

腹足類における
トリメチルアミンオキサイドの存在と
ホルムアルデヒドとジメチルアミン生成
との関係*

原 田 勝 彦・山 田 金 次 郎

Relation between Trimethylamine Oxide Content
and Formation of Formaldehyde and
Dimethylamine in Gastropod

By

Katsuhiko HARADA and Kinjiro YAMADA

The simultaneous occurrence of formaldehyde and dimethylamine in some varieties of fish and shells during storage has been recently reported^{2,5,11)}. As a cause of the occurrence, it has been pointed out that a specific enzyme system capable of degrading trimethylamine oxide to formaldehyde and dimethylamine is involved in such organisms¹⁾. The enzyme system is, however, found even in bivalvian species which scarcely contain an appreciable amount of trimethylamine oxide¹²⁾. Similarly, most species of gastropod contain no detectable amounts of trimethylamine oxide¹⁴⁾.

In this connection, a broad spectrum of gastropodan species has been examined for the ability to convert trimethylamine oxide into formaldehyde and dimethylamine, and for the occurrence of the latter two substances during storage. Based on these experiments, some consideration were undertaken as for the relationship of the occurrence to the ability, and to trimethylamine oxide content.

* 水産大学校研究業績 第634号, 1971年7月12日 受理.
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 636.
Received July 12, 1971.

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

1. 緒 言

ある種の魚介類は貯蔵中に FA と DMA を生じる。この生起の一因として、TMO からこれら二物質を生成する酵素系の関与が考えられている¹⁾。しかしながら、この酵素系は TMO を含まない、またわずかしか含有しない種類の魚介類にも存在する。天野ら^{2~4)}はタラ類において、原田ら⁵⁾はイカ類において、この酵素系の存在を確かめている。これらは、いずれもかなりの量の TMO を含有する水産動物で^{6~10)}、貯蔵中に FA と DMA を生じる^{2, 5, 11)}。一方、二枚貝類のカリガネエガイ、ムラサキインコガイおよびムラサキガイにはほとんど TMO が存在しない¹²⁾。それにもかかわらず、これらの貝類には上記酵素系が存在する¹³⁾。だが、貯蔵中における FA と DMA の生起の原因については明らかでない。

すでに報告したように、腹足類中大部分の種類は二枚貝類と同様に TMO をほとんど含有しない¹⁴⁾。よって、この腹足類について、貯蔵中における FA と DMA の生起を調べると共に、この生起と TMO からこれら二物質の生成能との関係を検討した。

2. 実 験 方 法

2-1 試 料

試料(腹足類)は主として吉見(下関市)で入手し、すべて生活反応を示すものであった。試料の入手場所、季節、殻高(または殻長)および使用個体数は第1表に示すとおりである。なお、一部の試料については TMO 含量を合わせ調べ、その結果を既報¹⁴⁾に示した。

Table 1. Description of the sample examined.

Sample No.	Species*	Source	Season	Average shell height*** cm
	Subclass PROSOBRANCHIA			
	Order Archaeogastropoda			
	Family Haliotiidae			
1	<i>Sulculus diversicolor aquatilis</i> —"tokobushi"	Yatama	Aug.	5.8†(3)
2	<i>Nordotis discus</i> —"kuroawabi"***	Yoshimi	Jul.	5.7†(3)
3	<i>Nordotis gigantea</i> —"madakaawabi"	Yuyachō	Aug.	14.8†(1)
4	<i>Nordotis gigantea sieboldii</i> —"mekaiawabi"***	"	Oct.	17.0†(1)
	Family Patellidae			
5	<i>Cellana grata</i> —"betsukōgasagai"	Yoshimi	Jul.	1.4(7)
6	<i>Cellana toreuma</i> —"yomegakasagai"***	"	Sep.	0.7(69)
7	<i>Cellana nigrolineata</i> —"matsubagai"***	"	Jul.	1.2(27)
	Family Trochidae			
8	<i>Tristichotrochus uncus</i> —"ebisugai"	"	"	1.9(48)
9	<i>Monodonta perplexa</i> —"kubirekurotsukegai"	"	Aug.	1.4(89)
10	<i>Monodonta labio</i> —"ishidatamigai"	"	"	1.8(10)
11	<i>Chlorostoma arygyrostoma lishkei</i> —"kubogai"	"	Sep.	2.5(12)
12	<i>Omphalius rustica</i> —"koshitakagangara"	"	Jul.	2.2(23)
13	<i>Omphalius pfeifferi carpenteri</i> —"ookoshitakagangara"	"	"	3.1(9)
	Family Turbinidae			
14	<i>Batillus cornutus</i> —"sazae"	"	"	5.2(4)
15	<i>Lunella coronata</i> —"sugai"	"	"	2.0(31)
	Family Neritidae			
16	<i>Heminerita japonica</i> —"amagai"	"	Aug.	1.1(253)

Table 1. -(Cont'd)

Sample No.	Species*	Source	Season	Average shell height*** cm
	Order Mesogastropoda			
	Family Viviparidae			
17	<i>Cipangopaludina chinensis malleata</i> —"marutanishi"***	Yoshida	Jul.	5.7(5)
	Family Littorinidae			
18	<i>Littorina brevicula</i> —"tamakibigai"	Yatama	Aug.	1.1(421)
	Family Vermetidae			
19	<i>Serpulorbis imbricatus</i> —"oohebigai"	Yoshimi	Feb.	1.1 †† (21)
	Family Potamididae			
20	<i>Batillaria multiformis</i> —"uminina"	"	Aug.	3.0(92)
21	<i>Cerithideopsis cingulata</i> —"henatarigai"	"	Oct.	2.7(103)
22	<i>Cerithidae rhizophorarum</i> —"futohenatarigai"	"	"	3.3(31)
	Family Naticidae			
23	<i>Neverita didyma</i> —"tsumetagai"***	Yasuoka	Sep.	5.7(31)
	Order Neogastropoda			
	Family Muricidae			
24	<i>Chicoreus asianus</i> —"onisazae"	Yoshimi	Jul.	8.1(4)
25	<i>Rapana thomasiana</i> —"akanishi"***	Yatama	Aug.	9.1(1)
26	<i>Thais bronni</i> —"reishigai"	Yoshimi	Jul.	3.8(26)
27	<i>Thais clavigera</i> —"ibonishi"	"	"	2.7(65)
	Family Buccinidae			
28	<i>Babylonia japonica</i> —"bai"***	"	Aug.	6.8(3)
29	<i>Japeuthria ferra</i> —"isonina"	"	"	2.7(61)
	Family Nassariidae			
30	<i>Niotha livescens</i> —"mushirogai"	"	"	1.8(185)
	Family Bucyconidae			
31	<i>Hemifusus ternatanus</i> —"tengunishi"***	"	"	17.0(2)
	Family Fasciolaridae			
32	<i>Fusinus perplexus minor</i> —"konaganishi"	"	Jul.	3.0(5)
33	<i>Fusinus nigrostratus</i> —"tsunomatagai"	"	"	4.4(41)
	Subclass PULMONATA			
	Order Basommatophora			
	Family Lymnaeidae			
34	<i>Radix auricularis japonicus</i> —"monoaragai"	Yoshimi	Oct.	1.9(89)
	Order Stylommatophora			
	Family Bradybaenidae			
35	<i>Acusta despecta</i> —"usukawamaimai"	"	"	0.8(95)

*Japanese name is given quotation marks.

**The content of TMO was simultaneously determined of which the value is demonstrated in a previous papers¹⁴⁾.

***Number of individuals analysed is given in parenthesis.

†, †† Shell length and shell diameter are indicated respectively.

2-2 FA ならびに DMA の定量

FA および DMA の定量はそれぞれアセチルアセトン法¹⁵⁾ およびジチオカルバメート銅複塩法¹⁶⁾ によった。

2-3 FA ならびに DMA 生成能の測定

腹足類内臓ホモジェネートの状態における TMO から FA と DMA との生成能測定は既述の方法⁵⁾, また反応条件はカリガネエガイで得たその条件¹³⁾ によった。すなわち, 腹足類内臓に2倍量の冷水を加えてブレンダーにかけ, 得られたホモジェネートを二重ガーゼでろ過し, 口液を検液とした。検液0.5ml をツン

ベルグ管の副室にとり、0.1M TMO 0.5ml, 0.001 M メチレン青0.25ml およびMCILVAINEリン酸緩衝液 (pH5.0) 3.75 ml を主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 45°C で 90 分間インキュベートし、その後、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 と DMA の定量を行なった。

2-4 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 生起は薄層クロマトグラフィーによって調べた。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°C 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 5 ml を加え、得られた口液中の FA と DMA をそれぞれ原田ら¹⁶⁾ および天野ら¹⁷⁾ の方法によって検出した。

FA の検出方法は次のとおりである。口液 5 ml を分液ロートにとり、これに n-ヘキサン 10 ml を加え振とうし、静置後水溶液層を試験管に移す。これに 1/10 飽和 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン溶液 1 ml 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 5 ml を加えて振とうし、2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンを石油エーテルに移行させる。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 20 μ l に溶かし検液とした。この検液 20 μ l を活性シリカゲル G のクロマト・プレート (厚さ 0.25 mm) 上にスポットした。このプレートをヘキサン-エタノール-酢酸 (90:10:3) で展開し、FA の検出を行なった。

一方、DMA の検出方法は次のとおりである。コンウェイ・ユニット内室に 0.01N 塩酸 1 ml, 外室に口液 1 ml と 25% 水酸化カリウム 1 ml をとり、このユニットを 37°C, 120 分間インキュベートした。インキュベート後、ユニット 5 個の内室中の塩酸溶液を小遠心分離管に集め、減圧乾固した。残渣を水 20 μ l に溶かし、その 4 μ l を活性シリカゲル G のクロマト・プレート (厚さ 0.10 mm) 上にスポットした。このプレートをエタノール-塩酸 (10:1) で展開し、充分風乾した後、Dragendorff 試薬を噴霧して DMA を検出した。

3. 実験結果および考察

腹足類 17 科 35 種について、内臓ホモジェネートの状態における TMO から FA と DMA との生成能、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生起を調べた結果は第 2 表のとおりである。

この表の結果からわかるように、FA と DMA の生成能が認められる種類はエビスガイ (試料番号 8) とバイ (試料番号 28) の 2 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 はエビスガイとバイに限り検出された。

使用した薄層クロマトグラフィーの FA 最小検出限界は 0.3 μ g / スポット で検出限界がきわめて低い¹⁸⁾。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 の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 から FA と DMA を生成する酵素系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¹⁹⁾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。というのは、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¹⁷⁾。

FA と DMA の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。このうち、エビスガイにおける DMA の出現は TMO の分解に帰因すると思われる。というのは、すでに述べたように¹⁴⁾、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。

Table 2. Relation between formation of FA and DMA in vitro and their occurrence during storage*.

Sample No.	Formation		Occurrence during storage (days)					
	FA	DMA-N	FA			DMA		
			0	2	4	0	2	4
	<i>μg/ml</i>							
1	0	0	+	+	+	-	-	-
2	0	0	+	+	+	-	-	-
3	0	0	+	+	+	-	-	-
4	0	0	+	+	+	-	-	-
5	0	0	+	+	+	-	-	-
6	0	0	+	+	+	-	-	-
7	0	0	+	+	+	-	-	-
8	7	2	+	+	+	-	+	+
9	0	0	+	+	+	-	-	-
10	0	0	+	+	+	-	-	-
11	0	0	+	+	+	-	-	-
12	0	0	+	-	-	-	-	-
13	1	0	+	+	+	-	-	-
14	0	0	+	+	+	-	-	-
15	0	0	+	+	+	-	-	-
16	1	0	+	+	+	-	-	-
17	0	0	+	+	+	-	-	-
18	0	0	+	+	+	-	-	-
19	0	0	+	+	+	-	-	-
20	0	0	+	+	+	-	-	-
21	0	0	+	+	+	-	-	-
22	0	0	+	+	+	-	-	-
23	0	0	+	+	+	-	-	-
24	0	0	+	+	+	-	-	-
25	0	0	+	+	+	-	-	-
26	0	0	+	+	+	-	-	-
27	0	0	+	+	+	-	-	-
28	29	9	+	+	+	-	+	+
29	0	0	+	+	+	-	-	-
30	0	0	+	+	+	-	-	-
31	0	0	+	+	+	-	-	-
32	0	0	+	+	+	-	-	-
33	1	0.5	+	±	±	-	-	-
34	0	0	+	-	-	-	-	-
35	0	0	±	±	+	-	-	-

*The enzymatic formation of FA and DMA from TMO by gastropodan visceral homogenates was measured with the mixture composed of 0.5 ml of the homogenate, 0.5 ml of 0.1 M TMO, 0.25 ml of 0.001 M methylene blue and 3.75 ml of phosphate buffer (pH 5.0) in a Thunberg tube. The mixture was incubated under anaerobic conditions, and the amounts of FA and DMA produced was colorimetrically determined. The post-mortem occurrence of FA and DMA in gastropoda viscera was investigated with its homogenates kept at refrigerated temperatures. The occurrence was identified by thin-layer chromatographic procedures.

これに対し、パイの TMO 含量は僅少である (試料番号 28 の TMO-N 量, 0.1 mg %¹⁴)。したがって、パイにおける 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となるためと推定される。

4. 要 約

腹足類 35 種について、貯蔵中における FA と DMA の生起を調べると共に、この生起と TMO からこれら二物質の生成能との関係を検討した。

本研究における試料の同定は本校網尾 勝助教授の援助によった。また、本研究の実験の一部は井上 武 および今田五十樹の諸君の協力によった。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 山田金次郎, 1968: 日水誌, 34, 541~551.
- 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, 296~302.
- 6) 山田金次郎, 1967: 日水誌, 33, 591~603.
- 7) SHEWAN, J. M., 1951: in "The Biochemistry of Fish", Biochemical Society Symposia No. 6. (R. T. WILLIAMS ed.), 28~48, Univ. Press, Cambridge.
- 8) DYER, W. J., 1952: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 8, 314~324.
- 9) GRONINGER, H. S., 1959: U. S. Fish and Wildlife Service Special Sci. Rept., Fish. No. 333, 1~22.
- 10) 原田勝彦・藤本哲夫・山田金次郎, 1968: 本報告, 17, 87~95.
- 11) 徳永俊夫, 1964: 北海道区水研報, 30, 90~97.
- 12) 原田勝彦・竹田淳一・山田金次郎, 1970: 本報告, 18, 287~295.
- 13) 原田勝彦・山田金次郎, 1971: 本報告, 19, 91~94., 95~103.
- 14) 原田勝彦・山本良久・山田金次郎, 1971: 本報告, 19, 105~114.
- 15) NASH, T., 1953: *Biochem. J.*, 55, 416~421.
- 16) DYER, W. J. and Y. A. MOUNSEY, 1945: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 6, 359~367.
- 17) 原田勝彦・三浦茂司・篠田義夫・山田金次郎, 1970: 日水誌, 36, 188~191.
- 18) AMANO, K., K. YAMADA, K. HARADA and K. KAMIMOTO, 1968: *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 53, 95~102.
- 19) RACHELE, J. R., A. M. WHITE and H. GRÜNEWALD, 1964: *J. Biol. Chem.*, 239, 353~356.