

# 0 °C 以下の温度におけるトリメチルアミン-N-オキシドの 酵素的および非酵素的分解

木村メイコ,<sup>1</sup> 関 伸夫,<sup>1\*</sup> 木村郁夫<sup>2</sup>

(2001年5月25日受付, 2001年8月20日受理)

<sup>1</sup>北海道大学大学院水産科学研究科食品生化学研究室, <sup>2</sup>日本水産中央研究所

## Enzymic and Nonenzymic Cleavage of Trimethylamine-N-oxide *in vitro* at Subzero Temperatures

Meiko Kimura,<sup>1</sup> Nobuo Seki,<sup>1\*</sup> Ikuo Kimura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food Biochemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, <sup>2</sup>Central Research Laboratory, Nippon Suisan Kaisha Ltd., Hachioji, Tokyo 192-0906, Japan

Marine fish species such as the gadoid family contain a large amount of trimethylamine-N-oxide (TMAO) which is cleaved to equimolar amounts of dimethylamine (DMA) and formaldehyde (FA) during storage. The cleavage of TMAO was investigated at subzero temperatures in a model system containing  $\text{Fe}^{2+}$  and reductants, ascorbate and cysteine, in the presence or absence of TMAOase which was prepared from walleye pollack muscle. At  $-4^{\circ}\text{C}$  in the supercooled solution, TMAO was cleaved to DMA and FA with TMAOase depending on enzyme concentration. Almost no nonenzymic cleavage occurred practically. However, in the frozen state at  $-4^{\circ}\text{C}$  as well as at  $-20$  and  $-40^{\circ}\text{C}$ , the enzymic cleavage was completely depressed and DMA was rapidly and greatly produced by the nonenzymic pathway in a  $\text{Fe}^{2+}$ -Cys system accompanied by a little formation of trimethylamine. Both enzymic and nonenzymic reactions required only  $\text{Fe}^{2+}$  with reductants to maintain the reaction.

キーワード：トリメチルアミン-N-オキシド, トリメチルアミン-N-オキシド脱メチル化酵素, ジメチルアミン, トリメチルアミン, 凍結貯蔵, 鉄イオン, システイン, アスコルビン酸, ホルムアルデヒド

タラ科の魚類と一部の海産魚類および板鰓類の筋肉および内臓組織には浸透圧調節のために多量のトリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) が含まれている。<sup>1-4)</sup> スケトウダラ筋肉中には我々の分析では 60-100 mmol/kg (筋肉湿重量) の TMAO が存在している。スケトウダラをすり身原料として利用する場合は水晒し工程で TMAO の大部分は除去されるが、魚肉として貯蔵された場合は、TMAO は貯蔵中に分解され、トリメチルアミン (TMA) を生成する場合と、ジメチルアミン (DMA) とホルムアルデヒド (FA) を等モルずつ生成する経路が知られている。これまでの多くの研究によると、0 °C 以上で魚を貯蔵すると、貯蔵初期には肉中の DMA 量が増大する傾向にあるが、数日後には微生物による TMAO 還元酵素による分解で TMA の急激な増大が起るために DMA の生成は事実上認められなくなる。<sup>2,5)</sup> 一方、徳永<sup>6)</sup>はスケトウダラ普通肉を  $-17^{\circ}\text{C}$  から

$-19^{\circ}\text{C}$  に凍結貯蔵すると、DMA と FA が多量に生成されることを明らかにしている。さらにスケトウダラ肉をミンチにして凍結貯蔵温度の影響を調べたところ、<sup>6)</sup> DMA と FA は  $-10^{\circ}\text{C}$  貯蔵で  $-5^{\circ}\text{C}$  および  $-20^{\circ}\text{C}$  貯蔵よりも多量に生成され、20 日後には 10 mmol/kg を越えたが、その後はほとんど増大しなくなった。血合肉では普通肉の 2 倍以上の DMA 生成がみられたが、温度依存性は普通肉の場合と似ていた。なお、スケトウダラでは普通肉でも血合肉でも凍結貯蔵中には TMA をほとんど生成しないが、マグロ、カツオ、マイワシ等では血合肉中で TMA の方が DMA より多量に生成されることから、これらの魚の血合肉では TMAO 還元酵素により TMA が生成するものと推定されている。<sup>6)</sup>

氷点下における TMAO の分解も TMAOase (TMAO 脱メチル化酵素, EC 4.1.2.32) あるいは TMAO 還元酵素による酵素分解であると考えられている。しかし、

\* Tel/Fax: +81-138-40-5568, E-mail: seki@fish.hokudai.ac.jp

DMA の生成が  $-10^{\circ}\text{C}$  で最も多いという事実や, Castell ら<sup>7)</sup>はヘイクのフィレーを  $110^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱した後, 凍結貯蔵したところ, 一ヶ月後には未加熱フィレー中の約 50% にもおよぶ多量の DMA が生成されたこと, Reece<sup>8)</sup>によると  $-10^{\circ}\text{C}$  凍結肉中の FA の生成は肉の表面に近い程阻害されるので, 酸素が生成反応を阻害することなどから, 氷点下における TMAO の分解が非酵素的反応である可能性は残されている。さらに, Castell ら<sup>7)</sup>, Spinelli と Koury は<sup>9,10)</sup> Pacific whiting の凍結肉では TMAO から DMA の生成は TMAOase の直接作用ではなく,  $\text{Fe}^{2+}$  とシステインの代謝産物である cysteinesulfinic acid や hypotaurine によって非酵素的に起ると報告している。

Parkin と Hultin<sup>11,12)</sup>はヘイク筋肉の TMAOase について研究し, 活性化に cofactor として  $\text{Fe}^{2+}$  を必要とすることを明らかにした。著者ら<sup>13,14)</sup>はスケトウダラ筋肉から TMAOase を精製, 单離し, 分子量 25,000 の酵素であり, 至適 pH 7.0,  $\text{Fe}^{2+}$  を cofactor とし, 還元剤は  $\text{Fe}^{2+}$  の酸化を抑制するために必要なことを示した。これらの結果から, 筋肉中に TMAOase が存在することは確実になったが, 氷点下で, 特に DMA の生成量の多い  $-5^{\circ}\text{C}$  から  $-10^{\circ}\text{C}$  で酵素が作用している可能性は明らかでない。同様に, 氷点下における TMA の生成機構についても疑問が残っている。そこで, 本研究では氷点下における TMAO からの DMA と FA の生成を TMAOase による酵素的反応と非酵素的反応を *in vitro* で比較して魚肉凍結貯蔵中に起る DMA と FA の生成機構を推定した。また, 氷点下において非酵素的に TMAO から TMA が生成される可能性についても検討した。FA の生成は魚肉タンパク質の変性を促進し, 品質を低下させることが古くから知られているが, その生成機構は未解決のまま残されている。これらの問題解決は TMAO 含量の高いタラ科やエソ科の魚を魚肉フィレーなどとして利用するうえで役立つと考えられる。

### 試料および方法

**試料** 函館近海産のスケトウダラ *Theragra chalcogramma* (体重約 700 g) を漁獲後 12 時間以内に購入し, その背肉フィレーを採取し, 血合筋を除き  $-60^{\circ}\text{C}$  で凍結貯蔵したものを使用した。TMAO は Aldrich 社製のものを, DMA, FA その他全ての試薬は和光純薬社製の特級試薬を使用した。DEAE-セルロースは Whatman 社製の DE-52, Sephadryl-S300 は Pharmacia 社製のものを使用した。

**TMAO, TMA, DMA, FA の定量** TMAO と TMA の定量は Dyer らの方法<sup>15,16)</sup>に基づいて行った。DMA は銅-ジメチルカルバメート法<sup>17)</sup>で定量した。すなわち反応をトリクロロ酢酸 (TCA) で停止し, その 4 mL を

共栓試験管に移し, 0.4 mL の  $\text{CuSO}_4$ -ammonia 溶液および 4 mL のベンゼンを添加した後,  $40^{\circ}\text{C}$  の恒温水槽中で 5 分間加温した。その後よくしん温, 搅拌し, 生成した黄褐色の銅-ジメチルカルバメートをベンゼン層(上層)に抽出した後, 440 nm で比色定量した。FA の定量は Nash 法<sup>18)</sup>により行った。

**筋原纖維画分と TMAOase の調製** スケトウダラ筋原纖維画分は次の方法によって調製した。まずスケトウダラ筋肉を解凍し, 細切し, 5 倍量の 0.1M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) を加えた後, Ace ホモジナイザー (日本精機製) により 10,000 rpm, 2 分間氷冷下でホモジナイズした。これを遠心分離 (3,000  $\times g$ , 10 分間) 後, 水溶性タンパク質を除去した。筋肉中に多量に含まれている TMAO を完全に除去するために, 得られた沈殿を同緩衝液でさらに 3 回洗浄した。

TMAOase は Kimura らの方法<sup>14)</sup>で, 筋原纖維画分から酸処理抽出後, DE52 セルロースクロマトグラフィー, Sephadryl S-300 クロマトグラフィーにより精製したもの用いた。

**反応組成** TMAO の非酵素的分解反応は 20 mM TMAO, 0.2 mM  $\text{FeCl}_2$ , 2 mM システイン (Cys), 2 mM アスコルビン酸, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-acetate (pH 7.0) からなる反応液 (標準系) を用いた。酵素反応の場合はこれに TMAOase を添加して反応を開始し, いずれの場合も終濃度 2.5% となるように TCA を添加して反応を停止させた。酵素活性は  $25^{\circ}\text{C}$  で 1 分間当たり 1  $\mu\text{M}$  の DMA を生成する活性を 1 unit と定義した。<sup>14)</sup> なお, 一部の実験では上述の反応系からアスコルビン酸を除いた反応組成液を用いたが, この場合は Fe-Cys 系と呼ぶこととする。

**氷点下における TMAO の分解反応** 恒温槽中に 40% エタノールを入れ,  $-4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  に保持した。この温度での反応は過冷却と凍結の 2 つの状態を行った。反応液 (1.7 mL) を氷冷したガラス試験管に入れ, これを恒温槽中に静置して過冷却状態を保った。凍結する場合は恒温槽中に反応液を静置してから 30 分後に氷の小片 (約 5  $\mu\text{g}$ ) を添加して凍結させた。 $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$  での反応はこれらの温度に設定した冷凍庫中に反応液を入れて行った。反応の停止は終濃度 2.5% となるように TCA を添加してから,  $25^{\circ}\text{C}$  で解凍し, 直ちに DMA と FA または TMA を定量した。

**タンパク質の定量** タンパク質量は, ビウレット法により, 牛血清アルブミン画分 V を標準として定量した。

### 結 果

**$-4^{\circ}\text{C}$  過冷却状態と凍結状態における DMA と TMA の生成** 種々の濃度の TMAOase (酵素濃度 0~4.8 unit/mL) を添加した反応液を  $-4^{\circ}\text{C}$  過冷却状態で 6 日

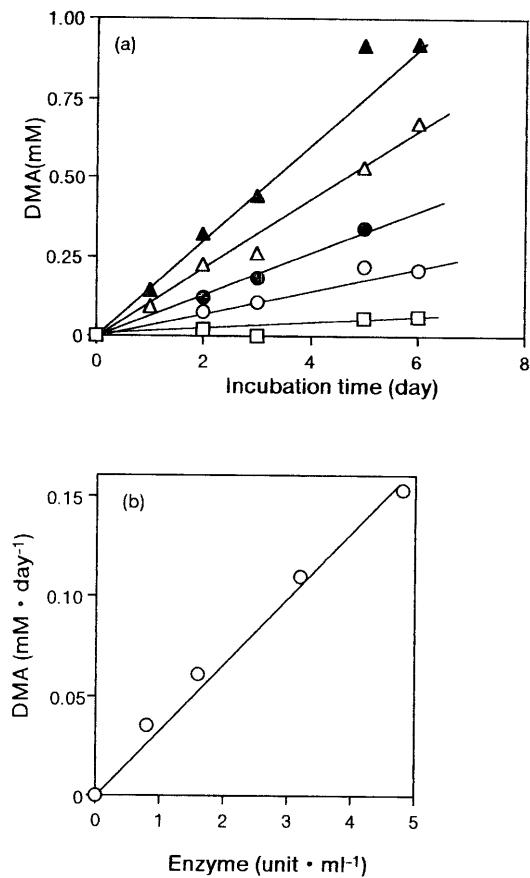


Fig. 1 Formation of DMA in supercooled TMAO solution at  $-4^{\circ}\text{C}$  in the presence of TMAOase. (a) Standard assay mixture (1.7 mL) containing 20 mM TMAO, 2 mM ascorbate, 2 mM cysteine, 0.2 mM  $\text{FeCl}_2$ , 50 mM NaCl, and 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) was incubated with 0 (□), 0.8 (○), 1.6 (●), 3.2 (△), and 4.8 (▲) unit/mL TMAOase in a supercooled state at  $-4^{\circ}\text{C}$ . TMAOase was prepared from walleye pollock muscle (Ref. 14). (b) Effect of enzyme concentration on the formation of DMA.

間までインキュベートした時の DMA の生成量を Fig. 1 に示す。酵素無添加時の DMA 生成速度は  $0.011 \text{ mM/day}$  と低かったが、TMAOase 添加では酵素量に比例して DMA の生成量は増大した (Fig. 1, b)。酵素 4.8 unit を添加した時の DMA 生成速度は  $0.150 \text{ mM/day}$  であった。なお、4.8 unit の酵素は  $25^{\circ}\text{C}$  では  $6.9 \text{ mM/day}$  の DMA を生成する酵素量であることから、 $-4^{\circ}\text{C}$  での反応速度は  $25^{\circ}\text{C}$  の約 2 % に過ぎなかったが、それでも非酵素的に生成される DMA の 13 倍量であった。この結果は、 $-4^{\circ}\text{C}$  過冷却の条件下では TMAO は酵素分解されることを示している。

次に、Fig. 1 と全く同じ反応組成で  $-4^{\circ}\text{C}$  で凍結したときの TMAO の分解について調べた (Fig. 2)。TMAOase 無添加の時も DMA は急速に生成し、1 日後には  $0.295 \text{ mM}$  に達した。この量は未凍結時の 25 倍で

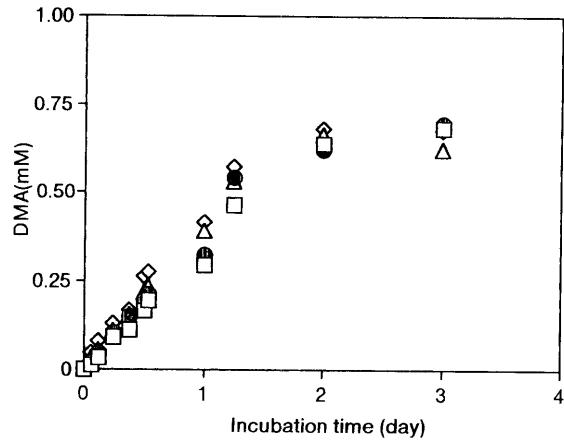


Fig. 2 Formation of DMA from TMAO in a frozen state at  $-4^{\circ}\text{C}$  in the presence of TMAOase. Assay condition was the same as in Fig. 1 except that enzyme concentration used was 0 (□), 1.6 (●), 3.2 (△), and 6.2 (◇) unit/mL and an ice crystal (5  $\mu\text{g}$ ) was introduced into the assay mixture to initiate freezing after 30 min at  $-4^{\circ}\text{C}$ .

ある。しかし、その後、反応時間が長くなるにつれて生成速度は低下し、2 日以後はほとんど増大しなくなった。次に、TMAOase を添加したが、添加した酵素濃度に関わらず無添加時と同量の DMA が生成された。この結果から、凍結すると酵素反応はほとんど停止し、非酵素的反応に置きわり DMA の生成速度が著しく増大することが明らかになった。

以上の結果から、TMAO の TMAOase による酵素分解は溶液中では進行するが、凍結するとほとんど停止することが明らかになった。

$-4^{\circ}\text{C}$  過冷却溶液中での TMAO の非酵素的分解は Fig. 3 に示すように、標準系と Fe-Cys 系のいずれの場合にも微量の DMA が生成し、TMA はほとんど生成しないことが明かとなった。しかし、同じ温度でも、凍結した場合には非酵素的分解が著しく起ることが示された。この場合は TMAO から DMA と TMA の両生成物を生じることが明らかになった。標準系では DMA より TMA の方が多量に生成されたが、Fe-Cys 系では DMA の方が多かった。

**-20°C 凍結貯蔵時の DMA の生成**  $-20^{\circ}\text{C}$  に設定された冷凍庫中に反応液 1.7 mL を静置したときの反応液中心部の温度変化は Fig. 4, a に示すように、冷凍庫中に静置してから過冷却状態を経ておよそ 40 分後から凍結しはじめ、80 分後には  $-20^{\circ}\text{C}$  に到達した。使用した冷凍庫中の試料温度はおよそ 150 分の周期で  $-19^{\circ}\text{C}$  と  $-24^{\circ}\text{C}$  の間で変化した。TMAOase を 0, 1.7, 4.2 unit/mL 添加した標準系で生成する DMA の量を 24 時間後まで調べ、Fig. 4, b に示した。貯蔵時間は氷冷試料に酵素を添加し、直ちに冷凍庫中に静置した時を 0 時間

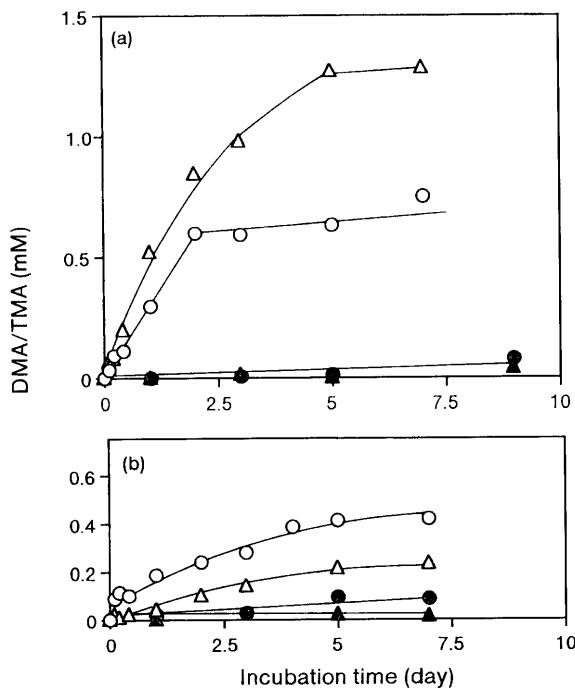


Fig. 3 Nonenzymic formation of DMA and TMA from TMAO at  $-4^{\circ}\text{C}$ . Assay was carried out in the standard (a) and Fe-Cys (b) assay systems in the supercooled state (closed symbols) and frozen state (open symbols) at  $-4^{\circ}\text{C}$ . Fe-Cys system contained standard assay mixture without ascorbate. DMA (circles); TMA (triangles).

とした。酵素無添加の場合は貯蔵後約2時間はDMAの生成はなかったがその後増大した。一方、TMAOaseを添加した場合は貯蔵初期からDMAの生成があり、酵素量が多い方が生成量が多かった。しかし、貯蔵24時間後にはいずれの場合もDMAの生成量は0.25~0.3mMとなり、酵素添加の影響は小さくなかった。Figs. 1と2の結果から、 $-20^{\circ}\text{C}$ に到達するまでの80分間に酵素反応によって生成されると予想される量に比べて、この間に生成するDMAの量ははるかに多い。この理由は明らかではないが、凍結中の未凍結液中の酵素や基質等の濃縮による反応の促進が考えられる。 $-4^{\circ}\text{C}$ で凍結した場合は過冷却した反応液に氷核を入れて瞬時に凍結させたので、このような効果が小さかったものと推定される。凍結すると、非酵素的反応が主となり、多量のDMAが生成されることから、貯蔵時間の経過とともに酵素の影響は小さくなるものと考えられる。

**凍結貯蔵中のDMAとTMAの生成** 試験管内の本実験の結果から、凍結溶液中では非酵素的反応でTMAOが分解され、DMAおよびTMAが生成されることが明らかになった。そこで、 $-4$ ,  $-20$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ での標準系とFe-Cys系で凍結貯蔵時のこれらの分解生成物の経時変化を調べた (Fig. 5)。標準系の場合 (Fig. 5, a),

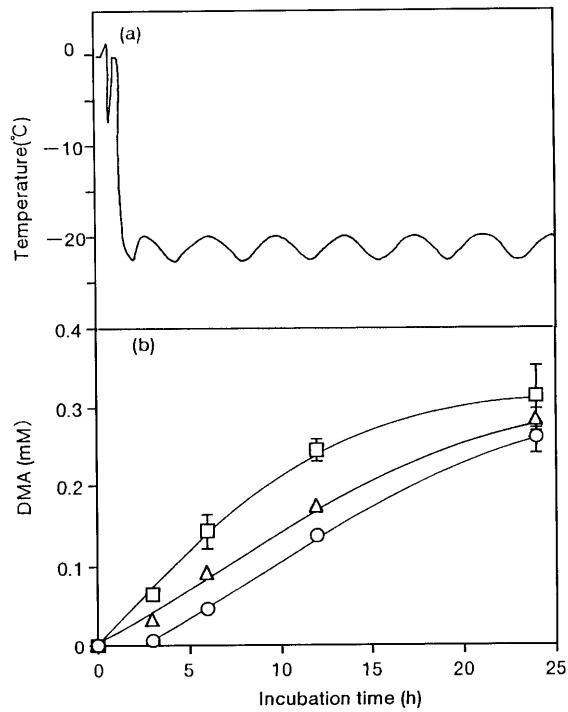


Fig. 4 Formation of DMA from TMAO at an early stage of the incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the presence or absence of TMAOase. (a) Temperature change at the center of the assay mixture (1.7 mL). (b) Formation of DMA in the standard assay mixture with 0 (○), 1.7 (△), and 4.2 (□) unit/mL TMAOase. Data are expressed as the means  $\pm$  SD for six independent determinations.

DMAよりTMAの方が少し多く生成されたが、低温になる程生成量は低下した。一方、Fe-Cys系 (Fig. 5, b)では標準系とは著しく異なる結果が得られた。特にDMAが多量に生成され、2日後には $-20^{\circ}\text{C}$ で2.3mM,  $-40^{\circ}\text{C}$ で2.7mMとなり、温度が低いほど多量に生成した。しかし、DMAの生成は2~3日以降はほとんど停止することが示された。Fe-Cys系におけるTMAの生成はわずかであった。

**$-4^{\circ}\text{C}$ と $-20^{\circ}\text{C}$ における非酵素的TMAO分解に及ぼすcofactorの影響** 非酵素的TMAOの分解に及ぼすTMAOase酵素反応のcofactorである $\text{Fe}^{2+}$ と還元剤の影響を調べた結果をTable 1に示す。 $-4$ および $-20^{\circ}\text{C}$ での貯蔵初期の2日間にTMAOから生成するDMAの量を比較した。 $-4^{\circ}\text{C}$ 過冷却溶液の場合はCys存在下で $\text{Fe}^{2+}$ または $\text{Fe}^{3+}$ で微量のDMAが生成しただけであった。また、カッコ内に示すようにTMAの生成もないことから、未凍結の溶液中ではTMAOは非酵素的にほとんど分解されないものと考えられる。

一方、凍結状態ではFig. 5に示したように、Fe-Cys系で多量のDMAが生成した。さらに、量的には少ないが $\text{Fe}^{2+}$ とアスコルビン酸の場合もDMAが生成し

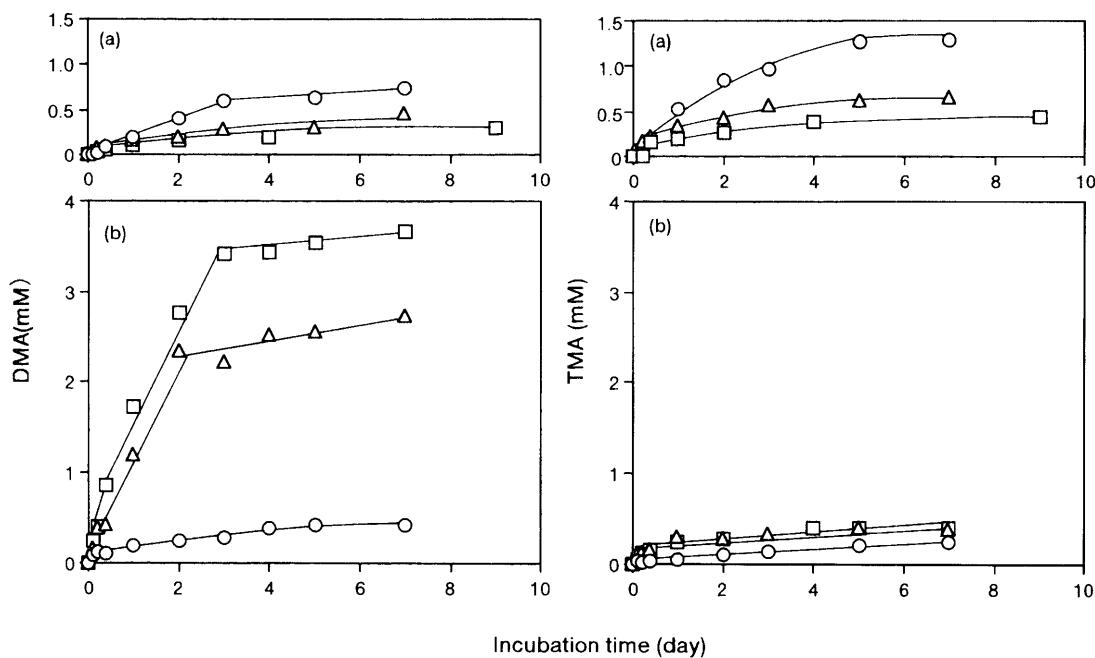


Fig. 5 Nonenzymic formation of DMA and TMA in frozen states. The incubation was carried out in the standard (a) and Fe-Cys (b) systems at  $-4^{\circ}\text{C}$  (○),  $-20^{\circ}\text{C}$  (△), and  $-40^{\circ}\text{C}$  (□).

Table 1. Effect of the composition of reaction mixtures on the nonenzymic formation of DMA and TMA at  $-4$  and  $-20^{\circ}\text{C}$

Composition of reaction mixture	Relative value (%) <sup>*1</sup>		
	Supercooled	-4°C	-20°C
TMAO + $\text{Fe}^{2+}$ + As <sup>*2</sup> + Cys (Standard assay system)	0(0)	100(100)	42(58)
TMAO + $\text{Fe}^{3+}$ + As <sup>*2</sup> + Cys	0(0)	32(96)	41(52)
TMAO	0(0)	0(0)	0(0)
TMAO + $\text{Fe}^{2+}$	0(0)	0(0)	9(0)
TMAO + $\text{Fe}^{3+}$	0(0)	0(0)	0(0)
TMAO + As	0(0)	0(0)	0(0)
TMAO + Cys	0(0)	0(0)	0(0)
TMAO + $\text{Fe}^{2+}$ + As	0(0)	71(16)	0(0)
TMAO + $\text{Fe}^{3+}$ + As	0(0)	29(20)	0(0)
TMAO + $\text{Fe}^{2+}$ + Cys (Fe-Cys assay system)	6(0)	50(15)	337(34)
TMAO + $\text{Fe}^{3+}$ + Cys	5(0)	11(15)	317(28)
TMAO + As + Cys	0(0)	0(6)	0(0)
$\text{Fe}^{2+}$ + As + Cys	0(0)	0(0)	0(0)
$\text{Fe}^{3+}$ + As + Cys	frozen	0(0)	0(0)
$\text{Fe}^{2+}$	0(0)	0(0)	0(0)
$\text{Fe}^{3+}$	0(0)	0(0)	0(0)

\*1 The data were expressed as relative values (%) to 0.64 and 0.82 mM for DMA and TMA respectively which were produced in the standard assay system incubated for the first 2 days in the frozen state at  $-4^{\circ}\text{C}$ . The data for TMA are presented in parentheses. \*2 Ascorbate.

た。また、 $\text{Fe}^{3+}$  と還元剤の組み合わせの場合も DMA が生成した。これらの結果から、非酵素的 DMA の生成反応も酵素反応<sup>14)</sup>と同じ cofactor を必要とし、 $\text{Fe}^{2+}$  が非酵素的触媒として機能していることが明らかになった。

TMA はアスコルビン酸の存在する標準系の方が Fe-Cys 系よりも多く生成したが、 $\text{Fe}^{2+}$  と還元剤が必要であることが示され、TMAO と還元剤だけでは反応は起らなかったことから、Cys と TMAO から直接 TMA が生成する反応<sup>19)</sup>はここでは起らないことが明らかになった。

**-20°C における非酵素的反応に及ぼす筋原纖維の影響** 筋肉中には多量の筋原纖維タンパク質が存在していることから、 $-20^{\circ}\text{C}$  凍結時の DMA の生成に及ぼす影響を Fe-Cys 系で調べた (Fig. 6)。凍結貯蔵初期の 2 日間の TMAO からの DMA の生成量は 2.3 mM であるが (Fig. 5, b)，同時に等モルの FA が生成している。DMA の生成量は筋原纖維の添加量の増大とともに徐々に低下し、30 mg/mL の筋原纖維の存在下では約 75% に低下した。この反応系から Cys を除くと DMA はほとんど生成しなかった。これは反応液中の筋原纖維タンパク質の Cys 残基は反応に関わっていないことを示唆している。

## 考 察

タラ科の魚類筋肉中には多量の TMAO が存在し、貯蔵中に分解されて等モルの DMA と FA が生成する。<sup>14)</sup>

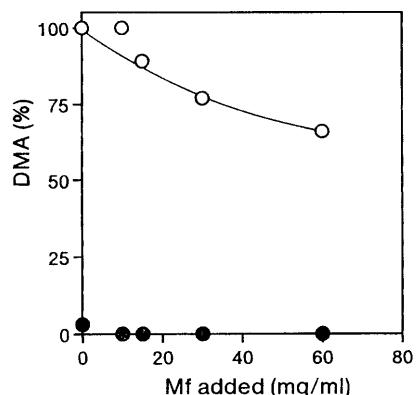


Fig. 6 Effect of added myofibrils on the formation of DMA at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Carp myofibrils (Mf) were added to the Fe-Cys system (open circles) and that without cysteine (closed circles). The reaction was carried out at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 days.

FAは魚肉タンパク質と反応してその品質を低下させることが知られている。<sup>6,20)</sup>特に、 $-5^{\circ}\text{C}$ から $-10^{\circ}\text{C}$ でDMAとFAが多量に生成するが、この生成は酵素TMAOaseの作用によるものと考えられてきたが、筋肉中の酵素の実在は長い間確認されていなかった。ParkinとHultin<sup>11,12)</sup>はTMAOaseがヘイク筋肉のミクロソーム画分に存在し、その酵素反応機構を推定した。著者ら<sup>14)</sup>はスケトウダラ筋肉からTMAOaseを精製単離し、酵素が普通肉中に存在することを明らかにした。しかし、酵素の存在と貯蔵肉中で酵素が作用することとは必ずしも一致しない。

本研究における試験管内のモデル実験の結果によると、未凍結溶液中ではTMAOは非酵素的には分解されないと推定された。したがって、魚の氷藏や室温程度の温度での貯蔵中のDMA生成はTMAOaseによる酵素反応によることになる。また、溶液中ではTMAの非酵素的生成もなかったことから、魚肉のTMA生成は血合肉あるいは微生物のTMAO還元酵素によるという従来の結果<sup>21)</sup>を支持するものである。酵素としてのTMAOaseの役割は基質TMAOと溶液中で低濃度の $\text{Fe}^{2+}$ を酵素に結合させ、 $\text{Fe}^{2+}$ を触媒として有効に利用するために重要であると考えられる。

一方、凍結した場合は酵素反応は起らないが、 $-20^{\circ}\text{C}$ の貯蔵初期には酵素の影響が認められた。 $-4^{\circ}\text{C}$ 凍結では過冷却状態から氷核を入れて瞬時に凍結させたが、 $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結では貯蔵庫内に反応液を静置したために、凍結中に溶質の濃縮が起り、この間に酵素が作用したと考えられる。標準系での貯蔵初期の24時間に生成されるDMAの量は0.3 mM程度であることから、凍結中に起る酵素反応によるDMAの生成量は少なく、その後非酵素的に生成する多量のDMA量のために、その

影響は貯蔵時間の経過とともに小さくなるものと推定される。非酵素的TMAOの分解が凍結により顕著に起る原因は溶質の凍結濃縮と考えられる。

タラのフィレーでは肉中の液体としての水は80%余りから $-5^{\circ}\text{C}$ 凍結で28%に、 $-20^{\circ}\text{C}$ でおよそ7%となる。<sup>22)</sup>これは単純な計算で3~10倍濃縮されることになり、鉄イオンと還元剤の濃縮により非酵素的DMAの生成が著しく促進される可能性が高い。

魚肉を凍結貯蔵したときにはTMAの生成は起らないこと、血合肉の場合もDMAに比較してTMAの生成はわずかであることが知られている。<sup>5,6)</sup>本研究で用いた標準系ではDMAよりTMAが多く生成される。この系は還元剤としてCysの他にアスコルビン酸を含んでいるが、Cysだけを還元剤として含むFe-Cys系が魚肉中のTMAO分解の傾向に近いことが明らかになった。この系では $-20^{\circ}\text{C}$ と $-40^{\circ}\text{C}$ で2日間で2~3 mMの多量のDMAが生成するが、その後の反応は非常に緩やかになった(Fig. 5)。この時点でのDMAの生成量は2~3 mMであることから、反応速度の低下が基質TMAO(20 mM)の欠乏のためでないことは明らかである。Table 1に示したようにTMAOと $\text{Fe}^{2+}$ ではDMAの生成は起らないことから、反応液に添加した $\text{Fe}^{2+}$ は溶存酸素で直ちに酸化され作用を失うと推定される。<sup>23)</sup>したがって、反応の低下は還元剤(Cys)濃度の低下による $\text{Fe}^{2+}$ の酸化が原因であると思われる。細胞内の鉄は $\text{Fe}^{2+}$ として存在しているが、その量は0.2~0.5  $\mu\text{M}$ である。<sup>23,24)</sup>魚肉中の $\text{Fe}^{2+}$ もこのように微量であると考えられることから、肉中に存在するCysやグルタチオン、NADHのような還元剤によって $\text{Fe}^{2+}$ の酸化が防止され、反応が維持されていると考えられる。したがって、酵素および非酵素的反応のいずれの反応も還元剤の消耗によって低下あるいは停止することになる。さらにCysやグルタチオンはFAとも反応することから、<sup>25-27)</sup>これによっても消耗される。Fig. 5に示したように、DMAの生成が凍結2日以降に2~3 mMに達した時点で停止する原因は反応溶液中のCys(2 mM)が酸化される他に、DMAと等モル生成したFAと反応して消失することが推定された。

この推測によるとDMAとFAの生成量が魚種間および普通肉と血合肉で異なる原因はTMAO含量の違いの他に還元剤の量的および質的違いによることが示唆される。また、魚肉中のDMAとFAの生成が酸素の存在や酸化状態では起らないこと、<sup>8)</sup>あるいは少量のFA添加がTMAO分解を阻害する知見<sup>28)</sup>と一致している。

## 文 献

- Dyer W. Amines in fish muscle. VI. Trimethylamine oxide content of fish and marine invertebrates. *J. Fish. Res. Board*

- Can. 1952; **8**: 314-324.
- 2) 天野慶之, 山田金次郎. タラ類筋肉中のホルムアルデヒド形成について. 日水誌 1964; **30**: 430-435.
- 3) 徳永俊夫. 魚類血合肉中のトリメチルアミノキシドならびにその分解-I. 日水誌 1970; **36**: 502-509.
- 4) 原田勝彦. 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. 水産大学校研究報告 1975; **23**: 163-241.
- 5) Castell CH, Neal WE, Dale J. Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine, and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets. *J. Fish. Res. Board Can.* 1973; **30**: 1246-1248.
- 6) 徳永俊夫. 冷凍スケトウダラの品質におけるトリメチルアミノキシド分解物の影響. 日水誌 1974; **40**: 167-174.
- 7) Castell CH, Smith B, Neal W. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle. *J. Fish. Res. Board Can.* 1971; **28**: 1-5.
- 8) Reece P. The role of oxygen in the production of formaldehyde in frozen minced cod muscle. *J. Sci. Food Agric.* 1983; **34**: 1108-1112.
- 9) Spinelli J, Koury B. Nonenzymic formation of dimethylamine in dried fishery products. *J. Agric. Food Chem.* 1979; **27**: 1104-1108.
- 10) Spinelli J, Koury B. Some new observations on the pathways of formation of dimethylamine in fish muscle and liver. *J. Agric. Food Chem.* 1981; **29**: 327-331.
- 11) Parkin KL, Hultin HO. Characterization of trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) demethylase activity from fish muscle microsomes. *J. Biochem.* 1986; **100**: 77-86.
- 12) Parkin KL, Hultin HO. Partial purification of trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) demethylase from crude fish muscle microsomes by detergents. *J. Biochem.* 1986; **100**: 87-97.
- 13) Kimura M, Seki N, Kimura I. Occurrence and some properties of trimethylamine-*N*-oxide demethylase in myofibrillar fraction from walleye pollack muscle. *Fisheries Sci.* 2000; **66**: 725-729.
- 14) Kimura M, Seki N, Kimura I. Purification and characterization of trimethylamine-*N*-oxide demethylase from walleye pollack muscle. *Fisheries Sci.* 2000; **66**: 967-973.
- 15) Dyer WJ, Dyer FE, Snow JM. Amines in fish muscle. V. Trimethylamine oxide estimation. *J. Fish. Res. Board Can.* 1952; **8**: 309-313.
- 16) Dyer WJ. Amines in fish muscle. I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *J. Fish. Res. Board Can.* 1945; **6**: 351-358.
- 17) Dyer WJ, Mounsey YA. Amines in fish muscle. II. Development of trimethylamine and other amines. *J. Fish. Res. Board Can.* 1945; **6**: 359-367.
- 18) Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 1953; **55**: 416-421.
- 19) Brzezinski B, Zundel G. Formation of disulphide bonds in the reaction of SH group-containing amino acids with trimethylamine-*N*-oxide. *FEBS Lett.* 1993; **333**: 331-333.
- 20) Sotelo CG, Pineiro C, Perez-Martin RI. Denaturation of fish proteins during frozen storage: role of formaldehyde. *Z. -Lebensm. -Unters -Forsch.* 1995; **200**: 14-23.
- 21) 山田金次郎. 魚介類におけるトリメチルアミノキシドの分解. 日水誌 1968; **34**: 541-551.
- 22) Sussman MV, Chin L. Liquid water in frozen tissue: study by nuclear magnetic resonance. *Science* 1966; **151**: 324-325.
- 23) Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; **1331**: 1-40.
- 24) Breuer W, Epsztain S, Cabantchik ZI. Iron acquired from transferrin by k562 cells is derived into a cytoplasmic pool of chelatable iron (II). *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 24209-24215.
- 25) Kitamoto Y, Maeda H. Revaluation of the reaction of formaldehyde at low concentration with amino acids. *J. Biochem.* 1980; **87**: 1519-1530.
- 26) Sanghani PC, Stone CL, Ray BD, Pindel EV, Hurley TD, Bosron WF. Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 2000; **39**: 10720-10729.
- 27) 早川和徳, 阿部英理子, 木村メイコ, 関 伸夫. ホルムアルデヒドによる魚類筋原纖維タンパク質の変性とその防止. 平成13年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 2001; 178.
- 28) Sikorski Z, Kostuch S. Trimethylamine-*N*-oxide demethylase: Its occurrence, properties, and role in technological change in frozen fish. *Food Chem.* 1982; **9**: 213-222.