

## *Escherichia coli* による Trimethylamine Oxide の還元について

西田孝太郎・小林 昭

### I. 緒 言

trimethylamine oxide の微生物による還元については、このものを含有する魚肉の腐敗と関連して、従来より多数の研究がなされていたが、近来この還元に関与する酵素 triamine-oxidase<sup>1)</sup>乃至は trimethylamine oxide reductase に着目されて、酵素学的な面の研究が進展してきた。著者は *E. coli* を用いてこのものの還元について研究を行ったが、特にこの酵素作用が硝酸塩の存在によつて阻害される点に注目し、この酵素及び硝酸塩還元酵素の両者の生成と関連して考察した。

### II. 実験方法

著者は京大系 *E. coli* 数種の内 No. 6 が trimethylamine oxide の還元力において最もすぐれていることを知つたので、これを試験菌種とした。富沢氏<sup>2)</sup>は *E. coli* の resting cell を用いて酵素作用を詳細に実験し、また超音波処理によつてこの酵素を cell-free に得られると報じている。著者は同氏の実験方法に準じて resting cell による還元を調べ、また living cell による場合についての実験を並行して検討した。

#### (1) living cell 及び resting cell

Tikka<sup>3)</sup> の用いた medium において lactose を glucose に代えて glucose-inorganic salt medium とし、これに trimethylamine oxide を 0.2%\* 添加せるものを basel medium\*\* とした。living cell による還元はこの培地に 35°, 48 時間培養した後、培養液の一部について trimethylamine を定量して検討した。resting cell は上記の如く培養した菌体を生理的食塩水で 2 回洗滌遠心分離して、一定量の M/5 phosphate buffer (pH 7.4) に懸濁した。cell suspension の bacterial N は約 0.2 mg/ml であつた。

#### (2) resting cell による trimethylamine oxide 還元反応

M/10 trimethylamine oxide 1 ml; M/10 glucose 1 ml; M/5 phosphate buffer, pH 7.4 1 ml; yeast extract (pressed yeast を 5 倍量の水にて約 90° に 20 分加熱後遠沈せる上澄液) 0.25 ml; 及び cell suspension 1 ml よりなる試験液を、37° に一定時間放置後 trimethylamine を定量した。この反応はすべて好氣的条件で行わせたが、Thunberg 管を用いて嫌氣的に行わせてもほぼ同様の結果を与えた。

註 \* 著者の実験によれば  $\text{Me}_3\text{NO}$  の添加量 0.5% で *E. coli* は生育阻害があらわれ、0.6% では生育しない。

\*\* glucose 1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04, NaCl 0.1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.15,  $\text{Me}_3\text{NO}$  0.2.

## (3) trimethylamine の定量

従来多数の方法があり最近 Dyer<sup>4)</sup> は Na-picrate を用いる比色法を提案しているが、著者の経験によればこの場合操作が煩雑であるので、富沢氏の加温通気法を採用した。即ち試料液に 35% formalin 0.5 ml, 30% KOH 0.5~2 ml を加えて 45° に 15 分加温通気する。溜出する trimethylamine を富沢氏は 2% 硼酸に吸収せしめているが、滴定の終点がやや明確を欠くので著者は N/100 HCl を用い、N/100 NaOH を以て残余の HCl を滴定し trimethylamine 量を知ることとした。

(4) NaNO<sub>2</sub> の定量

試料液に醋酸 uranium 及び脱色炭を加えて除蛋白、脱色して濾過する。これに Griess-Romijn の試薬<sup>5)</sup>約 0.1 gm を添加して呈色せしめ、30 分放置後島津製光電比色計 filter S<sub>53</sub> にて比色定量した。

なお実験に用いた trimethylamine oxide は著者の実験室において合成した<sup>6)</sup>が、mp. 96° の白色柱状結晶で結晶水 2 分子のものに相当し、picrate の mp. は 189° であり、文献記載に一致する。

## III. 実験結果及び考察

## (1) living cell による還元

i) 培養基の pH をかえて培養した場合の還元率は Fig. 1 に示すとおりである。

ii) trimethylamine oxide が N 源として利用されるか否かを検するため、basal medium

の硫酸量を変えて培養した結果は Table 1 の如くである。

iii) 接種後培養の時間的経過と trimethylamine oxide の還元量及び残糖率との関係をしらべた結果を Fig. 2 に示す。

trimethylamine oxide が N 源として利用

Fig. 1 The pH value of the medium and the reduction of trimethylamine oxide.

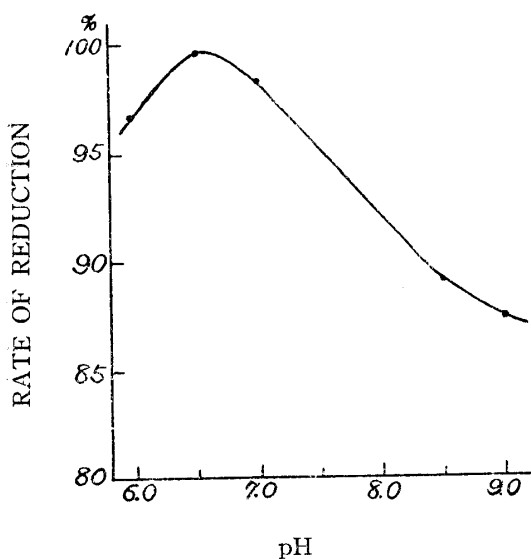


Table 1 The content of ammonium sulphate in the medium and the reduction of trimethylamine oxide.

No.	1	2	3	4
Content of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	% 0*	0.05	0.1	0.15
Rate of reduction	% 0*	87.6	90.6	91.8

\* non growth was observed

註 \* 酒石酸 89 gm, sulphanilic acid 10 gm, α-naphthylamine 1 gm を乳鉢にて充分搗碎混合する。

され得ないことは明らかであり、上記の結果は何れも trimethylamine oxide が菌体の増殖と平行して還元されることを示している。還元率が最大となる場合の medium の pH は *E. coli* 生育の最適 pH と一致して居り、また培養開始後菌体の増殖が著しくなると共に trimethylamine oxide の還元が急激に起ることが認められる。

(2) Nitrate による阻害

NaNO<sub>3</sub> の影響は Taylor<sup>6)</sup> が始めて用いて以来魚の保存と

関連して研究されてきたがその魚肉の保存に対する効果は部分的であるにせよ、このものが trimethylamine oxide の細菌による還元を防ぐ点にあるのであろうとされている。<sup>7)</sup> 著者の実験においても、N 源として NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を用いれば還元が著しく低下して、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> の添加がかえって阻害的に作用することが認められた。この場合 medium 中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の増加の影響をさけるため、NaNO<sub>3</sub> を添加しても全く同様な阻害作用をなし、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> による影響であることが考えられる。NaNO<sub>3</sub> をそれぞれ 30, 40 及び 50 mg 宛添加した basal medium 100 ml に培養し、48 時間後 trimethylamine を定量した結果、ならびにこの際得られる菌体を resting cell として還元反応を行わせた結果は Table 2 及び Fig. 3 に示すとおりである。

Castell 及び Snow<sup>8)</sup> は数種の菌の unwashed cell suspension による還元において、nitrate 還元菌では nitrate による阻害が著しく、非還元菌では阻害が殆んど、または全く起らないことを認め、かつ nitrite についても亦全く同様なことが認められるとしている。これより先 Watson<sup>9)</sup>

Fig. 2 The relationship of the incubation time to the reduction of trimethylamine oxide and the residual glucose in the medium.

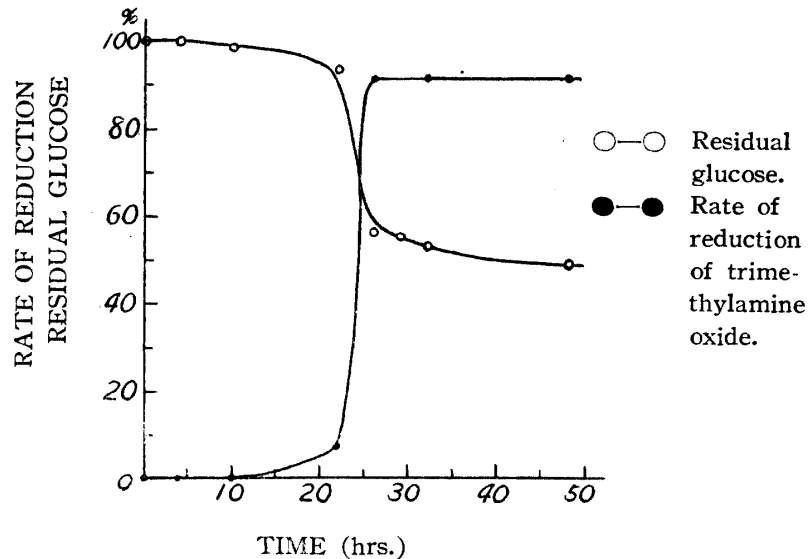


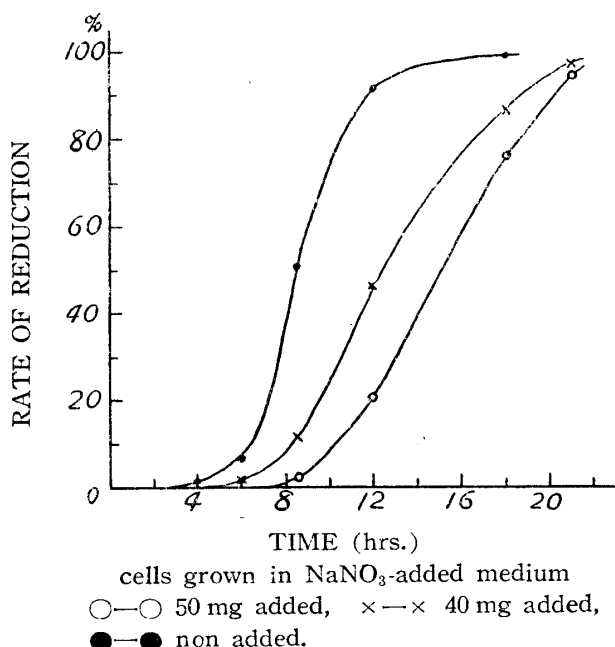
Table 2 The influence of sodium nitrate against the reduction of trimethylamine oxide by living cell.

No.	1	2	3	4
NaNO <sub>3</sub> added to medium*	mg 0	30	40	50
Rate of reduction	% 100	13.9	10.9	9.6

\* basal medium 100 ml

は *Achromobacter* の cell suspension を用いて trimethylamine oxide を還元させる時、nitrate または methylen blue が共存すれば trimethylamine oxide の還元を阻害し、他方 fumarate は阻害的でないことを見出した。そしてこのことは、potential series において methylen blue 及び nitrate が trimethylamine oxide より高く fumarate が低いからであると考えれば説明できるとし

Fig. 3 The reduction of trimethylamine oxide by resting cell grown in nitrate-added medium.



そのためこれを resting cell として, nitrate の存在しない条件で反応させても, 新たに trimethylamine oxide に対する適応がなされるまで還元が始まらないものと考えられる。

### (3) casein 加水分解液の添加

Bilien<sup>10)</sup> は *E. coli* における formic hydrogenase, formic hydrogenlyase 及び, hydrogenase の生成, ならびに nitrate によるこれら 3 酵素の阻害と casein 加水分解液との関係について報告している。著者は trimethylamine oxide 還元酵素の場合には如何なる影響を与えるかを検討するため, 次のような実験を行った。casein 加水分解液は硫酸を以て 48 時間煮沸分解したものを, Ba(OH)<sub>2</sub> にて中和脱硫酸し, BaSO<sub>4</sub> による吸着を考慮して約 10% の加水分解液となる如く水を加え, 一定量となして使用した。

i) basal medium 100 ml に対し casein 加水分解液 20 ml を添加して培養した菌体を, resting cell として還元反応をなさしめた結果

ている。

著者の実験においては, nitrate を添加した medium に生育した菌を resting cell として還元反応を行わせたのであつて, この場合の反応液には nitrate は共存しない。しかるに nitrate を添加した medium に生育した菌体は, しからざるものに比べて還元反応が著しくおくれることが認められた。即ち培養過程における阻害は Watson の考え方によつて解釈するとしても, resting cell とした場合の nitrate の阻害的影響は, これによつては説明できない。富沢氏は trimethylamine oxide の還元は生産された適応酵素によつてなされるといつている。上記の結果についても培養液に共存する nitrate が還元酵素の生成を阻害し,

Fig. 4 The effect of casein hydrolyzate upon the reduction of trimethylamine oxide by resting cell.

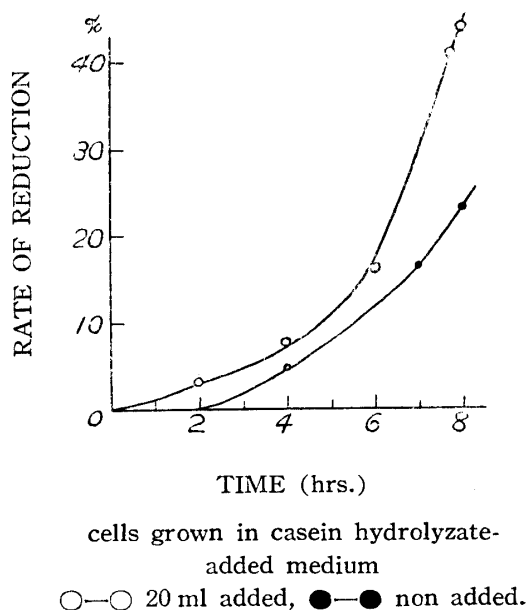


Table 3 The effect of casein hydrolyzate against the inhibition with sodium nitrate (living cell).

No.		1	2	3	4
Casein hydrolyzate added to medium*		ml 0	10	30	50
Rate of reduction	Me <sub>3</sub> NO	% 12.1	24.7	54.5	53.0
	NaNO <sub>3</sub>	% 52.4	27.0	18.4	10.8

\* basal medium (100 ml) with 50 mg NaNO<sub>3</sub>

は Fig. 4 に示すとおりである。

ii) NaNO<sub>3</sub> 50 mg を加えた basal medium 100 ml に添加する casein 加水分解液の量を変え、それぞれ培養した時の trimethylamine 生成量、及びこの際得られる resting cell による還元反応の結果を Table 3 及び Fig. 5 に示す。

casein の加水分解液を添加した medium に生育した菌体は、無添加のそれに比べて著しい還元反応を示す。これは casein 分解液が trimethylamine oxide 還元酵素の生成に好影響を与えたからであろう。medium に nitrate が共存する場合においても、casein 分解液の添加によって nitrate による阻害が回復され、さらに添加量を増加すれば阻害が全く認められなくなる。一方 trimethylamine oxide の還元が増加する反面、nitrate の還元が減少している点が注目される。casein 分解液が nitrate の還元に影響を及ぼすか否かを見るため、trimethylamine oxide の代わりに NaNO<sub>3</sub> を 0.1% 添加した basal medium にて、casein 分解液の添加量を変えて培養し、NaNO<sub>2</sub> を定量した結果 (Table 4) 殆んど何等の影響をも与えないことがわかった。従って trimethylamine oxide 還元酵素と nitrate 還元酵素との間に適応の競合があることが覗かれる。

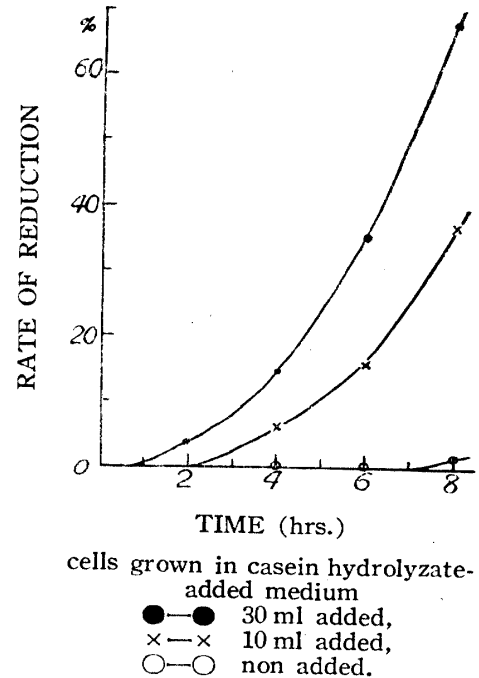
無機 N 源のみを与えた場合には、後者の生成がより容易であるため trimethylamine oxide の還元が抑制されるが、casein 分解液を添加すれば前者の生成に特異的に有利となり、拮抗的に

Table 4 The influence of casein hydrolyzate upon the reduction of nitrate (living cell).

No.	1	2	3	4
Casein hydrolyzate added to medium*	ml 0	10	20	30
Rate of reduction	% 53.9	49.3	53.2	51.4

\* basal medium (100 ml) without Me<sub>3</sub>NO

Fig. 5 The effect of casein hydrolyzate against the inhibition with sodium nitrate (resting cell).



nitrate の還元が減少するのである。

(4) 培養中 nitrate を添加する時期を異にする場合の阻害の状況

basal medium 100 ml に casein 加水分解液 10 ml を加えたもの、及び加えないものに培養し、培養開始

後 0, 5, 10, 15 時間にそれぞれ  $\text{NaNO}_3$  50 mg 宛を別々に添加した。48 時間後還元量を定量した結果は Table 5 のとおりである。

Table 5 The relation between the time of addition of nitrate and the reduction by living cell.

Medium	Rate of reduction	Age of culture when nitrate* was added				
		hr. 0	5	10	15	non added
Basal medium	$\text{Me}_3\text{NO}$	11.5%	28.1	89.8	89.8	93.3
	$\text{NaNO}_3$	68.1%	67.3	65.9	38.9	—
Basal medium with casein hydrolyzate**	$\text{Me}_3\text{NO}$	23.2%	32.3	88.6	89.2	90.9
	$\text{NaNO}_3$	62.7%	56.3	57.4	32.8	—

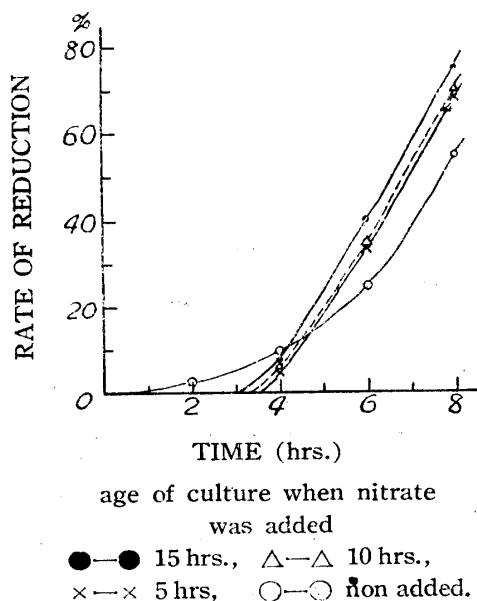
\* 50 mg to 100 ml medium, \*\* 10 ml to 100 ml medium

casein 分解液を添加して培養した方の菌体を, cell suspension として還元反応を行わせて Fig. 6 の如き結果を得た。

またこの cell suspension による nitrate の還元を検討するため, trimethylamine oxide の代わりに M/10  $\text{NaNO}_3$  1 ml を用い他は全く同じくした反応液を作り, 8 時間後  $\text{NaNO}_2$  を定量した。 $\text{NaNO}_3$  の還元率として Table 6 に示す。

上記の如く培養初期に添加した nitrate は casein 分解液が存在しても著しい阻害を示し, trimethylamine oxide 還元酵素生成の誘導期に添加された nitrate が nitrate 還元酵素の生成

Fig. 6 The relation between the time of addition of nitrate and the reduction of trimethylamine oxide by resting cell.



を促進し,還元は nitrate についてのみ起ることとなる。培養中期以後になれば既に trimethylamine oxide 還元酵素が生成され,かつその還元作用が相当進んでいるため, nitrate による阻害がみられない。この場合においても trimethylamine oxide が共存しない resting cell の反応条件では, nitrate の還元は添加した時間に影響されずほぼ同様の還元率が示されることは Table 6 に明らかである。resting cell による trimethylamine oxide の還元の場合には (Fig. 6), 顕著な結果があら

Table 6 The reduction of nitrate by resting cell (after 8 hrs.).

No.	1	2	3	4
Age of culture when nitrate was added	hrs. 5	10	15	non added
Rate of reduction	64.1	72.5	73.1	47.4

われていないが、培養初期に nitrate が添加された菌体では還元率が低く, trimethylamine oxide 還元酵素の生成が阻害されたものと思われる。

著者は cell-free の酵素についての実験を行い得なかつたから、上記の実験結果には菌体乃至は他の酵素系の影響が若干加わっていることも考えられる。しかしながら trimethylamine oxide の還元が nitrate により阻害されるのは、nitrate が単なる阻害剤として作用しているものではない。nitrate の存在によつて nitrate 還元酵素が生成され、拮抗的に trimethylamine oxide 還元酵素の生成が抑制されるからであり、又培養の条件によつてはその逆になる場合もあつて、これら両酵素の相対的な消長に密接な関連を有していることは明らかである。

#### IV. 要 約

*E. coli* の living cell 及び resting cell を用い、trimethylamine oxide の還元について実験した結果を要約すれば次の如くである。

- (1) living cell による trimethylamine oxide の還元は菌体の増殖に比例して増加する。
- (2) nitrate を medium に添加すれば trimethylamine oxide の還元は阻害され、また nitrate を添加した medium に生育した菌体では、無添加のそれに比べて、resting cell としての還元反応が著しくおくれて開始される。即ち培養中還元酵素の生成が阻害されていたため、nitrate の共存しない resting cell の反応条件において trimethylamine oxide に対する適応に数時間を要するものと思われる。
- (3) casein の加水分解液を培養基に添加すれば trimethylamine oxide 還元酵素の生成を促進する。
- (4) casein の加水分解液を添加することにより、nitrate による阻害が回復され同時に nitrate の還元は減少するが、nitrate の還元そのものは casein 加水分解液の添加には殆んど影響されないから、trimethylamine oxide 還元酵素の生成が促進される結果拮抗的に nitrate に対する適応が起らないものと考えられる。
- (5) 培養の初期に nitrate を添加すれば、trimethylamine oxide 還元酵素は著しく生成を阻害されるが、中期以後の添加は影響を与えない。

#### 文 献

- 1) Tarr, H. A., J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 367 (1939)
- 2) 富沢純一, 日細雑, 6, 405 (1951)
- 3) Tikka, J., Biochem. Z., 279, 264 (1935)
- 4) Dyer, W. J., J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 351 (1945)
- 5) Org. Synthesis Vol. I, p. 528; Tcmitta, M. and Tanaka, T., J. Biochem., 36, 345 (1944)
- 6) Taylor, H. F., U. S. P. 1929222 (1933)
- 7) Castell, C. H., J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 421 (1949)
- 8) Castell, C. H. and Snow, J. M., ibid., 8, 195 (1951)
- 9) Watson, D. W., ibid., 4, 267 (1939)
- 10) Bilien, D., J. Bact., 61, 515 (1951), 63, 793 (1951)

**R É S U M É****On the Reduction of Trimethylamine Oxide  
by *Escherichia coli***

Kotaro NISHIDA and Akira KOBAYASHI

In the reduction of trimethylamine oxide by living and resting cell of *E. coli* No. 6 the following results were obtained :

1) The reduction of trimethylamine oxide by living cell increased with the proliferation of cell.

2) Addition of nitrate to the medium inhibited the reduction of trimethylamine oxide. The resting cell grown in the nitrate-added medium, in comparison with that in the nitrate-free medium, required markedly prolonged lag period, which was considered to be necessary because nitrate had inhibited the adaptation to trimethylamine oxide during the incubation.

3) Addition of casein hydrolyzate to the medium promoted the formation of trimethylamine oxide reductase.

4) The inhibition with nitrate was recovered by addition of casein hydrolyzate and at the same time the reduction of nitrate was decreased. Since the hydrolyzate was not inhibitive to the reduction of nitrate, it is considered that the cells were not adapted to nitrate in consequence of competitive formation of trimethylamine oxide reductase.

5) The addition of nitrate to the young culture fairly inhibited the formation of trimethylamine oxide reductase, while scarcely any influence was observed when nitrate was added afterwards middle stage of incubation.

Other enzyme systems or the growth of the cell may have some influences on the above results without examination on the cell-free enzyme. Nevertheless, it is no doubt that nitrate does not inhibit the reduction of trimethylamine oxide as a simple inhibitor itself, but promotes the formation of nitrate reductase, and that the formation of trimethylamine oxide reductase is consequently suppressed. In another cultural condition quite reverse results were obtained and so the above results should be explained from the relative superiority or inferiority of these two adaptive enzymes.