

原 報

石黒伊三雄, 高取吉太郎, 内藤純子, 原田治良: 王乳 (ローヤルゼリー)
の栄養学的研究 (第3報)

王乳中に含まれる蛍光物質とキヌレニンの含有量について

Isao Ishiguro, Junko Naitō and Jirō Harada:
Nutritional Studies on Royal Jelly (Part III)
Fluorescent Substances and Kynurenine Content in Royal Jelly

In royal jelly, 7 fluorescent substances were observed and investigated by paperchromatography.

A blue fluorescent spot with Rf 0.39 was the most prominent and largest of them all and we guessed it bioppterin.

It was remarkable that the quantity of FAD was much more than that of FMN, FR and that royal jelly was pretty similar to human milk.

We also found that an another blue fluorescent substance with Rf 0.46 was kynurenine and that the content was 172.21 r/g in royal jelly.

1958年, Butenandt¹⁾らは王乳 (ローヤルゼリー) 中に含まれる特有成分としてピオプテリンを同定した。これより先, Wieland²⁾らは蝶の羽の白色色素がキサントプテリンであることを発見し, 生物体にプテリン類の分布することを初めて明らかにした。これらはいずれも紫外線下で蛍光を発する物質として知られ, この性質を指標としてプテリン類分布の特異性や生理作用に関する検索が行われ, これらが生体内で特異な生理機能にあつかることも次第に解明されつつある。王乳中に分布するピオプテリンは微生物の発育を促し, 葉酸と類似の作用を示すことや, この物質が人尿中に微量存在することからその生理的意義も推察されている。なお生物体に分布する蛍光物質としては, 既にビタミンB₂ やトリプトファン³⁾の中間代謝産物などが知られ, 何れも重要な生理作用に関与することも周知の事実である。

我々は前報³⁾⁴⁾の実験において王乳中のビタミンB₂ について観察していた際, 王乳中に B₂ 以外に数種の蛍光物質の存在することを認めていたので, 今回これらについての検討を行った。特にペーパー上 Rf0.46 を示す青色蛍光物質はトリプトファン³⁾の中間代謝産物の一つであるキヌレニンであることを同定し得たので, その定量化についても同時に検索し, 王乳に含まれる蛍光物質の特異性を明らかにした。

実験材料及び実験方法

実験材料

実験に用いた王乳は人工王台から採取した新鮮なもので採取時の詳細については前報³⁾に述べた通りである。なお乳汁は正常な各種動物の新鮮乳汁をそれぞれ実験に供した。

実験方法

a) ペーパークロマトグラフィーによる蛍光物質の分離法

王乳 1~2g, 各種新鮮乳汁 10ml をそれぞれ水を加えて 30ml に溶解させ, 直ちに 80°C, 15 分加温する. 冷後遠沈してその上清を取り, Crammer の方法に従って濃縮し, 東洋濾紙 No. 51 に濃縮液の一定量を塗抹, 風乾後 n-ブタノール/H₂O/HAC (4:1:1) の展開溶媒でペーパークロマトグラフィーを行い, 14~16 時間展開後, 紫外線下で蛍光スポットの検出を行って Rf 値を測定した.

b) 王乳中に含まれる蛍光物質のペーパー上の確認反応

a) の方法で王乳のペーパークロマトグラフィーを行い Dalgriesh⁶⁾ らの方法に従って各種の確認反応を行った.

c) キヌレニンの紫外外部吸収スペクトル

a) の方法で多量の王乳を同時に処理してペーパークロマトグラフィーを行った後, Rf 0.46 の蛍光部分を抜き取り, 温水に抽出後減圧濃縮し, 再び無蛍光濾紙に塗抹, 展開, この操作を 2 回くり返した後蛍光部分を切り取り, 下降法で蛍光部分を pH7.4, M/10 phosphate buffer に溶出し, 分光光度計で紫外外部吸収スペクトルを測定した.

d) 王乳中に含まれるキヌレニンの定量

王乳 1.0g を秤取し水を加えて 10ml とし, 15 分加温し, 冷後 30% トリクロロール酢酸 2ml を加えて除蛋白し, その濾液の一定量をとって Bratton-Marshall 反応⁷⁾を行い, 分光光度計で 560m μ の吸収を測定し, キヌレニンの標品から作成した基準曲線より含量を算出した. なお同時に働蜂, 蛹および王台についても同様に実施した.

実験成績ならびに考察

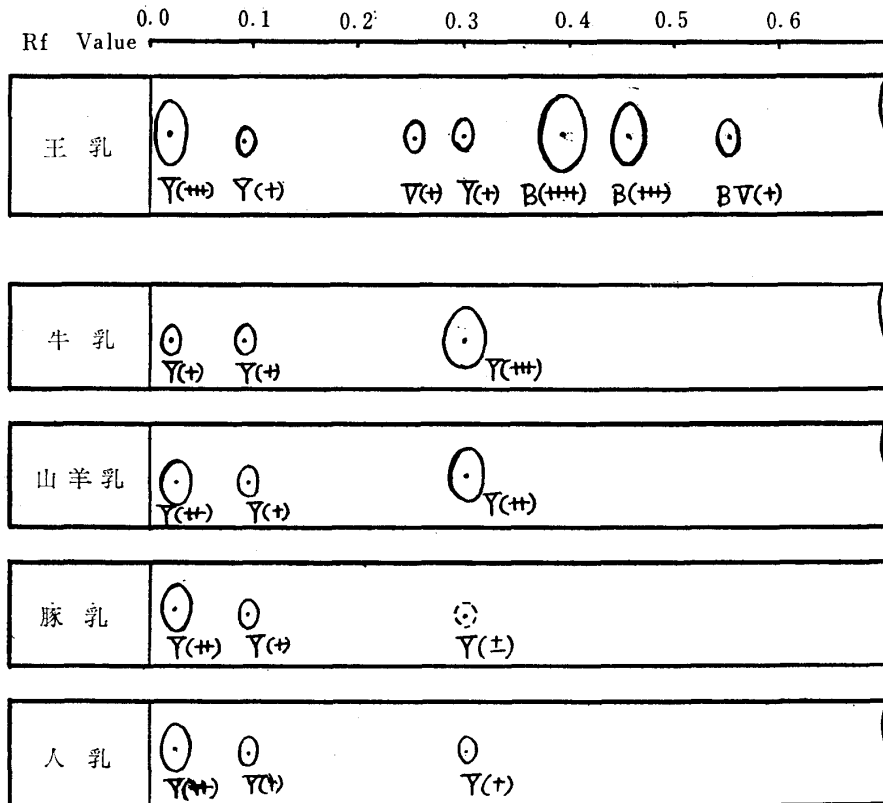
1) 王乳中の蛍光物質の分布について

王乳および各種の乳汁, 牛乳, 山羊乳, 豚乳, 人乳についてそれぞれ前記の方法に従ってペーパークロマトグラフィーを行い, 蛍光物質を検索した結果, 第 1 図に示すように王乳以外の乳汁においてはビタミン B₂ の黄色蛍光スポットが 3 種 (FAD, FMN, FR) 認められただけであった. これに反し王乳中には B₂ の黄色蛍光スポットの他 Rf0.26 の紫色, Rf0.39, 0.46 の青色, Rf0.54 の青紫色蛍光物質が認められた. このうちで最も強い蛍光を示す Rf0.39 物質は Rf 値, ペーパー上の確認反応, 吸収スペクトルなどの成績からビオプテリンと考えられた. また王乳に含まれる 3 種の黄色蛍光スポットのうち Rf 0.02 を示す FAD が大部分を占めることは前報の B₂ 定量成績ともよく一致する. そしてこの分布の特異性は乳汁のうちでは人乳に最も類似していることは興味ある事実である. また Rf 0.46 の青色蛍光物質は, これまでの先人の実験成績によればキヌレニンと考えられたが, 更にこれについて詳細な検討を行い, その確認反応や吸収スペクトルの結果からキヌレニンと同定することができたので, その含有量をも測定した. Rf 0.26 の紫色および Rf 0.54 の青紫色蛍光物質は前述の 2 種の蛍光物質に比べると分布も極めて少量で, まだ確認するに至っていない.

2) 王乳中のキヌレニンの同定と定量

王乳を前記の方法で処理し, ペーパークロマトグラフィーによって蛍光物質を分離した後, これについてペーパー上で Dalgriesh らの方法により確認反応を行ったところ第 1 表にみられるように, Rf 0.46 を示す物質はジアゾ反応, 逆ジアゾ反応, ニンヒドリン反応, Ehrlich's Aldehyde 反応等が陽性で, すべてキヌレニンの標品

第1図：王乳および2,3乳汁の螢光物質について



Developer: *n*-Butanol/HAc/H₂O (4 : 1 : 1) 東洋濾紙No.51

(+) = 螢光量を示す。

Y = Yellow, B = Blue,

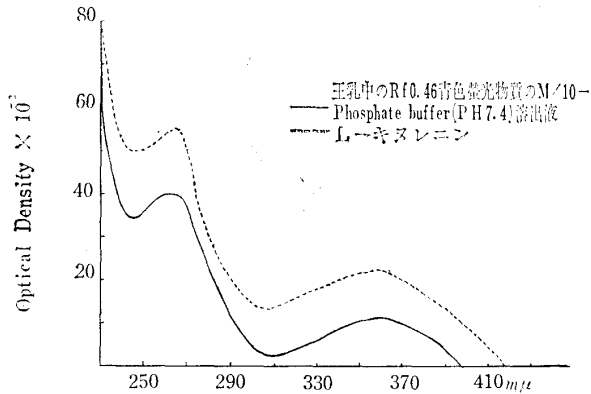
BV = Blue-Violet, V = Violet.

第1表：王乳の螢光物質の濾紙上に於ける呈色反応について

Paper 分布	Rf Value	0	0	0	0	0	0	0
		0.02	0.09	0.26	0.30	0.39	0.46	0.54
螢光色調	Y	Y	V	Y	B	B	BV	
螢光量	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+++)	(++)	(+)	
Diazo 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
逆 Diazo 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
Ninhydrin 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	
KMnO ₄ 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	
NH ₃ 性 AgNO ₃ 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
FeCl ₃ 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Millon 反応	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	
Ehrlich's 直後	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)	
Aldehyd ^e 反応	2 時間	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	橙色 (+)	(-)
	24 時間	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	// (+)	(-)
吸収スペクトル推定物質	FAD	FMN	?	FR	Biopterine	Kynurenine	?	

第2表: 王乳の青色蛍光物質の各種展開溶媒に対する Rf 値の比較

溶媒 No.	展 開 溶 媒	王乳の青色蛍光物質	L-キヌレニン
1	<i>n</i> -ブタノール-酢酸-水 (4:1:5)	0.45	0.45
2	<i>n</i> -ブタノール- <i>n</i> -プロパノール-水 (2:2:1)	0.75	0.75
3	メタノール- <i>n</i> -ブタノール-ベンゼン-水 (2:1:1:1)	0.42	0.42
4	メタノール- <i>n</i> -ブタノール-ベンゼン-0.05M-水酸化ナトリウム (2:1:1:1)	0.68	0.68
5	水飽和ベンジルアルコール	0.24	0.24
6	5%リン酸二ナトリウム溶液	0.74	0.73

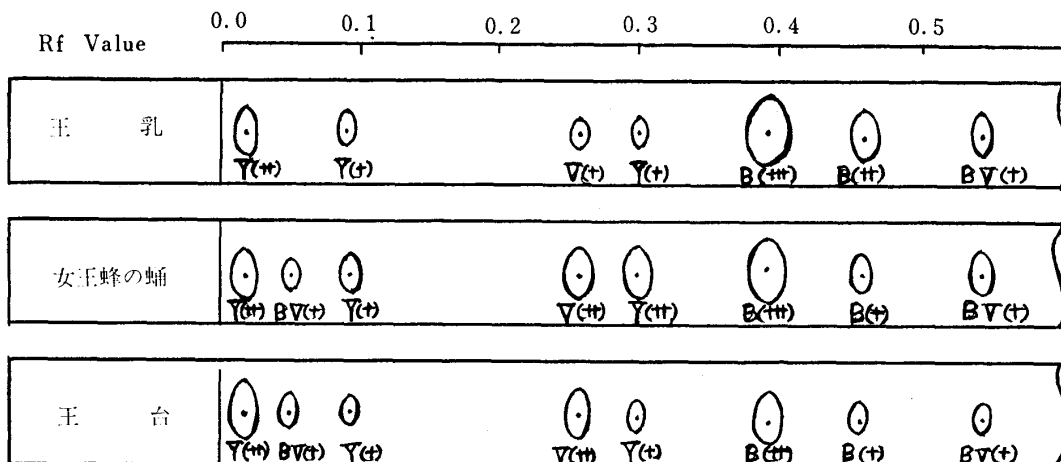


第2図: 王乳の青色蛍光物質 (Rf 0.46) の紫外部吸収スペクトル

東洋濾紙 No. 51, 上昇法にて実施

とよく一致する成績が得られた。次に王乳を前記の 2), b) の実験方法によって Rf 0.46 の蛍光部分を抽出し, その紫外部吸収スペクトルを L-キヌレニンの標品と比較して測定した結果は第2図の如くであった。また東洋濾紙 No. 51 を用い, 上昇法によって各種展開溶媒に対する本物質の Rf 値をキヌレニンの標品と比較したところ第2表の結果が得られた。以上の実験成績から王乳中のペーパー上 Rf 0.46 を示す青色蛍光物質はキヌレニンと同定されたので, 次にその量的な関係を研究した。

元来, 王乳は日令 12~15 日の働蜂の咽頭腺から分泌される女王蜂の飼料で, その幼虫は王乳によって成育される。このようにして成熟した女王蜂は他の働蜂と比較して顕著な生物学的特性を持つことはよく知られた事実である。このことから王乳中には生理的活性に富む物質や女王蜂の代謝を旺盛にする物質の含まれることが容易に想像される。また王乳中に含まれるキヌレニンは必須アミノ酸の一としてのトリプトファンの中間代謝産物として知られ, なお昆虫においては眼色素の形成母体であることも Butenandt により報告され生理的に極めて重要な物質であることが明らかになった。それ故, 王乳中に含まれるキヌレニンの量的関係や分布の特異性は女王蜂の生物学的特性を知る手懸りとして重要と考え, 王乳中のキヌレニンの定量を王乳のみならず, 女王蜂の蛹, 王台などについても実施した。実験は予め王乳, 蛹, および王台の蛍光物質について比較してみたところ第3図の如く



第3図: 王乳, 女王蜂蛹, 王台の蛍光物質について
 展開剤: *n*-Butanol/HAC/H₂O (4:1:1)
 (+) = 蛍光量を示す, Y = Yellow, B = Blue, BV = Blue-Violet, V = Violet.

ほぼ同じ種類の蛍光物質の存在が明らかになった。そこでキヌレニン定量の際、これら女王蜂、蛹、王台についても同様に行ってみた。その結果、第3表の如く、王乳には 172.21 γ /g の含有量を示し、かなりのキヌレニ

第3表：王乳及び女王蜂蛹のキヌレニン含有量

(新鮮材料 γ /g)

実験番号	王乳	女王蜂蛹	王台
1	129.60	97.68	55.62
2	142.26	89.16	58.98
3	126.12	39.12	48.66
4	230.40	61.02	68.58
5	209.82	68.90	63.42
6	195.06	—	38.78
平均	172.21	71.17	55.67

ンが存在することが分った。しかし女王蜂の蛹、王台に少量存在するのは王乳中のキヌレニンが移行したものと考えられ、王乳のキヌレニンは、これらに比べて非常に多いところからかなりの特異性があり、これは女王蜂の成育に重要な生理作用を及ぼすものと考えられる。

結 語

1) 王乳中に含まれる蛍光物質をペーパーで観察し、B₂3型のほかにペーパー上に4種の未知蛍光物質を認め、このうち最も多量に存在するのはRf 0.39の青色蛍光物質で、ビオプテリンと考えられる。B₂の分布はFADが最も多く、FMN、FRは僅少で、乳汁について比較すると、王乳は人乳のそれに類似した傾向にあった。

2) 王乳中に含まれる蛍光物質のうち、ペーパー上Rf 0.46を示す青色蛍光物質は各種の確認反応、Rf値の比較、および紫外吸収スペクトルなどの成績からキヌレニンと同定した。

3) 王乳中のキヌレニン含量は172.21 γ /gであり、かなり特異的な分布を示し、女王蜂の成育に重要な意義を持つものと考えられる。

本研究費は昭和38年度文部省機関研究費(王乳および蜂毒成分の化学的ならびに生理化学的研究(代表者本学教授中沢浩一))によった。なお本研究に際し終始御鞭撻を賜った本学学長宮道悦男博士、材料の採集に御協力を載せ、材料の一部を恵与された日本養蜂協会理事松原喜八氏、秋田屋本店社長中村源次郎氏、ならびに貴重な御助言を載せた中外製薬研究所佐野肇氏に深く感謝する。

文 献

- 1) A. Butenandt: Z. Physiol. Chem. **311**, 79(1958).
- 2) Wieland, H., Schöph, C.: Ber., **28**, 2178 (1925).
- 3) 石黒伊三雄, 内藤純子, 田中きよ子: 栄養と食量, **16**, 127 (1963).
- 4) 石黒伊三雄, 内藤純子, 田中きよ子: 栄養と食量, **16**, 130 (1963).
- 5) Crammer, T. L.: Nature, **191**, 349 (1948).
- 6) Dalgriesh, C. E.: Biochem. J., **52**, 3 (1952).
- 7) Bratton, A. C., Marshall, E. K. Jr.: J. Biol. Chem., **28**, 537 (1939).