

ローヤルゼリータンパク質の特徴と機能

米倉 政実

ローヤルゼリーは、健康食品として現在広く利用されており、種々の薬理作用（藤井，1995）および栄養生理的作用（中島，1994）が報告されている。このローヤルゼリーの有効成分の研究は、10-ヒドロキシ-2-デセン酸を代表とする脂肪酸，アミノ酸，ビタミンなどの低分子化合物を中心になされてきた。一方，ローヤルゼリーには通常10%以上のタンパク質が含まれているが，このタンパク質の分子構造や生理作用などに関する研究はおこなわれている。また，ローヤルゼリー配合のドリンク剤などの製造時には，アルコール抽出が行われ，タンパク質は沈殿物として分離されるが，このタンパク質の積極的な有効利用は図られていないのが現状である。

そこで著者らは，ローヤルゼリータンパク質の分子構造や生理的機能の解明ならびにドリンク剤製造時の副産物であるタンパク質の高度利用を目的として研究を行ってきた。したがって，ここでは著者らがローヤルゼリーから単離した分子量350,000および55,000の糖タンパク質を中心に，その性質，構造ならびに培養動物細胞に対する作用について述べる。またローヤルゼリータンパク質のうち，唯一全アミノ酸配列が解明されているロイヤリシンと呼ばれる抗菌性タンパク質についても触れる。

ところで，ローヤルゼリータンパク質についての研究は，まずゲル電気泳動による分析（八並ら，1987；Hanes and Simuth，1992）が行われ，20成分以上のタンパク質の存在が報告されている。他方では，各種溶媒を用いた分画（友田ら，1974），さらにカラムクロマトグラフィーによる分離精製（Tomoda et al.，1977；

竹中，1984；竹中・越後，1984）が試みられ，竹中（1984）は，2種の水溶性タンパク質（分子量46,000および55,000）および2種のアルカリ可溶性タンパク質（分子量63,000および30,000）の単離に成功した。そして，これら4種のタンパク質は，いずれも糖タンパク質であること，またそれらのアミノ酸組成や等電点を明らかにしている。しかし，その分子構造や生理的機能に関する研究はほとんど行われていない。

I. ローヤルゼリータンパク質の特徴

1. ローヤルゼリーは高タンパク質

ローヤルゼリーの化学成分については古くから多くの報告があるが，各成分の値は研究者によりかなりまちまちであった。そこで，ある一定条件のもとで採取したローヤルゼリーを用いて分析した結果（竹中，1982）によると，そのタンパク質含量は，中国および台湾産の場合9.3～12.5%，日本産の場合9.5～14.1%であった。高タンパク質で，完全食品といわれている鶏卵は，ローヤルゼリーと同程度の水分含量（約66%）であり，タンパク質は約12%含まれている。したがって，ローヤルゼリーは鶏卵と同様高タンパク質の食品といえることができる。

2. ローヤルゼリーのタンパク質成分

ローヤルゼリーのタンパク質は，水溶性のものと水不溶性のものがあり，前者が全体の約75%を，後者が約25%をそれぞれ占めている（竹中，1982）。また，竹中（1982）は水溶性のタンパク質をゲル濾過法により分析した結果，分子量が約10万，約9万および1万以下の少

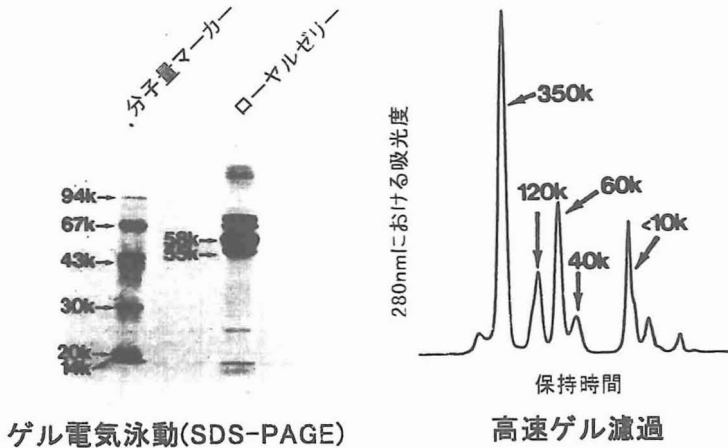


図1 ローヤルゼリータンパク質のゲル電気泳動および高速ゲル濾過による分析

なくとも3種類のタンパク質が含まれていることを報告している。

著者ら(1992)も、ローヤルゼリーの全タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分析した結果、分子量約10万~1万のタンパク質が約20種類存在することがわかった。その中で最も量的に多いのが分子量58,000のタンパク質であり、次いで多いのが55,000のタンパク質であった(図1)。また高速ゲル濾過法によりローヤルゼリーの水溶性タンパク質を分析した結果(図1)、分子量約35万、約12万、約6万、約4万および1万以下の各タンパク質成分が認められ、中でも最も多い成分が約35万のタンパク質であることも明らかになった。後述するように、この分子量35万のタンパク質は、SDS-PAGEにおいて検出された分子量58,000の成分と同一であり、このタンパク質6分子から構成されているオリゴマータンパク質であることが明らかになった。また、分子量約6万のタンパク質は、SDS-PAGEにおける分子量55,000のタンパク質成分と同一であることがわかった。

3. 糖タンパク質が多いローヤルゼリー

SDS-PAGEを用いてローヤルゼリータンパク質を分離したのちに、PAS(過ヨウ素酸-シッフ試薬)染色法により糖タンパク質の検出を試みたところ、ほとんどのタンパク質成分が染

色され、ローヤルゼリータンパク質の大部分が糖タンパク質であることが明らかになった。また、この結果はレクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーによっても確認された。もちろん、単純タンパク質も一部含まれていた。

II. 分子量350,000の糖タンパク質(アピシン)

1. ローヤルゼリータンパク質の分離精製

ローヤルゼリーの水溶性タンパク質について、その成分を個々に分離し、純粋な形で取り出すことを、図2に示す方法により行った。まず、生ローヤルゼリーから透析により分子量1万以下の低分子成分を除去した水溶性タンパク質を、DEAE-セルロフエインA-500カラムを

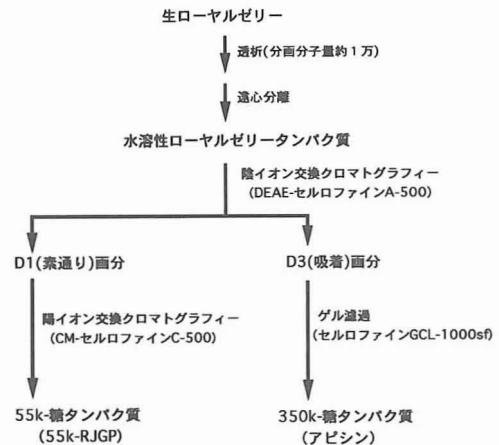


図2 ローヤルゼリー糖タンパク質の分離精製法

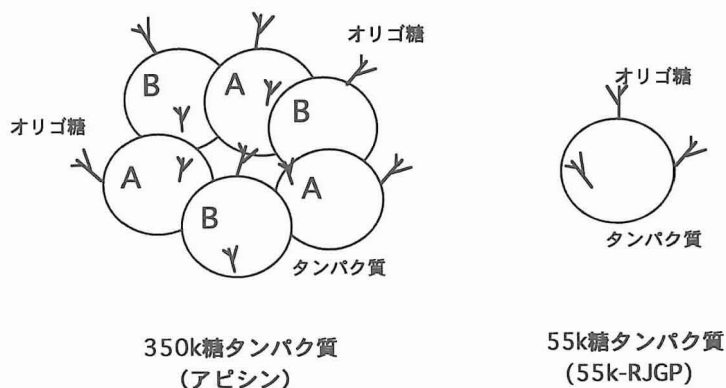


図3 ローヤルゼリーに含まれている 350k 糖タンパク質 (アピシン) と 55k 糖タンパク質 (55k-RJGP) の構造

用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。次に吸着画分である D3 画分を、セルロフィン GCL-1000sf カラムを用いたゲル濾過に供し、分子量 35 万のタンパク質を純品として取り出した (米倉ら, 1992)。なお、ミツバチの学名 (*Apis mellifera* L.) にちなんで、この分子量 35 万のタンパク質をアピシン (apisin) と命名した。

他方、前述の DEAE-セルロフィン A-500

カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、カラムに吸着しなかった素通り画分である D1 画分を、CM-セルロフィン C-500 カラムを用いる陽イオン交換クロマトグラフィーにかけ、分子量 55,000 のタンパク質を純品として精製した (伊豆川ら, 1995)。

これら 2 種の糖タンパク質が、竹中 (1984) が単離した 4 種の糖タンパク質のいずれに該当するかを検討したが、断定するには至らなか

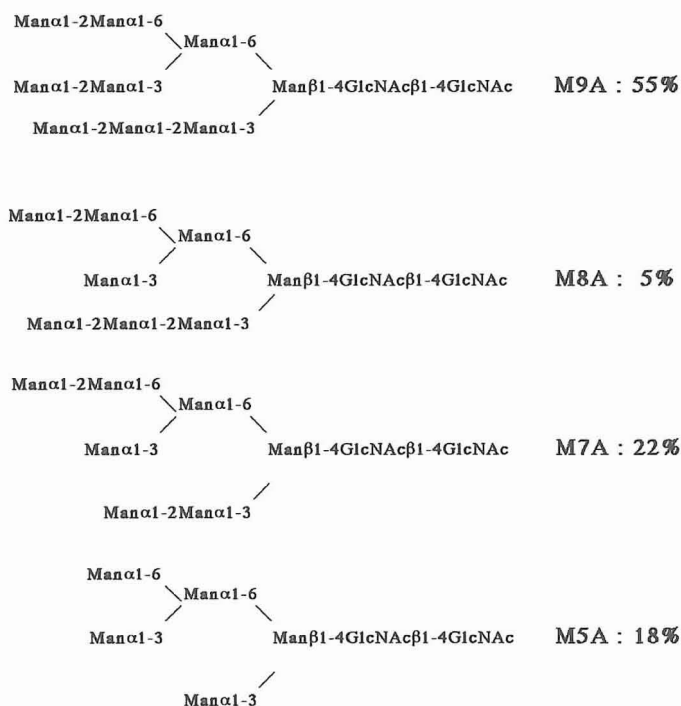


図4 アピシンに結合しているオリゴ糖 (糖鎖) の構造

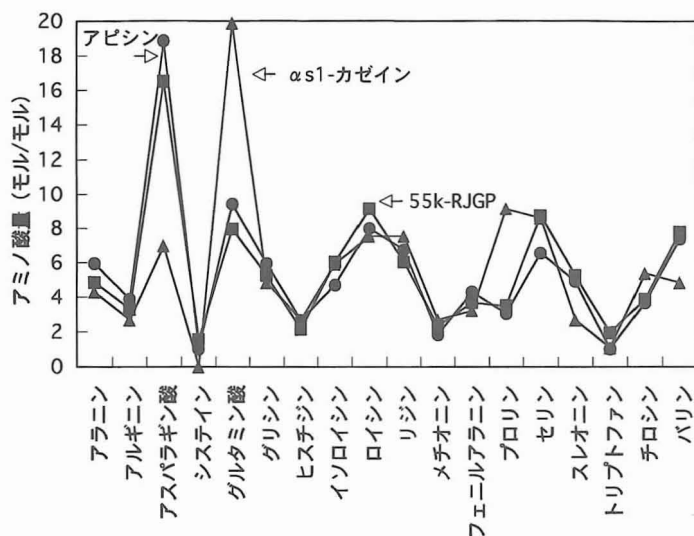


図5 ローヤルゼリータンパク質（アピシンおよび55k-RJGP）と牛乳タンパク質 α_{s1} -カゼインのアミノ酸組成の比較

った。

2. アピシンのタンパク質化学的性質と構造

アピシンの分子量を測定した結果、高速ゲル濾過法では350,000、一方SDS-PAGE法では58,000であった。したがって、アピシンは分子量58,000のサブユニット6個からなるオリゴマータンパク質であると推定された。また、このサブユニットは、そのアミノ酸組成分析およびN-末端アミノ酸配列分析の結果、2種類（AおよびBサブユニットとする）であることがわかった。よって、現時点では図3に示すようにアピシンはAサブユニット3個とBサブユニット3個からなるヘテロオリゴマータンパク質であると著者ら（1995）は考えている。

また、アピシンの等電点を求めたところ、約4.4~5.4であり、アピシンは酸性タンパク質であることが明らかになった。

次に、アピシン中のオリゴ糖含量を分析したところ、約5.5%であり、さらにその糖鎖構造を¹H-NMRにより解析した結果、マンノースが5個（M5A）、7個（M7A）、8個（M8A）ならびに9個（M9A）それぞれ結合したオリゴマンノースからなる典型的な高マンノース型糖鎖（図4）であることが明らかになった（Kimura et al., 1995）。

アピシンのアミノ酸組成を牛乳のタンパク質である α_{s1} -カゼインと比較したものが、図5であるが、大部分のアミノ酸では両タンパク質においてその含量が類似しており、アピシンはカゼインと同様、栄養価の高いタンパク質であるといえる。ただし、アピシンではアスパラギン酸含量が多く、逆にカゼインではグルタミン酸量とプロリン量が多く、この3種のアミノ酸含量が両者で大きく異なっていた。

3. アピシンの培養動物細胞に対する作用

アピシンがミツバチにとって、あるいはヒトに対してどのような生理作用を発揮するかを解明する第一段階として、アピシンの培養動物細胞に対する作用を調べた（Watanabe et al., 1996, 1997）。すなわち、細胞をシャーレの中で培養し、この際培地にアピシンを添加して、生きている細胞の数を測定した。その一例を図6に示すが、これはヒトの血球系単球細胞株についての結果であり、アピシンを添加すると、培養1日後で約5倍の細胞数に増え、培養日数とともにさらに少しずつ増加し、培養5日後には培養開始時の約7倍に増殖することが明らかになった。一方、アピシンを添加しない場合でも、細胞の増殖は起こり、培養4日後で約3.5倍に増殖していたが、アピシンの有無で細

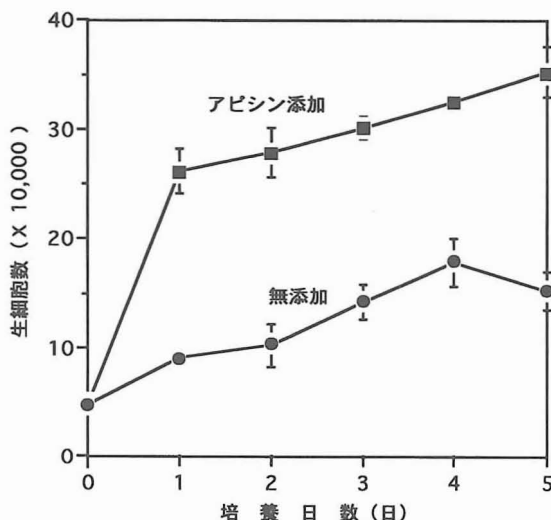


図6 ヒト血球系単球細胞の増殖に対するアピシンの影響

胞数に大差が認められた。このように、アピシンは細胞の増殖を強く促進する作用のあることが明らかになった。

このような培養細胞の増殖に対する促進作用は、他のヒト単芽球様細胞株やヒト-ヒトハイブリドーマ株などのヒト細胞、チャイニーズハムスター細胞ならびに昆虫（ハスモンヨトウ）細胞においても認められた（関島ら, 1995; Watanabe et al., 1996）。ただし、細胞の種類によって、アピシンの増殖促進作用の程度には差異があり、細胞によってアピシンに対する応答が異なることがわかった。

さらに、シロネズミ（ラット）の肝臓細胞を取り出し、同様にシャーレの中で培養し、アピシンの添加効果を調べた（Fujii et al., 1996）。すなわち、ネズミ肝臓の初代培養細胞に対する作用を調べた結果、図7に示すように、アピシンを培地に添加した場合、培養1日後で約2倍の細胞数に増えたのち、20日間の長期にわたり、その細胞数の約9割を維持する作用のあることが明らかになった。他方、アピシンを添加しない場合でも、培養1日後には約1.8倍の細胞数に増殖したが、培養2日後から次第に細胞が死滅し、約1週間後には培養開始時よりわずかに多いくらいの細胞数まで大きく減少するこ

とがわかった。

このことから、アピシンは肝臓細胞の増殖を促進する作用はさほど強くないものの、いったん増殖した細胞が死ぬのを抑制し、その寿命を延ばしていることがわかった。その作用メカニズムについては現在のところ不明であるが、今後の研究により解明されるものと期待される。

III. 分子量 55,000 の糖タンパク質 (55k-RJGP)

1. 55k-RJGP の性質と構造

II. 1. で述べた方法により、精製した分子量 55,000 のタンパク質（以下 55k-RJGP と略する）について、分子量を測定したところ、高速ゲル濾過法および SDS-PAGE 法ともに 55,000 であった。したがって、本タンパク質はアピシンとは異なり、サブユニット構造をもたないことが明らかになった（図3）。また、その等電点は約 6.3~7.3 のほぼ中性にあることがわかった（伊豆川ら, 1995）。

また、55k-RJGP のアミノ酸組成分析を行った結果、図5に示すように、全体としてアピシンに類似しており、 α_{s1} -カゼインとはアスパラギン酸、グルタミン酸およびプロリンにおいてその含量に差異がみられたが、アミノ酸組成か

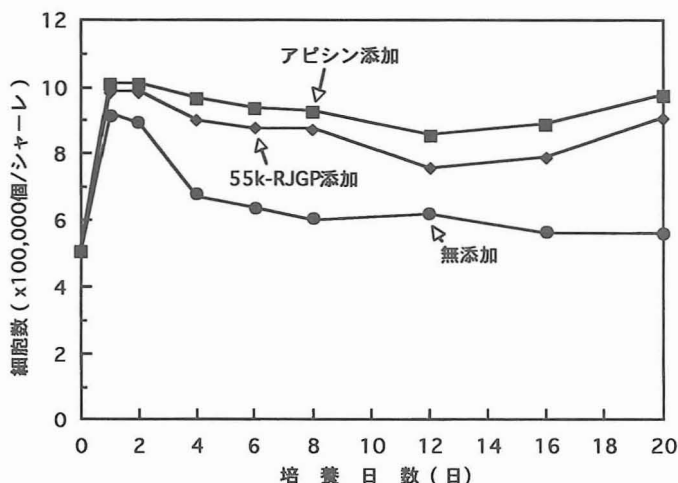


図7 ネズミ肝臓細胞に対するアピシンおよび55k-RJGPの影響

らみた55k-RJGPの栄養価はカゼインと同様高いものであった。なお、55k-RJGPのN-末端アミノ酸配列は、アピシンとは全く異なっており、本タンパク質がアピシンとは異なるタンパク質であることを裏付けた。

さらに、55k-RJGPの糖含量を測定した結果、約2.8%であり、アピシンよりも低い値であった。また、このオリゴ糖の糖鎖構造を¹H-NMRおよびMALDI-TOF MSにより調べた結果、マンノース9個からなるオリゴマンノース型の糖鎖(M9A, 図4)であり、アピシンと同様高マンノース型であった(Kimura et al., 1996)。しかし、アピシンで発見されたマンノース5個、7個ならびに8個のオリゴマンノース型糖鎖は認められなかった。

2. 55k-RJGPの培養動物細胞に対する作用

アピシンと同様に、ヒトの血球系単球細胞株を用いて、その細胞増殖に対する55k-RJGPの添加効果を調べたところ、細胞増殖促進作用が認められた。しかし、55k-RJGPの場合、ハスモンヨトウの培養細胞では細胞増殖促進作用はほとんど認められなかった。概して、55k-RJGPの細胞増殖促進作用はアピシンに比べ、弱いようである。

また、シロネズミの初代培養肝臓細胞に対する55k-RJGPの効果を調べた結果を図7に示

すが、アピシンに比べ若干弱いものの、肝臓細胞の死滅を防ぎ、20日間にわたって細胞数を維持する効果が認められた。

このように、アピシンとは全く異なる糖タンパク質である55k-RJGPについても、アピシンと同様、培養動物細胞の増殖を促したり、細胞死を防ぎ、長生きさせる作用のあることが明らかになった。しかし、その作用はいずれもアピシンよりも弱いものであった。

IV. 分子量5,500のタンパク質 (ロイヤリシン)

1. ロイヤリシンの構造と性質

ロイヤリシン(royalisin)と名付けられた分子量5,523のタンパク質は、Fujiwaraら(1990)によって発見され、その全アミノ酸配列が決定されている(図8)。ロイヤリシンは、51個のアミノ酸からなる小さなタンパク質で、分子内に3カ所S-S結合があり、架橋されている。ちょうどヒトのインシュリン(51個のアミノ酸からなり、分子量5,800)というホルモンとはほぼ同じサイズのタンパク質であるが、インシュリンには血糖低下作用があるのに対して、ロイヤリシンは抗菌作用をもっており、両者は全く異なったタンパク質である。また、ロイヤリシンにはオリゴ糖は結合しておらず、単純タンパ

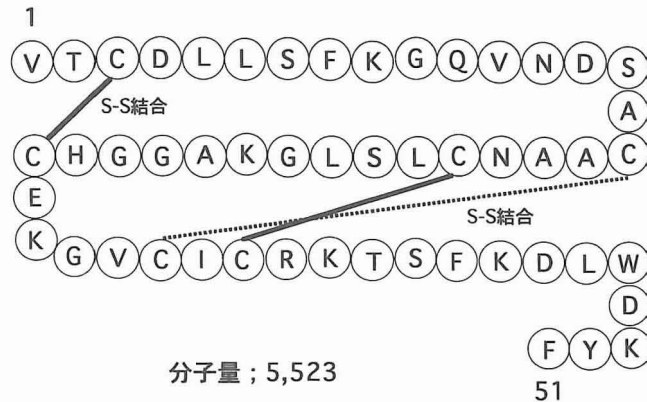


図8 抗菌性タンパク質ロイヤリシンのアミノ酸配列

ク質である。

2. ロイヤリシンの抗菌作用

ロイヤリシンは抗菌性タンパク質であり、*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* などのグラム陽性菌の増殖を強く阻害した(Fujiwara et al., 1990). またその抗菌力は、菌種によっては抗生物質と同じくらいの強さ ($1\mu\text{M}$ 以下) であることが報告されている。しかしながら、大腸菌 (*Escherichia coli*), サルモネラ菌 (*Salmonella infantis*) などのグラム陰性菌に対しては抗菌力は認められなかった。なお、ロイヤリシンは熱安定性があり、 100°C で 15 分間加熱しても、その抗菌力は失われなかった。ロイヤリシンはミツバチが細菌の感染から身を守るための生体防御物質の 1 つと考えられている。

ところで、ローヤルゼリーにはもともと抗菌作用のあることが報告されており、その主体は 10-ヒドロキシ-2-デセン酸などの脂肪酸である (Yatsunami and Echigo, 1985)。デセン酸は、大腸菌などのグラム陰性菌に対して抗菌作用を示す。このようにローヤルゼリー中のロイヤリシンがグラム陽性菌に対して、デセン酸などの脂肪酸がグラム陰性菌に対してそれぞれ抗菌作用を発揮することによって、ローヤルゼリーは強い抗菌力を示すことができるものと考えられる。

V. まとめ

ローヤルゼリーのタンパク質のうち、量的に多い 2 種の成分を分離精製し、そのタンパク質化学的性質、構造および培養動物細胞に対する作用を調べた。分子量 350,000 の糖タンパク質 (アピシン) は、6 個のサブユニット (分子量 58,000) からなるオリゴマータンパク質であり、その糖鎖は高マンノース型であった。アピシンはヒトなどの培養細胞に対して、強い細胞増殖促進作用を示す一方、シロネズミ肝臓の初代培養細胞では、細胞死を抑制し、長生きさせる作用があることが明らかになった。

分子量 55,000 の糖タンパク質 (55k-RJGP) は、サブユニット構造をもたない中性タンパク質であり、その糖鎖は高マンノース型であった。55k-RJGP も培養動物細胞に対して増殖促進作用を示したが、その作用はアピシンよりも弱いものであった。また、シロネズミ肝臓の初代培養細胞に対してアピシンと同様の効果が認められたが、アピシンより若干弱かった。

Fujiwara ら (1990) によって発見されたロイヤリシンは、グラム陽性菌に対して抗菌作用を示す、分子量 5,523 の単純タンパク質であった。

ここで述べた著者らの研究は、茨城大学農学部食品機能学研究室において、渡辺和彦をはじめとする学生諸氏とともになされたものである。また、農林水産省食品総合研究所篠原和毅

博士および津志田藤二郎博士の研究グループ、鹿儿岛大学農学部藤井 信教授、岡山大学農学部木村吉伸助教授、九州大学農学部原 敏夫助教授ならびにアピ株式会社総合研究所金枝 純所長らとの共同研究として実施されたものである。

(〒300-0393 稲敷郡阿見町中央 3-21-1
茨城大学農学部)

引用文献

- 藤井彰. 1995. ミツバチ科学 16 (3) : 97-104.
- Fujii, M., M. Yonekura, T. Higuchi, K. Morimitsu, I. Yoshino, S. Mukai, T. Aoki, T. Fukunaga, Y. Inoue, M. Sato and J. Kanaeda. 1996. Food Sci. Technol., Int. 2 (4) : 223-225.
- Fujiwara, S., J. Imai, M. Fujiwara, T. Yaeshima, T. Kawashima and K. Kobayashi. 1990. J. Biol. Chem. 265 (19) : 11333-11337.
- Hanes, J. and J. Simuth. 1992. J. Apic. Res. 31 (1) : 22-26.
- 伊豆川智美, 本多創, 藤井信, 木村吉伸, 金枝純, 米倉政実. 1995. 生化学 67 (7) : 615.
- Kimura, Y., N. Washino and M. Yonekura. 1995. Biosci. Biotech. Biochem. 59 (3) : 507-509.
- Kimura, Y., S. Kajiyama, J. Kanaeda, T. Izukawa and M. Yonekura. 1996. Biosci. Biotech. Biochem. 60 (12) : 2099-2102.
- 中島將次. 1994. New Food Industry 36 (3) : 54-64.
- 関島善行, 原敏夫, 鷲野憲之, 米倉政実. 1995. 農化 69 : 133.
- 竹中哲夫. 1982. ミツバチ科学 3 (2) : 69-74.
- 竹中哲夫. 1984. 玉大農研報 24 : 101-149.
- 竹中哲夫, 越後多嘉志. 1984. ミツバチ科学 5 (1) : 7-12.
- 友田五郎, 松山惇, 柴内昌子, 矢崎恵理子. 1974. 玉大農研報 14 : 86-96.
- Tomoda, G., J. Matsuyama and M. Matsuka. 1977. J. Apic. Res. 16 (3) : 125-130.
- Watanabe, K., H. Shinmoto, M. Kobori, T. Tsuchida, K. Shinohara, J. Kanaeda and M. Yonekura. 1996. Biotechnol. Techniques 10 (12) : 959-962.
- Watanabe, K., H. Shinmoto, M. Kobori, T. Tsuchida, K. Shinohara, J. Kanaeda and M. Yonekura. 1997. Cytotechnology 25 : 1-5.
- Yatsunami, K. and T. Echigo. 1985. Bull. Fac. Agr., Tamagawa Univ. 25 : 13-22.
- 八並一寿, 三輪章志, 越後多嘉志. 1987. 玉大農研報 27 : 31-40.
- 米倉政実, 渡辺和彦, 斎藤学志, 堤将和, 篠原和毅, 木村吉伸, 高木茂明. 1992. 生化学 64 (8) : 816.
- YONEKURA, MASAMI. Characterization and physiological function of royal jelly proteins. *Honeybee Science* (1998) 19 (1) : 15-22. School of Agriculture, Ibaraki University, 3-21-1, Chuuo, Ami-machi, Ibaraki, 300-0393 Japan.

We purified and characterized two glycoproteins from royal jelly of the honeybee *Apis mellifera* L. One was a glycoprotein which had a molecular weight of 350-kDa and consisted of six subunits with a molecular weight of 58-kDa. For this glycoprotein, we proposed the name apisin. The structures of *N*-linked sugar chains of apisin were found to fall into the category of oligomannose-type sugar chains. Apisin stimulated the growth of human lymphocytic cell lines in serum-free conditions. Apisin was also effective in maintenance the high viability of the primary monolayer culture of rat hepatocytes for 20 days in a serum-free medium.

The other glycoprotein (55 k-RJGP) was a single polypeptide with a molecular mass of 55-kDa and its *N*-linked sugar chain was found to be a non-processed high mannose type sugar chain. The 55k-RJGP also had the proliferation stimulating activity for human monocytes and maintained the high viability of rat liver primary cultured cell.