

ミツバチ・コロニーの微生物に対する 総合的防御機構

吉垣 茂

ミツバチの巣箱内を観察すると、育児圏は35℃の一定に保たれており湿度も高い。しかも、蜂児、花粉や蜜のような高栄養物質が多量に詰まっている。これらの条件は、微生物が繁殖するのにきわめて好適なはずである。にもかかわらず、巣箱内においては菌類の繁殖は見られない。ミツバチはどのように巣箱内を清潔に保っているのだろうか。セイヨウミツバチは抗菌活性のあるプロポリスを利用し、巣内を抗菌的に保っているという説もある。だが、日本在来種のニホンミツバチはプロポリスを集めないにもかかわらず、セイヨウミツバチの巣内と同様に通常、微生物の繁殖が見られない。

そこで私達は、ミツバチがプロポリスなどの外来の抗菌性物質の利用の他に、自ら生合成した抗菌活性物質群を利用し、それらの物質群を相乗作用させ総合的に微生物の繁殖を妨げているのではないかと考えた。

本文では巣箱内での総合的な抗菌環境作りを想定し(図1)、それらの実態の解明を試みることにした。

昆虫の生体防御反応

生物は外部から体内に入り込んだウイルス、バクテリア、カビ、その他の異物、さらには有害な自己由来成分を非自己と認識し、これを防ぎ排除する機構を発達させている。

生体防御機構は、生物の系統発生的進化の過程で獲得した多くの防御因子や機能発現の積み重ねから成り立っている。脊椎動物、特に両生類以上になると、生体防御機構の重要な部分を担うリンパ球を進化させ、リンパ球による非自己抗原識別すなわち抗原抗体反応(免疫系)を獲得した。生体防御機構は動植物の両方に存在するが、脊椎動物など一部を除いて未解明の部分が多く、近年ようやくその重要性が認識され

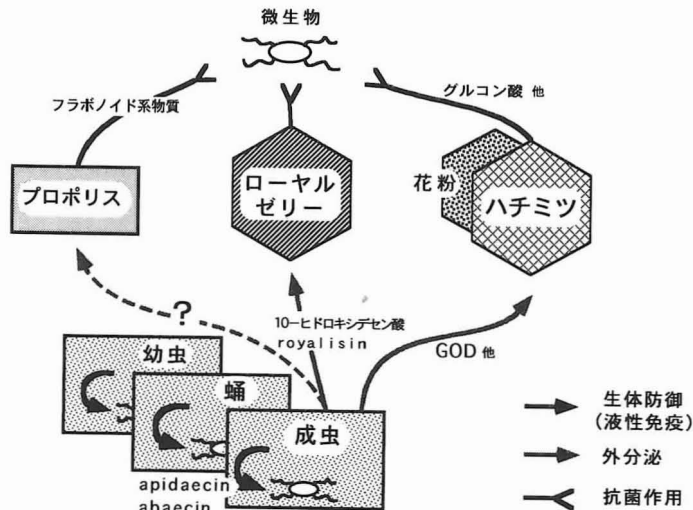


図1 ミツバチコロニーの微生物に対する総合的防御機構の模式図

るとともに、活発な研究が途についたところである。

昆虫類は先口動物の中で最も進化しており、100万種以上が地球上のあらゆる場所で生息している。この様な繁栄をもたらした背景には、繁殖能力や環境適応能力などの強さとともに、生体防御機構の発達も挙げることができる。昆虫の生体防御機構は、皮膚、消化管、体腔という三つの場所で行われている (Kushner and Harvey, 1969; Ayuzawa, 1969)。一般的に、外骨格をつくる外表皮にはカプリル酸やラウリル酸などの低級脂肪酸やフェノール性物質が含まれており、糸状菌の体内への侵入を妨げている。消化管内では、消化液、病原微生物の増殖を抑制する抗菌性フェノール化合物や抗ウイルス物質などが働いており、このため病気微生物やウイルスの感染を阻止することができる (Wago, 1984)。体腔内の防御は体液によるもので、先に述べた二つのバリアーが破られたとき、たとえば皮膚に損傷が生じたり環境変化や餌不足により健康が損なわれ、乳酸菌 (*Streptococcus faecalis*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、霊菌 (*Serratia marcescens*) など昆虫に感染を引き起こす菌類が体腔内に侵入した場合に起こり、その反応は二つにわけられる。第1は細胞性防御反応で、病原微生物や人為的に注入された異物に対し、顆粒細胞やプラズマ細胞の働きによる食作用、ノジュール形成、包囲化作用という三つの作用によってこれを排除する。第2は液性防御反応である。これは感染防御物質、細胞凝集性レクチン、フェノール酸化酵素前駆体活性系などの液性因子群が、細菌などの異物に直接働き、異物を不活化したり凝集したりするものである。

近年まで、昆虫には免疫系は存在しないとされてきた。確かに脊椎動物に見られるような免疫グロブリンによる細胞性免疫は存在しない。しかし、Boman ら (1981) によってセクロピア蚕 (*Hyalophora cecropia*) の休眠蛹に大腸菌 (*Escherichia coli*) を接種すると体液中に抗菌活性を示すペプチド系物質が誘導されることが証明され、昆虫における液性免疫の存在が認め



図2 抗菌性活性物質アミノ酸配列の比較

- ① sapecin: センチニクバエ *Sarcophaga peregrina*
 ② phormicin A: クロバエ *Phormia terranovae*
 ③ royalicin: セイヨウミツバチ *Apis mellifera*
 ④ apidaecin 1b: セイヨウミツバチ *Apis mellifera*
 ⑤ abaecin: セイヨウミツバチ *Apis mellifera*
 ⑥ dipteracin A: クロバエ *Phormia terranovae*
 アルファベットはアミノ酸を示す。

①～③ではアミノ酸配列の共通部分を枠で囲んだ。
 ④～⑥ではプロリンおよび疎水性アミノ酸の部分を囲み構造の類似を示した。
 ③の royalicin のみ外分泌性 (ローヤルゼリー中)
 *①～③は Fujiwara ら (1990) を、④～⑥は Casteels ら (1990) を引用して作図

られるようになった。それ以降、昆虫の生体防御、特に液性免疫の研究は目覚ましく進展し、カイコなどの鱗翅目、ニクバエなどの双翅目、ゴキブリ目などの幾つかの昆虫で誘導されたペプチド系抗菌物質の単離および構造決定が行われている。

ミツバチの液性免疫に関する研究

ミツバチの幼虫および成虫については、原因となる病原菌や寄生虫がある程度判明しており、また、処置法や化学療法も研究されている (Bailey and Ball, 1991)。病原菌や寄生虫に対するミツバチの生体防御機構についてはほとんど知見がなかったが、ごく最近になってミツバチにおいても体液中に細菌を接種すると apidaecin, abaecin などのペプチド系抗菌物質が誘導されることが報告された (Casteels et al., 1989, 1990, 1993)。これらの物質は、グラム陰性菌に強い活性を示すが、グラム陽性菌にはあまり効かない。これも最近になって、これに似た構造の活性物質が外分泌物であるローヤルゼリー中に発見され (図2) (Fujiwara et al., 1990)。この物質は royalisin と名づけら

れ、グラム陽性菌に強い活性を示すことが調べられた。このことはミツバチがペプチド系抗菌物質を外分泌し利用していることを意味する。私達は Casteels らが行った研究に注目し、彼等の実験の一部を再試すると共に、十分に検討されていない生物学的な意味を調べてみた。

ミツバチの成虫の体腔内に大腸菌を接種すると、菌接種約 15 時間後に体液中に抗菌活性が誘導され、3 日程強い活性が維持されることが分かった。また幼虫や蛹でも、成虫と比べると弱い抗菌活性が誘導されることが確認でき、これより細菌類に対して弱いとされていた幼虫や蛹のステージでも、生体防御機構が機能していることが判明した。働き蜂を使用して加齢に伴う抗菌活性の変化を調べたところ、出房 1~7 日目が最も活性が高く、以後次第に低下することが分かった。

自然状態でミツバチの体腔内に細菌が直接侵入することは少なく(万一、外部にひどい損傷を負ったり病気にかかった個体は、ミツバチの場合コロニーの外に捨てられる)、また実験操作中に菌接種以外の刺激が加わることも考えられたので、外部からいろいろな刺激を与えて体液中に抗菌活性が誘導されるか否か調べてみた(図 3)。腹部に傷を付けたり脚を切断した個体では、そこから菌の侵入がない限り抗菌活性の誘導が見られなかった。バッファー液や墨汁を注入した場合も抗菌活性は見られなかった。ミツバチを菌液に浸し外部から感染させたところ抗菌活性がみられるときもあった。30%ショ糖液に十分量大腸菌を混合し経口投与した場合、体液中に抗菌活性は誘導されなかった。CO₂ 麻酔の影響も見られなかった。

ミツバチの体液中に誘導された抗菌活性物質はグラム陽性菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に対して抗菌作用が低いことが確認できた。これは Casteels らの結果と同様で、このことは、ミツバチが腐蝕病 (*Bacillus* 属) に対して抵抗性が低いことと関連があるかもしれない。

食料保存方法

ミツバチの巣内に保存されている食料には実際多くの微生物たとえば酵母菌、子のう菌などが存在している (Gilliam, 1979; Gilliam and Prest, 1987; 山崎ら, 1975)。しかし、ミツバチは食料を長期的に保存するためにいくつかの手段を取っている。

(1) ミツバチは花から集めてきた花蜜(主成分はショ糖)を下咽頭腺起源の α -グルコシダーゼにより低分子のブドウ糖と果糖に分解することで高浸透圧のハチ蜜にし、脱水作用によって微生物の繁殖を抑えている。また、グルコン酸などの各種の水溶性有機酸類を生成し、蜜の低 pH 化を図っている(越後・竹中, 1974)。これはバクテリアなどにとくに有効である。グルコン酸はブドウ糖にやはり下咽頭腺起源のグルコースオキシダーゼを作用させて作られる。さらにグルコン酸が生成するときの副産物として一時的に生成される過酸化水素も強い抗菌活性を示す(越後, 1973)。花粉も巣内に保存される時、ハチ蜜が混ぜられることから、ハチ蜜と同様な抗菌作用をもっているといえる。

(2) ローヤルゼリー中に特異的かつ多量に入っている 10-ヒドロキシデセン酸は、*Micrococcus* や *E. coli* などの細菌類に抗菌活性を示す(Blum, 1959)。この脂肪酸はまた、低 pH 下で花粉の発育を抑制することも知られている(Iwanami et al., 1979)。この特異な脂肪酸は働き蜂の大顎腺で合成され、ローヤルゼリーの栄養素と防腐剤としての二重の作用をしていると考えられている(Kinoshita and Shuel,

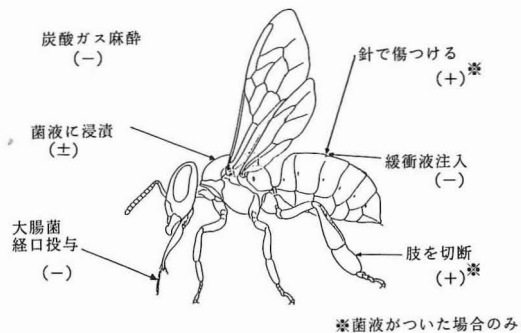


図 3 外部刺激による抗菌活性物質の誘導効果(十は誘導, 一は無関係, ±は条件次第で誘導, を示す)

1974). 類似した物質を、南米のハキリアリの仲間が種子の貯蔵のため使用している。この物質は3-ヒドロキシデカン酸で myrmicacin と呼ばれ、胞子の発芽を抑制する (Shildknecht and Koob, 1971)。これら二つの物質はともに炭素数 10 の脂肪酸で、化学構造も似ており同様な活性を示す。類縁化合物の発芽阻害力も調べられており、炭素数 8~10 の飽和直鎖脂肪酸 (Caprylic acid, Pelargonic acid, Capric acid, Δ -2-Decenoic acid) に強い活性が見られる (Iizuka et al., 1978)。同じ系列のカプロン酸はローヤルゼリーの刺激臭を構成する一成分で揮発性が高く、蒸気の形で巣内の抗菌環境の実現に役立っている可能性がある。

(3) ミツバチが集めてくる植物由来のプロポリス (蜂やに) は巣箱内の穴や透き間の修理、巣板の補強、侵入者の死体の遺棄に使われる。また、巣面にプロポリスを塗り付けたりする (増田, 1992)。プロポリスには強い抗菌活性があり、グラム陽性および陰性菌、放線菌、真菌類など多くの菌類に抗菌性を示すことが報告されている (Ghisalberti, 1979)。その主成分はフラボノイド化合物である。このことから、プロポリスは巣内の抗菌性に関係していると考えられている。

まとめ

私達は“超個体”ともいえるミツバチのコロニーが、図 1 のようにプロポリスなどの外来の活性物質の利用に加えて、自ら生合成した抗菌物質群を体内外に作用させて、多面的、総合的に自らの体や長期保存食料を微生物から守っていると考えている。

ミツバチの生体防御機構の解明は、ミツバチ特有の病気の予防や治療に役立てることができると考えられる。また夢物語として、巣内に外分泌されているかもしれない抗菌活性物質を防腐剤として役立てることも考えられ、もしそうならばミツバチ生産物が一つ増えることになる。真社会性昆虫であるミツバチの生体防御機構の解明により昆虫の進化の過程の研究に、これまでと違った角度から光を当てられる可能性もある。

(〒194 町田市玉川学園 6-1-1 玉川大学)

主な引用文献

- Bailey, L. and B. V. Ball. 1991. Honey bee pathology. Academic Press. 183 pp.
 Boman, H., A. Boman and A. Pigon. 1981. Biochem. 11: 33-42.
 Blum, S. 1959. Science. 130: 452-453.
 Casteels, P., C. Ampe, F. Facobs, M. Vaeck and P. Tempst. 1989. EMBO J. 8: 2387-2391.
 Casteels, P. et al. 1990. Eur. J. Biochem. 187: 381-386.
 Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs and P. Tempst. 1993. J. Biol. Chem. 265: 7044-7054.
 Fujiwara, S. et al. 1990. J. Biol. Chem. 265: 11333-11337.
 Gilliam, M. 1979. Apidologie. 10: 43-53.
 Iwanami, Y., M. Iwamatsu, I. Okada and T. Iwadare. 1979. Experientia 35: 1311-1312.
 和合治久. 1984. 植物防疫 38: 469-474.

YOSHIGAKI, SHIGERU. Integrated defensive strategy against microbial infection in the honeybee colony. *Honeybee Science* (1994) 15(3): 115-118. Fac. Agric., Tamagawa Univ., Machida, Tokyo, 194 Japan.

Antibacterial peptide, which structure is homologous to those induced in hemolymph (Casteels, 1989), has been reported from royal jelly as an excreted bee milk (Fujiwara, 1990).

I confirmed that antibacterial activities induced in the hemolymph of larval, pupal and adult honeybees. The activity was not induced by oral administration of *E. coli* but it was occasionally induced by external application.

On the basis of their evidence, I hypothesized that inside the honeybee colony, which is often called "superorganism", is homologous to inside the body of usual solitary insects.

Honeybee seems to evolve very integrated defensive strategy exploiting both exogenous materials such as propolis and endogenous substances like antibacterial peptides.

I tried to review the idea which I have just started to study.