

ローヤルゼリーに含まれるインスリン様 およびアンジオテンシン転換酵素阻害物質について

奥田 拓道, 亀田 健治, 森本 千恵,
松浦 幸永, 近木 麻理子, 蔣 明

ローヤルゼリー（以下R Jと略す）は、ミツバチの働き蜂の下咽頭腺から分泌される乳白色のクリーム様物質であり、女王蜂の幼虫のための餌である。R Jを餌として成長した女王蜂は、同じ雌である働き蜂に比べて数十倍も寿命は長く、体は3倍も大きく、最盛期には1日に2000個以上も産卵し、その産卵期間も一年のうち2月から11月までという精力的な活動を続ける。このような事実に基づき、R Jの中にヒトの健康増進や病気の治療に役立つ機能物質が存在する可能性を求めて多くの研究が行われてきた。すでに、R Jにはタンパク質、炭水化物、脂質、ミネラル、ビタミン等が含まれていることが知られている。

私たちは薬用人参をはじめ、種々の天然物から生理活性を目安に機能物質を単離している(Takaku et al., 1990)。まず試験管内で測定できる生理作用を用いて、天然物中の機能物質の構造を明らかにし、次に動物実験を行い、最後にヒトでの意義を明らかにするという順序である。

R Jに関し、私が採用した試験管内の生理作用は、インスリン様作用とアンジオテンシン転換酵素(ACEと略す)の阻害作用である。インスリンは、その標的細胞の一つである脂肪細胞で、グルコースからの脂肪合成を促進すると共に、カテコールアミンによる脂肪分解を抑制する(Rahn et al., 1994)。したがって、試験管内でのインスリン様作用とは、脂肪細胞での脂肪の合成促進と分解抑制である。ACEは血管を収縮し、血圧を上昇させるアンジオテンシンIIを生成し、血管を拡張し、血圧を下げるキニンを分解する酵素であり、その阻害は血圧低

下に連なることが知られている。

インスリン様作用とACE阻害を取り上げた理由は、糖尿病や高血圧の患者の臨床症状がR Jによって改善したという報告に注目したからである(水野, 1975; 高須・太田, 1975)。

I. 実験材料および方法

1. ローヤルゼリー(R J)

R Jは、全国ローヤルゼリー公正取引協議会より提供を受けた。R Jを水に溶解した後、水に対して一昼夜透析し、透析外液を以後の実験に供した。

2. 脂肪細胞の調製

Wistar King系雄性ラット(体重150-200g)を用い、その副辜丸脂肪組織からRodbell(1964)の方法で脂肪細胞を調製した。

3. 脂肪分解の測定

2.5%牛血清アルブミン(活性炭で処理し、脂肪酸を除いたもの)を含む緩衝液(25mM TES, pH7.4, 135mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂) 200 μ lに検体溶液25 μ l, エピネフリン溶液25 μ l(最終濃度0.5 μ g/ml)に脂肪細胞50 μ l(packed volume)を加え37 $^{\circ}$ C, 1時間incubateし、遊離する脂肪酸を定量する(Okuda et al., 1986)。

4. 脂肪合成の測定

6%牛血清アルブミンと3mMグルコースを含むHanks buffer(pH7.4) 175 μ lに脂肪細胞40 μ l(packed volume)を加え37 $^{\circ}$ C, 20分放置する。次に、検体溶液25 μ lを加え37 $^{\circ}$ C, 5分incubateする。インスリン溶液25 μ l(最終濃度1nM)を加え、さらに37 $^{\circ}$ C, 5分

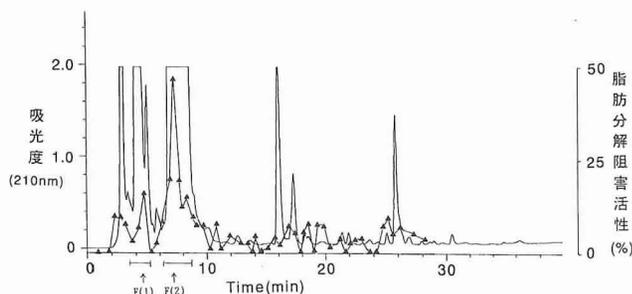


図1 ローヤルゼリーのHPLC分画の脂肪分解阻害活性

カラム：AM-312 S-5 120A ODS (YMC) 溶離液
 A: 0.1%TFA in 30%CH₃CN B: 0.1%TFA in 70%CH₃CN
 グラジエント：A (0-5 min) A→B (5-35 min)
 流速：1 ml/min 検出：210 nm

放置する。最後に¹⁴C - グルコース 25 μl (0.25 μCi) を加え 37°C, 30 分 incubate し, EM 液 (イソプロピルアルコール 2400ml, ヘプタン 600ml, 1N H₂SO₄ 60ml の混液) 0.83ml, ヘプタン 0.5ml, 水 0.25ml を加え反応を止める。遠心分離後上清を取り, トルエンシンチレーターを加えて放射能を測定する。活性は, 脂肪に取り込まれた放射能 (cpm) で表す。

5. アンジオテンシン転換酵素の測定

2.5mM Hippuryl - His-Leu を基質として用い, Takada et al. (1982) の方法で測定した。阻害活性はパーセントで表示した。

6. 統計処理

Student's t-test を用い, 有意差検定を行った。

II. 実験結果

RJ の水溶液を水に対して透析した外液を Sep-Pak (C₁₈ 前処理用逆相カラム, ウォーターズ製) で処理し, その吸着画分を 30% アセトニトリルに溶解し, 図 1 に示すような条件で分画した。210nm の吸光度で検出し, 溶出画分を凍結乾燥した後, 脂肪分解測定用緩衝液に溶解してエピネフリンの脂肪分解に対する阻害活性

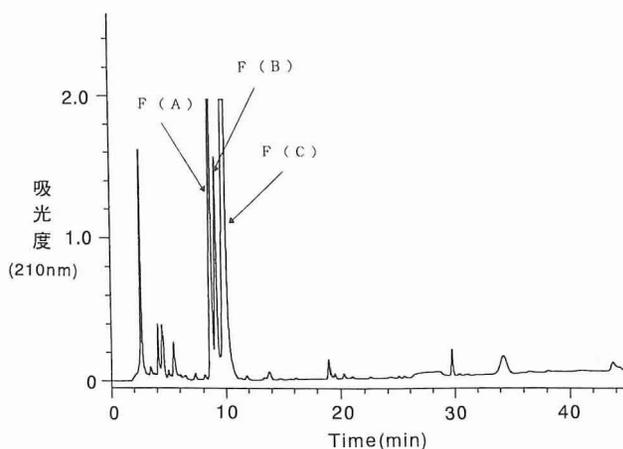


図2 ローヤルゼリーに含まれる脂肪分解阻害活性物質の精製

カラム：AM-312 S-5 120A ODS (YMC)
 溶離液：0.1% TFA in 30% CH₃CN
 流速：1 ml/min 検出：210 nm

を測定した. 図1に示すように, 阻害活性はF(1)とF(2)の画分に認められるが, F(2)の方がF(1)に比べてはるかに高い阻害活性を示している. そこでF(2)について, さらに精製を進めることにした.

図2は, F(2)を同じカラムを用い, 0.1% TFAを含む30% CH₃CNで溶出したパターンを示している. 脂肪分解阻害活性は, 図のF(A), F(B), F(C)の画分に存在し, 他の画分には認められなかった. まずF(A), F(B), F(C)の構造を明らかにした上で, 生理活性について検討することにした. それぞれの画分を再クロマトした後, 重水素化メタノールに溶解し, ¹H-NMRおよび¹³C-NMRでそれぞれの化学構造を決定した.

F(A)は¹³C-NMRスペクトル(完全デカップリング)より10本の炭素が確認された. また, カルボキシル基の炭素, 一組の二重結合の炭素, 水酸基の付け根の炭素が認められることから, 水酸基を持つ炭素数10の不飽和脂肪酸と考えられる. さらに¹H-NMRスペクトルにおいて, 二重結合の水素のカップリングパターンは, 二重結合がカルボキシル基に隣接し, トランス結合していることを示している. また, 水酸基の付け根の水素はメチル基であり, 末端のメチル基とカップリングしている. 以上の結果から, この物質はtrans-9-hydroxy-2-decenoic acidと推定される.

また, F(B)は¹³C-NMRから8本の炭素が確認された. カルボキシル基の炭素と一組の二重結合の炭素が認められるが, F(A)とは異なり, 水酸基の付け根の炭素は認められない. したがって, 水酸基をもたない炭素数8の不飽和脂肪酸と考えられる. さらに,¹H-NMRスペクトルから二重結合の水素のカップリングパターンがF(A)に類似していることから, 二重結合はカルボキシル基に隣接し, トランス結合しているものと考えられた.

以上の結果から, F(B)はtrans-2-octenoic acidと推定された.

F(C)については同様の検索を経て, trans-10-hydroxy-decenoic acidと推定された.

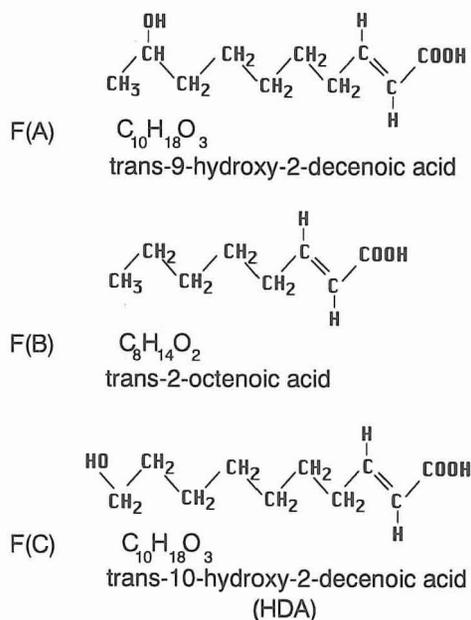


図3 ローヤルゼリーに含まれる脂肪酸

図3は, F(A), F(B), F(C)の化学構造を示したものである.

図4はtrans-9-hydroxy-2-decenoic acidが, 50 μg/mlの濃度でエピネフリンによる脂肪分解を阻害することを示した成績である. この物質について, 脂肪細胞におけるグルコースからの脂肪合成について検討したが, サンプル量が少なく, 一定の結論を得るには至らなかった. trans-2-octenoic acidには脂肪分解を阻害する作用は認められなかったが, グルコースからの脂肪合成を促進する効果がインスリン存在下, および非存在下でみられた(図5). trans-10-hydroxy-2-decenoic acidは, 脂肪細胞におけるエピネフリンによる脂肪分解を阻害するとともに, グルコースからの脂肪合成を促進する(図6, 7). ACEについては, trans-2-octenoic acidとtrans-10-hydroxy-2-decenoic acidが共に阻害作用を示したが(図8), trans-9-hydroxy-2-decenoic acidについてはサンプル量が少なく, 検索することはできなかった.

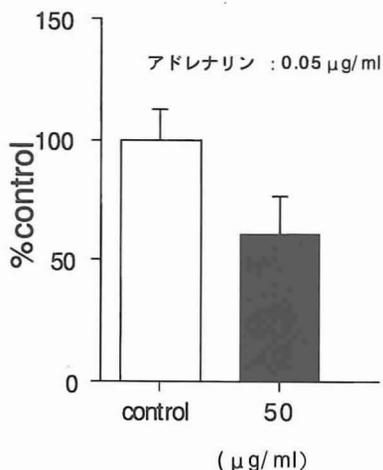


図4 trans-9-hydroxy-2-decenoic acid の脂肪細胞におけるアドレナリンによる脂肪分解に対する作用

III. 考察

脂肪細胞における脂肪の分解阻害と合成促進というインスリン作用を指標にして、RJ中のインスリン様物質を検索した。その結果、インスリン様物質の候補として、trans-9-hydroxy-2-decenoic acid, trans-2-octenoic acid, および trans-10-hydroxy-2-decenoic acid の3物質が突き止められ、その化学構造が明らかにされたのである。

trans-9-hydroxy-2-decenoic acid と trans-10-hydroxy-2-decenoic acid は共にエピネフリンによる脂肪分解を抑制する点で、trans-2-octenoic acid と trans-10-hydroxy-2-decenoic acid はグルコースからの脂肪合成を促進する点で、インスリンと同じ様な作用を持っているのである。すでに、trans-10-hydroxy-2-decenoic acid については抗菌作用 (Blum et al., 1959) や抗腫瘍作用 (Townsend et al., 1960) が報告されているが、今回インスリン様作用も併せ持つことが明らかになったわけである。

インスリンが脂肪細胞におけるグルコースからの脂肪合成を促進することはよく知られているが、エピネフリン等の脂肪分解ホルモンの働

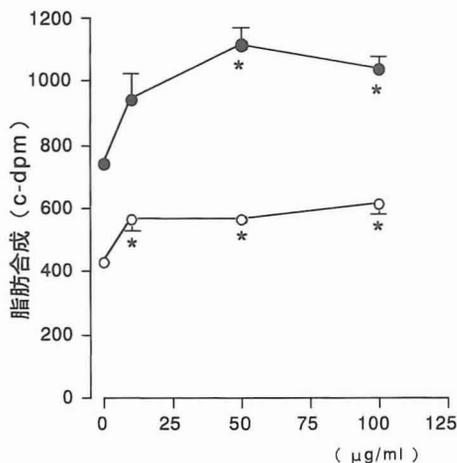


図5 trans-2-octenoic acid の脂肪細胞におけるグルコースからの脂肪合成に対する作用
(○) insulin (-) (●) insulin (+)
* P < 0.01

きを阻害するという作用の生理的意義については余り知られていない。インスリン作用の低下した糖尿病では、相対的にインスリンに対抗するホルモン(ノルエピネフリン, エピネフリン, ACTH等)の作用が強くなり、脂肪細胞での脂肪分解が高まり、血液遊離脂肪酸が増加する。この遊離脂肪酸が、筋肉等でのグルコースの利用を阻害して、糖尿病の病態をさらに悪化させる主要な原因になっているのである (Randle et al., 1963)。さらに上昇した血液遊離脂肪酸は肝臓でコレステロールや脂肪になり、リポタンパク (VLDL) として血液に分泌され、高脂血症をもたらす動脈硬化の誘因となる。このように、脂肪細胞における脂肪分解を抑制することは、糖尿病の進展を止め、高脂血症や動脈硬化の予防に連なることになるのである。

アンジオテンシン転換酵素 (ACE) は、血管内皮細胞から血液中に分泌され、アンジオテンシン I に作用して、アンジオテンシン II を生成する酵素である。アンジオテンシン II は細動脈を収縮して、血圧を上昇させる。さらに ACE は、血管を拡張するキニンを分解する。したがって、ACE は血圧上昇物質を生成し、血圧下降物質を分解することを通じて、血圧を上げる働きをする酵素なのである。食塩を取り過ぎ

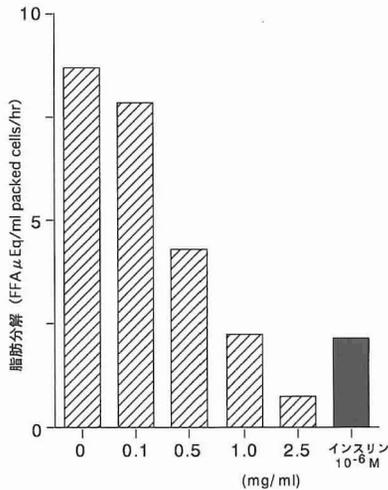


図6 trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (HDA) の脂肪細胞におけるアドレナリンによる脂肪分解に対する作用

ると血圧が上昇することはよく知られているが、最近私たちは、食塩中の塩素がACEを活性化することで血圧の上昇をもたらすことを明らかにした (Kato, 1994)。また、ACEの阻害するカプトプリルは、高血圧の治療に広く用いられている。

今回の実験で、trans-2-octenoic acid と trans-10-hydroxy-2-decenoic acid が ACE を阻害することが明らかになったが、この実験結果を直ちにヒトの血圧低下に結びつけることはできない。あくまで試験管内での成績なので、今後、動物を用いた *in vivo* の実験で確かめる必要がある。

インスリン様物質についても同じことがいえるわけであり、今後、*in vivo* へと研究を進める必要がある。インスリン様物質の探索にはしばしば動物の血糖低下が指標として用いられているが、これを目安にした場合、化学構造の決定はほぼ不可能ともいえるほど難しくなる。理由は、生体ホメオスタシスの中で種々の因子によって厳重に制御されている血糖を低下させるには、大量の試料が必要なこと、および精製が進むにつれ、生体内での分解が容易に起こるようになり、活性が消失する等の現象がしばしばみられることである。そこで、種々の問題はあっても、まず試験管内の指標を用いて機能

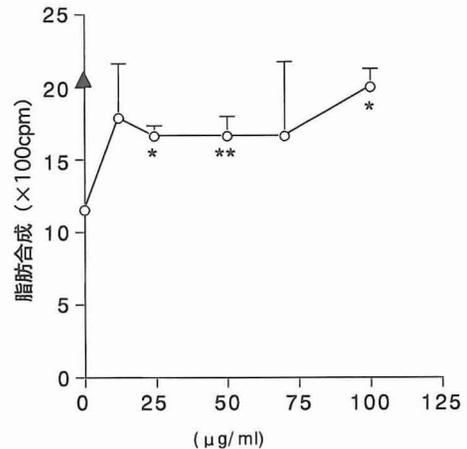


図7 trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (HDA) の脂肪細胞におけるグルコースからの脂肪合成に対する作用

(▲) insulin 1 nM

* P<0.01.

** P<0.05

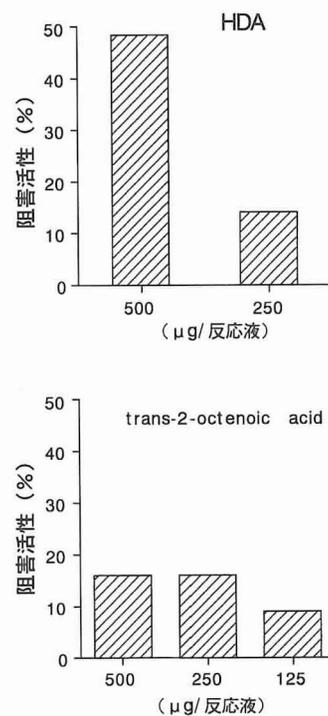


図8 trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (HDA) のアンジオテンシン I 転換酵素に対する阻害作用

物質の化学構造を決定し、それに基づいて動物、さらには、ヒトへと検索を進めていく手法をとっている次第である。

したがって、今回の実験におけるR Jからのインスリン様物質とACE阻害物質の発見は、糖尿病や高血圧の予防や治療に連なる可能性を持つものと考えるのが妥当と思われる。

(〒791-0295 温泉郡重信町志津川
愛媛大学医学部医化学第二)

引用文献

- Blum, M. S., A.F. Novak and S. Taber. 1959. *Science* 130: 452-453.
- Kato, H., T. Taguchi, H. Okuda, M. Kondo and M. Takara. 1994. *J. Trad. Med.* 11: 198-205.
- 水野 章. 1975. *基礎と臨床* 9: 3369-3375.
- Okuda, H., T. Tsujita and M. Kinutani. 1986. *Pharmacol. Res. Comuun.* 18: 877-893.
- Rahn, T., et al. 1994. *FEBS Lett.* 350: 3M-318.
- Randle, P.J., P.B. Garland, C.N. Hales and E.A. Newsholme. 1963. *Lancet* 1: 785-789.
- Rodbell, M. 1964. *J. Biol. Chem.* 239: 375-380.
- Takada, Y., M. Unoo, K. Hiwada and T. Kokubu. 1982. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 189-194.
- Takaku, T., K. Kameda, Y. Matsuura, K. Sakiya and H. Okuda. 1990. *Planta Medica* 56: 27-30.
- 高須靖夫・太田喜昭. 1975. *診療と新薬* 12: 1789-1796.

Townsend, G. F., J. F. Morgan, S. Tolnai, B. Hazlett, H. J. Morton and R.W. Shuel. 1960. *Cancer Res.* 20: 503-510.

OKUDA, HIROMICHI ; KAMEDA, KENJI ; MORIMOTO, CHIE ; MATSUURA, YUKINAGA ; CHIKAKI, MARIKO and ; JIANG MING. Studies on insulin-like substances and inhibitory substances toward angiotensin-converting enzyme in royal jelly. *Honey-bee Science* (1998) 19 (1) : 9-14. 2nd Dept. of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime Univ., Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime, 791-0295 Japan.

Royal Jelly was found to contain insulin-like substances with inhibit catecholamine-induced lipolysis and stimulate lipogenesis from glucose in rat adipocytes. The insulin-like substances were identified to be trans-9-hydroxy-2-decenoic acid, trans-2-octenoic acid and trans-10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly. In addition to insulin-like activity, trans-2-octenoic acid and trans-10-hydroxy-2-decenoic acid possess an inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme.

These experimental results suggest that pathological states of diabetes mellitus and hypertension may be improved by fatty acids in royal jelly.