれぞれFAとDMAの生成能を認めた。これら貝類のうち、カリガネエガイおよびムラサキインコガイのTMO-aseは恒常的に存在した。一方、腹足類のカワニナは淡水産動物であるにもかかわらずFAとDMAの生成能が認められた。

腔腸動物2種のうち、ベニウミトサカ1種にTMO-aseの存在を認めた。

節足動物47種、棘皮動物20種、原索動物6種およびその他の無脊椎動物8種について調べたが、いずれの水産動物にもFAとDMAの生成が認められなかった。

脊椎動物114種についてはエソ類すなわち、ホシノエソ、オキエソ、マエソとワニエソの4種およびマトガイにTMO-aseの存在を認めた。これらの魚類はいずれも強い酵素活性を示した。

4. ホルムアルデヒドとジメチルアミンを生成する酵素の精製と性質 酵素活性の強いワニエソ肝臓を酵素源として用い、TMO-aseの精製を行ない、酵素標品I、IIおよびIIIを作製した。これらのうち、標品IIIは組織ホモジネートを遠心分離し、酢酸カルシウム、加熱、酸・アルカリおよび活性炭処理したもので、最も比活性が高かった。

得られた酵素標品をセファデックスG-50でゲル濾過を行ない、酵素蛋白質と補助因子とに分けることが

できた。この補助因子は酸およびアルカリ存在下で耐熱性を示した。一方、透析されることから低分子物質であることがわかった。また、補助因子をさらに陽イオン交換樹脂で処理し、吸着・溶離を行ない、酸およびアルカリで溶出し2成分に分けた。この2成分への分離から、補助因子は単一成分でないことが明らかとなった。

一方、これとは別に標品をアルカリ処理 (pH 10.0) して、上澄区分と沈殿区分とに分け、両区分について酵素活性を調べた。その結果、単一区分は活性を示さないが、両区分の混合物は明らかな活性を示した。しかし、いずれか一方の区分の加熱により、混合物は失活した。この失活から、FAとDMAの生成に関与する酵素蛋白質は少なくとも2種類存在すると考えられる。この事実をさらに確かめるため、上澄ならびに沈殿区分の蛋白質について、前述と同様にゲル濾過を行ない、それぞれ蛋白質を分画した。得られた画分は基質を加えても活性を示さなかったが、補助因子を加えることにより活性を回復した。以上の事実からTMO-aseは複合酵素系と推定される。

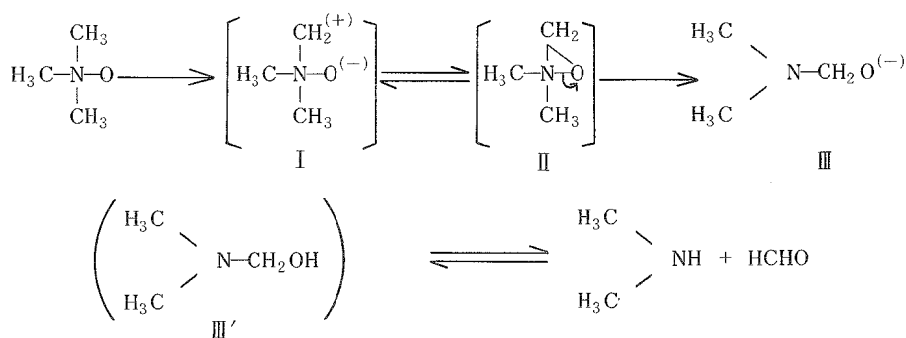
5. ホルムアルデヒドとジメチルアミンの生成機構 酵素および非酵素触媒によるTMOからFAとDMAを生成する反応機構について実験を行なった。また、反応機構に関する知見を得るため、実験結果の一部についてシミュレーションを行なった。

酵素触媒を用いて、反応速度論的な観点から反応条件を種々変えた場合、すべての条件下でTMOの減少量とFAならびにDMAの生成量の間に関係が成り立つことを明らかにした。メチレン青に相当する生体色素はフラビン系色素と推定され、また、この色素が NADH_2 、 NADPH_2 、ビタミンC、鉄(II)あるいは光の存在下で活性に役立つことを明らかにした。

一方、非酵素触媒すなわち酸・塩基触媒を用いて、酵素モデルの実験を行なった。特殊酸・塩基ではpH 2~12の範囲で触媒活性が認められなかった。一方、一般酸・塩基(緩衝液)では弱いながら触媒活性が認められた。また、一般酸・塩基(トリスヒドロキシメチルアミノメタン-二塩基酸-水酸化ナトリウム系)ではpH 10~11で強い触媒活性が認められた。この触媒を用いて、基質濃度あるいは触媒濃度を変えた場合、FAならびにDMAの生成はシグモイド曲線となった。この曲線の誘導期は真の誘導期であることを確かめた。

つぎに酵素および非酵素触媒の実験結果の一部についてシミュレーションを行なった。酵素触媒においては基質の酵素阻害を認めた。一方、非酵素触媒のトリスヒドロキシメチルアミノメタン-二塩基酸-水酸化ナトリウム系触媒においては触媒活性の基質濃度および触媒濃度依存性が定性的に確認された。

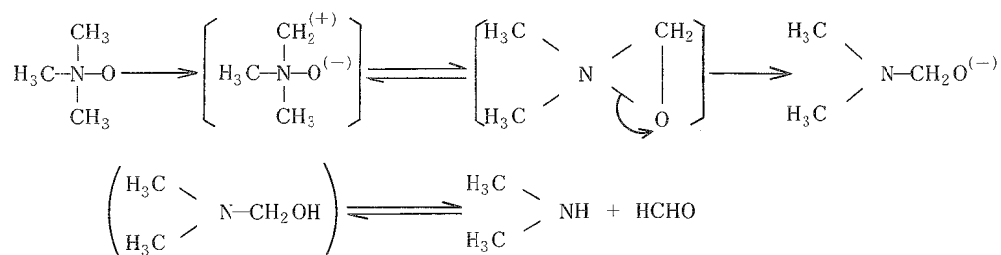
以上の結果から、FAとDMAの生成機構に関与する物質は一般塩基と考えられる。これにもとづいて、つぎの転位反応式を推定した。



さらに、Iの物質について電子論的考察を加えた。

結 語

生鮮魚介類のTMOからFAとDMAを生成する酵素は魚類のタラ類においてのみ存在することが知られているに過ぎなかった。しかし、多種類の水産動物について調べた結果、かなりの種類にこの酵素が存在することがわかった。特に、魚類におけるエソ類の酵素活性はタラ類のその活性にほぼ匹敵した。よって、エソ類の肝臓を用いてTMO-aseの精製を行ない、得られた酵素標品につき酵素の化学的性質を調べた。また、反応機構について酵素触媒と非酵素触媒を用いた実験を行ない、結果の一部についてシミュレーションを実施し、つぎの転位反応式を推定した。



後 記

本研究を終るにあたり終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜わった九州大学教授林 勝哉先生に深甚なる感謝の意を表す。また本研究遂行にさいして有益なる御教示を賜わった東海区水産研究所所長天野慶之博士ならびに水産大学校教授山田金次郎先生に謹んでお礼申し上げる。

なお、シミュレーションを行なうにあたっては九州大学院生麻生陽一君の援助を受けた。ここにあわせて感謝の意を表す。

文 献

- 1) 石田鼎一, 薬学雑誌, 422号, 300 (1917).
- 2) D. B. DILL and P. B. CLARK, *J. Assoc. Official Agric. Chem.*, **9**, 117 (1926); *J. Soc. Chem. Ind.*, **45**, 339 (1926) の抄録より引用.
- 3) A. R. TANKARD and D. J. T. BAGNALL, *Analyst*, **51**, 565 (1926).
- 4) 木村金太郎・川口武男, 缶詰時報, **5**, 45 (1926).
- 5) 木村金太郎・熊篠京司, 缶詰時報, **6**, 90 (1927).
- 6) 衣笠 豊・小毛利毛利三・堤 清雄・伊藤一男・清水永治, 衛生試験所彙報, **33**, 57 (1929).
- 7) 島崎米次郎・池田清三・高井仁八, 日本衛生化学会誌, **2**, 1 (1930).
- 8) 衣笠 豊・服部安蔵・岩元 恒, 衛生試験所彙報, **39**, 177 (1932).
- 9) 柳沢秀吉・堀井善一・西浦真一, 薬学雑誌, **52**, 603 (1932).
- 10) 服部安蔵・長谷部俊彦, 日本衛生化学会誌, **6**, 326 (1934).
- 11) 服部安蔵・長谷部俊彦, 薬学雑誌, **54**, 1081 (1934).
- 12) G. LUNDE and E. MATHIESEN, *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 974 (1934).
- 13) G. A. REAY, *Analyst*, **61**, 78 (1936).

- 14) 服部安藏・長谷部俊彦, 薬学雑誌, **57**, 928 (1937).
- 15) 清水 亘, 水産研究誌, **33**, 385 (1938).
- 16) 服部安藏, 衛生試験所彙報, **53**, 149 (1940).
- 17) 太田冬雄, 日水誌, **24**, 334 (1958).
- 18) E. TANIKAWA, *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **6**, 67 (1958).
- 19) C. F. MANGAN, *Comm. Fish. Rev.*, **21**, 21 (1959).
- 20) F. SOUDAN, *Rev. Trav. Inst. Pêches Mar.*, **23**, 203 (1959).
- 21) 豊水正道, 日水誌, **26**, 726 (1960).
- 22) 豊水正道, 日水誌, **26**, 733 (1960).
- 23) H. S. GRONINGER, *Food Technol.*, **15**, 10 (1961).
- 24) T. C. YU, E. A. DAY and R. O. SINNHUBER, *J. Food Sci.*, **26**, 192 (1961).
- 25) R. B. HUGHES, *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 822 (1961).
- 26) R. B. HUGHES, *J. Sci. Food Agric.*, **14**, 893 (1963).
- 27) C. J. WYATT and E. A. DAY, *J. Food Sci.*, **28**, 305 (1963).
- 28) M. YURKOWSKI, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **22**, 17 (1965).
- 29) M. YURKOWSKI and M. A. BORDELEAN, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **22**, 27 (1965).
- 30) 藤巻晶子・武田和子・天野立爾・川田公平・川城 巖, 食品衛生化学会誌, **6**, 510 (1965).
- 31) 山西 貞・小林彰夫・中山典子・仲宗根洋子, 農化, **40**, 311 (1966).
- 32) 松任茂樹・永山文男・小野豊樹, 日水誌, **33**, 586 (1967).
- 33) 野中順三九・川上晴雄・小泉千秋, 日水誌, **34**, 712 (1968).
- 34) 徳永俊夫, 日水誌, **36**, 502 (1970).
- 35) 徳永俊夫, 日水誌, **36**, 510 (1970).
- 36) S. A. BEATTY, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **4**, 63 (1938).
- 37) G. A. REAY, *Rept. Food Invest. Bd. for the year 1938*, 87 (1939).
- 38) J. M. SHEWAN, *Rept. Food Invest. Bd. for the year 1938*, 79 (1939).
- 39) J. M. SHEWAN, *Nature*, **143**, 284 (1939).
- 40) S. A. BEATTY and V. COLLINS, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **5**, 32 (1940).
- 41) W. J. DYER and Y. A. MOUNSEY, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6**, 359 (1945).
- 42) 宮本高明・安藤宗八, 千葉大学腐敗研報, **7**, 89 (1954).
- 43) R. B. HUGHES, *Nature*, **181**, 1281 (1958).
- 44) R. B. HUGHES, *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 431 (1959).
- 45) 村田喜一・大石圭一・飯田 優, 北海道大学水産学部彙報, **8**, 74 (1957).
- 46) 八坂 茂・宮原昭二郎・田端義明, 長崎大学水産学部研報, **2**, 275 (1959).
- 47) 宮原昭二郎, 日化, **81**, 1158 (1960).
- 48) 日下部寛男・小島喜久, 理化学研究所報告, **38**, 224 (1962).
- 49) 林 誠・畝本 力・内田礼子・宮本高明, 千葉大学腐敗研報, **15**, 39 (1965).
- 50) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通, 日水誌, **29**, 659 (1963).
- 51) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通, 日水誌, **29**, 860 (1963).
- 52) 天野慶之・山田金次郎, 日水誌, **30**, 430 (1964).
- 53) K. AMANO and K. YAMADA, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **30**, 639 (1964).
- 54) K. YAMADA and K. AMANO, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 60 (1965).
- 55) K. YAMADA and K. AMANO, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 1030 (1965).
- 56) K. YAMADA and K. AMANO, *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **41**, 89 (1965).
- 57) C. H. CASTELL, N. NEAL and B. SMITH, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27**, 1685 (1970).
- 58) C. H. CASTELL, B. SMITH and N. NEAL, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **28**, 1 (1971).
- 59) 徳永俊夫, 北海道区水研報, **29**, 108 (1964).
- 60) 徳永俊夫, 北海道区水研報, **30**, 90 (1965).
- 61) 徳永俊夫, 北海道区水研報, **31**, 95 (1966).

- 62) 山本為親訳, J. F. WALKER 著, ホルムアルデヒド, p. 80, 慎書店, 東京 (1964).
- 63) W. D. LANGLEY, *J. Biol. Chem.*, **84**, 561 (1929).
- 64) J. M. BARNES and P. N. MAGEE, *Brit. J. Indust. Med.*, **11**, 167 (1954).
- 65) P. N. MAGEE and J. M. BARNES, *Brit. J. Cancer*, **10**, 114 (1956).
- 66) P. N. MAGEE, *Biochem. J.*, **64**, 676 (1956).
- 67) F. ENDER, G. N. HARVE, R. MADSEN, L. ČEH and A. HELGEBOSTAD, *Zeit. für Tierphys.*, **32**, 181 (1967).
- 68) H. L. A. TARR, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **5**, 187 (1940).
- 69) 富沢純一, 日細菌, **6**, 405 (1951).
- 70) J. TOMIZAWA, *Jap. Med. J.*, **4**, 21 (1951).
- 71) 富沢純一, 酵素化学シンポジウム, **7**, 67 (1952).
- 72) H. L. A. TARR, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **4**, 367 (1939).
- 73) D. W. WATSON, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **4**, 267 (1939).
- 74) A. J. WOOD and E. A. BAIRD, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6**, 194 (1943).
- 75) Y. TSUCHIYA and E. ENDO, *Tohoku J. Agric. Res.*, **3**, 127 (1952).
- 76) H. L. A. TARR, *Bacteriol. Rev.*, **18**, 1 (1954).
- 77) 須山三千三, 東京水産大学特別報告, **3**, 152pp. (1960).
- 78) D. W. WATSON, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **4**, 252 (1939).
- 79) S. A. BEATTY and V. K. COLLINS, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **4**, 412 (1939).
- 80) V. K. COLLINS, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **5**, 197 (1941).
- 81) J. B. NEILANDS, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6**, 368 (1945).
- 82) C. H. CASTELL and J. M. SNOW, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **8**, 195 (1951).
- 83) E. BILINSKI, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **21**, 765 (1964).
- 84) J. R. BAKER and S. CHAYKIN *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 548 (1960).
- 85) J. R. BAKER, A. STRUEMLER and S. CHAYKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 58 (1963).
- 86) 三堀三郎・小菅貞良, 日本衛生化学会誌, **6**, 155 (1934).
- 87) 菰田太郎・竹下隆三・藤田昌彦, 日本食品衛生学会, 昭和37年5月18日発表.
- 88) 豊沢 功・小倉セイ, 日食工会誌, **12**, 46 (1965).
- 89) A. S. COOK, *Canad. Chem. Med.*, **15**, 22 (1931).
- 90) F. A. HOPPE-SEYLER, *Z. Physiol. Chem.*, **221**, 45 (1933).
- 91) F. KUTSCHER and D. AKERMANN, *Ann. Review Biochem.*, **2**, 355 (1933).
- 92) 高橋豊雄, 日水誌, **4**, 91 (1935).
- 93) 服部安蔵・長谷部俊彦, 衛生試験所彙報, **50**, 95 (1938).
- 94) W. LINZEL, H. PFEIFFES and I. ZIPPEL, *Biochem. Z.*, **301**, 29 (1939).
- 95) E. R. NORRIS and G. J. BENOIT, JR., *J. Biol. Chem.*, **158**, 443 (1945).
- 96) O. A. RONOLD and F. JAKOBSON, *J. Soc. Chem. Ind.*, **66**, 160 (1947).
- 97) D. W. ANDERSON JR. and C. R. FELLERS, *Food Res.*, **17**, 472 (1952).
- 98) M. YAMAGATA, K. HORIMOTO and G. NAGAOKA, *Food Technol.*, **24**, 92 (1952).
- 99) 佐々木林治郎・藤巻正生・小田切 敏, 農化, **27**, 424 (1953).
- 100) 河端俊治, 日水誌, **19**, 505 (1953).
- 101) 清水 亘・日引重幸・紫田 栄・武田一雄, 日水誌, **19**, 871 (1953).
- 102) M. SUYAMA and T. TOKUHIRO, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **19**, 1003 (1954).
- 103) M. ASANO and H. SATO, *Tohoku J. Agric. Res.*, **5**, 191 (1954).
- 104) W. O. KERMACK, H. LEES and J. D. WOOD, *Biochem. J.*, **60**, 424 (1955).
- 105) 遠藤金次・清水 亘, 日水誌, **21**, 127 (1955).
- 106) R. VENKATARAMA and S. T. CHARI, *Indian J. Fish.*, **2**, 37 (1955).
- 107) S. HORIE and Y. SEKINE, *J. Tokyo Univ. Fish.*, **42**, 25 (1956).
- 108) 鴻巣章二・秋山明子・森高次郎, 日水誌, **23**, 561 (1957).

- 109) W. SIMIDU and S. HIBIKI, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **23**, 255 (1957).
- 110) J. J. COHEN, M. A. KRUPP and C. A. CHIDSEY III, *Am. J. Physiol.*, **194**, 229 (1958).
- 111) N. K. VELANKAS and T. K. GOVINDAN, *Proc. Indian Acad. Sci.*, **47**, 202 (1958).
- 112) T. OKAICHI, M. MANABE and Y. HASHIMOTO, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **25**, 136 (1959).
- 113) R. LOVE, J. A. LOVERN and N. R. JOHNES, *Food Invest. Sp. Rep.*, No.69, 37 (1959).
- 114) 進藤淑子・橋本迪代, 家政学研究, **6**, 58 (1958).
- 115) 佐藤良裕, 日水誌, **26**, 312 (1960).
- 116) C. TESTA e G. SIMONGINI, *Atti Soc. Ital. Sci.*, **14**, 469 (1960).
- 117) S. KONOSU and Y. MAEDA, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **27**, 25 (1961).
- 118) 高木一郎・清水 亘, 日水誌, **28**, 1192 (1962).
- 119) H. SCHAFFER, *Helv. Wiss. Meeresunters.*, **8**, 258 (1962).
- 120) 長岡忠二郎・鈴木直辰, 冷凍, **37**, 338 (1962).
- 121) 遠藤金次・藤田真夫・清水 亘, 日水誌, **28**, 833 (1962).
- 122) 遠藤金次・藤田真夫・清水 亘, 日水誌, **28**, 1099 (1962).
- 123) 高木一郎・清水 亘, 日水誌, **29**, 66 (1963).
- 124) 坂口守彦・清水 亘, 日水誌, **30**, 1033 (1964).
- 125) C. KOIZUMI and Y. HASHIMOTO, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 439 (1965).
- 126) J. ARAKAKI and M. SUYAMA, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **32**, 74 (1966).
- 127) C. KOIZUMI, H. KAWAKAMI and J. NONAKA, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **33**, 131 (1967).
- 128) 高木光造・村上花子・遠藤繁子, 北大水産彙報, **18**, 261 (1967).
- 129) 高木光造・村上花子・遠藤繁子, 北大水産彙報, **18**, 268 (1967).
- 130) L. J. LEAD, *Biol. Bull.*, **135**, 537 (1968).
- 131) C. H. CASTELL and B. SMITH, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **30**, 91 (1973).
- 132) E. B. VAISEY, *Canadian J. Biochem. Physiol.*, **34**, 1085 (1956).
- 133) F. SOUDAN, Presented Paper at FAO International Conference on Fish in Nutrition, Washington, D. C., Sep., 19 (1961).
- 134) J. C. CRAIG, F. B. DWYER, A. N. GLAZER and C. HORNING, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1871 (1961).
- 135) J. P. FERRIS, R. D. GERWE and G. P. GOPSKI, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5270 (1967).
- 136) Y. HAYASHI, Y. NAGANO, S. HONGYO and K. TERAMURA, *Tetrahedron Letters*, **14**, 1299 (1974).
- 137) 大塚 滋, 私信.
- 138) 山田金次郎, 未発表.
- 139) G. A. REAY, C. L. CUTTING and J. M. SHEWAN, *J. Soc. Chem. Ind.*, **62**, 77 (1943).
- 140) J. M. SHEWAN, *Biochem. Soci. Sym.*, No.6, 28 (1951).
- 141) W. J. DYER, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **8**, 314 (1952).
- 142) H. S. GRONINGER, U. S. Fish and Wildlife Service, Sep. Sci. Report Fish., No.333, 22pp. (1959).
- 143) 山田金次郎, 日水誌, **33**, 591 (1967).
- 144) J. BYSTEDT, L. S. SWENNE and H. W. ASS, *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 301 (1959).
- 145) E. J. CONWAY, "Micro-diffusion Analysis and Volumetric Error", p.176, Crosby Lockwood and Son Ltd., London (1950).
- 146) 原田勝彦・山本良久・山田金次郎, 昭和45年度日本水産学会中国・四国支部11月例会にて発表 (1970).
- 147) T. NASH, *Biochem. J.*, **55**, 416 (1953).
- 148) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 149) 原田勝彦・山田金次郎, 水大研報, **19**, 95 (1971).
- 150) J. R. RACHELE, A. M. WHITE and H. GRÜNEWALD, *J. Biol. Chem.*, **239**, 353 (1964).
- 151) 中埜栄三, 電気泳動実験法 (青木・中埜・大井編) p.132, 広川書店, 東京 (1970).
- 152) 萩原文二, 酵素研究法 I (赤堀四郎編), p.106, 朝倉書店, 東京 (1954).

- 153) 萩原文二, 酵素研究法 I (赤堀四郎編), p.153, 朝倉書店, 東京 (1954).
- 154) K. YAMADA, K. HARADA and K. AMANO, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 227 (1969).
- 155) E. R. STADTMAN, G. D. NOVELLI and F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, **191**, 365 (1951).
- 156) C. R. PENZER and G. K. RADD, "Methods in Enzymology" (Edited by D. B. McCORMICK and L. D. WRIGHT), p. 479, Academic Press, New York and London (1971).
- 157) M. S. FISH, N. M. JOHNSON and E. C. HORNING, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3668 (1956).
- 158) C. C. SWEELY and E. C. HORNING, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2520 (1957).
- 159) W. R. FRISSELL, C. W. CHUNG and C. G. MACKENZIE, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1297 (1959).
- 160) 山本為親訳, J. F. WALKER 著, ホルムアルデヒド, p. 271, 槇書店, 東京 (1964).

Appendix 1. Comparative list of Japanese and scientific names of the aquatic animals described.

| Japanese Name | Scientific name | Japanese Name | Scientific name |
|--------------------|------------------------------------|--------------------|---|
| COELENTERATA | COELENTERATA | Murasakiigai | <i>Mytilus edulis</i> |
| Beniumitosaka | <i>Alcyonium gracillimum</i> | Igai | <i>Mytilus corus</i> |
| Birōdotogetosaka | <i>Dendronephthya habereri</i> | Azumanishikigai | <i>Chlamys farreri</i> |
| ANNELIDA | ANNELIDA | Kinchakugai | <i>Decatopecten striatus</i> |
| Isogokai | <i>Perimereis brevicirris</i> | Akoyagai | <i>Pinctada fucata</i> |
| Sugokaiisome | <i>Diopatra sugokai</i> | Itayagai | <i>Pecten albicans</i> |
| Iwamushi | <i>Marphysa sanguinea</i> | Iwagaki | <i>Crassostrea nippona</i> |
| Chinchirofusagokai | <i>Loimia medusa</i> | Magaki | <i>Crassostrea gigas</i> |
| TENTACULATA | TENTACULATA | Yamatoshijimi | <i>Corbicula japonica</i> |
| Tatesujihōzukigai | <i>Coptothyris grayi</i> | Awajishijimi | <i>Corbicula leana awajiensis</i> |
| Fusakokemushi | <i>Bugula neritina</i> | Hamaguri | <i>Meretrix lussoria</i> |
| MOLLUSCA | MOLLUSCA | Shinahamaguri | <i>Meretrix petechialis</i> |
| Kaminariika | <i>Sepia Lycidas</i> | Asari | <i>Tapes philippinarum</i> |
| Kōika | <i>Sepia esculenta</i> | Oniasari | <i>Protothaca jedoensis</i> |
| Hyōmonkōika | <i>Sepia pardalis</i> | Kuchibagai | <i>Caecella chinensis</i> |
| Himekōika | <i>Sepia kubiensis</i> | Kagamigai | <i>Phacosoma japonica</i> |
| Shishiika | <i>Sepia peterseni</i> | Bakagai | <i>Mactra chinensis</i> |
| Shiriyakeika | <i>Sepiella japonica</i> | Shiofukigai | <i>Mactra veneriformis</i> |
| Dangoika | <i>Sepioloa birostrata</i> | Mirukui | <i>Tresus keenae</i> |
| Aoriika | <i>Sepioteuthis lessoniana</i> | Mategai | <i>Solen strictus</i> |
| Yariika | <i>Doryteuthis bleekeri</i> | Akamategai | <i>Solen gordonis</i> |
| Mehikariika | <i>Loligo edulis</i> | Zarugai | <i>Vasticardium burchardi</i> |
| Budōika | <i>Loligo budo</i> | Ōnogai | <i>Mya arenaria oonogai</i> |
| Jindōika | <i>Loligo japonica</i> | Hizaragai | <i>Liolophura japonica</i> |
| Surumeika | <i>Todarodes pacificus</i> | Tokobushi | <i>Sulculus diversicolor aquatilis</i> |
| Sodeika | <i>Thysanoteuthis rhombus</i> | Kuroawabi | <i>Nordotis discus</i> |
| Madako | <i>Octopus vulgaris</i> | Madakaawabi | <i>Nordotis gigantea</i> |
| Tenagadado | <i>Octopus minor</i> | Mekaiawabi | <i>Nordotis gigantea sieboldii</i> |
| Iidako | <i>Octopus ocellatus</i> | Betsukōgasagai | <i>Cellana grata</i> |
| Kariganeegai | <i>Barbatia virescens</i> | Yomegakasagai | <i>Cellana foreuma</i> |
| Akagai | <i>Scapharca broughtonii</i> | Matsubagai | <i>Cellana nigrolineata</i> |
| Kumasarubō | <i>Scapharca globosa ursus</i> | Ebisugai | <i>Tristichotrochus uncus</i> |
| Sarubō | <i>Scapharca subcrenata</i> | Kubirekurotsukegai | <i>Monodonta perplexa</i> |
| Nunomeakagai | <i>Cucullaea labiata granulosa</i> | Ishidatamigai | <i>Monodonta labio</i> |
| Tamakigai | <i>Glycymeris vestita</i> | Kubogai | <i>Chlorostoma arygyrostoma lishkei</i> |
| Murasakiinkogai | <i>Septifer virgatus</i> | Koshitakagangara | <i>Omphalius rustica</i> |
| | | Ookoshitakagangara | <i>Omphalius pfeifferi carpenteri</i> |

Appendix 1. - (Cont'd)

| Japanese name | Scientific name | Japanese name | Scientific name |
|-----------------|---|-----------------------|-------------------------------------|
| Sazae | <i>Batillus cornutus</i> | Funamushi | <i>Ligia exotica</i> |
| Sugai | <i>Lunella coronata</i> | Koudakakudahigeebi | <i>Solenocera alticarinata</i> |
| Amagai | <i>Heminerita japonica</i> | Yoshiebi | <i>Metapenaneus monoceros</i> |
| Marutanishi | <i>Cipangopaludina chinensis malleata</i> | Saruebi | <i>Trachypenaeus curvirostris</i> |
| Tamakibigai | <i>Littorina brevicula</i> | Akaebi | <i>Metapenaeopsis barbata</i> |
| Oohebigai | <i>Serpulorbis imbricatus</i> | Minaminaebi | <i>Neocaridina denticulata</i> |
| Uminina | <i>Batillaria multiformis</i> | Oniteppōebi | <i>Alpheus rapax</i> |
| Kawanina | <i>Semisulcospira bensoni</i> | Tenagaebi | <i>Macrobrachium nipponense</i> |
| Henatarigai | <i>Cerithideopsila cingulata</i> | Amerikazarigani | <i>Procambarus clarki</i> |
| Futahenatarigai | <i>Cerithidae rhizophorarum</i> | Honyadokari | <i>Pagurus samuelis</i> |
| Shidorogai | <i>Doxander vittatus</i> | Togetsuhoyadokari | <i>Diogenes edwardsi</i> |
| Tsumetagai | <i>Neverita didyma</i> | Yokosujiyadokari | <i>Dardanus arrosor</i> |
| Himetsumetagai | <i>Neverita vesicalis</i> | Akahoshiyadokari | <i>Dardanus diogenes</i> |
| Biwagai | <i>Ficus subintermedia</i> | Hiraashikamuri | <i>Petalomera granulata</i> |
| Onisazae | <i>Chicoreus asianus</i> | Hirakoukaikamuri | <i>Conchoecetes artificiosus</i> |
| Akanishi | <i>Rapana thomasi</i> | Kimengani | <i>Dorippe dorsipes</i> |
| Reishigai | <i>Thais bronni</i> | Jūichitogekobushigani | <i>Arcania undecimspinoso</i> |
| Ibonishigai | <i>Thais clavigera</i> | Tenagakobushi | <i>Myra fugax</i> |
| Bai | <i>Babylonia japonica</i> | Meganekarappa | <i>Calappa philargius</i> |
| Isonina | <i>Japeuthria ferra</i> | Tsunogai | <i>Hyastenus diacanthus</i> |
| Mushirogai | <i>Niotha livescens</i> | Koshimagani | <i>Leptomithrax edwardsi</i> |
| Araregai | <i>Niotha clathratus</i> | Hishigani | <i>Lambrus validus</i> |
| Tengunishi | <i>Hemifusus ternatanus</i> | Dorogani | <i>Zalasia dromiaeformis</i> |
| Konaganishi | <i>Fusinus perplexus minor</i> | Higegani | <i>Jonas distincta</i> |
| Tsunomatagai | <i>Fusinus nigrostratus</i> | Gazami | <i>Portunus trituberculatus</i> |
| Touito | <i>Siphonalia fusoides</i> | Taiwangazami | <i>Portunus pelagicus</i> |
| Kisewatagai | <i>Philine argentata</i> | Ibogazami | <i>Portunus gladiator</i> |
| Amefurashi | <i>Aplysia kurodai</i> | Janomegazami | <i>Portunus sanguinolentus</i> |
| Umifukurō | <i>Pleurobranchaea novaezealandiae</i> | Ishigani | <i>Charybdis japonica</i> |
| Hikariumiushi | <i>Plocamopherus tilesii</i> | Akaishigani | <i>Charybdis miles</i> |
| Nishikiumiushi | <i>Ceratosoma cornigerum</i> | Futahoshiishigani | <i>Charybdis bimaculata</i> |
| Madaraumiushi | <i>Dendrodis rubra nigromaculata</i> | Futahabenitsukegani | <i>Thalamita sima</i> |
| Monoaragai | <i>Radix auricularis japonicus</i> | Benihoshimanjūgani | <i>Liagore rubromaculata</i> |
| Usukawaimai | <i>Acusta despecta</i> | Urokoōgigani | <i>Xantho reynaudii</i> |
| ARTHROPODA | ARTHROPODA | Enkōgani | <i>Carcinoplax longimanus</i> |
| Kabutogani | <i>Tachypleus tridentatus</i> | Menagaenkōgani | <i>Ommatocarcinus mecgillivrayi</i> |
| Kamenote | <i>Mitella mitella</i> | Sawagani | <i>Potamon dehaani</i> |
| Kurofujitsubo | <i>Tetraclita squamosa japonica</i> | Iwagani | <i>Pachygrapsus crassipes</i> |
| | | Mokuzugani | <i>Eriocheir japonicus</i> |
| | | Isogani | <i>Hemigrapsus sanguineus</i> |
| | | Kefusaisogani | <i>Hemigrapsus penicillatus</i> |

Appendix 1. - (Cont'd)

| Japanese name | Scientific name | Japanese name | Scientific name |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------|--|
| Akategani | <i>Sesarma haemalocheir</i> | Shibireei | <i>Narke japonica</i> |
| Tarabagani | <i>Paralithodes camtschaticus</i> | Sakatazame | <i>Rhinobatos schlegeli</i> |
| Shako | <i>Squilla oratoria</i> | Uchiwazame | <i>Platyrrhina sinensis</i> |
| Sesujishako | <i>Squilla costata</i> | Dobukasube | <i>Breviraja smirnovi</i> |
| | | Hirataei | <i>Urolophus aurantiacus</i> |
| | | Tobiei | <i>Holorhinus tobijeii</i> |
| ECHINODERMATA | ECHINODERMATA | | |
| Nipponumishida | <i>Comanthus japonica</i> | Konoshiro | <i>Konosirus punctatus</i> |
| Okinotezurumozuru | <i>Gorgonocephalus caryi</i> | Maiwashi | <i>Sardinops melanosticta</i> |
| Momijigai | <i>Astropecten scoparius</i> | Katakuchiiwashi | <i>Engraulis japonica</i> |
| Togemomijigai | <i>Astropecten polyacanthus</i> | Yamabe | <i>Onchorhynchus masou</i> var. <i>ishikawae</i> |
| Yatsudesunahitode | <i>Luidia maculata</i> | | |
| Hoshihitode | <i>Stellaster equestris</i> | Nijimasu | <i>Salmo gairdnerii irideus</i> |
| Akahitode | <i>Certanaroda semiregularis</i> | Ayu | <i>Pleucoglossus altivelis</i> |
| Itomakihitode | <i>Asterina pectinifera</i> | Urumeiwashi | <i>Etrumeus micropus</i> |
| Hitode | <i>Asterias amurensis</i> | Sanma | <i>Cololabis saira</i> |
| Gangaze | <i>Diadema setosum</i> | Hoshinoeso | <i>Synodus hoshinonis</i> |
| Sunshōuni | <i>Temnopleurus toleumaticus</i> | Okieso | <i>Trachinocephalus myops</i> |
| Harisanshōuni | <i>Temnopleurus reevesi</i> | Maeso | <i>Saurida undosquamis</i> |
| Rappauni | <i>Toxopneustes pileolus</i> | Wanieso | <i>Saurida tumbil</i> |
| Akauni | <i>Pseudocentrotus depressus</i> | Zenitanago | <i>Pseudoperilampus typus</i> |
| Bafununi | <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> | Kamatsuka | <i>Pseudogobio esocinus</i> |
| Murasakiuni | <i>Anthocidaris crassispina</i> | Oikawa | <i>Zacco platypus</i> |
| Takonomakura | <i>Clypeaster japonicus</i> | Kawamutsu | <i>Zacco temminckii</i> |
| Fujinamako | <i>Holothuria monacaria</i> | Koi | <i>Cyprinus carpio</i> |
| Manamako | <i>Stichopus japonicus</i> | Funa | <i>Carassius carassius</i> |
| Okinagumimodoki | <i>Amphicyclus japonicus</i> | Dojō | <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> |
| Moguranamako | <i>Pentadactyla japonica</i> | Namazu | <i>Parasilurus asotus</i> |
| | | Gonzui | <i>Plotosus anguillaris</i> |
| PROTOCHORDATA | PROTOCHORDATA | Gigi | <i>Pelteobagrus nudiceps</i> |
| Itaboya | <i>Botrylloides violaceus</i> | Unagi | <i>Anguilla japonica</i> |
| Shiroboya | <i>Styela plicata</i> | Maanago | <i>Conger myriaster</i> |
| Eboya | <i>Styela clava</i> | Mongaradōshi | <i>Microdonophis erabo</i> |
| Karasuboya | <i>Pyura vittata</i> | Susumihebi | <i>Ophichthus urolophus</i> |
| Mihaeruboya | <i>Pyura michaelseni</i> | Dainanumihebi | <i>Ophisurus macrorhynchus</i> |
| Beniboya | <i>Herdmania momus</i> | Amiutsubo | <i>Gymnothorax reticularis</i> |
| | | Ginanago | <i>Rhynchocymba nystromi</i> |
| VERTEBRATA | VERTEBRATA | Medaka | <i>Oryzias latipes</i> |
| Dochizame | <i>Triakis scyllia</i> | Datsu | <i>Belone anastomella</i> |
| Hoshizame | <i>Mustelus manazo</i> | Matsukasauo | <i>Monocentris japonicus</i> |
| Akaei | <i>Dasyatis akajei</i> | Gusokudai | <i>Ostichthys japonicus</i> |
| Shirozame | <i>Mustelus griseus</i> | | |

Appendix 1. - (Cont'd)

| Japanese name | Scientific name | Japanese name | Scientific name |
|----------------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Matodai | <i>Zeus japonicus</i> | Akahaze | <i>Chaeturichthys hexanema</i> |
| Bora | <i>Mugil cephalus</i> | Sasanohabera | <i>Pseudolabrus japonicus</i> |
| Masaba | <i>Scomber japonicus</i> | Kyūsen | <i>Halichoeres poecilopterus</i> |
| Tachiuo | <i>Trichurus lepturus</i> | Honbera | <i>Halichoeres tenuispinis</i> |
| Maaji | <i>Trachurus japonicus</i> | Nishikibera | <i>Thalassoma cupido</i> |
| Kaiwari | <i>Kaiwarinus equula</i> | Umazurahagi | <i>Navodon modestus</i> |
| Okihiragi | <i>Leiognathus rivulata</i> | Hakofugu | <i>Ostracion tuberculatus</i> |
| Hiragi | <i>Leiognathus nuchalis</i> | Sabafugu | <i>Lagocephalus lunaris spadiceus</i> |
| Ishigakidai | <i>Oplegnathus punctatus</i> | Kusafugu | <i>Fugu niphobles</i> |
| Ishidai | <i>Oplegnathus fasciatus</i> | Mafugu | <i>Fugu vermiculare porphyreum</i> |
| Himeji | <i>Upeneus bensasi</i> | Kawahagi | <i>Stephanolepis cirrhifer</i> |
| Akatachi | <i>Acanthocephala krusensterni</i> | Komonfugu | <i>Fugu poëcilonotum</i> |
| Iitenakatachi | <i>Acanthocephala limbata</i> | Higanfugu | <i>Fugu pardale</i> |
| Kinnguchi | <i>Pseudasciaena manchurica</i> | madara | <i>Gadus macrocephalus</i> |
| Tenjikudai | <i>Apogon lineatus</i> | Usumebaru | <i>Sebastes thompsoni</i> |
| Teppoishimochi | <i>Apogon kiensis</i> | Kasago | <i>Sebastiscus marmoratus</i> |
| Nenbutsudai | <i>Apogon semilineatus</i> | Hachi | <i>Apistus carinatus</i> |
| Mutsu | <i>Scombrops boops</i> | Himeokoze | <i>Minous monodactylus</i> |
| Ara | <i>Niphon spinosus</i> | Oniokoze | <i>Inimicus japonicus</i> |
| Mahata | <i>Epinephelus septemfasciatus</i> | Darumaokoze | <i>Erosa erosa</i> |
| Ishimochi | <i>Argyrosomus argentatus</i> | Haokoze | <i>Hypodytes rubripinnis</i> |
| Kisu | <i>Sillago sihama</i> | Kujime | <i>Agrammus agrammus</i> |
| Kuromejina | <i>Cirella melanichthys</i> | Ainame | <i>Hexagrammos otakii</i> |
| Mejina | <i>Cirella punctatus</i> | Onigochi | <i>Onigocia spinosa</i> |
| Isuzumi | <i>Kyphosus lembus</i> | Megochi | <i>Suggrundus meerdervoorti</i> |
| Isaki | <i>Parapristipoma trilineatum</i> | Asahianahaze | <i>Pseudoblennius cottoides</i> |
| Madai | <i>Pagrus major</i> | Hōbō | <i>Chelidonichthys kumu</i> |
| Kurodai | <i>Acanthopagrus schlegelii</i> | Kanagashira | <i>Lepidotrigla microptera</i> |
| Kurakakegisu | <i>Neopercis sexfasciata</i> | Hirame | <i>Paralichthys olivaceus</i> |
| Toragisu | <i>Cilius pulchella</i> | Tamaganzōbirame | <i>Pseudorhombus pentophthalmus</i> |
| Wanigisu | <i>Champsodon snyderi</i> | Meitagarei | <i>Pleuronichthys cornutus</i> |
| Mishimaokoze | <i>Uranoscopus japonicus</i> | Makogarei | <i>Limanda yokohamae</i> |
| Nezuppo | <i>Callionymus lunatas</i> | Sasaushinoshita | <i>Heteromycteris japonicus</i> |
| Yomegochi | <i>Callionymus japonicus</i> | Tobisasaushinoshita | <i>Aseraggodes kobensis</i> |
| Nezumigochi | <i>Callionymus punctatus</i> | Kuroushinoshita | <i>Paraplagusia japonica</i> |
| Tobinumeri | <i>Callionymus beniteguri</i> | Genko | <i>Cynoglossus interruptus</i> |
| Shimaitachiuo | <i>Neobythites fasciatus</i> | Kiankō | <i>Lophius litulon</i> |
| Yoroiitachiuo | <i>Hoplobrotula armata</i> | Ankō | <i>Lophiomus setigerus</i> |
| Itohikihaze | <i>Cryptocentrus filifer</i> | Hanaokoze | <i>Histrio histrio</i> |
| Chagara | <i>Pterogobius zonoleucus</i> | | |

Studies on Enzyme Catalyzing the Formation of Formaldehyde and
Dimethylamine in Tissues of Fishes and Shells

By
Katsuhiko HARADA

SUMMARY

Numerous researchers have investigated the bacterial reduction of trimethylamine oxide (TMO) to trimethylamine in fishes and shells to find an adequate method of evaluating spoilage of these organisms. Apart from these investigations, it has been demonstrated that small amounts of dimethylamine (DMA) are produced also from TMO in the muscle of some species of fish during the storage at refrigerated temperature. In this kind of work it was never obviously established whether DMA was formed as the result of bacterial activity or by an enzyme native to the tissue. In recent years it has been clarified that in some tissues of gadoid and akin fishes there is an enzyme, TMO-ase, which catalyzes the breakdown of TMO into formaldehyde (FA) and DMA. The elucidation of chemical properties of this enzyme and the reaction mechanism of the breakdown will be of great value not only from the viewpoint of biochemistry of marine organisms, but also from the standpoint of food hygiene.

In this connection, the author first attempted to make clear the distribution of TMO-ase in aquatic animals, and found that the tissues of lizardfish, as well as gadoid species, are suitable as the materials for the preparation of this enzyme. The enzyme was partially purified and its some chemical properties were examined. Furthermore the formation of FA and DMA in non-enzymic catalysts was investigated. Based on the findings brought out, the enzymic reaction mechanism on the formation of FA and DMA from TMO was followed up by the methods of electronic theory of valence and simulation.

The results obtained from these experiments are summarized as follows;

Identification of formaldehyde and dimethylamine in tissues

Two different convenient methods based on thin-layer chromatography were developed to identify FA and DMA which circumstantially occur in the tissues of aquatic animals.

In the identification of FA, alkanals in muscle were converted to 2,4-dinitrophenylhydrazones. The hydrazones thus obtained were applied on silica gel G plates and developed with the solvent consisting of n-hexane-ethanol-acetic acid (90:10:3). The confirmatory evidence of FA in the tissue was successfully obtained from the parallel experiments conducted with authentic hydrazones. From the results, it was found that FA exists in quite small amounts in all of the tissue so far as examined except in the tissue of cyprinid, *Carassius auratus*. The minimum detectable amount of FA in muscle was 0.3 μ g/g.

With respect to the identification of DMA, the volatile amines in tissues were applied on silica gel G plates, and developed with the mixture of ethanol-hydrochloric acid (10:1). The amines developed were detected with Dragendorff reagent. DMA was identified by comparison with the experiment performed with an authentic sample.

Of the species examined, only three, *i.e.*, cod, *Gadus macrocephalus*, squids, *Todarodes pacificus* and *Doryteuthis bleekeri*, were proved to contain DMA in their tissues. The minimum detectable amount of DMA in muscle was 1.0 μ g/g.

Distribution of trimethylamine oxide in aquatic animals

In order to examine systematically the distribution of TMO in fish and shells inhabiting in Japanese waters, the samples covering roughly 180 species were analyzed.

The molluscan decapods showed, as a rule, high TMO contents in the mantle muscle, which were comparable to that of elasmobranchs, irrespective of lower contents of the same tissue of molluscan octopods. The contents of TMO in different tissues of decapods varied in the following order.

Mantle muscle > arm muscle > mid-gut gland

Of the shells examined, two of bivalvs, *Pecten albicans* and *Vasticardium burchardi*, and one of gastropods, *Tristichotrochus unicus* were proved to contain an appreciable amount of TMO, but it was found that the others contained either a little amount of TMO or not any.

Of the arthropods examined, crayfish, *Procambarus clarki* contained TMO in a considerable amount in spite of its inhabitancy in freshwater.

Regarding fishes, *i.e.*, teleosts and elasmobranchs, the determination of TMO in nearly 60 species is demonstrated. The content of TMO in the muscle of saltwater fishes was highest in Rajida, lowest in Clupeida and Tetraodontida, being intermediate in Anguillida, Percida, Cottida and Pleuronectida. In the muscle of freshwater fishes, TMO content was nearly undetectable.

Distribution of TMO-ase in aquatic animals

The screening test of TMO-ase distribution in the aquatic animals totaling about 300 species was done for their muscle, liver and viscera. Lizardfish, *Saurida tumbil* was the only kind of fish demonstrating the high ability to produce FA and DMA from TMO in its tissues.

Somewhat lower ability was found in Japanese John Dory, *Zeus japonicus*, in addition to some organisms belonging to the phylum of Mollusca.

Purification and properties of TMO-ase

The partial purification and some of the properties of TMO-ase were examined. Since the liver of lizardfish was shown to exhibit the activity, it was selected for use in the purification of the enzyme. The enzyme was partially purified in terms of preparation I, II and III. In the preparation III, no suspended materials were included in contrast with the turbid preparation I and II.

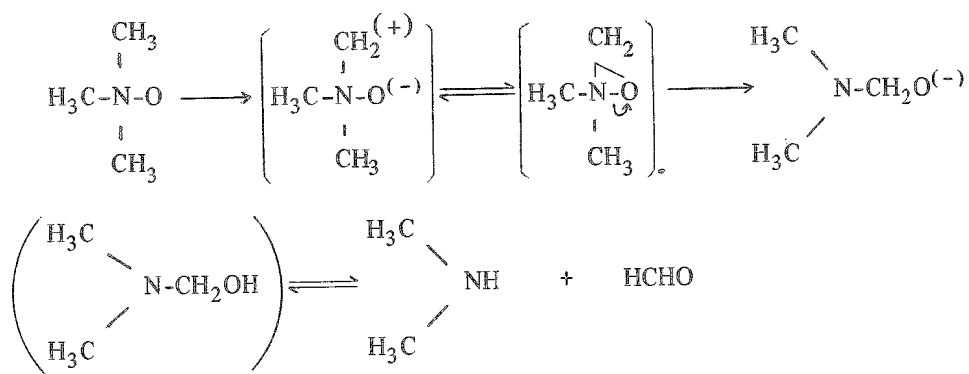
Two fractions of enzyme-protein and cofactor were eluted with water from the column fitted with Sephadex G-50 fine on which the preparation II had been applied. From the further chromatographic separation of the cofactor fraction, it was found that

the cofactor is not single substance, but consists of at least two. The cofactor is of heat-tolerant nature, and distributed in the liver and mid-gut gland of various species of marine animals. The enzyme-protein fraction was divided into two components, *i.e.*, supernatant and precipitate by alkaline treatment. The enzymic activity of supernatant and precipitate was inconsiderable, while that of the mixture comprised of both components enhanced to the same extent as that of the preparation II. It is, therefore, conceivable that the formation of FA and DMA from TMO is due to the activities of multi-enzyme.

Mechanism of the formation of formaldehyde and dimethylamine in tissues

At various experimental conditions, the substrate decreased and increase of the products bare an equimolecular relation to each other. It was also found that leuco-methylene blue and flavins increased the formation of the products in distinguishable extents. The investigations of various non-enzymic catalysts resulted in discovering the intensive activity of tris(hydroxymethyl)aminomethane-dibasic acid-sodium hydroxide in the formation of FA and DMA from TMO.

Adopting the electronic theory of valence and the simulation with computer to the results described above, the following reaction formula is presented:



Untersuchungen über die Bildung von Formaldehyd und Dimethylamin
 katalysierende Enzym in Geweben von Fischen und Muscheln

Von
 Katsuhiko HARADA

Zusammenfassung

Viele Forscher haben die bakterielle Reduktion von Trimethylaminoxid (TMO) zu Trimethylamin in Fischen und Muscheln studiert, um eine adäquate Methode zur Einschätzung der Zersetzung dieser Lebewesen zu finden. Neben diesen Forschungen wurde schon bewiesen, daß kleine Mengen von Dimethylamin (DMA) auch aus TMO im Muskel mancher Spezies von Fischen während der Aufbewahrung bei Kühltemperaturen gebildet werden. Jedoch in dieser Art von Referaten wurde niemals deutlich, ob DMA als Resultat bakterieller Aktivität oder durch ein natürliches Enzym der Gewebe entsteht. In den letzten Jahren hat man nun geklärt, daß in Geweben der Dorsche und ähnlicher Fische ein Enzym vorhanden ist, die TMO-ase, welche die Spaltung des TMO zu Formaldehyd (FA) und DMA katalysiert. Die Aufdeckung der chemischen Eigenschaften und des Reaktionsmechanismus würde von großem Wert sein, nicht nur unter dem Aspekt der Biochemie mariner Organismen sondern auch vom Standpunkt der Lebensmittelhygiene aus.

In diesem Zusammenhang versuchte der Verfasser zuerst, die Verteilung der TMO-ase in aquatischen Tieren zu klären, wobei sich das Gewebe des Eidechsenfisches ebenso wie das von Dorsch Spezies als geeignet zur Enzymgewinnung erwies. Das Enzym wurde teilweise gereinigt, und einige seiner chemischen Eigenschaften wurden geprüft. Zudem erforschte man die Bildung von FA und DMA mit nicht-enzymatischen Katalysatoren. Auf dieser Basis wurde der enzymatische Reaktionsmechanismus bei der Bildung von FA und DMA aus TMO durch die Anwendung der Elektronentheorie der Valenz und durch Computersimulation verfolgt.

Die Ergebnisse dieser Experimente werden im folgenden zusammengefaßt.

Nachweis von Formaldehyd und Dimethylamin in Geweben

Zwei bequeme Methoden auf Basis der Dünn-Schicht-Chromatographie wurden entwickelt, um FA und DMA in Geweben aquatischer Tieren zu identifizieren.

Beim Nachweis von FA wurden die Alkanale im Muskel zu 2,4-Dinitrophenylhydrazonen umgewandelt. Die so gewonnenen Hydrazone wurden auf Silika-Gel-Platten aufgetragen und mit n-Hexan-Äthanol-Essigsäure(90:10:3) als Lösungsmittel entwickelt. Der Nachweis von FA im Gewebe wurde aus parallelen Experimenten mit reinen Hydrazonen gewonnen. Die Resultate zeigten, daß FA in sehr kleinen Mengen in allen, soweit untersuchten Geweben außer dem von *Carassius auratus*(Karausche) vorhanden ist. Die minimale nachweisbare Menge von FA im Muskel betrug 0.3 µg/g.

Zur Identifikation von DMA wurden die flüchtigen Amine der Gewebe auf Silika-Gel-G Platten aufgetragen und mit einer Mischung von Äthanol-Salzsäure(10:1) entwickelt. Die entwickelten Amine wurden mit Dragendorff-Reagenz nachgewiesen. Die DMA wurde durch Vergleich mit Experimenten an authentischen Mustern identifiziert. Bei den untersuchten Spezies wiesen nur drei, d.h., *Gadus macrocephalus*(Kabeljau), *Todarodes pacificus* und *Dorytheuthis bleekeri*(Tintenfische), DMA in ihren Geweben auf. Die minimale nachweisbare Menge von DMA im Muskel betrug 1.0 µg/g.

Verbreitung von Trimethylaminoxid in aquatischen Tieren

Um die Verbreitung von TMO in Fischen und Muscheln der japanischen Gewässer systematisch zu untersuchen, wurden Proben von ungefähr 180 Spezies analysiert.

Die Mollusken-Decapoden wiesen in der Regel einen hohen TMO-Gehalt im Mantelmuskel auf, welcher vergleichbar mit dem der Elasmobranchien war, aber niedriger als bei Mollusken-Oktopoden. Der Gehalt an TMO in verschiedenen Geweben von Dekapoden variierte in folgender Reihenfolge:

Mantelmuskel > Armmuskel > Mittel-Darmdrüse

Bei den untersuchten Muscheln konnte gezeigt werden, daß zwei der Mollusken-Bivalven, *Pecten albicans* und *Vasticardium burchardi*, und eine der Mollusken-Gastropoden, *Tristichotrochus unicus*, eine annehmbare Menge von TMO enthalten, der Rest aber entweder nur kleinste Mengen oder überhaupt nichts aufwies.

Unter den untersuchten Arthropoden, hatte *Procambarus clarki*(Bachkrebs), obwohl diese Spezies im Süßwasser lebt, eine beträchtliche Menge TMO.

In bezug auf Fische, besonders Teleosten und Elasmobranchien, wurde das Vorhandensein von TMO in beinahe 60 Spezies demonstriert. Der Gehalt von TMO im Muskel von Salzwasserfischen war in Rajida am höchsten, am niedrigsten in Clupeida und Tetraodontida; Anguillida, Percida, Cottida und Pleuronectida lagen dazwischen. Im Muskel von Süßwasserfischen konnte TMO fast nicht nachgewiesen werden.

Verbreitung von TMO-ase in aquatischen Tieren

Die Bestimmung der TMO-ase Verbreitung wurde bei etwa 300 Spezies aquatischer Tiere in Muskel, Leber und Eigeweiden durchgeführt. *Saurida tumbil*(Eidechsenfisch) war die einzige Art von Fischen, die eine große Fähigkeit hatte, FA und DMA aus TMO im Gewebe zu bilden. Eine etwas geringere Fähigkeit wurde bei *Zeus japonicus*(Japanischer John Dory) vorgefunden, außerdem bei einigen Organismen die zur Klasse der Mollusken gehörten.

Reinigung und Eigenschaften der TMO-ase

Eine partielle Reinigung wurde vorgenommen und die manche Eigenschaften von TMO-ase wurden geprüft. Weil die Leber von *Saurida tumbil*(Eidechsenfisch) eine hohe Aktivität zeigte, wurde sie zur Reindarstellung des Enzyms ausgewählt. Die Enzym Präparationen wurden partiell auf drei Weisen, I, II und III durchgeführt. In der Präparation III wurden keine suspendierten Materialien eingeschlossen, im Gegensatz zu den getrübbten Präparationen I und II.

Aus einer mit Sephadex G-50(fein) gefüllten Säule, auf die die Präparation II aufgetragen worden war, konnten zwei Fraktionen von Enzym-Eiweiß und Kofaktor gewonnen werden.

Die weitere chromatographische Trennung der Kofaktor-Fraktion bewies, daß der Kofaktor nicht eine einzige Substanz ist, sondern mindestens aus zweien besteht. Der Kofaktor ist hitzbeständig, und in Leber und Mittel-Darmdrüse von verschiedenen Spezies mariner Tiere verbreitet. Die Enzym-Protein Fraktion wurde bei alkalischer Behandlung in zwei Komponenten getrennt, d.h., in Supernatant und Präzipitat. Die Aktivität von Supernatant und Präzipitat für sich war unbedeutend, die einer beide Bestandteile enthaltenden Mischung jedoch erhöht, und zwar im gleichen Maß wie die der Präparation II. Somit ist ersichtlich, daß die Bildung von FA und DMA aus TMO der Aktivität von Multi-Enzymen zugeschrieben werden kann.

Mechanismus der Bildung von Formaldehyd und Dimethylamin in Geweben

In den verschiedenen experimentellen Bedingungen stehen die Abnahme an Substrat und die Zunahme an Produkten in einer äquimolekularen Relation zueinander. Es zeigte sich, daß Leuko-Methylenblau und Flavine die Bildung von FA und DMA in verschiedenem Ausmaß katalysieren. Die Erforschung einiger nicht-enzymatischer Katalysatoren resultierte in der Entdeckung einer intensiven Aktivität von Tris(hydroxymethyl)amino-methan-dibasisch Säure-Natriumhydrat bei der Bildung von FA und DMA aus TMO.

Durch Anwendung der Elektronentheorie der Valenz und durch Computersimulation auf die oben beschriebenen Resultate kann folgender Reaktionsmechanismus festgesetzt werden:

