

ローヤルゼリー中に新たに見出された品質指標となる タンパク質: ロイヤラクチン

鎌倉 昌樹

ローヤルゼリー (RJ) は、働き蜂が下咽頭腺と大腮腺から分泌する女王蜂の幼虫を育成させるための食物である。RJ は、タンパク質、糖質、脂質、アミノ酸、ビタミン、ミネラルなどを主成分とし (Takenaka, 1982)、他に抗腫瘍活性や殺菌作用を有する 10-ヒドロキシ-2-デセン酸 (10-HDA) (Townsend et al., 1959; Blum et al., 1959) や抗菌作用を持つ分子量 5,500 のペプチド (Fujiwara et al., 1990) などの生理活性物質やプロテアーゼ (Funakoshi et al., 1993)、グルコースオキシダーゼ (Takenaka et al., 1986)、 α -グルコンダーゼ (Kubo et al., 1996) などの酵素を含んでいることが報告されている。また、RJ は血圧降下作用 (Shinoda et al., 1978)、抗炎症作用 (Fujii et al., 1990)、血清コレステロール低下作用 (Nakajin et al., 1982) など様々な薬理作用を有することから、医薬品原料や栄養補助食品として幅広く活用されている。

RJ の物理的性状や化学成分の組成は、保存条件によって容易に変化する。RJ を 5°C 以下

の低温で保存した場合、その成分含量に殆ど変化は見られないが、室温 (約 25°C) で保存した場合、粘度・酸度の上昇、メイラード反応の促進などの物理的性状の変化、不溶性窒素量の増加、遊離アミノ酸組成の変化などが観察される。このような保存中の成分組成の変化は、RJ の品質の劣化に影響を与えるものと考えられる。従って、RJ の成分に影響を与えない環境で保存することが、RJ の品質管理の上で重要な課題となっている。しかし、RJ の品質の評価基準や評価法に未だ適切なものがないのが現状である。また、RJ の品質に及ぼす保存条件の影響についても未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、RJ の品質の評価基準となりうる指標物質を見いだすことを目的として、RJ の保存中における成分組成の変化について、またその成分組成の変化が品質に及ぼす影響について検討した。その結果、品質指標物質 (ロイヤラクチン) を発見し、その生理活性についても検討した。

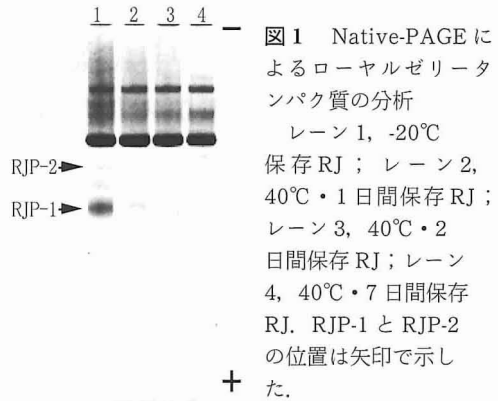
表 1 高温保存条件下におけるローヤルゼリー中の各種ビタミンと 10-ヒドロキシ-2-デセン酸 (10-HDA) の含有量の変化

| | 4°C・7日間保存 | 40°C・7日間保存 | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| | mg/RJ 100g | mg/RJ 100g | 残存率 (%) |
| ビタミン B ₁ | 0.34 | 0.32 | 94 |
| ビタミン B ₂ | 0.85 | 0.83 | 98 |
| ビタミン B ₆ | 0.37 | 0.33 | 89 |
| ビタミン B ₁₂ | 検出されず | 検出されず | 検出されず |
| ビタミン C | 検出されず | 検出されず | 検出されず |
| 葉酸 | 27.0×10^{-3} | 23.0×10^{-3} | 85 |
| パントテン酸 | 8.46 | 7.70 | 91 |
| ビオチン | 17.4×10^{-3} | 17.4×10^{-3} | 100 |
| ナイアシン | 4.73 | 4.83 | 102 |
| 10-HDA | 1.67 ^{a)} | 1.70 | 102 |

a) 10-HDA 含量はローヤルゼリーに対する重量%で示した。

ローヤルゼリーの鮮度を評価するための 指標物質の探索

RJは、保存条件に依存して品質が劣化する。そこで、RJの鮮度を評価するための指標物質を見いだすことを目的として、RJの成分組成の変化に及ぼす保存条件の影響について検討した。その結果、RJ中の有効成分である10-HDAなどの脂肪酸や9種類のビタミン類は、40℃で7日間保存してもその含有量に変化が見られなかった(表1)。しかし、RJの水溶性タンパク質をnative-PAGEで分析した結果、40℃の保存条件下ではroyal jelly protein-1 (RJP-1)とroyal jelly protein-2 (RJP-2)と命名した2種類のタンパク質のみが特異的に分解されることを見いだした(図1)。さらに、RJを4~50℃の範囲内の種々の温度で1~7日間保存したサンプルを作成し、RJタンパク質のHPLC分析を行った結果、RJP-1は保存温度と保存期間に比例して特異的に分解されていた(図2A)。一方、RJP-2はRJの保存温度とは無関係に分解されていた(図2B)。これらの結果から、RJP-1はRJの鮮度を評価するための指標物質となりうることが示唆された。次に、RJからRJP-1の分離精製を行い、諸性質を調べた結果、RJP-1は等電点が5.1である分子サイズ57kDaの



単量体の糖タンパク質であった(図3, Kamakura, et al., 2001 a)。57kDaタンパク質のアミノ酸組成を分析した結果、これまでに報告されたRJ中のタンパク質の中には、同一のアミノ酸組成を示すタンパク質はなかった。さらに、57kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した結果、米倉によって報告されたRJ中の350 kDaタンパク質(アピシン: Yonekura, M. 1998)のN末端アミノ酸配列と5残基まで一致していた。しかし、57kDaタンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、350kDaタンパク質は57kDaタンパク質に対する抗体により認識されなかったことから、57kDaタンパク質は、350kDaタンパク質とは異なる新規なタン

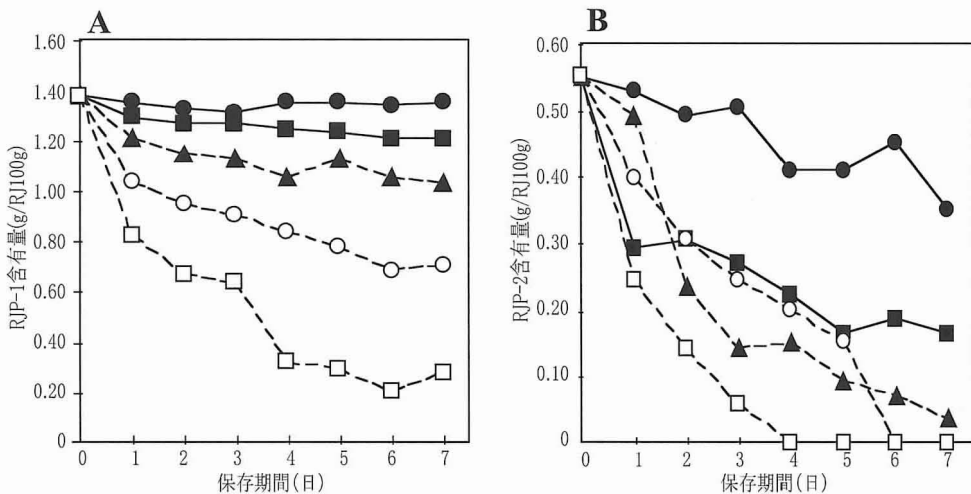


図2 様々な温度条件下で保存したRJ中のRJP-1とRJP-2の含有量の変化
RJ中の(A) RJP-1含有量と(B) RJP-2含有量をHPLC分析によって測定した。RJサンプルは4℃(●), 室温(■), 30℃(▲), 40℃(○), 50℃(□)で7日間保存した。n=3

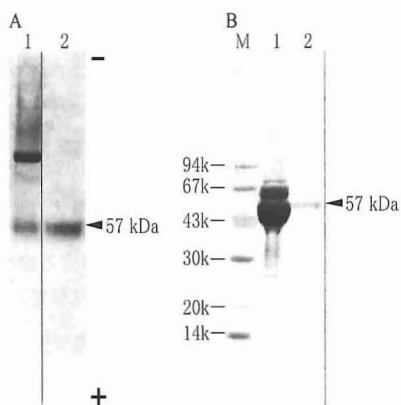


図3 精製RJP-1の電気泳動による分析
RJと精製RJP-1をnative-PAGE (A)とSDS-PAGE (B)により分析した。レーンM, マーカートンパク質; レーン1, 3% (W/V) RJ 溶液; レーン2, 精製RJP-1. RJP-1は分子サイズ57kDaの単量体のタンパク質であった。

パク質であることが明らかとなった (Kamakura, et al., 2001 c).

ローヤルゼリーの抗疲労効果と 57kDa タンパク質含量との関係

RJは滋養強壮に効果があることが知られている。しかし、その滋養強壮効果や抗疲労効果は、生化学的に明確な評価がなされていない。そこで、RJの成分組成の変化が抗疲労効果に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、マウス運動量測定流水槽を用い、RJの抗疲労効果について検討した。マウスを15分遊泳させた後、30分間休息させ、その後再度遊泳させた時の限界遊泳時間と再度15分遊泳した後の運動性疲労に関与する生化学的パラメーターを測定することによって、抗疲労効果を評価した。投与サンプルは、採取後-20℃で保存したRJ (-20 RJ), 40℃で7日間保存したRJ (40-7d RJ), RJと同等の摂取エネルギーになるようカゼイン, コーンスターチ, 大豆油から調製したサンプル (コントロール) を用いた。その結果、-20RJ投与群の遊泳時間はコントロール群や40-7dRJ投与群の遊泳時間より有意に増加していた (図4)。また、再度15分間遊泳し

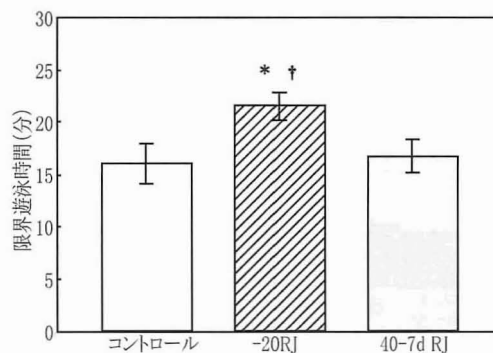
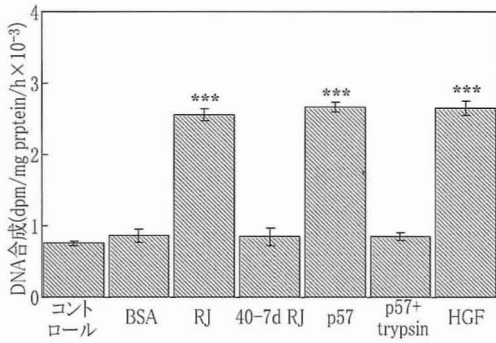


図4 -20RJと40-7dRJのマウス限界遊泳時間に対する効果

マウスは遊泳前の48時間, 24時間, 0.5時間前にコントロール溶液 (カゼイン, コーンスターチ, 大豆油から調製したサンプル), -20RJ又は40-7dRJを投与された。15分遊泳後, 30分休息し, 再度遊泳した時のマウスの限界遊泳時間を測定した。値は, 7?8匹のマウスの平均値と標準誤差を実測値で示した。-20RJは-20℃で保存したRJ, 40-7dRJは40℃で7日間保存したRJを示す。コントロール群との有意差: * $p < 0.05$. 40-7dRJ投与群との有意差: † $p < 0.05$.

た後の生化学的パラメーターを測定した結果、血中乳酸量は-20RJ投与群で、他の2群より有意に低下していた。腓腹筋のグリコーゲン濃度も-20RJ投与群で他の2群より有意に高く、血糖値は、40-7dRJ投与群で他の2群に比べ有意に低かった。これらの結果から、高品質のRJには抗疲労効果があることが明らかとなった。一方、40-7dRJにはこの抗疲労効果が見られなかった。本実験に使用したRJサンプルの成分分析の結果、57kDaタンパク質は40℃で7日間保存する間にその90%が分解されていた。また、-20℃で保存したRJは、RJP-2より16倍 (重量比) 高く57kDaタンパク質を含有していた。さらに、57kDaタンパク質の含有量の異なるRJを含む粉餌でマウスを2週間飼育し、その期間内のマウスの遊泳時間を測定した。その結果、飼育2週間目におけるマウスの遊泳時間の増加率は、RJ中の57kDaタンパク質含量に比例した。これらの結果から、57kDaタンパク質が抗疲労効果についてのRJの品質を評価するための指標物質になりうることが示唆された (Kamakura, et al., 2001 b)。



ラット初代培養肝細胞に対する 57kDa タンパク質の増殖因子様作用

57kDa タンパク質が特異的に分解されている RJ がマウスの抗疲労効果を示さなかったことから、RJ 中の 57kDa タンパク質が疲労に対し何らかの作用を示すことが考えられる。運動中に生成した乳酸は、コリサイクルで肝臓に運ばれて糖新生によってグルコースに変換された後、筋肉に運ばれる。この乳酸の代謝には肝臓が重要である。上皮増殖因子 (EGF) は肝臓でのピルビン酸キナーゼを不活性化することにより糖新生を活性化し、さらに TCA サイクルも活性化する。また、RJ は投与後比較的短時

図5 ラット初代培養肝細胞に対する 57kDa タンパク質の DNA 合成促進作用

Control (無添加), BSA (牛血清アルブミン, 1.5 mg/ml), RJ (ローヤルゼリー, 1.5mg/ml), 40-7 dRJ (40°C・7 日間保存 RJ, 1.5mg/ml), p57 (精製 57kDa タンパク質, 0.05 mg/ml), p57 + trypsin (37°C で 6 時間トリプシン処理した精製 57kDa タンパク質, 0.05mg/ml), HGF (肝細胞増殖因子, 10 ng/ml). 値は 3 回の実験の結果の平均値と標準誤差を実測値で示した. コントロールとの有意差: *** p < 0.001.

間で抗疲労作用を示した。これらのことから、RJ 中の 57kDa タンパク質は遊泳中のマウスに対し EGF 様の作用を示したのではないかと推測された。そこで、57kDa タンパク質の生理機能を明らかにすることを目的として、ラット初代培養肝細胞に対する 57kDa タンパク質の影響について検討した。

ラット初代培養肝細胞を無血清条件下で培養した場合、57kDa タンパク質は肝細胞の DNA 合成を促進した (図 5)。脱糖鎖した 57kDa タンパク質は DNA 合成促進作用を示したが、57 kDa タンパク質をトリプシンで処理した場合はその作用を示さなかった。さらに、57kDa タンパク質による DNA 合成促進作用は濃度依存

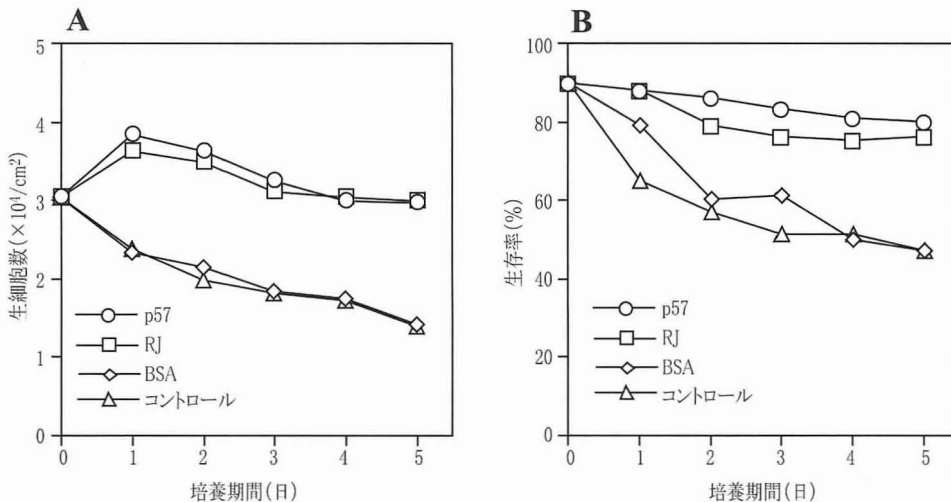


図6 ラット初代培養肝細胞の生細胞数・生存率に対する 57kDa タンパク質の影響

分離された肝細胞を無血清条件下で 5 日間培養し、培養期間内の生細胞数 (A)、生存率 (B) を測定した。△, Control (無添加); ◇, BSA (牛血清アルブミン, 1.5mg/ml); □, RJ (ローヤルゼリー, 1.5mg/ml); ○, p57 (精製 57kDa タンパク質, 0.5mg/ml). 値は 2 回の実験の結果の平均値を実測値で示した。各値の標準偏差は実測値の 10% 以下であった。

的に増加した。これらの結果から、57kDa タンパク質がマイトジェンとして肝細胞に対し DNA 合成促進作用を示すことが示唆された。57kDa タンパク質による DNA 合成促進作用は、肝細胞の細胞濃度が低濃度 (3×10^4 cells/cm²) の場合でより顕著であった。これは、肝再生を促進する因子として知られる EGF や肝細胞増殖因子 (HGF) でも見られる現象である。また、低細胞濃度で培養された肝細胞は部分切除後の再生肝に相当することから、57kDa タンパク質は肝再生を促進する可能性があると考えられた。さらに、肝細胞を5日間培養した際の生細胞数、生存率の変化を測定したところ、57kDa タンパク質によって肝細胞の生細胞数、生存率が維持された (図6)。また、その培養期間内で57kDa タンパク質は肝機能のマーカーであるアルブミンの分泌を促進していた。従って、57kDa タンパク質には肝機能を向上させる作用もあることが示唆された。これらの作用は、EGF や HGF の肝細胞に対する作用と同様であった (Kamakura, et al., 2001 c)。以上の結果は、遊泳中のマウスに対し、57kDa 蛋白質が EGF 様の作用を示したことを支持する結果であると考えられる。そして、この57kDa タンパク質をロイヤラクチン (royalactin: royal jelly-derived, hepatocyte-activating protein) と命名した。

この様に、ロイヤラクチンは RJ の鮮度指標として重要であるばかりでなく、品質にとっても重要な成分であることが分かった。今後、このロイヤラクチンを用いて品質管理を行うことにより、新鮮で品質の高い RJ の生産・供給が可能になると思われる。

おわりに

本研究はすべてポーラ化成工業株式会社健康科学研究所にて行ったものである。研究を遂行するに当たり、良き研究環境をお与え下さった株式会社科薬・福島信様 (元ポーラ化成工業株式会社・健康科学研究所所長) に厚く御礼申し上げます。本論文は、著者の博士論文「ローヤルゼリーの品質指標物質ロイヤラクチンの生物学

的機能に関する研究」の一部を掲載したものであり、博士論文を審査頂いた京都大学大学院農学研究科教授・伏木亨先生に、また、学位申請に際しご協力頂いた同助教授・井上善晴先生、同助手・井沢真吾先生に心より御礼申し上げます。

(〒244-0812 横浜市戸塚区柏尾町 560

ポーラ化成工業株式会社中央研究所)

引用文献

- Blum, M.S., A. F. Novak and S. Taber. 1959. *Science* 130: 452-453.
- Fujii, A., S. Kobayashi, N. Kuboyama, Y. Furukawa, Y. Kaneko, S. Ishihama, H. Yamamoto and T. Tamura. 1990. *Japan. J. Pharmacol.* 53: 331-337.
- Fujiwara, S., J. Imai, M. Fujiwara, T. Yaeshima, T. Kawashima and K. Kobayashi. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 11333-11337.
- Funakoshi, T., H. Shimada and S. Kojima. 1993. *Med. Biol.* 127: 85-89.
- Kamakura, M., T. Fukuda, M. Fukushima and M. Yonekura. 2001 a. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 277-284.
- Kamakura, M., N. Mitani, T. Fukuda and M. Fukushima. 2001b. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47: 394-401.
- Kamakura, M., N. Suenobu and M. Fukushima. 2001c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 865-874.
- Kubo, T., M. Sasaki, J. Nakamura, H. Sasagawa, K. Ohashi, H. Takeichi and S. Natori. 1996. *J. Biochem.* 119: 291-295.
- Nakajin, S., K. Okiyama, S. Yamashita, Y. Akiyama, and M. Shinoda. 1982. *Yakugaku Zasshi* 36: 65-69.
- Shinoda, M., S. Nakajin, T. Oikawa, K. Sato, A. Kamogawa and Y. Akiyama. 1978. *Yakugaku Zasshi* 98: 139-145.
- 竹中哲夫. 1982. *ミツバチ科学* 3: 69-74.
- Takenaka, T., K. Yatsunami and T. Echigo. 1986. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 33: 1-7.
- Townsend, G. F., J. F. Morgan and B. Hazlett. 1959. *Nature* 183: 1270-1271.
- 米倉政実. 1998. *ミツバチ科学* 19: 15-22.

MASAKI KAMAKURA. Royalactin is a possible marker for quality of royal jelly. *Honeybee Science* (2002) 23 (1): 17-22. POLA R & D Laboratories, POLA Corporation, 560 Kashicho, Totsuka-ku, Yokohama 244-0812, Japan

In order to identify a marker that could be used to evaluate the quality of royal jelly (RJ), the relationship between the composition, the physiological activity and the freshness of RJ was investigated. First of all, the composition change of RJ during storage was investigated to find a marker for freshness of RJ. The contents of 10-hydroxy-2-decenoic acid, a bioactive component of RJ, and several vitamins did not change during storage at 40°C for 7 days. However, a specific protein, designated royal jelly protein-1 (RJP-1), was gradually degraded during storage under various conditions (from 4°C to 50°C for up to 7 days). The specific degradation of RJP-1 was proportional to both storage temperature and storage period. RJP-1 was purified to homogeneity and characterized as a monomeric glycoprotein with a molecular mass of 57 kDa. Next, the anti-fatigue effect of RJ on male Std ddY mice was investigated. All mice were forced to swim for 15 min once, and then the maximum swimming time to fatigue was measured after a rest period. The swim-

ming endurance of the RJ group significantly increased compared with those of the other groups. The mice in the RJ group showed significantly decreased accumulation of serum lactate and serum ammonia and decreased depletion of muscle glycogen after swimming compared with the other groups, whereas there was no significant difference between the 40-7d RJ (RJ stored at 40°C for 7 days) group and the control group in these parameters after swimming. These results suggest that RJ can ameliorate the physical fatigue after exercise and this anti-fatigue effect of RJ in mice seems to be associated with the freshness of RJ, possibly with the content of 57-kDa protein. Furthermore, 57-kDa protein stimulated hepatocyte DNA synthesis and prolongs the proliferation of hepatocytes, as well as increasing albumin production. Therefore, 57-kDa protein may be suitable for a marker of RJ quality. The author have named the 57-kDa protein royalactin (royal jelly-derived, hepatocyte-activating protein).