

ローヤルゼリータンパク質の健康機能

Jozef Šimúth and Katarína Bíliková

ローヤルゼリーは進化の過程で自然が創り出した非常に特殊な栄養物質である。その名称からは女王蜂が作る栄養物質と誤解されることもあるが、女王蜂は実際には子孫に対して何ら母性を示さない。女王蜂はコロニー全体の遺伝的性質の源であり、再生産者ではあるが、産みつけた卵や孵った幼虫に対して母親として世話をすることはしない。女王蜂としては、コロニーの性質を遺伝的に決定する管理者としての役割が最重要で、自らの遺伝的性質に、交尾によって貯精嚢に貯えられた精子を使って自分の卵子を受精させ、交尾相手の遺伝的性質を加えながら、卵を産んでコロニーを築く。これが女王蜂を、巣箱内外の環境条件によって調節される「生きた産卵機械」（最盛期には1日に受精卵を2000個ほど産む）と呼ぶ所以である。

孵化した幼虫の育児と給餌は若い働き蜂によって行われる。働き蜂は頭部にある分泌腺から、女王蜂になる幼虫向けのローヤルゼリー、働き蜂になる幼虫向けのワーカーゼリー、雄蜂幼虫向けのドローンゼリーを分泌して育児をする。これらの3種のゼリーは化学組成上は相互に大きな差がなく、いずれもタンパク質、炭水化物、脂質を含んでいる。ローヤルゼリーとワーカーゼリーの根本的なちがいは、ある物質（群）が含まれていれば、同じ受精卵から女王蜂ができ、その物質（群）がない場合は、働き蜂になるということになるが、こうした物質は未だに確認されていない。女王蜂になるものでは発現し、働き蜂になるものでは発現が抑制される、何らかの特別な遺伝子に織り込まれた分化制御機構の発現が、両者を分ける基本機構と考えられる。これは、ホルモンなどで制御されることが多

い、いわゆる遺伝子の発現分化で、女王蜂を働き蜂から区別するような種々の表現型を制御する遺伝子群の制御系を含んでいる (Evans and Wheeler, 2000; Evans and Wheeler, 2001)。

この現象は多型現象として定義されるもので、ある生物が何らかの環境要因によって発生を調節あるいは転換することを可能にするものである。栄養条件は環境予測の明確な要因で、ミツバチを含む多くの昆虫で利用されている。幼若ホルモン (JH) と脱皮ホルモン (エクダイソン) は昆虫の多型現象調節ではとりわけ重要である。栄養によって誘導される多型現象は現在わかっている以上に広範に見られるものであろう。栄養刺激、つまりローヤルゼリーはミツバチコロニーでのカースト分化に、形態的、生理的、あるいは種々の行動的な方向付けをする発生過程において重要と考えられる。

女王蜂はこの分化過程を経て、一生ローヤルゼリーだけを食べるようになるおかげで長い寿命を保つ。実際、働き蜂は3~4週間しか生きられないのに女王蜂は4~5年生きる。このことが、ローヤルゼリーがヒトの寿命をも長くする可能性をもつという見解を招いている。ただしこれは科学的に実証されたわけではなく、今日までに可能性が支持されているのは、主にローヤルゼリーがヒトの栄養においては再活性化因子として働くという点であろう。

ミツバチの幼虫の発育においてはタンパク質の消費量が多いことが特徴で、1匹の幼虫が35 mgの大きさに達するのに50 mgのゼリーを必要とする (von Rhein, 1956)。ミツバチによってローヤルゼリー中に分泌されるタンパク質は、ミツバチのコロニーの成長を適正化する

さまざまな働きをもっている。下咽頭腺、大顎腺、および唾液腺がミツバチのタンパク質分泌腺としては重要なものである。花蜜をハチミツに変えるのと同様に、花粉から花粉団子へ、花粉団子から蜂パンへというミツバチ特有の過程を経て、最終的にはこれらの分泌腺で、数百種類のタンパク質やペプチドが合成される。合成されるいずれのタンパク質も蜂児が成長し分化するためには欠かせない栄養である。また外分泌されることで、栄養源である花蜜の炭水化物や花粉のタンパク質と接触することができる。同様に病原菌から幼虫を守るバリアとしても機能する。幼虫の餌中に含まれるタンパク質は、栄養素として、あるいは結合剤として、さらには抗微生物剤として、果ては輸送タンパク質としての性質を元来有している。本稿では、ローヤルゼリーおよびそのタンパク質成分について多角的に総括して述べたい。

ローヤルゼリーの成分組成

ローヤルゼリーの化学的成分分析は過去何年にもわたって行われてきた。松香(1998)はローヤルゼリーの含有成分について総括している。ローヤルゼリーの成分には、蜂群や品種、あるいは季節が異なることで相対的に変動が見られる。水分は生重量の約3分の2であり、タンパク質は12.5%、糖質が11%で、主要成分としてこれに続くのが脂肪酸の5%である。ローヤルゼリー中の糖は、フラクトース6%、グルコース4.2%、スクロース0.3%、その他0.5%となっていて、ちょうどハチミツの糖組成と同じような比率になっている。ローヤルゼリーに特有で注目に値するのはなんとといっても脂肪酸であろう。一般的に動植物が有する脂肪酸は炭素数が14～20個のものが多いが、これとは異なり、ローヤルゼリー中に見られる脂肪酸は、炭素数が8～10個の短鎖遊離脂肪酸で、通常ヒドロキシ脂肪酸かジカルボキシル脂肪酸として存在する。

ローヤルゼリーは生存のために不可欠な種々の成分に満ちた天然の食物である。しかし、人体への効果に関しては、未知の成分が効いてい

表1 平均的なローヤルゼリーの成分組成

成分	含有量*
チアミン	6 µg/g
リボフラビン	9 µg/g
ピリドキシン	3 µg/g
ナイアシン	50 µg/g
パントテン酸	100 µg/g
イノシトール	100 µg/g
ビオチン	1.5 µg/g
葉酸	0.2 µg/g
ビタミンC	4.0 µg/g
ビタミンA	～0
ビタミンD	0 (?)
ビタミンE	～0
ビタミンK	～0

*各数値は以下の報告による。

Evans et al., 1937; Haydak and Palmer, 1942; Haydak and Vivino, 1950; Lercker et al., 1982; 竹中, 1984; Howe et al., 1985; Ascot and Lensky, 1988; Karaali et al., 1988.

ると思われるものが多く、化学分析で明らかにされてきた範囲の成分で、全体の効果が説明できるということはない。

ローヤルゼリーの生理活性を賞賛する場合にも、個々の成分の含有量を度外視した非客観的な評価が行われていて、こうしたことへは非難も多い。例えば、ローヤルゼリー中のビタミン(表1)の含有量について、しばしばローヤルゼリーの有効性評価として強調されることがあるが、仮に誰かが毎日0.5gずつローヤルゼリーを摂取したとしても、ローヤルゼリー由来のビタミン総量は、所要量から見れば無視できるほどわずかな量にしかならない。

ローヤルゼリーをアピセラピーで利用する場合に重要となってくるのは、ミツバチが分泌するローヤルゼリー中の基本成分であるタンパク質について分子レベルで詳細を明らかにすることであろう。タンパク質に関しては最近になってそれがローヤルゼリーの主要な生理活性物質として認知されるようになってきた。この分野の研究は、日本とスロバキアを中心に、この10年ほどの間に大きく進展してきた。

ローヤルゼリーの構造

ローヤルゼリーは生物学的に複雑な構造をしており、個々の物質の相互関係は微少なものか

ら巨視的な状態まで多段階にわたり、まだ研究し尽くされていない部分が多い。一般的にローヤルゼリーの状態はエマルジョン（乳状液）である。走査電子顕微鏡（SEM）を用いた研究で生のローヤルゼリーの構造について特異的な状態が観察されている（Šimúth, 2001）。薄く伸ばしたローヤルゼリーを電子顕微鏡で観察すると、その一部に小球状の構造が見られる（図1）。この小球の大きさは20～80 μmで、小球同士は細い糸状の構造で互いにつながっている。この「糸」は直径約2 μmで、長さはさまざまである。高倍率で観察すると、各小球の表面にある殻構造からこの糸は放射状に広がっている。この微細構造はミツバチ働き蜂の下咽頭腺で作られたものであると推定される。

分泌されるタンパク質と 最終生成されるタンパク質の分類

ローヤルゼリーの本質的部分であるタンパク質は乾重の40%に達する（Šimúth, 2001）。総ローヤルゼリータンパク質の90%を占める主要タンパク質は分子量49～87 kDaで、同族のタンパク質群に含まれ、それをコードする遺伝子群も同族である（Hanes and Šimúth, 1992; Ohashi et al., 1997; Schmitzová et al., 1998; Malecová et al., 2003）。残りのタンパク質とペプチドには、抗微生物あるいは抗真菌性などの種々の機能を持つものがある（Fujiwara et

al., 1990; Bíliková et al., 2001; Bíliková et al., 2002; Bachanová et al., 2002）。

ミツバチの外分泌性のタンパク質は機能に基づいて以下のように分類できる。

酵素類：花蜜をハチミツに転換する酵素類で、 α -グルコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼ、アミラーゼなどが含まれる。これらは「工学的酵素」とも呼ばれる。

栄養性タンパク質：幼虫の餌中に含まれるもので、幼虫にとってタンパク質源として重要なものである。

防御タンパク質およびペプチド：ミツバチが生産物中に分泌するものでおもに成長過程の蜂児を病原から保護する。

生理活性タンパク質およびペプチド：コロニー内でさまざまな機能を示し、培養下の動物細胞に影響を与えるものである。

分子レベルでのローヤルゼリー タンパク質の特性

糖質や脂肪酸における詳細な成分分析に比べ、個々のローヤルゼリータンパク質の詳細な研究は例外的に行われたひとつの研究によってようやく数年前に始められたところである。ローヤルゼリーからプロテオーム研究レベルで単離された最初のペプチドは「ローヤリシン royalisin」である（Fujiwara et al., 1990）。その後私たちもローヤルゼリータンパク質をターゲット

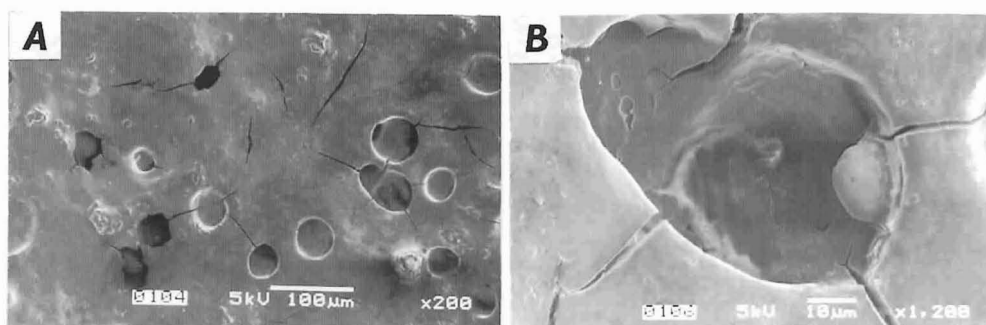


図1 自然状態のローヤルゼリーに見られる特異的な球状構造の走査電子顕微鏡像

A) 球状構造, B) 高倍率での球状構造の拡大図. 2日齢の女王蜂幼虫の入った王台を巢板から切り取り、幼虫を取り除いたあと王台ごと中のローヤルゼリーを -20°C で凍結して、ローヤルゼリーの全体的な構造を走査電子顕微鏡で観察した。現状が壊れないように定着処理をせず、再凍結した試料を直径1.2 cmのアルミニウム製試料台に薄膜としてのせたあと室温に72時間放置した。 10^{-3}Pa で真空状態にしたチャンバー内で銅の蒸着を行い、これを電子顕微鏡(JSM-580, Jeol製)の試料とした。

ットにした研究に着手した。最初に単離したのは MRJP1 と命名されたローヤルゼリーの主タンパク質である (Hanes and Šimúth, 1992). 次いで, 1994 年には 2 種のローヤルゼリータンパク質についてアミノ酸配列を初めて公表することができた (Klaudiny et al., 1994).

私たちの研究室では, ローヤルゼリーの主タンパク質の特性についての実験はすでに完了している (Schmitzová et al., 1998). その中でスロバキアのリプトスキー・フラドックにある養蜂研究所から得たカーニオラン種 *Apis mellifera carnica* の 8 日齢の働き蜂の頭部から得られた相補的 DNA ライブラリー (Klaudiny et al., 1994) を使用した. タンパク質のアミノ酸配列はそれをコードする相補的 DNA の塩基配列から導き出し, それによってローヤルゼリー中のタンパク質の主体 (総タンパク質の 90% を占める) であるいわゆるローヤルゼリータンパク質は, アミノ酸配列の相同性が 72% と高い 5 種類一組の, ある同族タンパク質ファミリーに属するものであることが明らかになった (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999a; Albert et al., 1999b). 私たちは物理化学性が明らかになる前にはこのタンパク質を MRJP (Major Royal Jelly Protein の頭字語) と呼んできたので, 得られた個々のタンパク質に対してはそれぞれ数字を付けて区別することにした (MRJP1, MRJP2 など).

その後, これらのタンパク質は水溶性に優れ (Šimúth, 2001), 物理化学特性はオパルブミン (卵白アルブミン, 主要な卵白タンパク質) や血清アルブミン (血清中の主タンパク質) に似ていて, 典型的な水溶性タンパク質であることが明らかになった (Smith et al., 1997). アルブミンという名前は卵白からの発想でラテン語の「*albus* (白の意)」に由来する. 私たちはローヤルゼリーのこの主要タンパク質に, ミツバチを意味する「*apis*」から派生する「*ap-*」を接頭語としてつけた「アパルブミン apalbumin(s)」という名前を提唱した. したがって MRJP1~5 はそれぞれ, アパルブミン-1, アパルブミン-2, アパルブミン-3, アパルブ

ミン-4, アパルブミン-5 となる.

アミノ酸組成を調べると, 必須アミノ酸率は, アパルブミン-1 で 48%, アパルブミン-2 で 47%, アパルブミン-5 では 51.4% となっていて (Schmitzová et al., 1998), 他の高栄養価タンパク質 (ミルクカゼイン 49.1%, ニワトリ卵白アルブミン 51.6%) に匹敵する. アパルブミンの必須アミノ酸含有率が高いことは, これがミツバチのコロニーの中で明らかに栄養素としての役割を担っていることを示している.

一方で, あるアパルブミンの示すあまり普通とは言えない分子構造についても触れておくべきであろう. 例えばアパルブミン-3 ではそのアミノ酸配列の C 末端側に QXNXX (Q はアスパラギン, N はグルタミン, X は不特定のアミノ酸) となる 5 個のアミノ酸の配列が何回も反復し (Albert et al., 1999a), その反復部位にはアルギニンとリジンが多く含まれている. またこの配列はこのタンパク質をコードする 5 つの対立遺伝子によって反復回数が 14~28 回の間で変動する点も興味深い. これは PCR を用いて個々のミツバチの DNA を調べアパルブミン-3 の多型性を調べた研究 (Beye et al., 1998) とも関係が深い. 栄養性タンパク質のアミノ酸配列長の多型現象が, 種類の異なるミツバチが分泌するローヤルゼリーの質的差異の評価につながるという新しい見方もできる. これはまた, ローヤルゼリータンパク質の生産と個々のミツバチの幼虫時代の栄養状態との関係という観点からみると, ミツバチコロニーの性質の差が遺伝的に決定していることを示すものとなる. 同様に防御タンパク質を含む上記以外のタンパク質群も, ミツバチコロニーの多型性に関与していることが示唆される. これはおそらくアメリカ腐蛆病のような細菌性の病気, さらにはカビやウイルスの感染に対して, あるコロニーが感受性であるか, あるいは逆に抵抗性であるかというような差として現れるのであろう.

私たちはローヤルゼリーからローヤリシンを単離する簡便な方法を開発した (Biliková et al., 2001). このペプチドの抗菌活性はアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae larvae* と灰色かび

病菌 *Botrytis cinerea* に対する成長阻害効果によって確かめた。

また私たちはローヤルゼリーのタンパク質分画からある抗菌性のペプチドを見いだして「アピシミン apisimin」と命名した (Bíliková et al., 2002). このペプチドのアミノ酸配列から考え得る相補的 DNA の塩基配列をミツバチの頭部で発現している DNA ライブラリから選び出して N 末端側の一部の塩基配列の解析を行った。その結果、このペプチドは Swiss-Port データベース (タンパク質のアミノ酸配列のデータベース) に登録されているいかなるタンパク質とも相同ではなく、またこれまでに見つかった防御タンパク質やペプチドである、ローヤリシン、アピダエシン、ヒメノプタエシン、およびアバエシンとも異なっていた。現在は、このペプチドをコードしている DNA を大腸菌内で異種発現させるために pMAL-C2 という発現可能なベクターにサブクローニングするところまで進んだ段階である (Šimúth, 未発表)。

今後の分子遺伝学的な研究の方向はミツバチの遺伝情報、特に抗菌性タンパク質の合成に関わる情報を増大させることにある。病気の効果的な予防という観点からも、この種の遺伝情報と、実際にコロニーの中で感染源にどのように抵抗性を発揮できるのか、その機構の解明も不可欠となっている。

ミツバチの分子生物学研究が目指すのは、系統育種および繁殖育種を行っている登録ブリーダーが、養蜂家に対して、女王蜂をその外観的な表現型としての特徴だけではなく、感染性の疾病からコロニーを守るタンパク質の合成に関わる遺伝子に関する情報までを提供できるようにすることである。私たちは、世界中の養蜂家と研究者が病気や寄生者に対してミツバチが本来持っている遺伝的性質を利用して戦えるように、知識上の可能性と経済的な可能性の双方を集積し始めたところである。

最も多いアパルブミン -1 の物理化学特性

アパルブミン -1 はこれまで分子生物学の立場から研究の対象となったことはなかった。こ

れまでの前処理では分離などが不適當で、他のローヤルゼリータンパク質同様にアパルブミン -1 の分子特性は不明であった。これまでのアパルブミンの単離精製法はタンパク質を沈殿させる、不溶性タンパク質分析向きのものであった (Schmitzova et al., 1998)。

私たちは、最も多量に含まれるアパルブミン -1 をその分子構造特性にしたがったやり方で効率よく分画するには超遠心分離法が利用できることを見いだした。超遠心分離法によって鮮黄色でやや固い、琥珀のような外観のゲルが得られた。前述のように生化学的な解析によってこのローヤルゼリーの主要タンパク質はアルブミン型の水溶性タンパク質であることがわかったのでアパルブミン -1 と名付けられたわけであるが、このアパルブミン -1 が脂肪酸との相互作用によって不溶性タンパク質分画を構成するようになるものと考えられる。この他のタンパク質、例えばアパルブミン -2 やアパルブミン -3 は、アパルブミン -1 と構造上相同性が高いにもかかわらず、ゲル化することはなく上清中にとどまる (Schmitzová et al., 1998)。

アパルブミン -1 はサブユニットをもっている (Šimúth, 2001)。基本のサブユニットは 420 kDa で、これは 55 kDa の単量体からなっている。顕微観察ではアパルブミン -1 はローヤルゼリー自体でも見られるようなエアフォーム構造をしていて、濃度によってさまざまな規則性を示す反復構造が観察された (図 2)。これはこのタンパク質の自己集合的な構造で、サブユニットの重合反応によるものである。アパルブミン -1 と相同性が高くても他のタンパク質では重合は起こらないが、この点も実に興味深い。

それではこの自己組織的な分子構造はミツバチコロニーにとってどのような機能を持っているのであろうか。多くのタンパク質が単量体であるよりも多量体である方が安定である。ローヤルゼリー中のタンパク質含有量が多いことから考えても、また理論的にいっても、ローヤルゼリー中の栄養性タンパク質がすべて急速に分解する可能性は低い。アミノ酸濃度があまりに高くなると、幼虫の消化管内で不均衡な浸透圧

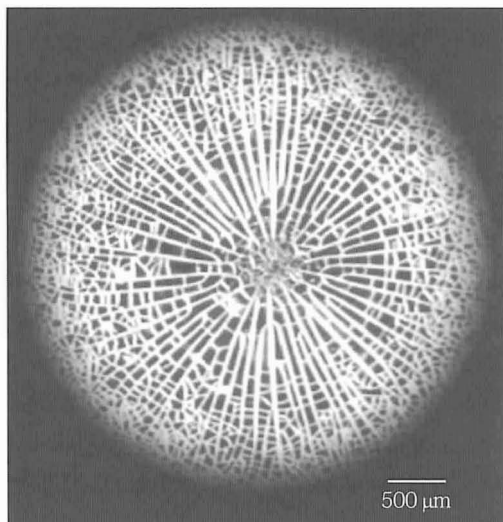


図2 アパルブミン-1の規則的な自己集合構造
1滴 (3 μ L) のアパルブミン-1 (80 mg/1 mL)
水溶液をカバーガラス上に置いて20分間放置
したあとの光学顕微鏡観察像。

の上昇を招いてしまう。私たちはアパルブミン-1がハチミツや花粉団子にも含まれることを確認している。ミツバチはアパルブミン-1を花の花粉から花粉団子を作る時点でも利用できるようである。つまりアパルブミンで花粉を包み込むという感じである。アパルブミン-1はローヤルゼリー中では物性に関わっており、ローヤルゼリー入り化粧品ではそれが肌触りなどに関係するのであろう。アパルブミン-1は幼虫の餌の栄養という以外にも、このように種々の機能を持っていると考えられる。

ローヤルゼリータンパク質および ペプチドの物理的機能性

最近の分子生物学、機能ゲノム学、さらには細胞生物学の手法をもってすれば、ローヤルゼリーとそのタンパク質の個々の特性について科学的に明らかにすることができるはずである。伝統的で経験主義的なアピセラピーにおける利用に関しても、実証実験を伴うローヤルゼリー研究が新しい流れとして現れてきている。ローヤルゼリーの生理的特性に関する研究は個々のタンパク質およびペプチドの生理機能の分子的研究によって成し遂げられる。

ローヤルゼリーの生理機能についての新しい

発見は、過去10年間に日本において行われ、そのことがローヤルゼリーをはじめとするミツバチ生産物が機能性食品として評価を受ける機会を改めて創り出した。

まず第一に、私たちは、ローヤルゼリーは奇跡でもなければ万能薬でもないが、治療という名目で利用するとある時にはわずかに、しかし多くの場合は相当の効果が得られることを受け入れなければならない。高品質のものを過大視することは常に危険であり、私たちは常に冷静で、自分たちの実験結果に対してできる限り客観的でなければならない。例えば、人類の加齢現象の減速化への影響といったものがある。この考え方は実証するのも反証するのも困難であろう。社会性昆虫の生殖個体の発生に重要な栄養物質が人類や他の哺乳動物の寿命を延ばし、また生殖能力を高めるはずであるという先験的な理由は何もないように思われる。ただ、アパルブミン-1およびアパルブミン-2の遺伝子がミツバチの脳の記憶や学習を司る部位で発現している (Kucharski et al., 1998; Kucharski and Maleszka, 2002) ことを根拠にすればアパルブミンはミツバチの神経系において何らかの機能を有するということができるであろう。

昆虫と哺乳動物の免疫システムの類似性についての新たな研究成果によって、これまで経験的に認められてきたローヤルゼリーが加齢現象に影響し得るという事実を間接的に再確認する結果となっている。最近ではローヤルゼリーのこの種の抗加齢作用は分子レベルでは明らかになってきている。マウスにおいてはDNAの損傷をローヤルゼリーが軽減することで寿命が延びると報告されている (Inoue et al., 2003)。

ローヤルゼリーを経口投与することでアトピー性皮膚炎症状を予防する栄養補給になることが示されている。小児期に発症するアトピー性皮膚炎は慢性の炎症性皮膚疾患で、掻痒感と湿疹を伴う皮膚の病変を特徴としている。患者数は、先進工業国を中心に急速に増えている。アトピー性皮膚炎の患者に頻繁に見られる症状として血清中のIgE抗体価の増加および血中の好酸球増加症があるが、この両者にはTh2細胞

で作られるサイトカイン IL-4 と IL-5 が関与しており、また病変部の細胞内の mRNA やタンパク質量を調べることでそのことは確認されている (Taniguchi et al., 2003).

サイトカインはそれぞれ種類によってミツバチやヒトの免疫反応に重要な遺伝子を活性化させる種々の役割を果たすことがわかっている。その過程で腫瘍壊死因子 α (TNF- α) は細胞増殖や炎症反応といった重要な細胞過程の調節が中軸となる働きをしている。ここで問題となるのはローヤルゼリー中のどの物質がこの過程に関与するかということであろう。この点では、アパルブミン-1 とアパルブミン-2、それにアピシミンがマウスのマクロファージ内で TNF- α の分泌を誘導することは確かめられた (Šimúth et al., 投稿中)。したがって、ミツバチは主に幼虫発育期に自己の生体防御機構としてこれらのタンパク質を餌の中に分泌しているということになる。このことは、ローヤルゼリータンパク質が、化学治療薬のように即効性物質として働くのではなく、生理機構の調節物質として働くことを意味している。

アパルブミンの生理活性では汎化はほとんど起こらないことが特徴である。必須アミノ酸の含有量が高い (約 50%) ことはこのタンパク質がミツバチコロニー内では主として栄養源となることを示し、栄養科学の観点からすればこれがこのタンパク質の主機能といえる。ローヤルゼリー由来のタンパク質とペプチドの栄養として以外の機能は幼虫体内の種々の調節過程の制御であると考えられる。行動学的な実験からは、いまだにアパルブミンが幼虫発育の初期にも後期にも同じように機能するかどうかという点について、示唆的ではあるものの直接的な回答は得られていない。幼虫の中腸でのローヤルゼリーの消化・代謝に関する研究 (Tsao and Shuel, 1968) を根拠とすれば、いくつかのローヤルゼリータンパク質は分解されないまま腸の上皮細胞層を通過するのであろう。

ローヤルゼリー中のタンパク質については完全に解明が終わっていないとはいえ、最近では試験管内で数種のアパルブミンがヒトの培養細

胞の非常に重要な生理過程に影響することが明らかになった。例えば分子量 350 kDa で N 末端側のアミノ酸配列がアパルブミン-1 と同じタンパク質 (Schmitzová et al., 1998; Júdová et al., 1998) は、ヒトの単球様細胞 (U937 細胞株: ヒト胸膜浸出液由来) とヒト=ヒト融合細胞 (HB4C5 細胞株: ヒトリンパ球とヒト腫瘍細胞を電気融合法により融合したもの) の増殖を促す (Kimura et al., 1995)。さらに、この研究ではこの 350 kDa のタンパク質の N 末端側に結合する糖鎖は昆虫を含む動植物に一般的なマンノース比の高い構造 (Man9-GlcNAc2) をしていることも見いだしている。Kamakura et al. (2001) は分子量 57 kDa で、N 末端側のアミノ酸配列がアパルブミン-1 と同じタンパク質が、ラットの肝細胞の一次培養株の増殖を促し、また血清のない状態でアルブミン生産量を増加させたと報告している。分子量 55 kDa で N 末端側のアミノ酸配列がアパルブミン-2 のような二次的に多いローヤルゼリータンパク質と同じタンパク質 (Schmitzová et al., 1998; Bíliková et al., 1999) はラットの一次培養細胞を活性化させたが、ヒトの単球様細胞の増殖には効果が見られなかった (Kimura et al., 1996)。生理活性を持つアパルブミンの化学構造の評価については、それぞれの生理機能における他の生理活性物質との協力作用の分子的機構を解明する端緒についたという段階であろう。

生理活性の観点からは、水溶性タンパク質のうち、量的に最も多く含まれる、酸性タンパク質であるアパルブミン-1 と塩基性タンパク質であるアパルブミン-2 が主要な位置づけにある。しかし、主要タンパク質のひとつであるアパルブミン-3 (MRJP3) は試験管内および生体内試験で抗アレルギー作用を示し、このアパルブミン-3 の免疫調節作用は臨床的にも有効と考えられている (Okamoto et al., 2003)。これらの知見と、昆虫と哺乳動物の免疫システムの類似性 (Dushay et al., 1966; Imler and Hoffmann, 2001; Baud and Karin, 2001; Gliński and Kostro, 2001) から、ローヤルゼリータンパク質は重要な生理過程の調節作用を含む関

与因子であるということが示される。このことは人工ハチミツでは無反応でも、1%の天然ハチミツ溶液では未感作の MonoMac-6 細胞から TNF α が分泌されることでも間接的に確かめられている (Tonks et al., 2001)。

ヒトの単球様細胞の増殖 (Kimura et al., 1995), 免疫調節作用 (Šver et al., 1996), ローヤルゼリーによるアレルギー鎮静化作用 (Oka et al., 2001), さらにはローヤルゼリーペプチドによる抗高血圧症効果 (Matsui et al., 2002) などの生理活性に関する実験結果の蓄積が、医療におけるローヤルゼリーの応用分野を広げ、また幼虫発育期における生体防御反応の誘導物質という観点では、ミツバチの進化過程での本質的な機能の理解につながっている。もしこの考え方が正しいのであれば、ローヤルゼリータンパク質が免疫反応や炎症反応に重要な働きを示すサイトカイン調節因子の生産を誘導し、細胞増殖や分化、細胞死を調節する働きを持つ可能性が高まる。私たちは、1%のハチミツ水溶液中のローヤルゼリータンパク質が、試験管内でヒト単球様細胞での TNF- α の生成促進効果を示すことも確認した (Tonks et al., 2001)。これは同時に、このタンパク質が、細菌の感染以前から特定の生理機構 (例えばサイトカイン生成系など防御物質を生産する系) に関与する遺伝子を活性化させていることを示唆している。

最新の生化学的、分子生物学的な手法を応用することで、ローヤルゼリーに関する私たちの知識が増大することは明かである。さらに、ミツバチがいかにして侵入する微生物や寄生者と戦っているかを知ることが、ミツバチの免疫機構を医学や獣医学分野といったより応用的な分野に焦点を当てるきっかけになるであろう。

ミツバチは他の昆虫同様、細菌の感染に対して抗菌性ペプチドをコードしている遺伝子の発現を高め、生成されたペプチドはやがて血中に放出される。こうした「免疫反応」は急速で (数時間以内に見られる) あるが、非特異的であることが多い (Casteels, 1997; Zasloff, 2002)。アピダエシン, アバエシン, ヒメノプタエシンのような抗菌性ペプチドは、細菌の感染後、そ

れぞれ個々に誘導され、血中に放出されるが、ミツバチのディフェンシンであるローヤリシン (Fujiwara et al., 1990; Bíliková et al., 2001; Bachanová et al., 2002) とアピシミン (Bíliková et al., 2002) はローヤルゼリー中に見つかっており、おそらくミツバチが一生涯続けるものであると考えられる。微生物がミツバチ生産物に含まれる場合には直接、また防衛タンパク質やペプチドをサイトカインの関与する作用系を誘導することで、ローヤルゼリーのタンパク質とペプチドが病原性微生物に対抗することができるようになっている。

明らかにされているローヤルゼリータンパク質の生化学的あるいは生物学的特性は、ミツバチがいかに病気に対して防御系を働かせているかという問題を通じて機能性ゲノム科学の基礎を提供し、また同時に機能性食品としてのミツバチ生産物の生理活性のよりよい理解材料となっている。臨床でのローヤルゼリーの効果・効能を評価するにはまだ難関があるがローヤルゼリーを利用できる人々が、効果の見られる条件や効果の機作、あるいは適用量や適用期間などを評価する見込みはある。ローヤルゼリーおよび機能性食品の重要成分として含まれるタンパク質の本質を見極めるというのが、現時点で、ミツバチがローヤルゼリー中に分泌するタンパク質の分子レベルでの実験研究の方向性であろう。アパルブミン、特にハチミツ中のタンパク質として最も多く含有されるアパルブミン-1は、機能性食品としてのハチミツや他の生産物の生理活性を評価する際に、適切な実験系を用いてサイトカイン生成を測定することができれば、有効な指標物質となる。

最近、アパルブミン-1はトウヨウミツバチ (Srisuparbh et al., 2003) でもアフリカ蜂化ミツバチ (Sano et al., 2004) でも、ローヤルゼリー中の最大含有タンパク質であることが確認された。このことは、ミツバチの種を超えてローヤルゼリーの成分としてアパルブミン-1が共通であることを意味する。とすれば同じようにいずれのミツバチのハチミツ中にもアパルブミン-1が含まれるということになる。こうし

た結果から、ハチミツ中のアパルブミン-1の存在に基づいた生理学的な試験のような免疫化学試験によるハチミツの偽和性の検出なども可能になってくると考えられる。

ここで、免疫系、内分泌系、神経系、循環系および消化系の調節に何らかの役割を担うタンパク質およびその食品の第3の機能が見えてくる。これは新しいだけでなく、ローヤルゼリーのような、病気の予防の助けとなる生理的に活性のある食品成分の応用という分野になる。この考え方からは「機能性食品」という新しい言葉は、薬品のように患ってから病気を治すものではなく、病気の診断が必要となる前から予防のために利用が勧められる食品群を示す言葉といえるだろう。当初は、栄養欠乏症の予防から始まったが、やがてバランスのよい食事へ、さらには適切な栄養構成という考え方に移り変わる中で、今日、目指されているのは、病気や故障につながる危険因子を減少させ、生理的機能を向上させることである。

20世紀を通じて栄養面での向上が見られ、またローヤルゼリータンパク質の生理活性が明らかにされたことで、機能性食品の成分としてのミツバチ生産物の利用機会は、今後ますます増大することになるだろう。

(著者の住所は下記参照 翻訳:中村 純)

引用文献

- Albert, Š., J. Klauđiny and J. Šimúth. 1999a. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 427-434.
- Albert, Š., D. Bhattacharya, J. Klauđiny, J. Schmitzová and J. Šimúth. 1999b. *J. Mol. Evol.* 49: 290-297.
- Asencot, M. and Y. Lensky. 1988. *Insect Biochem.* 18: 123-33.
- Bachanová, K., J. Klauđiny, J. Kopernický and J. Šimúth. 2002. *Apidologie* 33: 259-269.
- Baud, V. and M. Karin. 2001. *Trends Cell Biol.* 11: 372-377.
- Beye, M., P. Neumann, J. Schmitzová, J. Klauđiny, Š. Albert, J. Šimúth M. Felder, and R. Moritz. 1998. *Apidologie* 29: 255-263.
- Bíliková, K., J. Klauđiny and J. Šimúth. 1999. *Biologia* 54: 733-739.
- Bíliková, K., G. Wu, and J. Šimúth. 2001. *Apidologie* 32: 275-283.
- Bíliková, K., J. Hanes, E. Nordhoff, W. Saenger, J. Klauđiny and J. Šimúth. 2002. *FEBS Letters* 528: 125-129.
- Casteels, P. 1997. *IV: Molecular mechanisms of immune responses in insects.* Breay, P. T. and D. Hultmark (eds.), pp. 92-110.
- Dushay, M. S., B. Asling and D. Hultmark. 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1034-1047.
- Evans, H. M., G. A. Emerson and J. Eckert. 1937. *J. Econ. Entomol.* 30: 642-46.
- Evans, J. D. and D. E. Wheeler. 2000. *Genome Biol.* 2:1-6.
- Evans, J. D. and D. E. Wheeler. 2001. *BioEssays* 23: 62-68.
- Fujiwara, J., T. Yaeshima, T. Kawashima and K. Kobayashi. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 11333-11337.
- Gliński, Z. and K. Kostro. 2001. *Cent. Eur. J. Immunol.* 26: 43-49.
- Hanes, J. and J. Šimúth. 1992. *J. Apic. Res.* 31: 22 - 26.
- Haydak, M. H. and L. S. Palmer. 1942. *J. Econ. Entomol.* 35: 319-20.
- Haydak, M. H. and A. E. Vivino. 1950. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 43: 361-67.
- Howe, S. R., P. S. Dimick and A. W. Benton. 1985. *J. Apic. Res.* 24: 52-61.
- Imler, J. L. and J. A. Hoffmann. 2001. *Trends Cell Biol.* 11: 304-310.
- Inoue, S., S. Koya-Miyata, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda and M. Kurimoto. 2003. *Exp. Gerontol.* 38: 965-969.
- Júđová, J., J. Klauđiny and J. Šimúth. 1998. *Biologia* 53: 777-784.
- Kamakura, M., N. Suenobu and M. Fukushima. 2001. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 282: 865-874.
- Karaali, A., F. Meydanoglu and D. Eke. 1988. *J. Apic. Res.* 27: 182-85.
- Kimura, Y., N. Washino and M. Yonekura. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 507-509.
- Kimura, Y., S. Kajiyama, J. Kanaeda, T. Izukawa and M. Yonekura. 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 12: 2099-2102.
- Klauđiny, J., J. Hanes, J. Kulifajová, Š. Albert and J. Šimúth. 1994. *J. Apic. Res.* 33:105-111.
- Kucharski, R. and R. Maleszka. 2002. *Genome Biol.* 3: res. 0007.1-0007.9.
- Kucharski, R., R. Maleszka, D. C. Hayward and E. E. Ball. 1998. *Naturwissenschaften* 85: 343-346.
- Lercker, G., P. Capella, L. S. Conte, F. Ruini and G. Giordani. 1982. *J. Apic. Res.* 21: 178-84.
- Malečová, B., J. Ramser, J. K. O' Brien, M. Janitz, J. Júđová, H. Lehrach, and J. Šimúth. 2003. *Gene* 303: 165-175.

- Matsui, T., A. Ykiyoshi, S. Doi, H. Sugimoto, H. Yamada and K. Matsumoto. 2002. *J. Nutr. Biochem.* 13: 80-86.
- 松香光夫. 1998. *ミツバチ科* 19: 1-8.
- Ohashi, K., S. Natori and T. Kubo. 1997. *Eur. J. Biochem.* 249: 797-802.
- Oka, H., Y. Emori, N. Kobayashi, Y. Hayashi and K. Nomoto. 2001. *Intl. Immunopharmacol.* 1: 521-532.
- Okamoto, I., Y. Taniguchi, T. Kunikata, K. Kohno, K. Iwaki, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 2003. *Life Sci.* 73: 2029-2045.
- von Rhein, W. 1956. *Insect. Soc.* 3: 203-212.
- Sano, O., T. Kunikata, K. Kohno, K. Iwaki, M. Ikeda and M. Kurimoto. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 15-21.
- Schmitzová, J., J. Klaudivy, Š. Albert; W. Schröder, W. Schreckengost, J. Hanes and J. Šimúth. 1998. *Cell. Mol. Life. Sci.* 54:1020-1030.
- Šimúth, J. 2001. *Apidologie* 32: 69-80.
- Smith, A. D. et al.(eds). 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.* Oxford University Press, Oxford. p. 23.
- Srisuparbh, D., S. Klinbunga, S. Wongsiri and S. Sittipraeed. 2003. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36: 572-579.
- Šver, L., N. Oršolić, Z. Tadić, B. Njari, I. Valpotić and I. Bašić. 1996. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 31-38.
- 竹中哲夫. 1984. *玉川大学農研報* 24: 101-149.
- Taniguchi, Y., K. Kohno, S. -I. Inoue, S. Koya-Miyata, I. Okamoto, N. Arai, K. Iwaki and M. Ikeda. 2003. *Intl. Immunopharmacol.* 3: 1313-1324.
- Tonks, A., R. A. Cooper, P. C. Price, P. C. Molan and K. P. Jones. 2001. *Cytokine* 14: 240-242.
- Tsao, W. and R. W. Shuel. 1968. *J. Apic. Res.* 7: 119-128.
- Zasloff, M. 2002. *Nature* 415: 389-395.

JOZEF ŠIMÚTH and KATARÍNA BÍLIKOVÁ. Potential contribution of royal jelly proteins for health. *Honeybee Science* (2004) 25(2): 53-62. Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9. SK-84538 Bratislava, Slovakia.

The proteins secreted by honeybee into its products have different functions in establishment of optimal development of honeybee colony. The polyfunctional properties of the secreted proteins may be demonstrated on proteins of larval diet, particularly proteins of royal jelly (RJ). Systematic research of RJ proteins at molecular level showed

that the main part of the RJ protein fraction belongs to one protein family wherein the most abundant RJ proteins occupy an exclusive position because they are simultaneously synthesized in brain as well as in hypopharyngeal glands of adult honeybee. The minor part of RJ proteins is composed of proteins with different functions, including antibacterial and antifungal properties.

A general view on the activity in a honeybee colony is fascinating: the way how a honeybee gets, processes and protects the nectar, honey, and pollen, and ensures the nutrition of the brood. In these processes the proteins secreted by honeybee play a significant role. They are a material link for interactions between the individual members of the honeybee family: from nursing of larvae to processing of propolis. They represent a substrate for generating a nutrition chain by which honeybees are associated into a superorganism. RJ is considered a unique nutrient developed in nature during evolution of animals and has been accepted and broadly used as a health promoting substance. There is growing scientific evidence to support the concept that the most attractive bioactive compounds of honeybee products are proteins of RJ. The new experimental knowledges on the similarities between the immune systems of insects and mammals confirmed indirectly the original empirical observations that RJ could participated as immunomodulators. The recent discovery that RJ-proteins may have physiological functions as suppressors of allergic reactions, their anti-hypertensiv and proliferation stimulatory properties opened a new era in application of RJ and honey. The quality of honeybee products has long been evaluated basing on static properties that can be defined by chemical, physical, and instrumental analyses. Nowadays, it is generally understood that quality of honeybee products should be defined in terms of a variety of dynamic functions of their individual components. Systematic molecular-biological research of the individual proteins and peptides of RJ showed that their polyfunctional properties could be used as markers for standardization of dosages for application of RJ as a substance that can be consumed as a part of the daily diet, and which serves to regulate or otherwise affect a particular bodily process when ingested. Medical-pharmacological effects of honeybee products will be precisely evaluated and quantified on the basis of quantity of the individual proteins of RJ present in the used diet.