

カリガネエガイのホルムアルデヒドならびに ジメチルアミン生成酵素の性質について*

原 田 勝 彦・山 田 金次郎

Some Properties of a Formaldehyde and Dimethylamine-forming Enzyme
Obtained from *Barbatia virescens*

By

Katsuhiko HARADA and Kinjiro YAMADA

In the course of studies on the production of formaldehyde and dimethylamine in species of Bivalvian Mollusca, the production was demonstrated in *Barbatia virescens*, *i.e.*, the both substances were produced from trimethylamine oxide by the mediation of the visceral homogenate in the presence of methylene blue as an activator¹⁾. The mediating activity was assumed as the catalytic function of an enzyme system involved in tissues of this species.

For this reason, the possible mediation of an enzyme system and some of biochemical properties of this system have been examined. The results obtained are as follows:

1) The production by the visceral homogenate was confirmed to result from the reaction catalyzed by an enzyme system similar to that of gadoid-akin fishes and Cephalopoda species²⁻⁵⁾. However, the participation of co-factor was not recognized in this reaction, as opposed to the case of a gadoid-like species⁶⁾.

2) The production was always attended with the development of trimethylamine, but the development was confirmed to be an apparent event on the basis of a thin-layer chromatographic separation of produced amines.

* 水産大学校研究業績 第625号, 1971年1月18日 受理.

Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 625.

Received Jan. 18, 1971.

* 本報告では次の略号を用いる。トリメチルアミンオキシド, TMO; トリメチルアミン, TMA; ジメチルアミン, DMA; ホルムアルデヒド, FA.

1. 緒 言

著者らはさきに FA と DMA の生成が二枚貝類カリガネエガイに見出されたことを報告した¹⁾。この生成はタラ類^{2~4)}およびイカ類⁵⁾と同様、TMO を基質とする酵素作用によると推定される。よって、カリガネエガイの FA と DMA 生成における酵素の関与と、同酵素の性質につき若干の実験を行なった。その結果をここに報告する。

2. 実験方法および結果

2-1 試 料

下関市吉見海岸産のカリガネエガイを用いた。使用した試料はすべて生活反応を示すものであった。

2-2 硫酸アンモニウム塩析

カリガネエガイの FA と DMA 生成が酵素作用による可能性を確かめるため、硫酸アンモニウム塩析によるそれら生成能の変化を調べた。実験方法は次のとおりである。カリガネエガイ内臓に冷水を 1:2 の重量比で加え、ブレンダーにかけた。得られたホモジネートを二重ガーゼで口過し、その口液を検液 (粗酵素液と称する) とした。この検液を山田ら⁶⁾と同様の方法で塩析した。すなわち、粗酵素液を冷却下 16,000 × g で 30 分間遠心して上澄液を得、この上澄液 10 ml あてに硫酸アンモニウム 1~7 g を加え、2 時間氷水中に放置、ときどきかきまぜて塩析した。塩析後、12,000 × g で再び冷却下で遠心し、その上澄液をとり、この検液につき FA, DMA および TMA 生成能を山田ら⁷⁾の方法によって測定した。その方法は次のとおりである。基質として 0.1M TMO 0.5 ml, 反応促進剤として 0.001M メチレン青 0.25 ml および MCLVAINE リン酸緩衝液 (pH 6.1) 3.75 ml をツンベルグ管の主室にとり、検液 0.5 ml 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 120 分間インキュベートした。インキュベート後、20% トリクロル酢酸 5 ml を加えて口過した。口液について FA, DMA および TMA の定量を行ない、あわせて塩析上澄液のタンパクを定量した。FA, DMA および TMA の定量はそれぞれアセチルアセトン法⁸⁾、ジチオカルバメート銅複塩法⁹⁾ および CONWAY 微量拡散法¹⁰⁾ により、タンパクの定量は FOLIN 法¹¹⁾ による。

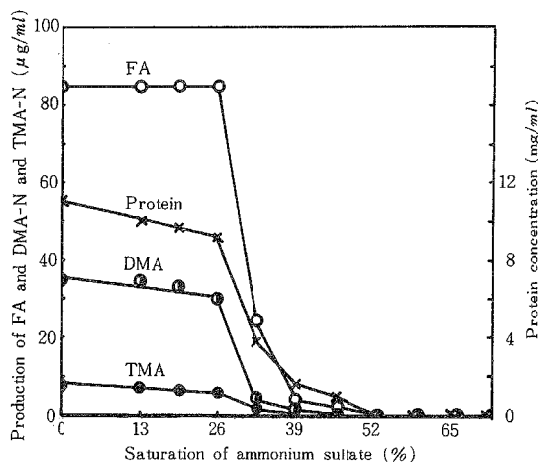


Fig. 1. Salting-out of the visceral homogenate of *Barbatia virescens*.

System, anaerobic by the use of Thunberg tubes, incubation at 26°C for 120 minutes, 0.5 ml of the supernatant of the salted-out homogenate in the hollow stopper, and 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, 3.75 ml of MCLVAINE's phosphate buffer (pH 6.1) in the main tube. Protein determination was done in the supernatant.

この実験において FA と DMA の生成とあわせて TMA の生成を調べた理由は、マダラ幽門垂³⁾およびイカ中腸腺⁵⁾で FA と DMA の生成とともに TMA も生じ、前二者の生成に TMA 生成の関与が考えられたため

である。

結果は第1図のとおりである。この図から三物質の生成に関与するタンパク、すなわち酵素が硫酸アンモニウム飽和度 0.26~0.39 (2~3 g 硫酸アンモニウム/10ml) で塩析されることがわかる。

次に、スケトウダラの場合⁶⁾と同様、塩析上澄液中に co-factor が存在するかを山田ら⁶⁾と同様の方法を用いて検討した。すなわち、硫酸アンモニウム飽和度 0.26~0.39 で沈殿する区分を蒸留水に溶解した溶液と、それに沈殿の上澄液を加えた溶液との二検液について FA, DMA と TMA 生成能を調べた。この方法は次のとおりである。ツンベルグ管主室に塩析上澄液 0.5ml, 0.1M TMO 0.5ml, 0.001 M メチレン青 0.25 ml, MCILVAINE リン酸緩衝液 (pH 6.1) 3.25 ml をとり、塩析粗酵素液を副室に加え、前実験と同様に処理して三物質の生成を測定した。結果は第2図のとおりである。この図から、カリガネエガイの酵素はスケトウダラと相違し co-factor を必要としないことがわかる。なお、硫酸アンモニウム飽和度 0.26~0.39 で沈殿する区分の生成能は、その区分の水溶液を 60℃, 30分間加熱することにより完全に失活することを確かめた。

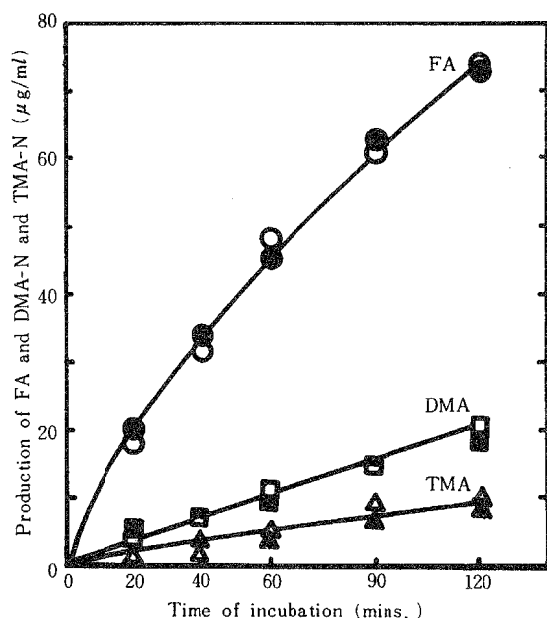


Fig. 2. Production of FA, DMA and TMA by salted-out crude enzyme with or without supernatant.

System, anaerobic, incubation at 26°C for 120 minutes, 0.5 ml of the salted-out crude enzyme (a fraction precipitated at 26~39 per cent saturation of ammonium sulfate), 0.5 ml of the supernatant (replaced with distilled water in the control sample), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 6.1) to 5.0 ml.

○, △ and □, in the reaction mixture containing the salted-out crude enzyme and the supernatant. ●, ▲ and ■, in the control sample.

2-3 透 析

前実験の結果によると、カリガネエガイの酵素は

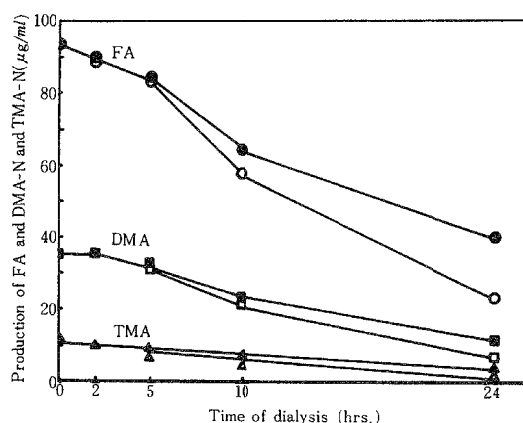


Fig. 3. Production of FA, DMA and TMA by dialyzed crude enzyme.

System, anaerobic, incubation at 26°C for 120 minutes, 0.5 ml of the dialyzed crude enzyme (in the control sample, replaced with the crude enzyme not dialyzed and stored for the same time-intervals as the dialyzation), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 6.1) to 5.0 ml.

○, △ and □, in the mixture containing the dialysate, ●, ▲ and ■, in the control sample.

スケトウダラと相違して co-factor を必要としないことが明らかとなったが、さらに透析により co-factor の存在を確かめた。

まず、透析粗酵素液について FA, DMA ならびに TMA の生成能を調べた。すなわち、粗酵素液 2ml をそれぞれ 8 個のセルロースチューブ (Visking Co., size 8/32) にとり、そのうちの 4 個は 500ml の冷水

Table 1. Production of FA, DMA and TMA by dialyzed crude enzyme with or without diffusate.

	Production of		
	FA	DMA-N	TMA-N
		$\mu\text{g} / \text{ml}$	
Dialysate	37	14	4
Dialysate + Diffusate *	36	14	4
Dialysate	41	11	5
Dialysate + Diffusate **	38	10	5

*Concentrated at 100°C.

**Concentrated at the temperatures below 2°C.

System, anaerobic, incubation at 26°C for 120 minutes, 0.5 ml of the dialysate, 0.5 ml of the diffusate (replaced with distilled water in the control sample), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 6.1) to 5.0 ml.

(2°C) 中でかきまぜながら透析しつつ、2, 5, 10 および 24 時間後にとり出し、透析粗酵素液の三物質の生成能を調べた。なお、冷水は 2, 5, 10 および 17 時間目にとりかえた。他の 4 個のセルロースチューブは 2°C でそのまま放置して対照の検体とした。結果は第 3 図のとおりである。この図から、透析により粗酵素の活性が低下するが、その低下の度合は透析しない対照とほぼ同程度で co-factor の存在が認められないことがわかる。

次に、24 時間透析した粗酵素液に、100°C の常圧乾燥または約 2°C の凍結乾燥によって濃縮した透析外液を加え、この混合液の三物質生成能を山田ら⁷⁾の方法にしたがって調べた。第 1 表に示した結果からわかるように、透析外液添加によって酵素活性は増大しなかったため、co-factor の存在は認められない。

2-4 活性炭処理

カリガネエガイの酵素作用に co-factor が必要でないことをさらに確かめるため、活性炭による co-factor の吸着実験を行なった。方法は STADTMAN の CoA 吸着法¹²⁾ に準拠した。すなわち、粗酵素液を冷却下

Table 2. Effect of charcoal treatment of crude enzyme on the production of FA, DMA and TMA.

Treatment	Production of		
	FA	DMA-N	TMA-N
		$\mu\text{g} / \text{ml}$	
None	148	32	17
Charcoal (10 mg / ml)	145	31	16
" (30 mg / ml)	145	32	18
" (40 mg / ml)	145	31	17

System, 0.5 ml of the crude enzyme treated with charcoal (replaced with untreated enzyme in the control sample), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 6.1) to 5.0 ml.

16,000 × g で 30 分間遠心して得られた上澄液 5 ml に酸処理した活性炭 50, 150 または 200 mg を加え、4°C で 10 分間かきまぜ吸着させたのち遠心分離を行ない、得られた上澄液につき FA, DMA と TMA の生成能

を調べた。結果は第2表のとおりである。これからでも co-factor の存在は考えられない。なお、別に、上澄液 5ml に活性炭 50mg を加え 同上条件下で時間を変えて 120 分間まで吸着を行ない、吸着時間による生成能の変化を追跡した。この場合においても、生成能のわずかの低下がみられたに過ぎなかった。

2-5 最適温度と最適 pH

カリガネエガイの FA, DMA ならびに TMA 生成に関与する酵素の最適温度と最適 pH を次の方法によって求めた。粗酵素液 0.5ml, 0.1M TMO 0.5 ml, 0.001 M メチレン青 0.25 ml および MCILVAINE リン酸緩衝液 (pH 6.1) 3.75 ml をツンベルグ管にとり, FA, DMA および TMA 生成能測定の場合と同様に処理し反応温度を 12~55℃ に変化させその最適温度を求めた。第4図に示すように、最適温度は 45℃ であった。つぎに反応温度を 45℃ とし, MCILVAINE リン酸緩衝液の pH を 2.2~8.0 に変えた上記の反応液を用いて最適 pH を求めた。結果は第5図のとおりである。この結果から、最適 pH は 5.0 であることがわかった。

以上の結果により、反応温度を 45℃、反応液の pH を 5.0 とし、反応時間を変えた場合の三物質の生成を調べ第6図の結果を得た。この図から、三物質の生成は反応時間90分間ではほぼ一定値に達するこ

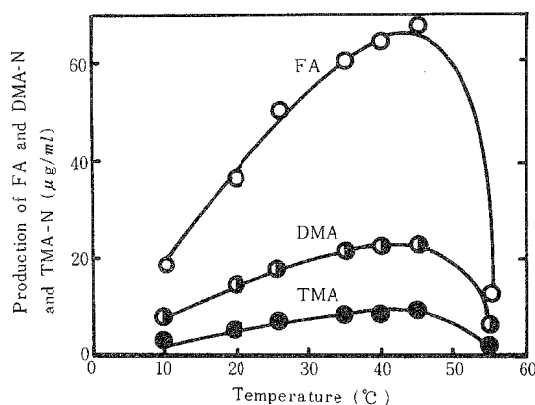


Fig. 4. Effect of temperature on the production of FA, DMA and TMA by crude enzyme.

System, anaerobic, incubation at different temperatures from 12 to 55°C for 120 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 6.1) to 5.0 ml.

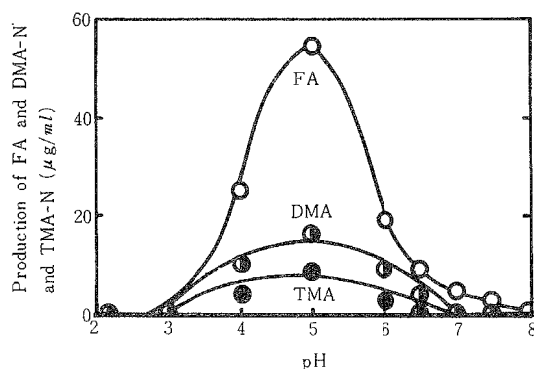


Fig. 5. Effect of pH on the production of FA, DMA and TMA by crude enzyme.

System, anaerobic, incubation at 45°C for 120 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer with different pH values from 2.2 to 8.0 to 5.0 ml.

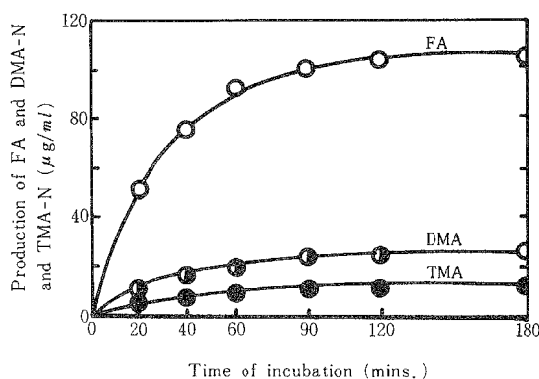


Fig. 6. Production of FA, DMA and TMA by crude enzyme at favorable condition.

System, anaerobic, incubation at 45°C for different intervals from 20 to 180 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 5.0) to 5.0 ml.

とがわかる。よって以後、三物質生成能の測定では pH 5.0 の MCILVAINE リン酸緩衝液を用い、反応温度 45℃、反応時間を 90 分間に変えた。

2-6 酵素の安定性

塩析粗酵素液についてその安定性を調べた。硫酸アンモニウム飽和度 0.26~0.39 で沈殿する区分を蒸留水に溶解した溶液 (2-2 参照) を 2℃ 付近で冷蔵し、一定日数後にとり出して塩析粗酵素液の FA, DMA および TMA 生成能を測定した。結果は第 7 図のとおりである。この結果から、DMA および TMA 生成能はほぼ平行して低下するが、FA 生成能では見かけ上、その低下が著しいことがわかる。

2-7 阻害剤の影響

FA, DMA および TMA 生成におよぼす各種阻害剤の影響をマロン酸, オキサロ酢酸, アデノシン硫酸, リボフラビン, シアン化ナトリウム, アジ化ナトリウム, ヒドロキシルアミン, α , α' -ジピリジル, ジエチル・ジチオカルバミド, チオ尿素, 8-オキシキノリンおよび EDTA について調べた。すなわち、粗酵素液 0.5 ml, 各濃度の阻害剤 (1~

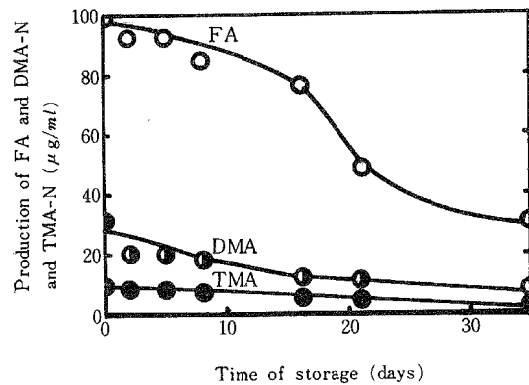


Fig. 7. Stability of salted-out crude enzyme at refrigerating temperature (2°C).

System, anaerobic, incubation at 45°C for 90 minutes, 0.5 ml of the salted-out crude enzyme, 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 5.0) to 5.0 ml.

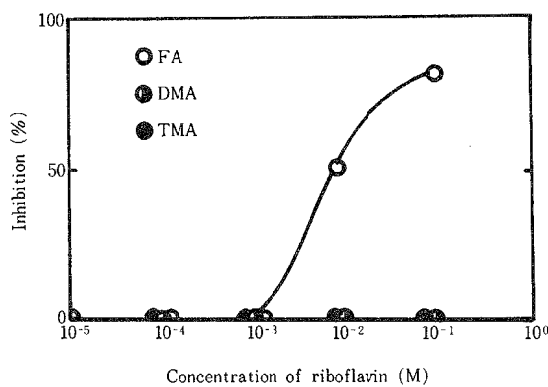


Fig. 8. Inhibiting effect of riboflavin on the production of FA, DMA and TMA by crude enzyme.

System, anaerobic, incubation at 45°C for 90 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of riboflavin (10^{-1} ~ 10^{-5} M), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 5.0) to 5.0 ml.

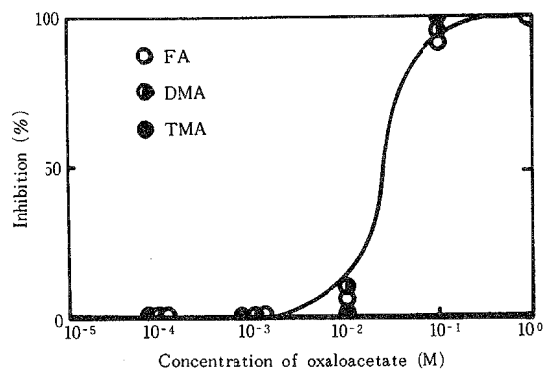


Fig. 9. Inhibiting effect of oxaloacetate on the production of FA, DMA and TMA by crude enzyme.

System, anaerobic, incubation at 45°C for 90 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of oxaloacetate (1 ~ 10^{-5} M), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 5.0) to 5.0 ml.

10^{-5} M) 0.5 ml, 0.1 M TMO 0.5 ml, 0.001 M メチレン青 0.25 ml および MCILVAINE リン酸緩衝液 3.25 ml を ツンベルグ管 にとり、反応後、FA, DMA および TMA 生成量を測定した。その結果、リボフラビンの

みが特異的に FA の生成を阻害したが, その他の阻害剤の濃度-阻害曲線は三物質生成に対しすべて同じようなパターンを示した。第 8 図はリボフラビンの濃度-阻害曲線, 第 9 および 10 図は被検阻害剤中の代表的な濃度-阻害曲線である。

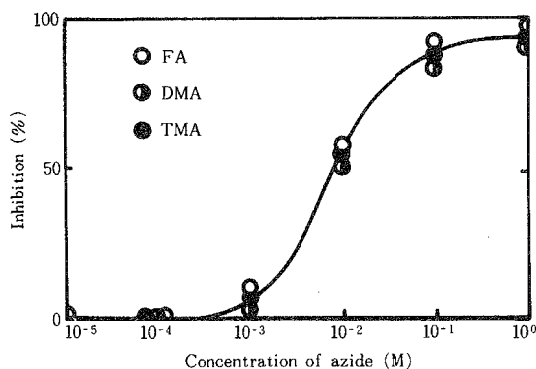


Fig. 10. Inhibiting effect of azide on the production of FA, DMA and TMA by crude enzyme.

System, anaerobic, incubation at 45°C for 90 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of sodium azide ($1 \sim 10^{-5}$ M), 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 5.0) to 5.0 ml.

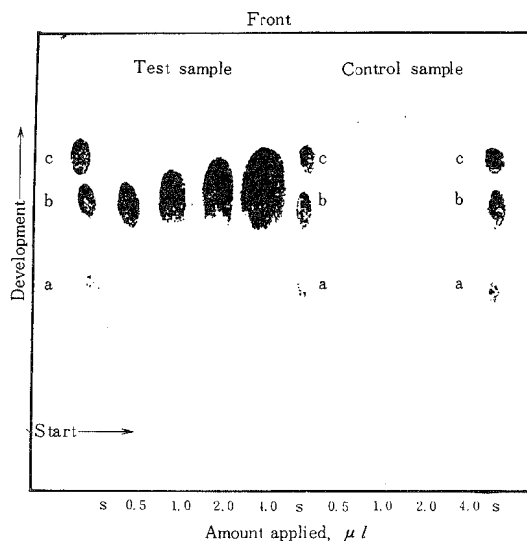


Fig. 11. Thin-layer chromatogram of volatile amines produced.

System, anaerobic, incubation at 45°C for 90 minutes, 0.5 ml of the crude enzyme, 0.5 ml of 0.1 M TMO (replaced with distilled water in the control sample), 0.25 ml of 0.001 M methylene blue, phosphate buffer (pH 5.0) to 5.0 ml.

s=authentic specimen (a, trimethylamine; b, dimethylamine; c, monomethylamine).

2-8 TMAの検出

CONWAY微量拡散法による TMA の定量法は, TMA とともに DMA の一部をも補そくする。よって, カリガネエガイにおける TMA の生成が見かけ上のものであるか否かを確かめるため, 次の実験を行なった。すなわち, 粗酵素液 0.5 ml, 0.1 M TMO 0.5 ml, 0.001 M メチレン青 0.25 ml および MCILVAINE リン酸緩衝液の反応混液につき, 薄層クロマトグラフィー¹³⁾ によって TMA の検出を行なった。なお, 対照として TMO を含まない反応混液を使用した。結果は第 11 区のとおりである。この図から, 粗酵素液の添加により TMO から DMA が生成するが, TMA が生じないことがわかる。

3. 考 察

カリガネエガイ内臓ホモジェネートを塩析すると FA と DMA 生成能が消失し, 得られた塩析タンパクに TMO を加えると FA と DMA が生成した (2-2)。このことは, カリガネエガイホモジェネートによる FA と DMA の生成¹⁾ が明らかに酵素作用であることを示している。しかし, カリガネエガイのこの酵素作用は, スケトウダラの場合⁶⁾ と相違して co-factor を必要としない。これは, 塩析, 透析および活性炭処理

の実験結果(2-2~4)から確認された。

カリガネエガイによる FA と DMA 生成の最適温度は45℃, 最適 pH は 5.0であり, スケトウダラの場合(最適温度25℃付近, 最適 pH 6.0付近)とかなり差異がある。これについては, 反応条件および酵素の安定性の相違を考慮しなければならない¹⁴⁾。カリガネエガイの酵素は低温でかなり安定であるが(2-6), スケトウダラ酵素の安定性は不明である。塩析粗酵素液の安定性に関する実験(2-6)において, FA 生成能の著しい低下が見かけ上認められる。これは, 塩析粗酵素液の貯蔵中, FA と反応し得る物質が生成し, この物質が生成能測定に際して生じる FA と反応するためであろう。FA はきわめて反応性に富む物質である¹⁵⁾。

被検阻害剤中, リボフラビンの FA 生成阻害(第8図)はこの阻害剤の酵素阻害が原因でなく, 生成 FA がリボフラビンのイミノ基と反応するため¹⁶⁾ の見かけ上の阻害と認められる。富沢¹⁷⁾, 土屋¹⁸⁾ および河端¹⁹⁾ は TMO 還元酵素の作用がシアニ化物, α, α' -ジピリジルにより阻害されることを報告している。しかし, 本研究では, これらの阻害剤が TMO から TMA の生成をとくに強く阻害するとの結果を示さなかった。

カリガネエガイにおける TMA の生成は 2-8 の結果からして見かけ上のものであることがわかる。したがって, VAISEY の反応²⁰⁾, すなわち生体外における TMO から TMA, DMA および FA の生成がカリガネエガイ粗酵素液で酵素的に生じるとは考えられない。マダラ幽門垂に TMO を加えると, カリガネエガイ内臓およびイカ中腸腺の場合⁵⁾ と異なり, TMA が DMA を上廻って生成する³⁾。この場合の TMA の定量も CONWAY 法による。しかし, TMA の生成が DMA のそれを上廻るため, TMA そのものが生じることは確かである。

4. 要 約

カリガネエガイ内臓ホモジェネートによる TMO から FA と DMA 生成を調べた結果を得た。

- 1) カリガネエガイによる FA と DMA 生成はタラ類およびイカ類と同様酵素作用による。
- 2) カリガネエガイによる FA と DMA 生成では, タラ類と異って co-factor を必要としない。
- 3) カリガネエガイによる FA と DMA 生成には TMA 生成が常に随伴するが, 見かけ上のものである。

本研究の実験の一部は井上 武君の協力によった。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 原田勝彦・山田金次郎, 1971: 本報告, 19, 27~30.
- 2) AMANO, K. and K. YAMADA, 1964: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 30, 430~435.
- 3) AMANO, K. and K. YAMADA, 1964: *ibid.*, 30, 639~645.
- 4) YAMADA, K. and K. AMANO, 1965: *ibid.*, 31, 60~64.
- 5) 原田勝彦・山田金次郎, 1970: 本報告, 18, 20~26.
- 6) YAMADA, K., K. HARADA and K. AMANO, 1969: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35, 227~231.
- 7) YAMADA, K. and K. AMANO, 1964: *ibid.*, 31, 1030~1037.
- 8) NASH, T., 1953: *Biochem. J.*, 55, 416~421.
- 9) DYER, W. J. and Y. A. MOUNSEY, 1945: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 6, 359~367.
- 10) CONWAY, E. J., 1950: "Micro-diffusion Analysis and Volumetric Error", p. 176,

Crosby Lockwood and Son Ltd., London.

- 11) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, 1951: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275.
- 12) STADTMAN, E. R., G. D. NOVELLI and F. LIPMANN, 1951: *J. Biol. Chem.*, **191**, 365~376.
- 13) AMANO, K., K. YAMADA, K. HARADA and Y. KAMIMOTO, 1968: *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **53**, 95~102.
- 14) BALDWIN, E., 1967: "Dynamic Aspects of Biochemistry", 5th Ed. p. 15~18, University Press, Cambridge.
- 15) FRENCH, D. and J. T. EDSALD, 1945: in "Advances in Protein Chemistry" (M. L. ANSON and J. T. EDSALD ed.), **2**, 277~335, Academic Press, New York.
- 16) WAKER, J. F. 著, 山本為親訳, 1964: "ホルムアルデヒド" p. 360, 槇書店, 東京.
- 17) 富沢純一, 1951: 日細菌, **6**, 405~408.
- 18) TSUCHIYA, Y. and E. ENDO, 1952: *Tohoku J. Agric. Res.*, **3**, 127~133.
- 19) 河端俊治, 1953: 日水誌, **19**, 505~512.
- 20) VAISEY, E. B., 1956: *Canadian J. Biochem. Physiol.*, **34**, 1085~1090.