海産魚類におけるトリメチルアミノキシドの生合成メカニズム

新 関 紀 文*・坂 口 守 彦**

“海産物の臭い”あるいは“魚臭”は日本人には馴染みのものである。これは主として海産魚介類に広く分布するトリメチルアミノキシド(TMAO)の還元体、トリメチルアミンによる。しかし、このTMAOの起源や合成経路に関する知見はこれまでほとんど得られていなかった。海水に馴化したティラピア(*Oreochromis niloticus*)を用いてTMAOの生成経路および合成機構について検討したところ、餌料中に含まれるコリンが腸内の微生物により代謝され、その際生成したTMAが肝臓や腎臓でTMAOに酸化され、これが筋肉に蓄積する可能性があることがわかった。さらに餌に含まれるTMAOについても腸内細菌の作用によりTMAに還元され、体内に吸収された後、同様に肝臓や腎臓などで再酸化され、筋肉に移行・蓄積する可能性があることを示した。このような事実から天然の海産魚類の組織中に含まれるTMAOの少なくとも一部は、これと類似したメカニズムで生成する可能性があるものと判断した。これに関連してTMAOの魚類体内における生理機能についても多角的な考察を加えた。

1. はじめに

海産魚介類の組織には、含窒素低分子化合物の一種トリメチルアミノキシド(TMAO)が多く含まれている。一般に海産物は特異的な臭気をもっているが、これは海産魚介類に広く分布するTMAOの還元体、TMAによるものであることはよく知られている。またTMAOは加熱や酵素の作用で分解し、ジメチルアミンおよびホルムアルデヒドを生じる。これらはそれぞれ発癌物質ジメチルニトロソアミンの生成^{17, 34, 72)}、および魚肉のスポンジ化²³⁾に関与する。後者についてはTMAO含量が高いタラ類では、冷凍貯蔵中に酵素TMAOase(TMAO demethylase, EC 4.1.2.32)^{31, 32, 63)}の作用でホルムアルデヒドが生じ、スポンジ化という肉質の劣化を起こすとして問題となる。さらにTMAOは魚油の酸化的分解を促進し²⁴⁾、またマグロ肉の蒸煮の際に肉の色を青変させること³³⁾などが確認されている。このような理由でTMAOは水産原料に含まれる低分子成分の内でも最も重要なものの一つに位置づけられ、種々の研究が行われてきた⁷¹⁾。

これまでさまざまな魚介類についてTMAOの含量が調べられてきたが、サメやエイなどの板鰐類、タラ類、そして頭足類の中でもイカ類にはきわめて多量のTMAOが見いだされている^{23, 74)}。また海水環境に生息するシーラカンス(*Latimeria chalumnae*)の体液から著量のTMAO(血液から110mmol/l、細胞液から290mmol/kg)が見いださ

れるなど、魚類進化の上からも興味深いものがある³⁸⁾。一方、淡水産の魚類にはTMAOはほとんど含まれてはいないか、あるいは痕跡程度見いだされるのみである^{23, 74)}。本物質は生体中で種々の生理機能、すなわち浸透圧調節⁷⁴⁾、タンパク質の安定化^{7, 8, 62)}、あるいは抗酸化²⁵⁻²⁷⁾などの作用を発揮すると考えられる。一方、この物質の起源や合成経路などに関しては、その還元体であるTMAが直接の前駆体であること以外にほとんど研究例がない。その理由として比較対象とすべき陸棲動物では餌に起因する単なる排泄成分でしかなく、成因に関する参考となるような情報は陸棲動物には望めないこと、何よりも海産魚介類の餌となる生物にはTMAOが多く蓄積されていることなどから、内因起源よりもむしろ外因起源や分布に研究の主眼がおかれたことがあげられる。

これまで得られた内因起源に関する知見としては、ロブスター、カニ、カレイ、タラなどに標識した基質を注射し、TMAOの前駆物質に関する検索を試みた例が数件みられるにとどまる^{1, 9-11)}。先述のように海洋生物の中でもサメやエイのような板鰐類、そして頭足類の中でもイカ類では硬骨魚類に比して著量のTMAOを体内に保有する。タラ類は硬骨魚類でも例外的に多量のTMAOを保有する魚種であることが一般的に知られている^{23, 74)}。タイセイヨウマダラ(*Gadus morhua*)を用いて得られた結果によれば、TMAが前駆物質として有効であったが、それ以外に化学構造的にみてTMAOの前駆物質としての可能性が高いとみられるコリンやジメチルアミンは前駆物質となりえなかったとの報告がみられる¹⁾。TMAOはTMAが一原子酸素添加されたものに過ぎないが、実際にTMAが本魚類の体内で生成し、合成の基質となっているのか、あるいはまたTMAが捕食する餌の中に含まれかつ合成基質として体内に経口的に搬入されているのか、さらにはTMAの前駆体は何かということまでは解明されていない。ただ、アメリカロブスター(*Homarus americanus*)⁹⁾、アメリカイチョウガニ(*Cancer magister*)¹⁰⁾およびヌマガレイ(*Platichthys stellatus*)¹¹⁾では、[メチル-¹⁴C]コリンの注射でTMAOへの¹⁴Cの取込みが確認されている。ヌマガレイの場合には[メチル-¹⁴C]コリンのみならず[¹⁴C]TMAの注射による投与も試みられているが、コリンからの¹⁴Cの取込み量はTMAに比べてきわめてわずかなものでしかない¹¹⁾。このように海洋生物のうちの少なくとも一部のものではコリンからTMAOに至る合成経路が実在することは確かである。しかし、これまでにそれらの詳細な部分、たとえば化学反応の機構や反応を触媒している酵素がどのようなものなのか等について十分に検討されておらず、海

*Norifumi NIIZEKI, カリホルニア大学リバーサイド校 環境科学部

**Morihiko SAKAGUCHI, 京都大学名誉教授(自宅)(〒611-0044 京都府宇治市伊勢田町名木 1-1-271)

洋生物におけるコリン・TMAO 生成の経路については解明すべき余地が多分に残されている。また最近の報告によると、淡水に生息する魚類でも通常の淡水魚に比して体内に高濃度の TMAO を保有しているものが見いだされており興味深い。すなわちビクトリア湖産の食用魚類であるナイルパーチ (*Lates niloticus*) およびティラピア類から⁴⁾、またアマゾン川産の食用魚 *Astronotus crassipinnis*、シクリッド類、*Pellona castelnaena*、*Prochilodus nigricans* の筋肉から⁶¹⁾ 比較的多量の TMAO が見いだされ、淡水産の魚であってもかなり多量の TMAO を保有する興味深い事例として注目されている。したがって体内の TMAO 保持の有無が海産か淡水産かを分け隔てる指標であるとはいいがたい⁴⁾。一般に魚類では海水環境に比べ、淡水のそれでは浸透圧が低いことから排泄が容易であり、さらに食物連鎖・食物網のスケールも小さいため、TMAO の移行・蓄積・濃縮の効果が高いとはいいにくい。それ以前に餌料となる可能性のある淡水動物プランクトンにはほとんど TMAO が含まれておらず、また淡水藻類についても TMAO を保有しないといわれている²³⁾。このような環境下において、これら淡水魚では何が起源物質となり、またどのようなメカニズムで TMAO が合成・保持されるのか興味深いところである。著者らはティラピア (*Oreochromis niloticus*) を用いて魚類における TMAO の成因の解明を試みるとともに、海産魚に限らず天然魚介類全般における TMAO の合成能について考察した。

ティラピアはアフリカや東南アジアを中心に食用魚として広く利用されている。また淡水のみならず海水でも飼育できる広塩性の魚種でもある。ティラピアは食欲旺盛で繁殖力が高く、さらにとりあつかいやすい大きさで、丈夫であるなど実験魚としては有利な点が多い。著者らはこれまで海産硬骨魚類のモデルとして、この魚類を人工海水に馴化したのち、TMAO の生合成機構の解明を目的として種々の試みを行うとともに、TMAO が海産魚類に蓄積する必然性に関して考察した。

2. TMAO の前駆物質

一般に TMAO は魚類組織中でも、特に筋肉に蓄積する傾向がみられる⁷¹⁾。実際に著者らが行ったティラピアの組織について分析したところでは大部分の TMAO は筋肉に局在していた^{43,45)}。そこで、まず TMAO の筋肉への蓄積量の増大を指標とし、TMAO と化学構造的に類似性が高い数種の生体物質を飼料に添加したのち投与し、TMAO 前駆物質の検索を試みた。TMAO の合成を考える上で重要と思われる合成機構は幾つか考えられる。すなわち、まず TMA がアンモニアの水素原子のメチル基との置換、あるいは 4 級アンモニウム化合物 (図 1) からのトリメチルアンモニウム基の離脱によって生じ、次にこのようにして生成した TMA が TMAO へと酸素添加される可能性である。そこで生物組織に広く分布する数種の 4 級アンモニウム化合物 (コリン、グリシンベタイン、およびカルニチン)、リン脂質であるホスファチジルコリン、TMA および TMAO を含む飼料をそれぞれ 20 日間にわたって投与した。その結果、4 級アンモニウム化合物の中ではコリンが、また TMA の投与では TMAO の筋肉中の含量が増大した。この点についてはシロザケへの TMA を含む飼料の投与でも筋肉中の TMAO 含量

図1 トリメチルアミンオキシド、トリメチルアミンおよび代表的な生体内 4 級アンモニウム化合物の化学構造 R および R' はアルキル基を示す。

が増大したことが示されている¹⁶⁾。また淡水の藻類や甲殻類が TMA や TMAO を含んでいる可能性は低いと考えられる²³⁾。したがって淡水では魚類の体内への TMAO や TMA の搬入はほとんどないものと考えてよい。一方海水域では植物プランクトンや大型の海藻類の中に TMA を含むもの^{28,29)}、動物プランクトンに TMA を TMAO に変換する酵素活性を有するもの^{65,66)} が認められている。したがって植物プランクトンが動物プランクトンに捕食された際に、TMA が TMAO へと変換され、動物プランクトンの体内に保持されることになる。また大型海藻類の中にも TMAO を含むものが見いだされている²³⁾。藻類を捕食する魚では藻類に含まれる TMA が、魚類の組織内における酸素添加酵素の基質になっている可能性も推測される。また海水に馴化したティラピアへ TMAO を含む飼料を投与したところ、筋肉の TMAO 含量が著しく増大することがわかった⁴⁵⁾。マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*)、クサフグ (*Fugu niphobles*) およびカワハギ (*Monacanthus cirrhifer*) でも同様に、TMAO を含む飼料の投与により TMAO レベルの増加がみられている⁷⁴⁾。これらの事実は、海産魚類では TMA や TMAO が経口で体内に搬入され、直接的・間接的に TMAO の蓄積をもたらす可能性が高いことをうらづけるものである。

また、グッピーでは投与する飼料中の TMA およびコリン添加量を増加させると筋肉中の TMAO 含量が増加する

図2 コリンの代謝・合成経路

ことが認められている¹⁶⁾。コリンは自然界に広く分布する化合物である⁴⁷⁾。淡水飼育の場合に効果が認められたグリシンベタインも、また海水飼育の場合に効果があったホスファチジルコリンも、ともにわずかな段階の代謝変換でコリンに帰着する(図2)。コリンはグリシンのアミノ基が段階的にメチル化され、カルボキシル基もまた段階的に還元されたものである。したがって、TMAOは段階的にメチル化されたグリシンのアミノ基のN-オキッドであると考えられる。一部の魚介類に見いだされるTMAOの一部は、

コリンを前駆物質として体内で生合成される可能性が高い。次に[メチル-¹⁴C]および[L, 2-¹⁴C]コリンをそれぞれ含む飼料を投与することにより、またこれらを腹腔内注射することにより、TMAOへの¹⁴Cの取り込みについて観察した。その結果、[メチル-¹⁴C]コリンを含む飼料を投与した場合にのみ、¹⁴C]TMAOの生成が観察された^{43, 45)}。¹⁴C]TMAでは、投与方法の違いに関わらず¹⁴C]TMAOの生成が観察された。また¹⁵N]コリンを含む飼料を投与したところ、¹⁵N]TMAの分子イオン m/z=60の出現がみら

図3 ティラピアにおける ^{15}N コリン態窒素のTMAOへの取り込み 海水馴化したティラピアそれぞれに対し、 0.45mmol の ^{15}N コリンを海水馴化完了の日から23日間かけて飼料投与。最終投与の48時間後に筋肉組織抽出液を調製、TMAOへの ^{15}N の取込みをGC-MSで分析した。TMAOは TiCl_3 でTMAへと還元、 KOH で揮発させ、ヘッドスペースガスのTMAをGC-MSで分析した。(−), TiCl_3 無添加；(+), 同添加。
挿入図は分子量59および60のマスキロマトグラムを表す。 $n=4$ (Niizeki N.⁴⁵⁾)

れ、TMAOへの ^{15}N の取り込みが確認された(図3)。この事実は、コリンのN-トリメチル部位がTMAOの前駆体となっていることを示している。またコリンを含む飼料をグッピーに投与すると筋肉中のTMAO含量が増大するが、他方ウナギへのコリンの腹腔内注射では組織中のTMAO含量はほとんど変化しないことが観察されている(大黒トシ子ら 未発表)。さらに、コリンの[メチル- ^{14}C]のTMAOへの取込みは経口投与の場合に限られることから、コリンからのTMAO生成には消化管が関与しているものと推察

した。

以前からヒト²⁾、ラット^{46,50)}、家禽⁴⁸⁾などの陸棲動物では腸管の微生物がコリンを分解し、TMAを生成するということは指摘されていた。しかし、直接的な検証を試みた報告はみられない。Norrisら⁴⁶⁾はすでにラットへのコリンの投与方法の違いで、尿中に出現するTMAOの量に大きな違いがみられることを示した。すなわちコリンを経口投与すると注射投与に比べて著量のTMAOが尿中に排出されることを見いだした。Prentissら⁵⁰⁾はラットを用い

た *in vivo* での実験で、腸内細菌がコリンを TMA に分解し、この TMA が酸化されて尿中に排泄されるが、同様の実験を無菌飼育下にあるラットを用いて行くと TMAO の排泄は認められなくなることを示した。また、ヒトや家禽では時として TMA が排泄物や卵に含まれ^{2, 47, 76)}、その結果腐敗臭やカニ臭を放つ個体がみられる。これは食物や飼料に含まれる TMA の他に TMAO やコリンが腸内細菌によって分解されて生じた TMA が、本来肝臓で酸素添加され TMAO へと変換されるべきところ、この反応を触媒するモノオキシゲナーゼが遺伝的に欠損しているために酸素添加されず、TMA のかたちでそのまま排泄されるためといわれている。このモノオキシゲナーゼはすでに種々の生物を用いて単離精製されており⁵¹⁾、体外から搬入され、または生物体内で何らかの作用により生じた TMA は酸素添加され TMAO に変換されることは容易に考えられるところである。

以上のことから陸棲動物の少なくとも一部のものでは、それ自身の酵素ではなく腸内微生物の作用によりコリンが分解され TMA が生成し、ひき続いて TMA が TMAO へと酸素添加される可能性がある。ティラピアの場合でも、これら陸棲動物と類似したメカニズムが存在している可能性があると判断した。

3. 消化管における微生物の作用

3-1. コリンの TMA への分解

微生物にはコリンを分解して TMA を生成する活性を有するもの、*Vibrio cholinaricus*²⁰⁻²²⁾、*Proteus vulgaris*⁶⁰⁾、TMA を酸化して TMAO を生成するもの、*Pseudomonas aminovorans*¹²⁾、また逆に嫌気下で TMAO を還元して TMA を生成するもの(後述 3.2.)がある。またティラピアの腸管には偏性嫌気性細菌の存在が報告されている^{55, 56)}。そこで著者らは消化管組織そのもの、もしくはその中に棲む微生物がコリン-TMAO 代謝経路の少なくとも一部を担っているとする仮説を立てた。

そこで、まず無菌操作を行ってティラピアから腸管および胃を単離し、これら組織の内腔にコリンを含む液体培地を注入し、飼育水温度と同じ 27℃ で 7 時間培養した。その結果 TMA の有意な生成が観察された。また、このときにペニシリンを共存させた場合 TMA の生成は明らかに抑制されることがわかった⁴³⁾。一方、TMAO の生成はまったく観察されなかった。このように抗生物質で TMA の生成が抑制されたところから、腸管内におけるコリンからの TMA の生成は微生物によるものであることが証明されたことになる。また[メチル-¹⁴C]コリンを基質として作用させ、¹⁴C の TMA への取込みについて観察を試みた。その結果、肝臓、腎臓、眼、筋肉、脳、エラ、胃、および腸の中で特に腸に、しかも組織内腔に注入した場合にのみ有意な活性増加が認められた^{43, 45)}。他方腸組織をホモジナイズし、[メチル-¹⁴C]コリンを作用させた場合には生成がみられなかった。これはおそらく腸組織が破碎されたために分散した何らかの成分が微生物の作用に影響を及ぼしたためか、あるいは腸内部で厳密に維持されている組織構造、酸化還元電位や嫌気的環境を崩壊させてしまったためと思われる。 [¹⁵N]コリンを単離した腸管の内腔に注入すると、 [¹⁵N]TMA の生成が観察されたところから、腸内でコリン

図4 ティラピア腸管内におけるコリン態窒素の TMAO への取り込み 海水馴化したティラピアから腸管を単離し、0.36M の [¹⁵N]コリン水溶液を注入(0.3 ml/g 組織)、これを 7 時間培養し、生成した TMA を分析した(分析方法は図3に示したものと同一)。

分子中の N-C 結合が解裂し、その結果 N-トリメチル部分が TMA として遊離することが明らかとなった(図4)。

コリンという物質は、上記の生物学的(酵素的)な分解以外に化学的(非酵素的)にも強アルカリ環境下では分解を起こして TMA を遊離するので、この反応に及ぼす pH の影響を無視することはできない。すなわち、腸内でコリンから生成した TMA は、酵素的なものによるのか、アルカリ分解のような非酵素的なものによるのか判別できない。そこで、まずティラピア腸内部の pH の測定を試みたところ、微アルカリ (pH8.2) であることがわかった。

なお、淡水飼育魚ではその pH は 7.2 で、海水馴化にともない、わずかにアルカリ側にシフトする傾向がみられた。また大黒¹⁵⁾も同様の結果を得ており、グッピー腸管内の pH は海水適応によって 7.8±0.1 から 8.8±0.1 に変化したという。次にこのようなアルカリ環境が TMA 生成に及ぼす影響を考慮し、腸内微生物によるコリンからの TMA の生成を検討した。ティラピアから単離した腸のホモジネートを数種の培地に接種し、これを密閉したシリンジ中で培養し、経時的に培養液の濁度の上昇、pH の変化および

TMA の生成を観察した。その結果、コリンを添加した培地では、濁度の上昇にともなって TMA の生成がみられ、かつ時間の経過にしたがって pH が低下する傾向を示した。またペニシリンおよびストレプトマイシンの共存下では微生物の増殖を示す濁度上昇および TMA の生成が抑制された。ストレプトマイシン添加培地の pH は終始アルカリ側に維持されていたにもかかわらず、TMA の生成はほとんど観察されなかった(図5)。したがって少なくともこのような弱アルカリ条件下では、コリンからの TMA の生成に対するアルカリ分解作用の寄与度は極めて低く、大部分の TMA は酵素的な作用によってコリンから生成するものと考えられる。

これまで提示されている報告と著者らが得た結果を総括

図5 ティラピア腸内微生物の培養に伴うコリンからの TMA の生成および pH, 増殖量の変化 トリプトン2.5%および酵母抽出物0.6%を含む人工海水を基本培地とした。塩化コリン無添加(◇), 2.0%の塩化コリンを添加(□), コリンに加えて1.0%のペニシリン G カリウムを添加(△), コリンに加えて1.0%の硫酸ストレプトマイシンを添加(×)した4種類の液体培地をそれぞれ調製した。次にティラピア腸管をホモジナイズし、基本培地とともに前培養したものをこれらの培地に接種し、密閉したシリンジ内において27℃で培養した。腸内微生物の増殖量は660nm における濁度の測定によった。(Niizeki, N.⁴⁴⁾)

すると、ティラピア体内にはコリンを分解して TMA を生成する活性が存在しており、さらにこれは魚類組織の酵素ではなく腸内微生物のそれによるものであると結論できる。腸内微生物由来の TMA は TMAO に酸化されるが、陸棲動物のようにその多くは排泄物として体外に排除されるのではなく、魚類ではむしろ能動的に筋肉に移行・蓄積し、体内の主要な成分のプールの一つを形成しているようである。Bilinski らはすでにヌマガレイ¹¹⁾ およびアメリカイチョウガニ¹⁰⁾, アメリカロブスター⁹⁾ に[メチル-¹⁴C]コリンを注射すると[¹⁴C]TMAO の生成が観察されたことを報告しているが、このときに腸内微生物が関与しているか否かについては検討していない。非常に興味深いところである。また TMA および TMAO の腸管からの吸収とそのメカニズムについてはこれまで報告がまったくなく、しかも体内への吸収能が組織中の TMAO レベルに影響する因子の一つである可能性も考えられるところから、この点についても今後検討を加える必要があろう。

3-2. TMAO の TMA への還元

一般に魚類の腸管にはそれ相応の嫌気的環境が形成・維持されていて、特に腸管の長いものでは嫌気性の程度は高いとおもわれる。また先に述べたようにティラピアの腸内には嫌気性細菌が生息する^{56, 57)}。ある種の微生物は嫌気条件下で TMAO を最終電子受容体として利用し、以下の反応にしたがって TMA へと還元する。

大腸菌 (*Escherichia coli*)^{3, 19, 54, 55)} や一部の細菌, *P. vulgaris*^{60, 67)}, *Salmonella typhimurium*^{35, 36)}, *Shewanella massilia*^{14, 58)}, *Rhodobacter sphaeroides*^{42, 53)}, *Rhodospseudomonas capsulata*³⁹⁾, *Roseobacter denitrificans*⁵¹⁾, *Alteromonas putrefaciens*^{51, 64)} では、TMAO が TMA へと還元される。特に大腸菌や *S. massilia* では、TMAO レダクターゼ (Tor A; EC 1.6.6.9) を含む呼吸鎖系の遺伝子が TMAO により誘導されるオペロンを形成していることなどが明らかとなっている^{3, 19, 58)}。

海洋生物には TMAO が含まれているが、これはこれら生物が捕食する餌の中に TMAO が含まれており、その結果体内に移行したためと考えられる。したがって腸管内に生息する微生物が TMAO を還元する可能性は十分に想定されるところである。そこで海水馴化したティラピアから単離した腸管に[¹⁴C]TMAO を注入し、これを27℃で7時間培養したところ実際に[¹⁴C]TMA の生成が観察された⁴⁵⁾。さらに、TMAO を含む液体培地に腸ホモジネートを添加し、これを密閉したシリンジ中で27℃で培養したところ、濁度の上昇(微生物の増殖)にともなって TMA の生成が観察された(図6)。このときペニシリンの共存下ではこれらが共に抑制された。この事実、腸管内で微生物が餌料成分として搬入される TMAO を TMA に還元した可能性が高いことを強く示唆している。

海洋ではさまざまな食物連鎖あるいは食物網による生物濃縮作用が行われているが、その過程で魚類が餌料に含まれる TMAO を常時経口摂取していると考えられる。このような環境下にあつて、腸内微生物が餌料に含まれる TMAO の少なくとも一部を最終電子受容体として利用し

図6 ティラピア腸内微生物の培養に伴う TMAO からの TMA の生成および増殖量の変化 基本培地 (図5の脚注)を基に3種の液体培地、(無添加(◇), 1.56%の TMAO 二水和物を添加(□), TMAO にさらに1.0%のペニシリンGカリウム(△)を添加した培地をそれぞれ調製した。海水馴化したティラピアの腸管を生理食塩水でホモジナイズし、これを接種源とし、それぞれの培地を図5の脚注に示しものに準じ、密閉シリンジ中で27℃で培養した。(Niizeki, N.⁴⁵⁾)

増殖するものと推察される。また、このようにして生じた TMA が魚の体内に吸収された後 TMAO へと再酸化され、筋肉に移行・蓄積している可能性が考えられる。今後は当該腸内微生物の単離や TMA, TMAO の腸管膜からの吸収機構なども含め、消化管内におけるコリンおよび TMAO からの TMA の生成をより詳細に解明する必要がある。

4. TMA の TMAO への変換(一原子酸素添加反応)

魚介類の組織中に含まれる TMA の大部分は一原子酸素添加を受けた TMAO として見いだされるので、餌料から直接もたらされた TMA およびコリンおよび TMAO から腸内微生物の作用で生成した TMA は、最終的には TMAO のかたちで多くは筋肉に蓄積されと考えられる。ティラピアを用いて TMA から TMAO への反応を触媒する酵素(flavin-containing monooxygenase; EC 1.14.13.8)の組織分布について調べたところ、酵素活性は主に肝臓および腎臓に局在していた。また NADPH を反応系に添加しない場合には TMAO の生成がきわめて低いことがわかった^{43,44)}。これは今まで知られていた TMA の一原子酸素添

加の様式(下記)に従っていると考えられる。

(Me, メチル基)

本酵素はアメリカテンジクザメ (*Ginglymostoma cirratum*)¹⁸⁾、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)³⁹⁾、ヒラメの一種 *Scophthalmus maximus* L.⁴⁹⁾ に存在すること、また魚類に限らず微生物 *Pseudomonas aminovorans*¹²⁾ やブタ⁶⁾ などでも報告されており種特異性は低い。また本酵素は N-oxygenation (N→O) のみならず S-oxygenation (S→O) をも触媒し、基質特異性が低く、有毒物質の解毒に関与していると考えられている⁵⁹⁾。すなわち、一般に脂肪酸アミン類には毒性があり、したがって TMA の TMAO への変換も一種の解毒作用のあらわれと考えられる。また興味深いことにグッピー、ウナギ¹⁶⁾ およびニジマス³⁷⁾ では、本酵素添加酵素は環境塩分の増大に伴い、その活性が上昇することが確認されている。

前記の事実は、TMAO のコリンからの生成過程には中間生成物として TMA が存在すること、コリン→TMA→TMAO という経路が魚類の体内に存在することなどを強く示唆する。コリンからの TMAO の生成は、水圏生物のみならず陸棲生物でもみられるものと考えられるが、特に海産魚類では浸透圧の関係で、生成した TMAO を筋肉中に蓄積する傾向が大きいので、主要なオスモライトの一つとして保持されているものと推察される。ただし淡水産魚類でもティラピアなどのように例外的に TMAO 含量の高い魚種^{4,61)} も存在するため、蓄積に影響する因子に関してはより慎重に検討することが必要であろう。

5. 野生ティラピアの組織には実際にコリンが含まれているか

遊離のコリンの他にリン脂質やアセチルコリンなどの結合同型も合わせれば、一般にコリンは自然界に広く分布する物質である。したがって天然のティラピアの餌となる生物の中にもコリンが含まれている可能性は高い。しかし、これまで魚介類を含む水産生物におけるコリンの分布を調べた例はさわめて少ない^{69,70)}。

これまでに海水飼育のみならず、淡水飼育の場合でも TMAO の生成経路(コリン→TMA→TMAO)が存在することを示した⁴³⁾。さらに前述のとおりビクトリア湖のような淡水の湖でも、そこに棲むティラピアが海産魚に匹敵する TMAO 含量を保有するという興味深い例がある。これらの魚が捕食する餌の中にコリンが含まれているとしたら、著者らの示した経路が実際に自然界でも成立している可能性が高い。そこで、実際に天然魚においてコリンを起源物質とし上記のメカニズムで TMAO が生成している可能性について検討することとし、天然におけるティラピアの餌料中に含まれるコリン(遊離のコリン)量および筋肉中の TMAO 含量を調べてみた。

ティラピアはアフリカ原産の魚類であるが、かつて日本にもマダイの代用魚として頻繁に移入され、現在でも一部の地域では温泉を利用して養殖されている。特に温暖な地域(たとえば沖縄県や鹿児島県)では、養殖場から逃げ出したティラピアが河川で繁殖するなどして野生化している例

が多くみられる。そこで鹿児島県指宿市内の河川(湊川)で繁殖しているティラピアを投網で捕獲し(平均体長約20cm), それらの組織の成分分析を試みた(捕獲地点は河口を遡ること500~600mにわたる一帯で, その日は快晴で水温は30℃で, 塩分濃度測定により海水の混入の痕跡はみとめられなかった)。

分析の結果, 筋肉中にTMAOが比較的多量に含まれ, また腸には多量のコリンと少量のTMAが検出された⁴³⁾。これは自然界でも餌料中のコリンが基質となって, TMAOが合成・蓄積されていることを示唆する結果であるといえる。なお, 一般に淡水魚類の餌料となる生物の体内にはTMAOはほとんど含まれていないものであるが, 本分析の結果でも, 胃および腸内容物(少量の腸管を含む)中にはTMAOは検出されなかった。ティラピアは藻類や植物プランクトンを好んで捕食する^{40, 41)}。湊川で捕獲した19尾のティラピアから3個体を任意に選び, 胃や腸の内容物の同定を試みたところ, 植物プランクトンおよび付着糸性藻類が含まれていたが, 他方動物プランクトンやベントス等は確認されなかった。したがってこれら植物プランク

トンや藻類がコリンの供給源である可能性が高い。これらは魚介類におけるコリンの起源を解明するためにも重要な手掛りとなるであろう。

6. コリン分解の分子機構: TMA 以外に何が生成するか

先述のとおり, 単離したティラピアの腸管を用いて¹⁴Cおよび¹⁵Nトレーサー試験を試みたところ, 検出されたTMAは, コリン分子から脱離したトリメチルアンモニウム基に由来するものであることがわかったが, これはコリン分子中のN-C結合が解裂するために生じるものであると考えられる。その際, 他方の炭素鎖部分からはどのような物質が生じるのか検討を進めた。Haywardら²⁰⁻²²⁾によれば, 土壌細菌 *Vibrio cholinus* がコリンを嫌氣的に分解し, TMAとエタノール, 酢酸および中間体としてアセトアルデヒドの生成を認めている。このとき次に示す代謝反応式が成立するとしている。

図7 コリン炭素鎖からの生成物のHPLCクロマトグラム(1) [1, 2-¹⁴C]コリンのティラピア腸管内培養物の抽出液を調製。コリン分解生成物をHPLC-flow counterで分析した。カラム, 陽イオン交換型 Shim-pack IC-C3; ガードカラム, Shim-pack IC-GC3; 移動層, 5 mM シュウ酸 (a), 標準物質; (b), 試料(コリン分解生成物)(Niizeki, N.⁴⁴⁾)

そこで[1, 2-¹⁴C]コリンを単離した腸管に注入し、これを27℃で7時間培養し、上記の化合物群を標的としてHPLCを用いて生成物を推定した。

生成物(1) 陽イオン：図7-bに示すように、培養の経過に伴いコリンのピークが消失し、新たに保持時間3-4分に大き目のピークが、そして約11分に小さ目のピークが出現した。これらの新たに出現したピークのうち、前者は陽イオン交換樹脂に保持されることなく溶出したものであると考えられた(エタノール、酢酸およびアセトアルデヒド、それぞれが示す保持時間と区別がつかなかった(図7-a)。後者は保持時間から判断して、少なくともこの分析条件下で陽イオンとしての性質をもつものであると判断される。コリンの代謝経路上(図2)に位置する物質、例えばベタインアルデヒドやグリシンベタインなどである可能性が高い。したがって腸管に注入した[1, 2-¹⁴C]コリン

の一部はN-C結合が解裂して分解されTMAを放出し、それ以外の一部のコリンはこのような解裂をみることなく陽イオンの性質を保持しながら代謝されたのであろう。なお、淡水飼育した場合についてもほぼ同様の結果が得られた。

生成物(2) 有機酸類およびアルデヒド：図8-bに示すように、保持時間約11.5分および14.5分に二つのピークが出現した。両ピーク間で面積に大きな差異はみられなかった。前者は、標準の酢酸およびアセトアルデヒドを展開したとき、ともにほぼ同一の保持時間を、また後者も標準エタノールと同様のそれを示した(図8-a)。淡水飼育の場合もほぼ同様の結果を示した。

生成物(3) アルコール類：図9-bに示すように、保持時間約5.5分および約10.5分に二つのピークが観察された。有機酸とアルデヒドの場合と同様に、これらのピーク間で面積に大きな差異は認められなかった。前者は0.5分程度のズレはあるものの酢酸およびアセトアルデヒドに近接した保持時間を示し(上記の図8の有機酸の分析では、

図8 コリン炭素鎖からの生成物のHPLCクロマトグラム(II) カラム、有機酸分析用(イオン排除型)Shim-pack SCR 101H; ガードカラム, Shim-pack SCR(H); 移動層, 0.01NHCl
(a), 標準物質; (b), コリン分解生成物 (Niizeki, N.⁴⁴⁾)

移動層は0.01NHClを用いていたため、有機酸類の解離度にあまり大きく影響しなかったが、他方アルコール類の分析では移動層を脱イオン水としているため解離度に影響が出やすく、その結果、保持時間に多少の差が生じたものと考えられる)、また後者のピークはエタノールとほぼ同一の保持時間を示した(図9-a)。淡水飼育の場合もほぼ同様の結果であった。

コリンは非酵素的にアルカリで分解してTMAを生成することが知られている。また、上述のとおりコリンの微生物による分解に際してもTMAが生成する。また著者らの行ったティラピア腸管の実験ではTMA以外に、エタノールおよびその酸化生成物が生成する可能性を示した(図7-9)。これらを基にしてコリンからのTMAの化学的な生成機構について考察すると、この反応は有機化学的には塩基により4級アンモニウムのβ位の炭素上の水素が引き抜

かれ、その結果N-C結合が解裂し、N-トリメチル部位がTMAとして離脱する(β脱離)と考えられる。すなわち腸内細菌によるコリンの分解は、酵素の触媒作用による分解反応であり、アルカリ分解の場合と同じタイプのβ脱離で進行するとみなされる(図10-1))。

コリンの腸内細菌による分解にともなうエタノール、アセトアルデヒドおよび酢酸が生成するとすれば、Haywardら²⁰⁻²²⁾の提示した見かけの代謝式は、数種の素反応で構成されていると考えられる(図10)。すなわち先ずコリンのβ脱離が起こる。

ビニルアルコールは一般に自然界ではきわめて不安定な物質のため、瞬時にアセトアルデヒドに変換される(ケト-エ

図9 コリン炭素鎖からの生成物のHPLCクロマトグラム(Ⅲ) カラム, 糖・アルコール分析用(ゲルろ過・配位子交換型)Shim-pack SCR 101N; ガードカラム, Shim-pack SCR(N); 移動層, 脱イオン水。(Niizeki, N.⁴⁰⁾)

図10 コリンからの TMA 生成の推定反応機構 Enz, 酵素; Base, 酵素のアミノ酸側鎖など。

ノール互変異性)。

生成した TMA は塩基であるからプロトン化された酵素から H^+ を引き抜くものとする。

Hayward³²⁾ は細胞抽出液を用いてアセトアルデヒドの代謝を検討した。すなわち反応の前後で化学量を決定し、次のようなアセトアルデヒドの不均化反応を示した。

(2) - (5) の辺々を加える $[(2) \times 2 + (3) \times 2 + (4) \times 2 + (5)]$ と、Hayward らが示した化学量論的な関係[(1)式]がコリンとその分解生成物との間に成立することとなる。

図7および8に示すように、酢酸(アセトアルデヒド)およびエタノールとほぼ同じ保持時間にピークがそれぞれ出現した。Hayward は化学量論的に示されたアセトアルデ

ヒドの代謝式(5)を提示するとともに、その内容に関して詳細に考察している。すなわち、コリンの分解で生成したアセトアルデヒドの一部が NADH で還元されエタノールに、そして他の一部がアセチル-S-CoA, アセチルリン酸を経て酸化され酢酸に至る、それぞれ別々の経路で代謝されるものと考察している²⁰⁾。

図7および8に示す結果から推測すると、保持時間から判断してティラピア腸内でのコリン分解にともない、炭素鎖部分からはアセトアルデヒド、およびその酸化・還元体(酢酸、およびエタノール)が生じる可能性が高いと考えられた。今後はこれら腸内細菌によるコリンの分解生成物についてマスマススペクトル法などにより厳密な同定をおこなう必要がある。

7. TMAO の生理機能

一般に、TMAO は海産魚介類の組織に特異的かつ多量に含まれ、一部の例外を除けば淡水産魚類にはほとんど見いだされない。また TMAO はその多くがなぜ筋肉に多量蓄積されるのか。さらに、TMA はなぜそのほとんどが N-オキシドへと変換されるのか。これらの疑問を解決するこ

とが TMAO の生理機能を明らかにする上でも重要なことと思われる。

先に述べたようにティラピアで得られた結果から、TMAO の少なくとも一部のものは餌料に含まれるコリンに起因することがわかった。硬骨魚における TMAO の一部は、腸内微生物がコリンを分解することによって生じる TMA の酸素添加体であると考えられる。TMA やその他のアミン類はアンモニア様の毒性を発揮する。そのため TMAO は TMA の一種の解毒体であるとの見方がある^{23,73)}。著者らは予備的にティラピア腹腔内への注射による毒性試験を試みた。すなわち、化学形態の違いはあるものの、等モルの TMA・HCl および TMAO・2H₂O を投与(平均体重約 50g に 0.5 μmol の各化合物を腹腔内注射)した場合には前者の方が致死率や体表の黒化率などが高くなり、行動異常などがみられた(ティラピアの体色は、急激な高浸透圧付与やなわばり争いによるストレスで黒化する現象がしばしば観察される)。この観察結果は TMA よりも TMAO の方が毒性は低いことを示すものであるが、注射液の投与量、両化合物の pH の相違について再考の余地があるため急な結論は避けたい。

進化の過程で生物は種々の浸透圧防御機構を発達させてきた³⁰⁾。なかでもオスモライトは細胞の容量変化を制御するものとして重要な生体因子である。板鰓類や海産無脊椎動物では体液の浸透圧が環境海水のそれに等しい。これらの生物では体内に無機成分のみならず有機低分子のオスモライトを保持し、細胞内部と外部浸透濃度をつり合わせるかたちで細胞容積を制御し、外圍環境に適応している⁷⁵⁾。

TMAO の場合についても環境浸透圧ストレスへの関与、あるいはオスモライトであることを示す報告はこれまでにいくつか見うけられる。前述のとおりサメやエイなどの板鰓類は TMAO をオスモライトとして利用していることが指摘されている^{62,75)}。サメは窒素を尿素として排泄するが、この多量の尿素にはタンパク質を変性する作用がある⁶²⁾。したがって尿素を単なるオスモライトとして保持することはできない。一方 TMAO には、ほどけた状態にあるタンパク質を折り畳むことにより安定状態へと導く作用がある^{7,8)}。尿素によるタンパク質の変性は TMAO が共存することによって抑制され、しかもそのモル比が尿素：TMAO = 2 : 1 となるとき変性抑制効果が顕著となる。板鰓類の体液でもこの比が保たれていることは興味深い。したがって板鰓類では尿素によるタンパク質の変性を TMAO によって抑えつつ、これらを総じてオスモライトとして巧妙に利用していると考えられる⁶²⁾。尿素以外にも化合物の中には濃度を上げると比較的毒性が出現しやすいものが少なくない。また内部浸透圧の維持を一部の化学種のみに依存することは合理的ではない。すでに体内には無機イオンや種々の生体化合物が存在するので、これに特定のアミノ酸、アミノ酸の近縁物質(タウリン、グリシン、ペプチド)そしてメチル化アミン類縁物質の TMAO 等を上乘せすることで体内の浸透圧を高めているものと考えられる。その際 TMAO のモル数が高ければ高いほど浸透圧調節への寄与度は高い。これらの物質は例えばタンパク質の素材とはならないようなもので、いわゆる「利用価値」の低いものが充当されることになる。

一般に海産硬骨魚類では体内の浸透圧が環境海水よりも低く保たれている。硬骨魚類の中でもタラ類のように

TMAO 含量の高い種もある。この種の魚類の体液浸透圧を調べた例はこれまで見あたらないが、もし他の海産硬骨魚類に比してタラ類の体内浸透濃度に対する寄与度が少しでも高ければ、それは TMAO をオスモライトとみなし得る根拠となるであろう。またニジマスでは環境の浸透圧上昇の結果、血漿の浸透圧および TMAO 含量が有意に上昇する³⁷⁾。体内の浸透圧を外囲よりも低く保つことが可能である硬骨魚類にとって、TMAO の筋肉内における蓄積は腸内細菌由来の老廃物 TMA の貯蔵組織、筋肉への一時的な保管なのか、それとも積極的に筋肉に取り込むことにより、筋肉中で何らかの機能を発揮しているのか判断しにくい。大黒は¹⁶⁾ TMAO がオスモライトとして機能するか否かについて興味深い判定を試みている。すなわち淡水飼育のグッピー(*Poecilia reticulata*)にあらかじめ TMA を含む餌料を投与しておき、これを 50% 海水に暴露する実験を試みた。その結果、このような処理を施すことによって延命時間が長くなることを報告している。グッピーにはモノオキシゲナーゼにより TMA を N-オキシドに変換する活性が存在することから、投与した TMA が体内で TMAO へと酸化されたかたちで浸透圧制御に寄与しているものと考察している。

金魚のような淡水魚であっても TMAO の搬入量が排泄量を上回れば、排泄しきれなかった TMAO が筋肉中に蓄積されるので、TMAO プールの大きさは TMAO の搬入と排泄に左右されることになる⁷⁴⁾。一般的には淡水環境の方が海水環境の場合に比べ、魚類にとって排泄が容易であると考えられている。著者らの行った餌料投与の実験でもこれらを裏付ける結果を得た。すなわち TMAO やその他の N-トリメチル化合物が含まれない基本食を投与した結果、淡水飼育のものに比べて海水飼育した場合の方が TMAO の筋肉中における含量が明らかに高い傾向を示した。一方、29mmol/100g もの多量の TMAO を含む餌料を継続的に投与した場合、淡水と海水環境との排泄の差異が筋肉中の TMAO 含量の差異に反映しにくいことを見いだした。

このように一般に海産硬骨魚類では海産軟骨魚類と異なり TMAO の含量が低く、また血中の浸透圧も環境海水よりも低く維持されている。したがって、このような状況からみても、また本物質の濃度からみても強力なオスモライトとして位置づけることは妥当ではないが、それ自身には少なくとも部分的に高浸透圧ストレスを回避するための役割を荷なっていることは確かである。

南極では海水温度が著しく低く、このため南極海に生息する魚類は、常時体液が凍結する危険に曝されている。このような極低温水域に生息するタラやヒラメ類では体液の凍結を防ぎ凝固点を低下させる目的で、不凍性タンパク質や不凍性糖タンパク質を合成し、これらを体液中に保持することで耐凍性を獲得しているとされているが¹³⁾。同様にこれら硬骨魚類では、TMAO を尿素とともに凝固点降下剤の一つとして利用していると考えられている³¹⁾。また Withers ら⁷³⁾ は TMAO が尿素とともに板鰓類の浮力の発生に関与していることを指摘している。

これまでに様々な物質が多かれ少なかれ抗酸化作用を示すことが知られているが、TMAO には、シネルギストとしてトコフェロールの抗酸化作用を助ける働きがあるようである²⁵⁻²⁷⁾。トコフェロールは魚類のみならずその餌料となる海藻にも広く分布するものである⁶⁸⁾。したがってこの

図11 海産魚類における TMAO の生成・蓄積経路

ような抗酸化機能が、TMAO を多量に保持する魚類の体内で発揮されている可能性がある。

硬骨魚類における TMAO の分布には興味深い傾向がみられる。すなわち持続的に遊泳するマグロやサバのような赤身の魚に比べて運動量の少ないヒラメやタラ等のような白身の魚に多く含まれる傾向がある²⁹⁾。後者ではどのような理由で TMAO を多く含み、またそれはどのような役割を果たすのか究明される必要がある。

8. まとめ

魚類における体内の TMAO の少なくとも一部は、腸などの消化管内で餌料成分のコリンが分解され、その際生成する TMA が魚類の組織中で酸素添加したものである可能性が高いことが明らかとなった。

今回ティラピアで得られた知見の興味深いところは、第一にコリンからの TMA の生成が魚類腸管内の微生物に依存していること、第二に生成した TMA は一原子酸素添加という変換を受けた後に多量に蓄積し、その結果魚類にとって主要と思われる物質プールを形成することである。すなわち TMAO を保持する魚介類は、腸管で生成する有毒でかつ利用価値の低い TMA を N-オキシドに酸素添加することでこれを解毒し、結果的に生じた TMAO を積極的に

保持することで適合溶質かまたはそれ以外の何らかの機能的物質として利用していると考えることができよう。またコリンからの TMA の生成も魚類組織の酵素が関与するのではなく腸内の微生物の作用によるものであるから、コリンからの TMAO の生成は、ティラピアのみならず海産魚種も含めた比較的広範囲にわたる生物種に認められる現象である可能性が高い。

海洋では TMAO は常時、摂餌によって魚の体内に搬入されるものでもある。したがって TMAO が餌料の中に含まれることの多い海産魚類の場合には、摂取したすべての TMAO が直接体内に移行・蓄積するのではなく、少なくとも一部は腸内細菌の作用で TMA に還元され、体内に吸収されたものが肝臓や腎臓などで TMAO へと再酸化され、組織中に保持される可能性がある(図11)。また、TMAO 含量が魚種によって違うのは、餌料中のコリンや TMA、TMAO 含量、環境浸透圧の相違、モノオキシゲナーゼ活性の差異だけではなく、TMA や TMAO の組織への吸収能、TMAO の組織への蓄積能などの差異を反映しているためである可能性が考えられるが、これらの点を明らかにするためには種々の条件を配慮した綿密な検討が必要となろう。また TMAO の組織分布(筋肉への局在のメカニズム)についてもさらなる検討が待たれるところである。

9. 謝辞

本研究に関して多大なる御助言・御助力を頂きました山陽学園大学大黒トシ子教授，ティラピアの提供および捕獲などに御協力を頂いた近畿大学農学部中村聡一助手，鹿児島県水産試験場指宿内水面分場の山本伸一主任研究員，並びに職員の方々，腸管内容物の同定に御協力頂いた京都大学農学研究科の中原紘之教授，また RI 実験に御協力頂いた京都大学放射性同位元素総合センターのスタッフの方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ágústsson, I. & Strøm, A.R.: *J. Biol. Chem.* **256**, 8045-8049 (1981)
- 2) Al-Waiz, M., Ayesb, R., Mitchell, S.C., Idle, J.R. & Smith, R.L.: *Clin. Pharmacol. Ther.* **42**, 588-594 (1987)
- 3) Ansaldi, M., Bordin, C., Lepelletier, M.L. & Mejean, V.M.: *Mol. Microbiol.*, **33**, 284-295 (1999)
- 4) Anthoni, U., Borresen, T., Christophersen, C., Gram, L. & Nielsen, P.H.: *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 569-572 (1990)
- 5) Arata, H., Shimizu, M. & Takamiya, K.: *J. Biochem.*, **112**, 470-475 (1992)
- 6) Baker, J.R. & Chaykin, S.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1309-1313 (1962)
- 7) Baskakov, I.V. & Bolen, D.W.: *J. Biol. Chem.*, **273**, 4831-4834 (1998)
- 8) Baskakov, I.V., Kumar, R., Srinivasan, G., Yan-shan, J. & Bolen, D.W.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 10693-10699 (1999)
- 9) Bilinski, E.: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **17**, 895-902 (1960)
- 10) Bilinski, E.: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **19**, 505-510 (1962)
- 11) Bilinski, E.: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **21**, 765-771 (1964)
- 12) Boulton, C.A., Crabbe, M.J.C. & Large, P.J.: *Biochem. J.*, **140**, 253-263 (1974)
- 13) Chen, C.C. & DeVries, A.L.: In *Life Under Extreme Conditions*, pp 1-14, Springer-Verlag, Berlin (1991)
- 14) Czjzek, M., Dos-Santos, J.P., Pommier, J., Giordano, G., Mejean, V. & Haser, R.: *J. Mol. Biol.*, **284**, 435-447 (1998)
- 15) 大黒トシ子：梅花女子大学文学部紀要，No.27, 63-121 (1992)
- 16) 大黒トシ子：魚の環境適応，pp 180-190, 青海社 (1995)
- 17) Fiddler, W., Pensabene, J.W., Gates, R.A., Hale, M. & Jahncke, M.: *J. Food Sci.*, **57**, 569-571 (1991)
- 18) Goldstein, L. & Dewitt-Harley, S.: *Comp. Biochem. Physiol.* **45**, 895-903 (1973)
- 19) Gon, S., Patte, J.C., Mejean, V. & Iobbi, N.C.: *J. Bacteriol.*, **182**, 5779-5786 (2000)
- 20) Hayward, H.R.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3592-3596 (1960)
- 21) Hayward, H.R. & Stadtman, T.C.: *J. Bacteriol.*, **78**, 557-561 (1959)
- 22) Hayward, H.R. & Stadtman, T.C.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 538-543 (1960)
- 23) Hebard, C.E., Flick, G.J. & Martin, R.E.: *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*, pp. 149-304, AVI, Connecticut (1982)
- 24) Horiuchi, M., Umamo, K. & Shibamoto, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5232-5237 (1998)
- 25) Ishikawa, Y. & Yuki, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 851-857 (1975)
- 26) Ishikawa, Y., Yuki, E. & Fujimaki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 703-709 (1978)
- 27) Ishikawa, Y., Yuki, E., Kato, H. & Fujimaki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 711-716 (1978)
- 28) 片山輝久：日本水産学会誌，**27**, 75-84 (1961)
- 29) 片山輝久：日本水産学会誌，**27**, 703-709 (1961)
- 30) 加藤咲一，野本保夫：代謝，**10**, 1381-1386 (1973)
- 31) Kimura, M., Seki, N. & Kimura, I.: *Fisheries Sci.*, **66**, 725-729 (2000)
- 32) Kimura, M., Seki, N. & Kimura, I.: *Fisheries Sci.*, **66**, 967-973 (2000)
- 33) 小泉千秋：冷凍，**44**, 143-152 (1969)
- 34) 國崎直道，松浦宏之，林 誠：日本水産学会誌，**43**, 1287-1292 (1977)
- 35) Kwan, H.S. & Barrett, E.L.: *J. Bacteriol.*, **155**, 1147-1155 (1983)
- 36) Kwan, H.S. & Barrett, E.L.: *J. Bacteriol.*, **155**, 1455-1458 (1983)
- 37) Larsen, B.K. & Schlenk, D.: *J. Comp. Physiol.* **171 B**, 421-429 (2001)
- 38) Luts, P.L. & Robertson, J.D.: *Biol. Bull.*, **141**, 553-560 (1971)
- 39) McEwan, A.G., Ferguson, S.J. & Jackson, J.B.: *Arch. Microbiol.*, **136**, 300-305 (1983)
- 40) Moriarty, D.J.W.: *J. Zool., Lond.* **171**, 25-39 (1973)
- 41) Moriarty, D.J.W. & Woriarty, C.M.: *J. Zool., Lond.* **171**, 41-51 (1973)
- 42) Mouncey, N.J., Choundhary, M., Kaplan, S.: *J. Bacteriol.*, **179**, 7617-7624 (1997)
- 43) Niizeki, N., Daikoku, T., Hirata, T., Shourbagy, I.E., Song, X., Sakaguchi, M.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **131B**, 371-386 (2002)
- 44) Niizeki, N.: 京都大学博士論文，農博第1248号 (2002)
- 45) Niizeki, N., Daikoku, T., Hirata, T., El-Shourbagy, I., Song, X. & Sakaguchi, M.: *Fisheries Sci.*, **69**, 74-87 (2003)
- 46) Noris, E.R. & Benoit, G.J.: *J. Biol. Chem.*, **220**, 443-448 (1945)
- 47) 大木道則，大沢利昭，田中元治，千原秀昭 編：化学大辞典，東京化学同人 (1994)
- 48) Pearson, A.W., Greenwood, N.M., Butler, E.J., Curl, C.L. & Fenwick, G.R.: *J. Sci. Food Agric.*, **34**,

- 277-285 (1983)
- 49) Peters, L.D., Livingstone, D.R., Shenin-Johnson, S., Hines, R.N. & Schlenk, D.: *Xenobiotica*, **25**, 121-131 (1995)
 - 50) Prentiss, P.G., Rosen, H., Brown, N., Horowitz, R.E., Malm, O.J. & Levenson, S.M.: *Biochem. Biophysics. Acta*, **94**, 424-429 (1961)
 - 51) Raymond, J.A. & DeVries, A.L.: *Fish Physiol. Biochem.*, **18**, 387-398 (1998)
 - 52) Ringo, E., Stenberg, E. & Strøm, A.R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1084-1089 (1984)
 - 53) Roland, M.D., Reyes, F., Moreno-Vivian, C. & Castillo, F.: *Current Microbiol.*, **29**, 241-245 (1994)
 - 54) Sakaguchi, M. & Kawai, A.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 923 (1986)
 - 55) 坂口守彦：京大食研報告, No.48, 37-40 (1985)
 - 56) Sakata, T., Sugita, H., Mitsuoka, T., Kakimoto, D. & Kadota, H.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1249-1255 (1980)
 - 57) Sakata, T., Sugita, H., Mitsuoka, T., Kakimoto, D. & Kadota, H.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 421-427 (1981)
 - 58) Dos-Santos, J.P., Iobbi, N.C., Couillaut, C., Giordano, G. & Mejean, V.: *J. Mol. Biol.*, **284**, 421-433 (1998)
 - 59) Schlenk, D.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **121C**, 185-195 (1998)
 - 60) Seim, H., Löster, H., Claus, R., Kleber, H. & Strack, E.: *FEMS Microbiol. Letters*, **13**, 201-205 (1982)
 - 61) Shirai, T., Onodera, M., Saitoh, S., Ogawa, M., Carvalho, N.L.A., Suzuki, T. & Hirano, T.: *Fisheries Sci.*, **64**, 569-573 (1998)
 - 62) Somero, G.N.: *Int. Union Physiol. Sci.*, **1**, 9-12 (1986)
 - 63) Sotelo, C.G. & Rehbein, H.: *Seafood Enzymes*, pp 167-190, Marcel Dekker (2000)
 - 64) Stenberg, E., Ringo, E. & Strøm, A.R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1090-1095 (1984)
 - 65) Strøm, A.R.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**, 243-249 (1980)
 - 66) Strøm, A.R.: *Mar. Biol.*, **51**, 33-40 (1979)
 - 67) Styrvold, O.B. & Strøm, A.R.: *Arch. Microbiol.*, **140**, 74-78 (1984)
 - 68) 須山三千三, 鴻巣章二：水産食品学, pp 63, 恒星社厚生閣, 東京 (1987)
 - 69) Takada, K. & Nishimoto, J.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 632-635 (1958)
 - 70) Takada, K. & Nishimoto, J.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 636-639 (1958)
 - 71) 徳永俊夫：東海区水産研究所研究報告, No.101, 1-5 (1980)
 - 72) 戸沢晴巳, 佐藤理子：日本水産学会誌, **40**, 425-430 (1974)
 - 73) Withers, P.C. & Morrison, G.: *J. Exp. Biol.*, **188**, 175-189 (1994)
 - 74) 山田金次郎：日本水産学会誌, **33**, 591-603 (1967)
 - 75) Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, D.R. & Somero, G.N.: *Sci. Wash. DC*, **217**, 1214-1222 (1982)
 - 76) Zhang, A.Q., Mitchell, S.C. & Smith, R.L.: *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 515-520 (1999)