

動物種間におけるミルクオリゴ糖の比較生化学

岩手大学大学院連合農学研究科
生物資源科学専攻生物資源化学講座
(帯広畜産大学配属)

上村 祐介

目 次

第 I 章 緒論	1
図表	5
第 II 章 ハクジラ亜目 4 種のミルクオリゴ糖組成とその比較	6
2.1 緒論	6
2.2 試料および方法	9
2.2.1 試料	9
2.2.2 ミルクオリゴ糖の抽出と分離・精製	10
(a) ミルクオリゴ糖画分の抽出	10
(b) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離	10
(c) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離	11
(d) 高速液体クロマトグラフィーによる精製	11
2.2.3 ミルクオリゴ糖の構造解析	12
(a) 核磁気共鳴スペクトル分析	12
(b) マトリックス支援レーザー脱離イオン化-時間飛行型-質量分析	13
2.3 結果	14
2.3.1 バンドウイルカ (<i>Tursiops truncatus</i>) 乳中のミルクオリゴ糖組成	14
2.3.2 シャチ (<i>Orcinus orca</i>) 乳中のミルクオリゴ糖組成	18
2.3.3 マダライルカ (<i>Stenella attenuata</i>) 乳中のミルクオリゴ糖組成	19
2.3.4 シロイルカ (<i>Delphinapterus leucas</i>) 乳中のミルクオリゴ糖組成	20
2.4. 考察	25
図表	29
第 III 章 アジアゾウ (<i>Elephas maximus</i>) 乳中のミルクオリゴ糖組成	55
3.1 緒論	55

3.2 試料と方法	57
3.2.1 試料	57
3.2.2 ミルクオリゴ糖の抽出と分離・精製	57
(a) ミルクオリゴ糖画分の抽出	57
(b) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離	57
(c) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離	58
(d) 高速液体クロマトグラフィーによる精製	58
3.2.3 核磁気共鳴スペクトル分析によるミルクオリゴ糖の構造解析	58
3.3. 結果	59
3.4 考察	66
図表	70
第 IV 章 総括	81
謝辞	84
参考文献	85

第 I 章 緒論

哺乳動物の定義に関する最大の特徴の一つが乳の生産・分泌である。乳中には様々な成分が含まれており、これらの成分は複雑なホルモン制御のもとで、乳腺上皮細胞内において各々生合成されて分泌される。この乳成分がもつ働きは、未熟な新生児（仔）に対する栄養源としてだけではなく、初期免疫賦活作用や抗感染など様々な生理学的な意味をもつことが解明されつつある。

多種多様な哺乳動物種が生産する乳成分は均一ではない^{1, 2)}。乳成分中の固形分として数%を占める糖質は、大半の動物種の乳においてラクトースが優勢的である。ホエータンパク質である α -ラクトアルブミンと β 1,4-ガラクトース転移酵素Iの共同作業により合成されるラクトースは、1分子のD-グルコース（Glc）と1分子のD-ガラクトース（Gal）から成り、 β 1-4 グリコシド結合した二糖（Gal(β 1-4)Glc）である^{3, 4)}。一方、単孔類、有袋類など一部の動物種には、ラクトースではなく、3~10糖程度の重合度をもつミルクオリゴ糖を優勢糖質とする乳をもつことが見出されている。

ミルクオリゴ糖は、還元末端側のラクトースユニットをコア骨格とし、それに単糖類が α および β グリコシド結合することで伸長した構造をもつ⁵⁻⁹⁾。様々な糖転移酵素の作用により付加される構成単糖は、Gal、L-フコース（Fuc）、N-アセチル-D-グルコサミン（GlcNAc）、N-アセチル-D-ガラクトサミン（GalNAc）、N-アセチル-D-ノイラミン酸（Neu5Ac）およびN-グリコリル-D-ノイラミン酸（Neu5Gc）であり、それらが直鎖または分岐状に α -または β -グリコシド結合することで、ミルクオリゴ糖は極めて多様な構造をもつ^{10, 11)}。

近年のミルクオリゴ糖研究から，その組成は動物種により大きく異なっていることが明らかになりつつある¹⁰⁾．特に，ヒト乳中のミルクオリゴ糖は初乳で 22～24 g/L，常乳で 12～13 g/Lもの高濃度で存在し，その化学構造から，基本骨格として 12 グループ (Fig. 1) に分類されている^{12, 13)}．他の動物種と比べた場合，ヒトミルクオリゴ糖の構造的特徴は，(1) タイプII型 (Gal(β1-4)GlcNAc-R) よりもタイプI型 (Gal(β1-3)GlcNAc-R) が優勢であること，(2) Le^a (Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc) ，Le^b (Fuc(α1-2)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc) およびLe^x (Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc) といったFuc含有オリゴ糖の割合が高いこと，(3) シアル酸誘導体としてNeu5Acのみを含むこと，(4) α-Galエピトープ (Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc-R) を含まないことが挙げられる¹¹⁾．

ヒトミルクオリゴ糖の生理学的意義として，まず腸管内ビフィズス菌を対象とするプレバイオティクス機能が挙げられる．母乳栄養児は人工栄養児と比べて，腸内菌叢におけるビフィズス菌の優勢性が高いことから，腸管内pHの低下によって大腸菌や他の病原菌の増殖を抑えることで，乳児の罹患を減少させている¹⁴⁻¹⁷⁾．また，ヒトミルクオリゴ糖は病原菌やそれらが産生する毒素に対する潜在的な感染阻害機能を有すると考えられている¹⁸⁻³³⁾．病原菌やその毒素の接着は，そのレクチン様タンパク質が粘膜細胞表面の複合糖質糖鎖を認識し，結合することにより起こる．この際のレセプターとなる表面糖鎖とヒトミルクオリゴ糖との間には，構造的類似性が認められており，病原体のレセプターへの拮抗的な接着阻害を生ずる．

以上のような特徴をもつミルクオリゴ糖であるが，上述の通り，最近の研究からその組成は動物種により大きく異なることが分かっ

てきた^{11, 34)}。これまでにミルクオリゴ糖組成が明らかになった動物種は、単孔類ではカモノハシ³⁵⁻³⁸⁾，ハリモグラ^{35, 37, 39, 40)}や有袋類ではフクロネズミ⁴¹⁻⁴⁵⁾が挙げられる。また，真獣類として，家畜動物種（ウシ⁴⁶⁻⁵³⁾，ウマ⁵⁴⁻⁵⁶⁾，ヒツジ^{57, 58)}，ヤギ⁵⁹⁻⁶¹⁾）をはじめ，野生下または飼育下動物種（イヌ⁶²⁾，エゾヒグマ⁶³⁾，ツキノワグマ^{64, 65)}，シロクマ^{66, 67)}，ジャイアントパンダ⁶⁸⁾，ハナグマ⁶⁹⁾，ミンク⁷⁰⁾，カニクイアザラシ⁷¹⁾，ズキンアザラシ⁷²⁾，オーストラリアアシカ⁷²⁾，ゼニガタアザラシ⁷³⁾，アゴヒゲアザラシ⁷⁴⁾，ミンククジラ⁷⁵⁾，イワシクジラ⁷⁶⁾，ニタリクジラ⁷⁶⁾，シロイルカ⁷⁵⁾，アジアゾウ^{77, 78)}，ラット⁷⁹⁻⁸³⁾）のミルクオリゴ糖組成が明らかにされた。これらヒト以外の動物種のミルクオリゴ糖の構造および組成は多種多様であるが，その大部分がタイプII型で構成されていることが知られている¹¹⁾。特に，真獣類のミルクオリゴ糖組成においては有蹄目（ウシ，ウマ，ヒツジ，ヤギ）では多様なガラクトシル化やN-グリコシル型シアル酸を，食肉目（イヌ，クマ類，アザラシ類）では高度にフコシル化され，重合度の高い分岐型オリゴ糖が含まれている点で，それぞれ特徴をもつことが明らかになった。

動物園・水族館施設などで出生した乳仔を人工哺育する際にしばしば問題が発生する。例えば，飼育されている哺乳動物種は，しばしば親が自らの新生仔に対する子育てを放棄する。これは限られた施設内で飼育されることから，社会的未発達状態での初産やストレスが原因と考えられる。そのようなケースにおいては乳仔に牛乳などをベースとした人工乳を与えた場合，その動物種本来の乳との成分組成の違いが原因で乳仔が下痢を引き起こしたり発育不全に陥ったりすることがあることから，使用する調合乳の調製はその種の特

徴をもった乳成分組成に出来るだけ近づけて行う必要がある。例えば、クジラ目の乳汁は、高濃度の脂質を含む一方で糖質含量は少ないと報告されているが、詳細な乳成分組成データは極めて少ない⁸⁴⁻⁹⁸⁾。特に、乳成分の中でも糖質の分析例は極めて少ない⁹⁹⁾。クジラ乳と牛乳などとの糖質組成の違いは、調合乳を摂取させた際の下痢の原因と成りうることから、その詳細な分析が必要である。

本研究では、主にハクジラ亜目に属する動物種から採集した乳を対象として、それらのミルクオリゴ糖組成を比較することでその違いを明らかにした。同様に、分析例が極めて少なく、詳細な糖質組成分析がされてこなかったアフリカ上獣目に属するアジアゾウのミルクオリゴ糖組成に関しても明らかにした。

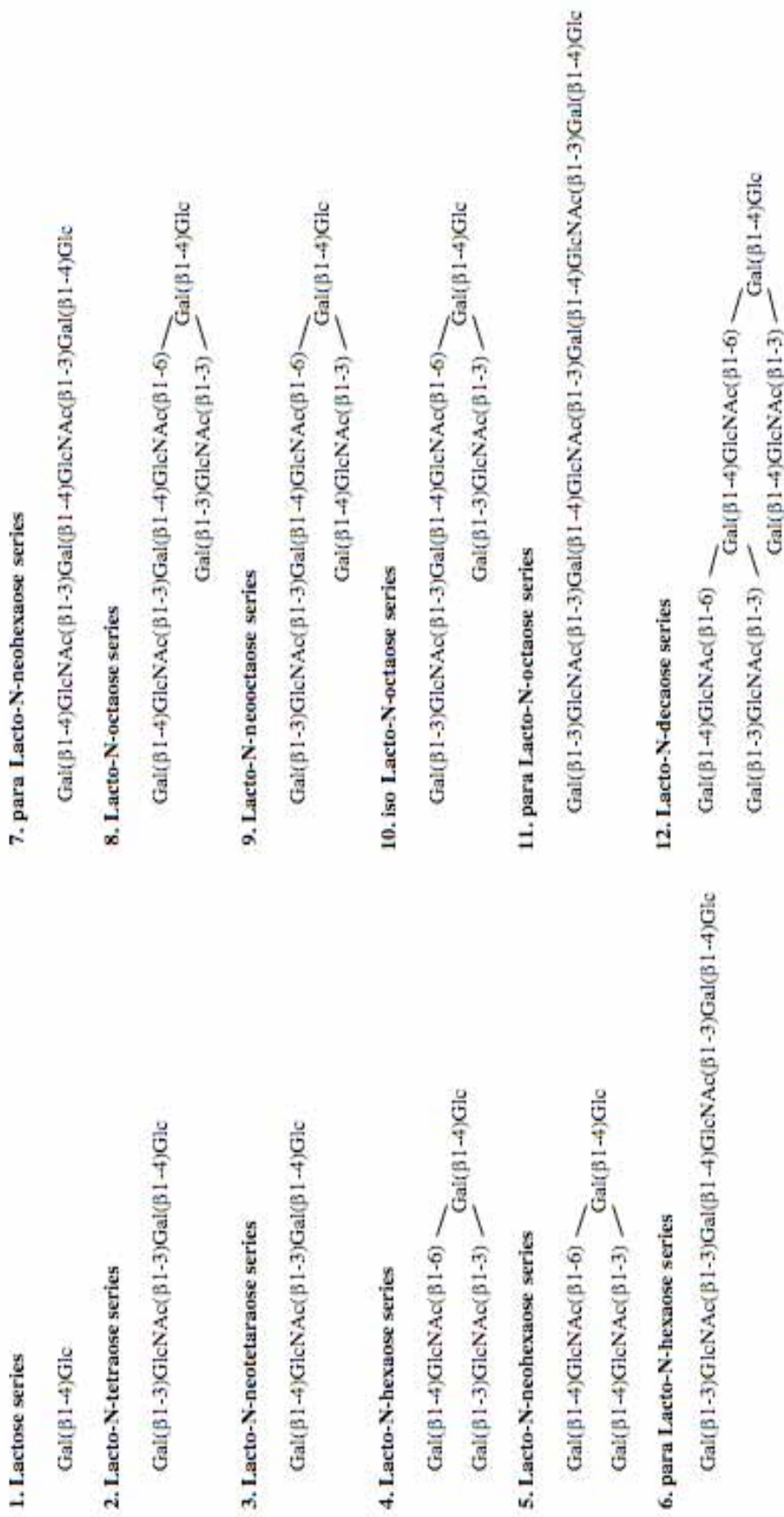


Fig. 1. Twelve groups of human milk oligosaccharides

第 II 章 ハクジラ亜目 4 種のミルクオリゴ糖組成とその比較

2.1 緒論

これまでのクジラ目における乳中糖質の分析から，糖質組成の状況は種ごとに不均一あることが伺える．例えば，マイルカ科のバンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) 乳には 1.1-2.5% のラクトース ($\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$) の存在が報告されている^{1, 90)}一方で，オオギハクジラ科のオオギハクジラ (*Mesoplodon stejnegeri*) 乳にはラクトースも他の糖質 (ミルクオリゴ糖) の存在も発見されていない⁹²⁾．またヒゲクジラ亜目に属するミンククジラ (*Balaenoptera acutorostrata*) の泌乳末期乳には主要糖質としてラクトースの他，中性オリゴ糖として 2'-フコシルラクトース ($\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-4)$; 2'-FL)，ラクト-N-ネオテトラオース ($\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; LNnT)，A四糖 ($\text{GalNAc}(\alpha 1-3)[\text{Fuc}(\alpha 1-2)]\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$)，パララクト-N-ネオヘキサオース ($\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; パラLNnH)，酸性オリゴ糖としてシアリルラクト-N-ネオテトラオース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; シアリルLNnT)，シアリルラクト-N-ネオテトラオースc ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; LSTc)，およびシアリルパララクト-N-ネオヘキサオース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; シアリルパラ-LNnH) が同定され⁷⁵⁾，同じナガスクジラ科に属するニタリクジラとイワシクジラの乳からはそれぞれ 3'-シアリルラクトース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; 3'-SL)，6'-シアリルラクトース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$; 6'-SL)，および

LSTcが同定されている。その結果，同じ科に属する種においてもミルクオリゴ糖組成が異なることが明らかにされた⁷⁶⁾。一方，ハクジラ亜目に属する野生下シロイルカ (*Delphinapterus leucas*) の泌乳末期乳からは痕跡量の 3'-SLの存在が認められた⁷⁵⁾。

バンドウイルカは世界中の水族館で飼育・展示されている最も多い鯨種であるが，日本動物園水族館協会バンドウイルカ繁殖検討委員会による繁殖に関するアンケート（1997年）によると，鯨類を飼育している30園館の繁殖状況は必ずしもその新生仔生存率が高くはなく，40年間の繁殖例の中で130頭（41.8%）が死産・流産，95頭（30.5%）が20日以内に死亡，また86頭（27.7%）は21日以上生存しているが，その69.4%に当たる58頭は1年以内に死亡している¹⁰⁰⁾。このように飼育技術は進歩しているが未だ出生個体の流産・死産及び早期死亡が多いのが現状である。近年，香港やアメリカの水族館施設では，飼育下でのバンドウイルカ（2001），シャチ（2001）やカマイルカ（2003）の人工繁殖に成功している。日本においてもバンドウイルカに対しその試みが行われ，凍結精液を用いた人工授精を世界で初めて成功させている。種の保存という観点からも，このように自然界で捕獲された個体を導入することなく飼育施設内での人工繁殖並びに飼育は今後盛んになると予想されることから，飼育下での乳仔へのクジラ目用人工調合乳の必要性も増すであろう。

また，バンドウイルカ乳では各泌乳段階による各成分の変動が報告されている¹⁰¹⁾が，この現象は他の鯨種でも起こっている可能性がある。乳仔が必要とする適切な人工調合乳を調製するためには，様々な泌乳段階における乳成分組成分析が不可欠である。

そこで本研究では，人工調合乳の調製を視野に入れた詳細な乳成

分組成データの収集と，クジラ目におけるミルクオリゴ糖組成の種間差を明らかにすることを目的とし，ハクジラ亜目に属するマイルカ科 3 種（飼育下バンドウイルカ，野生下シャチ（*Orcinus orca*）およびマダライルカ（*Stenella attenuata*））とイッカク科 1 種（飼育下シロイルカ）のミルクオリゴ糖組成を調査した．

2.2 試料および方法

2.2.1 試料

バンドウイルカ乳は神戸市立須磨海浜水族園より提供された，分娩後 2，3 日目の 1 個体から 1999 年 6 月に採集された初乳を，シロイルカ乳は財団法人名古屋港水族館より提供された 1 個体から採集された乳を用いた．シロイルカ乳は未分娩個体から得たもので，仔イルカとの同居により誘起されたものであった．授乳は 2004 年 11 月から 2005 年 10 月までの 1 年間継続され，1 年間の泌乳期を 3 期（初期；2004 年 11 月，中期；2005 年 3 月，末期；2005 年 9 月）に分けて分析した．また，シャチ乳およびマダライルカ乳は，アメリカのスミソニアン研究所国立動物学公園の Olav T. Oftedal 博士から提供されたものを用いた．シャチ乳はシーワールドオーランドで 2001 年 1 月および 3 月に採集された分娩後 65 日および 119 日の乳をプールして常乳として用い，マダライルカ乳は 1989 年 3 月にアメリカテキサス州にストランディングした個体から採集された泌乳期不明の乳を用いた（Table 1）．すべての乳試料は，分析まで -80°C のディープフリーザー内で凍結保存した．

糖標準品として，ラクトース 1 水和物 Kishida Kagaku (Osaka, Japan) から，3'-SL，6'-SL および N-アセチルノイラミン酸は Sigma (St. Louis, USA) から，LNnT および LST c は Seikagaku (Tokyo, Japan) から購入した．GalNA およびグロボトリオース ($\text{Gal}(\alpha 1-4)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$) は Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada) および Dextra Laboratories, Ltd. (London, UK) から購入した．また，シアリルパラ-LNnH ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$) およびシアリル LNnH

(Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)[Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glc) はアジアゾウ乳⁷⁸⁾およびゴマファザラシ乳⁷³⁾から，A四糖およびイソグロボトリオース (Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc) はミンククジラ乳⁷⁵⁾および，ジャイアントパンダ⁶⁸⁾とミンク⁷⁰⁾ 乳から当研究室で精製したものをを用いた．

2.2.2 ミルクオリゴ糖の抽出と分離・精製

(a) ミルクオリゴ糖画分の抽出

乳試料に 4 倍量のクロロホルム/メタノール (2 : 1 , v/v) 溶液を加え , 室温で充分攪拌した後 , 4 °C , 5000 x g , 30 分間遠心分離した . 得られた上層 (メタノール層) をロータリーエバポレーターで濃縮し , 凍結乾燥したものを糖質画分とした .

各乳試料中のヘキソース含量測定はDuboisらの方法¹⁰²⁾(フェノール-硫酸法) に準じて行い , ラクトース標準溶液を用いた検量線から 490 nmにて比色定量した . 同様に , シアル酸含量測定に関しては Jourdianらの方法¹⁰³⁾(過ヨウ素酸-レゾルシノール法) に準じて行い , N-アセチルノイラミン酸標準溶液を用いた検量線から 630 nmにて比色定量を行った . 分光光度計はHITACHI U-1100 Spectrometerを用いた .

(b) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離

得られた糖質画分を蒸留水 2 mL に溶解し , Bio-Gel P-2 (BioRad 社 , Extra Fine < 45 μ m) カラム (2.6 \times 100 cm) によるゲル濾過クロマトグラフィーに供した . 溶出液には脱気した蒸留水を使用し , 流速は 15 mL/h に調整し , 試験管 95 本に各 5 mL ずつ分画した . 各

画分の比色検出はフェノール-硫酸法および過ヨウ素酸-レゾルシノール法で行い、各画分の 125 ~ 250 μ L を用いて 490 nm および 630 nm での吸光度を測定した。クロマトグラム上で得られたピーク成分ごとにプールし、濃縮後に凍結乾燥した。

(c) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離

ゲル濾過クロマトグラフィーで得られた画分は、DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Biotech) カラム (1.0 \times 25 cm) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。溶離液は 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.7) を用い、流速は 15 ml/h に調整して、5 mL ずつ分画した。非吸着の画分を 200 mL 溶出した後に、0-0.5 M 塩化ナトリウム溶液のリニアグラジエントによる溶出により 40 本 (200 mL) から 50 本 (250 mL) の吸着画分を得た。各画分の比色検出はフェノール-硫酸法および過ヨウ素酸-レゾルシノール法で行い、各画分のアリクウェント (125 ~ 250 μ L) を用いて 490 nm および 630 nm での吸光度で測定した。ここで得られた画分は、ピーク成分ごとにプールし濃縮したものを凍結乾燥してから、Bio-Gel P-2 カラム (2.6 \times 40 cm , 2.6 \times 100 cm) を用いて脱塩した。

(d) 高速液体クロマトグラフィーによる精製

陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた中性および酸性オリゴ糖画分をさらに分離・精製するため、以下の条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。

酸性オリゴ糖画分の分離に関しては、検出は UV 検出器 TOSOH CM-8020 を、ポンプには Shimadzu LC-10AT VP を、及びカラムには

TSK-gel Amide-80 (4.6 I.D. × 250 mm , TOSOH , Japan) を用い , 波長 195 nm での吸光度を検出して行った . 溶出は流速 1 mL/min , 並びにカラム温度 40 °C から 60 °C の条件下で行った . 移動相にはアセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.2) を用いて , 80% から 50% までのアセトニトリル/リン酸カリウム緩衝液のリニアグラジエント溶出を 80 分間行った . 分取されたピーク成分は , セルロースエステル膜の透析チャンバーを用いた透析により脱塩し , 凍結乾燥した .

中性オリゴ糖画分の分離に関しては , 検出には光散乱検出器 SEDERE SEDEX 75 を , ポンプ及びカラムには酸性糖画分の分離と同様の装置を用いて行った . 検出器の条件として , 温度 50 °C , 感度 4 から 8 , 空気圧 3.5 , 流速 1 mL/min , 並びにカラム温度 40 °C で行った . 移動相にはアセトニトリル/イオン交換水を用い , 80% から 50% までのアセトニトリルのリニアグラジエント溶出を 80 分間行った .

2.2.3 ミルクオリゴ糖の構造解析

(a) 核磁気共鳴スペクトル分析 (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ; NMR)

精製したミルクオリゴ糖の構造を解析するため , ^1H -NMR , ^{13}C -NMR 及び ^1H - ^{13}C HSQC を行った . 測定装置には JEOL JNM-500FX または Varian INOVA-600 を用いた . 各オリゴ糖試料を測定前に D_2O (99.95% atom % , Merck , Sweden) を用いて凍結乾燥し , 測定時の溶媒には高精製 D_2O (100.00% atom D , Sigma-Aldrich , USA) を用いた . 内部標準物質としてアセトン (^1H : δ 2.225 , ^{13}C : δ 32.910) を用い , 温度 293.1 K (20.1 °C) で測定した .

(b) マトリックス支援レーザー脱離イオン化-時間飛行型-質量分析 (Matrix Asisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry; MALDI-TOF-MS)

精製したミルクオリゴ糖の構造を解析するため，単離したオリゴ糖の質量を MALDI-TOF-MS を用いて測定した．分析装置には AXIMA CFR (Shimadzu/Kratos, Japan) を用い，マトリックス支援レーザー，加速エネルギー 20 kV，linear/reflectron モードにより陽イオンを検出した．マトリックスとして 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DBH) を採用し，それを分析直前に蒸留水中の試料に混和させて用いた．

2.3 結果

2.3.1 バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) 乳中のミルクオリゴ糖組成

バンドウイルカ乳中に含まれるヘキソースおよびシアル酸含量は、ラクトースおよび N-アセチルノイラミン酸を用いた検量線を作成して算出した結果、ヘキソース含量は 28 g/L、シアル酸含量は 3.0 g/L と算出された。

バンドウイルカ乳 15 mLより抽出した糖質画分のゲル濾過クロマトグラムをFig. 2 に示した。ピーク 1 から 5 に分離され、それぞれを peak 1, peak 2, Tt 3 から Tt 5 と命名した。ここで得られたピーク 1 (Tt 1) とピーク 2 (Tt 2) はシアル酸陽性画分であったことから陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、その結果をFig. 3 に示した。また、Fig. 2 における溶出位置から、Tt 3, Tt 4 および Tt 5 は、それぞれ三糖、二糖および単糖を含むことが推測された。Tt 4 に含まれる糖質に関しては、¹H-NMRの結果ラクトースと同定された。

Fig. 4a から c に Tt 1, Tt 2 及び Tt 3 の高速液体クロマトグラムをそれぞれ示した。得られた全てのピークをそれぞれ分取した後、NMRにより構造解析を行った。この中からオリゴ糖として構造解析可能であったピークは Tt 1からは Tt 1-4, Tt 2からは Tt 2-2 から -4, および Tt 3からは Tt 3-8 であった。

高速液体クロマトグラフィーで分離した Tt 1-4, Tt 2-2 ~ 2-4, および Tt 3-8 の¹H-NMRスペクトラム及び Tt 1-4 の¹³C-NMRスペクトラムの帰属を Table 2 及び Table. 3 に示した。各ミルクオリゴ糖の構造解析結果は以下の(1)から(5)の通りである。

(1) Tt 1-4

Tt 1-4 の質量分析結果において, $M+K^+$ として $m/z=875.31$ に特徴的なイオンピークが得られたことから, 単糖組成は $Hex_2HexNAc_1Neu5Ac_1$ であると推測された.

Tt 1-4 の ^1H-NMR , $^1H-^{13}C$ HSQC スペクトラムを Fig. 5 および 6a, b に示した. δ 5.219 ppm 及び 4.665 ppm はそれぞれ還元末端の Glc 由来の α -及び β -アノマープロトンを示した. δ 4.529 ppm は β (1-4) 結合 Gal 残基の H-1 に帰属された (Fig. 5). δ 1.927 ppm, 2.657 ppm 及び 2.030 ppm は N-アセチルノイラミン酸残基 (Neu5Ac) の H-3 アクシャル (以下, ax), H-3 エクアトリアル (以下, eq) 及び N-アセチル基に帰属された. δ 4.151 ppm のダブルットダブルットシグナルは Neu5Ac 残基による β (1-4) 結合 Gal 残基の 3 位置換を示しているが, 通常の 3'-SL の同位置シグナルよりも低磁場シフトしていることが観察された. δ 2.013 ppm のシグナルは N-アセチルヘキソサミン (HexNAc) に特徴的な N-アセチル基 (NAc) シグナルに由来し, 同残基のアノマープロトンは δ 4.732 ppm に認められた. これはこの N-アセチルヘキソサミンが β 結合していることを示す. また, δ 4.119 ppm のダブルットシグナルは特徴的であり, 置換により低磁場シフトしていることを示していた. このシグナルのカップリング定数 2.9 は β (1-4) 結合 Gal 残基の H-3 と H-4 のカップリングによるものと考えられ, β (1-4) 結合 Gal 残基の 4 位が置換を受けていることを示唆した. β (1-4) 結合 Gal 残基の 4 位置換によって, 上述した β (1-4) 結合 Gal 残基の H-3 シグナルが 3'-SL のそれよりも低磁場シフトしていることとも矛盾しなかった.

さらに, 本オリゴ糖画分の $^{13}C-NMR$ 及び $^1H-^{13}C$ HSQC 解析を行った. 本オリゴ糖, 3'-SL 及び遊離型 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)

の¹³C-NMR スペクトラムのシグナルの帰属をTable. 2に示した .HSQC 相関 (Fig. 6aおよびb) から , Neu5Ac基により置換を受けたGal C-3 シグナル (76.65 ppm) は , 3'-SL (78.15 ppm) よりも高磁場側にあることが明らかになった . 逆に , Gal C-4 シグナル (79.82 ppm) は , 3'-SL (70.17 ppm) よりも著しく低磁場側にシフトしていた . これから , Gal C-3 に隣接する炭素 (C-2 もしくはC-4) が置換されていることを示すが , ¹H-NMRにより示されたGal(β1-4)残基の 4 位置換の観察とも一致していた . また , β-HexNAcの各シグナルはGalNAc標品のβ-GalNAcシグナルと , C-1 の低磁場シフト並びにC-2 シグナルの若干の高磁場シフトを除いて非常に一致しており , この残基がGalNAcであることを示した .

以上の解析から , Tt 1-4 はGalNAc(β1-4)[Neu5Ac(α2-3)]Gal(β1-4)Glc構造と決定された . 帰属された各¹³Cシグナルは上のような構造に対して全く矛盾がなかった . β (1-4)結合Gal残基のC-5 から 3'-SLの同位置のシグナルよりも若干高磁場シフトすることも特徴的である .

(2) Tt 2-2

δ 5.220 ppm及び 4.662 ppmはそれぞれ還元末端のGlc由来のα-及びβ-アノマープロトンを示した . δ 4.531 ppmはβ (1-4)結合Gal残基のH-1 に帰属された . δ 1.800 ppm , 2.757 ppm及び 2.029 ppmはNeu5Ac残基のH-3ax , H-3eq及びN-アセチル基に帰属された . δ 4.115 ppmシグナルはβ (1-4)結合Gal残基のH-3 に帰属され , Neu5Ac残基により置換を受けていることを示した . 以上の帰属並びに標品の¹H-NMRパターンとの完全一致から , Tt 2-2 は 3'-SLであると決定された .

(3) Tt 2-3

δ 5.224 ppm及び 4.669 ppmはそれぞれ還元末端のGlc由来の α -及び β -アノマープロトンを示した。 δ 4.427 ppmは β (1-4)結合Gal残基のH-1 に帰属された。 δ 1.800 ppm, 2.757 ppm及び 2.028 ppmはNeu5Ac残基のH-6ax, H-6eq及びN-アセチル基に帰属された。 δ 4.115 ppmシグナルは β (1-4)結合Gal残基のH-3 に帰属された。以上の帰属並びに標品の $^1\text{H-NMR}$ パターンとの完全一致から, Tt 2-3 は 6'-シアリルラクトース (Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc; 6'-SL) であると決定された。

(4) Tt 2-4

Tt 2-4 は Tt 1-4 との $^1\text{H-NMR}$ パターンの一致により, GalNAc(β 1-4)[Neu5Ac(α 2-3)]Gal(β 1-4)Glcの構造であることが決定された。

(5) Tt 3-8

Tt 3-8 の構造決定は, 市販品のGal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc (グロボトリオース)との $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 7)の比較によって行った。 δ 5.224 ppm及び 4.664 ppmはそれぞれ還元末端のGlc由来の α -及び β -アノマープロトンを示した。 δ 4.511 ppmは β (1-4)結合Gal残基のH-1 に帰属された。また, δ 4.945 ppmのダブルットシグナルは特徴的であるが, グロボトリオースの $^1\text{H-NMR}$ との比較から α (1-4)結合Gal残基のH-1 に, δ 4.036 ppmのトリプレットシグナルは α (1-4)結合Gal残基のH-5 に帰属された。以上の帰属並びにグロボトリオース標品のシグナルパターン的一致から, Tt 3-8 の構造はGal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glcであると決定された。 δ 4.363 ppmの特徴的なトリプレットシグナルは, α (1-4)

結合Gal残基の結合によって β (1-4)結合Gal残基のH-5 が低磁場シフトしたと考えられた。

2.3.2 シャチ (*Orcinus orca*) 乳中のミルクオリゴ糖組成

ラクトースを用いた検量線を作成して算出した結果、シャチ乳中に含まれるヘキソース含量は 8.9 g/L であった。

シャチ乳 51 mLより抽出した糖質画分のゲル濾過クロマトグラムをFig. 8 に示した。ピーク 1 から 7 に分離され、それぞれをKW 1 からKW 7 と命名した。ここで得られたKW 1 はシアル酸陽性画分であったことから陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果、シアル酸陽性画分のKW 1-1 およびシアル酸陰性のKW 1-2 に分離された (Fig. 9)。また、Fig. 8 における溶出位置から、KW 4 とKW 5、KW 6 およびKW 7 は、それぞれ三糖、二糖および単糖を含むことが推測された。しかし、KW 3、KW 4 とKW 5 の¹H-NMRスペクトルからは、オリゴ糖としての特徴的なシグナルが得られなかったことから未同定とした。KW 6 に含まれる糖質に関しては、¹H-NMRの結果ラクトースと同定された (Table 4)。

Fig. 10aおよびbにKW 1-1 およびKW 1-2 の高速液体クロマトグラムを示した。得られた全てのピークをそれぞれ分取した後、¹H-NMRにより構造解析を行った。この中から、オリゴ糖として構造解析可能であったピークは、KW 1-1 からはKW 1-1-4 とKW 1-1-5 であった。KW 1-2 のHPLCの結果では明確なピークが一つ得られ、KW 1-2-1 とした。

KW 1-1-4 とKW 1-1-5 の¹H-NMR分析で得られた化学シフトの帰属をTable 4 に示した。二つのオリゴ糖が示す¹H-NMRスペクトラムを

糖標準品および 2.3.1 (1)の結果¹⁰⁴⁾と比較したところ, KW 1-1-4 は 6'-SL, KW 1-1-5 はGalNAc(β 1-4)[Neu5Ac(α 2-3)]Gal(β 1-4)Glcであると同定された. 一方, KW 1-2-1 の¹H-NMRスペクトラムからは, Nakamuraら⁵⁶⁾が報告したリン酸化オリゴ糖の存在を示すダブルット-ダブルットで現れるアノマーシグナル δ 5.465 ppmおよび 5.433 ppmが観測されたが, 構造決定には至らなかった.

2.3.3 マダライルカ (*Stenella attenuatta*) 乳中のミルクオリゴ糖組成

ラクトースを用いた検量線を作成して算出した結果, マダライルカ乳中に含まれるヘキソース含量は 12 g/L であった.

マダライルカ乳 15 mLより抽出した糖質画分のゲル濾過クロマトグラムをFig. 11 に示した. ピーク 1 から 5 に分離され, それぞれをSA 1 からSA 4 と命名した. ここで得られたSA 1 はシアル酸陽性画分であったことから陰イオン交換クロマトグラフィーに供した. その結果, シアル酸陽性画分のSA 1-1 およびSA 1-2 が得られた (Fig. 12). また, Fig. 11 における溶出位置から, SA 3, SA 4 およびSA 5 は, それぞれ三糖, 二糖および単糖を含むことが推測された. SA 4 に含まれる糖質に関しては, ¹H-NMRの結果ラクトースと同定された (Table 5).

Fig. 13 に SA 1-1 の高速液体クロマトグラムを示した. 得られた全てのピークをそれぞれ分取した後, ¹H-NMRにより構造解析を行った. この中から, オリゴ糖として構造解析可能であったピークは, SA 1-1-3 のみであった. 一方, 中性オリゴ糖画分であるSA 2 をHPLCによる分離を行ったが, 各オリゴ糖濃度が低く, ¹H-NMRによる

構造決定には至らなかった。

SA 1-1-3 の¹H-NMR分析で得られた化学シフトの帰属をTable 5 に示した。このオリゴ糖が示す¹H-NMRスペクトラムを糖標準品と比較したところ、SA 1-1-3 は 3'-SLであると同定された。

2.3.4 シロイルカ (*Delphinoptera leucas*) 乳中のミルクオリゴ糖組成

シロイルカ乳中に含まれるヘキソースおよびシアル酸含量を、ラクトースおよび N-アセチルノイラミン酸を用いた検量線を作成して算出した結果、ヘキソース含量は泌乳初期乳で 28 g/L、泌乳中期乳で 15 g/L、泌乳後期乳で 12 g/L であり、シアル酸含量は泌乳初期乳で 5.9 g/L、泌乳中期乳で 6.2 g/L、泌乳後期乳で 6.8 g/L であった。

シロイルカ乳 (泌乳初期乳 36.5 mL ; 泌乳中期乳 35.0 mL ; 泌乳後期乳 36.0 mL) より抽出した糖質画分のゲル濾過クロマトグラムをFig. 14aからcに示した。初期乳ではピーク 1 から 3 に、中期乳と後期乳ではピーク 1 から 4 に分離され、それぞれをNov 1 からNov 3、Sep 1 からSep 4、そしてMar 1 からMar 4 と命名した。ここで得られたシアル酸陽性画分のNov 1、Sep 1 およびMar 1 を陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、中性オリゴ糖画分のNov 1-1、Sep 1-1 およびMar 1-1 と、酸性オリゴ糖画分Nov 1-2、Sep 1-2 およびMar 1-2 が得られた (Fig 15aからc)。また、Fig. 14 における溶出位置から、Nov 2 およびNov 3、Sep 3 およびSep 4、そしてMar 3 およびMar 4 は、それぞれ三糖および二糖を含むことが推測された。Nov 2、Sep 3 およびMar 3 に含まれる糖質に関しては、¹H-NMRの結果ラクトースと同定された (Table 6 および 8)。

Fig. 15 で最初に溶出した中性オリゴ糖画分 Nov 1-1 , Sep 1-1 および Mar 1-1 を HPLC に供したが , いずれのオリゴ糖も微量であるため構造決定には至らなかった . 一方 , 酸性オリゴ糖画分 Nov 1-2 , Sep 1-2 および Mar 1-2 の高速液体クロマトグラムは , それぞれ Fig. 16a から c に示した . Nov 1-2 と Sep 1-2 から得られた全てのピークを分取した後 , $^1\text{H-NMR}$ により成分の構造解析を行った . Mar 1-2 の HPLC 分析で得られた各オリゴ糖の構造解析は , Sep 1-2 とピークの組成と保持時間が類似していたことから , Sep 1-2 のピークにおける各オリゴ糖の構造解析結果に準じて行った . この中からオリゴ糖として構造解析可能であったピークは Nov 1-2-1 から 1-2-4 , Sep 1-2-1 (Mar 1-2-1) から Sep 1-2-6 (Mar 1-2-6) であった .

また , Fig. 14b および c における中性オリゴ糖画分 Sep 2 , Mar 2 および Mar 3 の高速液体クロマトグラムを Fig. 17a から c に示した . ここで得られた全てのピークをそれぞれ分取した後 , $^1\text{H-NMR}$ により構造解析を行った . この中からオリゴ糖として構造解析可能であったピークは , Mar 2-3 , Mar 3-3 および Sep 2-3 であった .

HPLC で得られた , 各泌乳期の酸性オリゴ糖および中性オリゴ糖の各ピークについて $^1\text{H-NMR}$ による構造解析を行った結果 , 以下の通りであった . なお , 構造解析は , 糖標準品および 2.3.1 (1)¹⁰⁴ の結果における $^1\text{H-NMR}$ スペクトラムと比較して行った .

(a) 酸性オリゴ糖

(1) 泌乳初期

泌乳初期乳から得られた画分 Nov 1-2-1 から Nov 1-2-4 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトラムのシグナル帰属を Table 6 に示した . 構造解析の結果 ,

Nov 1-2-1 は 3'-SL , Nov 1-2-2 は 6'-SL , Nov 1-2-3 は GalNAc(β 1-4)[Neu5Ac(α 2-3)]Gal(β 1-4)Glc , Nov 1-2-4 はLST cと 同定された .

(2) 泌乳中期および後期

泌乳中期および泌乳後期乳から得られた画分 Sep 1-2-1 から Sep 1-2-6 (Mar 1-2-1 から Mar 1-2-6) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトラムのシグナル 帰属を Table 7 に示した . 構造解析の結果 , Sep 1-2-1 (Mar 1-2-1) に 含まれるは 3'-SL , Sep 1-2-2 (Mar 1-2-2) は 6'-SL , Sep 1-2-3 (Mar 1-2-3) は GalNAc(β 1-4)[Neu5Ac(α 2-3)]Gal(β 1-4)Glc , Sep 1-2-4 (Mar 1-2-4) はLST cと 同定された .

Sep 1-2-5 (Mar 1-2-5) に含まれるオリゴ糖の構造解析は , 3.3 (b) (6) の構造解析結果⁷⁸⁾ に準じて行った . δ 5.219 , 4.667 , 4.454 , 4.398 , 4.438 , 4.725 および 4.698 は , それぞれ還元末端 α -及び β -Glc , 3 つの β (1-4)結合Gal残基および 2 つの β (1-3)結合GlcNAc残基由来のアノ マープロトンを示した . 2 つの β (1-3)結合GlcNAc残基による置換を 受けた還元末端側の 2 つの β (1-4)結合Gal残基のH-4 シグナルは , δ 4.158 に 2 つのプロトン数を表すシグナル強度を示した . また , α (2-6)結合性のNeu5Ac残基のH-3ax , H-3eqおよびNAcシグナルが , δ 1.724 , 2.668 および 2.027 に帰属され , 2 つの β (1-3)結合GlcNAc残基 のNAcシグナルが δ 2.053 および 2.030 に帰属された . 以上の解析結 果から , 本オリゴ糖はシアリルパラ-LNnHと 同定された .

Sep 1-2-6 (Mar 1-2-6) に含まれるオリゴ糖の構造解析は , 文献値⁷⁰⁾ との比較により行った . δ 5.220 , 4.667 , 4.472 , 4.455 , 4.433 , 4.726 および 4.640 は , それぞれ還元末端 α -及び β -Glc , 3 つの β (1-4)結合

Gal残基， $\beta(1-3)$ 結合GlcNAc残基および $\beta(1-6)$ 結合GlcNAc残基由来のアノマープロトンを示した．シアリルパラ-LNnHとは異なり，1つの $\beta(1-3)$ 結合GlcNAc残基による置換を受けた還元末端側の $\beta(1-4)$ 結合Gal残基のH-4シグナルは， δ 4.155に1つのプロトン数を表すシグナル強度を示した．また， $\alpha(2-6)$ 結合性のNeu5Ac残基のH-3ax，H-3eqおよびNAcシグナルが， δ 1.724，2.668および2.027に帰属され， $\beta(1-3)$ 結合GlcNAc残基および $\beta(1-6)$ 結合GlcNAc残基のNAcシグナルが δ 2.053および2.061に帰属された．以上の解析結果から，本オリゴ糖はシアリルLNnHと同定された．

(b) 中性オリゴ糖

(1) 泌乳中期

泌乳中期乳から得られた画分Mar 2-3およびMar 3-3の¹H-NMRスペクトラムのシグナル帰属をTable 8に示した．構造解析の結果，糖標準品のスペクトラムと一致したことから，Mar 2-3に含まれるオリゴ糖はLNnT，Mar 3-3はイソグロボトリオースと同定された．

(2) 泌乳後期

泌乳後期乳から得られた画分Sep 2-3の¹H-NMRスペクトラムのシグナル帰属をTable 8に示した．本オリゴ糖の構造解析は，糖標準品のスペクトラムと文献値⁶⁶⁾との比較により行った．

δ 5.227，4.630，4.584，5.177および5.351は，それぞれ還元末端 α -及び β -Glc， $\beta(1-4)$ 結合Gal残基， $\alpha(1-3)$ 結合GlcNAc残基および $\alpha(1-2)$ 結合Fuc残基由来のアノマープロトンを示した． $\alpha(1-3)$ 結合GlcNAc残基のH-2の α -及び β -シグナルが δ 4.249および4.222に，

H-5 シグナルが δ 4.222 に , そして NAc シグナルが δ 2.041 にそれぞれ帰属された . また , $\alpha(1-2)$ 結合 Fuc 残基由来の H-5 および H-6 シグナルが δ 4.325 および 1.245 に帰属された . 以上の構造解析の結果 , 本オリゴ糖は A 四糖と同定された .

2.4. 考察

長らく、海洋哺乳類である鯨類の乳中糖質には、ラクトース以外の遊離オリゴ糖の存在は発見されていなかったが⁸⁵⁻⁹⁹⁾、最近の研究^{75, 76, 104)}と本研究によりラクトース以外のミルクオリゴ糖の存在が明確となった。

シロイルカの泌乳中期(15 g/L)・後期(12 g/L)やシャチ(8.9 g/L)およびマダライルカ乳(12 g/L)に比べ、バンドウイルカ初乳(28 g/L)およびシロイルカの泌乳初期乳(28 g/L)では、糖質含量が高かった。一方シロイルカ乳では、シアル酸含量は泌乳初期乳で5.9 g/L、泌乳中期乳で6.2 g/L、泌乳後期乳で6.8 g/Lであり、ほぼ一定の値を示した。このことから、イルカ乳仔は泌乳開始直後でのエネルギー源としてのラクトース要求量が高い一方で、泌乳期に渡って一定量のシアル酸の供給を受けていることが示唆された。この傾向は、ウシ乳で報告されているものとは異なっていた¹⁰⁵⁾。誕生した直後に水中を自由に泳ぐ必要のあるイルカ類は、タンパク質や脂質と共に糖質が重要なエネルギー源の一つとしていることが示唆された。

本研究により、ラクトース以外の乳中糖質として、バンドウイルカ乳からは3'-SL、6'-SL、モノシアリル化四糖(GalNAc(β1-4)

[Neu5Ac(α2-3)]Gal(β1-4)Glc)およびグロボトリオースが同定され¹⁰⁴⁾、シャチおよびマダライルカ乳からは6'-SL、モノシアリル化四糖および3'-SLがそれぞれ同定された。シロイルカ乳では泌乳期によりオリゴ糖組成が異なり(Table 9)、酸性オリゴ糖として、泌乳初期乳では3'-SL、6'-SL、モノシアリル化四糖およびLSTcが、泌乳中期乳と泌乳後期乳では初期乳と同様の4種に加えて、シアリルパラ-LNnHとシアリルLNnHがそれぞれ同定された。また、中性オリ

ゴ糖として、泌乳中期からLNnTとイソグロボトリオースが、泌乳後期からA四糖が同定された。イルカ類 4 種におけるミルクオリゴ糖組成は、中性オリゴ糖よりも酸性オリゴ糖の方が種類・量ともに多いことが明らかになった (Fig. 2, 8, 11, 14 および Table 10)。Table 10 に示した通り、バンドウイルカ、マダライルカおよびシロイルカでは 3'-SLが、バンドウイルカ、シャチおよびシロイルカでは 6'-SLとモノシアリル化四糖が共通のオリゴ糖として存在したが、その違いは個体差や泌乳期の違いに拠る可能性はある。事実、定量試験は行ってはいないが、シロイルカ乳では泌乳初期乳と泌乳中期・後期乳におけるオリゴ糖組成の変化が示された (Fig. 16, Table 9)。泌乳期の進行による優勢なミルクオリゴ糖の変化はシロクマ乳でも報告されており⁶⁷⁾、乳腺上皮細胞内の糖転移酵素の作用もしくは発現が泌乳期により異なっている可能性が示唆されるが、より詳細な情報を得るにはさらなるデータの蓄積が必要である。酸性オリゴ糖が優勢である結果は、同じクジラ目に属するヒゲクジラ亜目のミンククジラ、ニタリクジラおよびイワシクジラと類似していた^{75, 76)} (Table 10)。しかし、ミンククジラ乳には 3'-SL, 6'-SLは分離されない一方、他の鯨種では確認されていない中性オリゴ糖 3 種 (2'-FL, LNnT およびパラLNnH) が報告されている⁷⁵⁾。

シトクローム*b*およびベイズ定理による遺伝子多型解析に基づくクジラ目の最新の分類¹⁰⁶⁾に拠ると、本研究で対象としたイルカ類において、バンドウイルカとマダライルカはより近縁であり、次いでシャチ、シロイルカの順で位置することが明らかになっている。本研究で示されたそれぞれのミルクオリゴ糖組成において、マイルカ科 3 種ではよりシンプルな組成を示した。これに対し、イッカク科

のシロイルカでは特に酸性オリゴ糖において比較的複雑な組成であり、ヒゲクジラ亜目のミンククジラの組成と類似点が多かった (Table 10)。本研究結果とUrashimaらの報告^{75, 76)}から、ハクジラ亜目とヒゲクジラ亜目で形成されるクジラ目のミルクオリゴ糖組成は、モノシアリル化四糖の有無が決定的な違いであるが、分類学上近縁の有蹄目や食肉目と比べて比較的シンプルであり、重合度の高い高級ミルクオリゴ糖やフコース含有オリゴ糖の割合が非常に低いことが特徴として見出された。このことから、クジラ目では、陸上から水中へ生活の場を大きく変更させた進化の過程において、何らかの理由でよりシンプルなオリゴ糖組成に収束したことが推察された。

本研究で分析したイルカ乳には共通してモノシアリル化四糖が含まれていた。本構造をもつミルクオリゴ糖はバンドウイルカ乳から本研究で初めて分離され、その構造からガングリオ系糖脂質GM₂の糖鎖と類似していた。また、この糖鎖構造は、血液型決定基でありβ1,4-GalNAc残基を免疫原糖とするSd^a抗原として知られる^{107, 108)}。この糖鎖抗原の合成には、β1,4-GalNAc転移酵素 (Sd^a-βGalNAc-転移酵素) が関わっていると言われている。このSd^a抗原は、ヒト、モルモット、ラット、マウスおよびブタでは大腸や腎臓の遠位尿管といったごく一部の組織に非常に高いレベルで発現している¹⁰⁹⁻¹¹²⁾。このことから、本オリゴ糖がGM₂やSd^a抗原をレセプターとする病原菌や毒素などの接着阻害因子としての機能を有している可能性がある。また近年、イルカ類の消化管から大腸菌群の*Escherichia coli*¹¹³⁾、B型レンサ球菌の*Streptococcus agalactiae* が検出され^{114, 115)}、また新規*Helicobacter*属^{116, 117)}が発見されて、それに伴う病症・炎症が見出されており、それらの感染の初期段階にはシ

アリル化糖鎖との接着が関わっていることが知られている。特に、イルカ類の授乳は海中で行われ、乳仔が海洋中に無数に存在する微生物に暴露される機会は極めて高いと考えられるので、3'-SLやモノシアリル化四糖を含む酸性オリゴ糖などのイルカ類乳中のミルクオリゴ糖は、乳仔消化管において接着阻害による感染防御因子の一つとして機能することが示唆された。

イソグロボトリオースはシロイルカの泌乳中期乳から同定された他、ウシ⁵³⁾、ヒツジ⁵⁷⁾、ヤギ⁵⁹⁾、クマ類⁶³⁻⁶⁷⁾、ジャイアントパンダ⁶⁸⁾およびハナグマ⁶⁹⁾の乳から見ついている。一方で、この中性三糖の異性体グロボトリオースはバンドウイルカ乳から同定されたが、モノシアリル化四糖と同様に他の哺乳類乳中からは見つからない。ミルクオリゴ糖は、その構造からラクトおよびネオラクト系糖脂質糖鎖との類似性が高いとされるが、グロボ系の類似構造をもつオリゴ糖の発見は特徴的である。

以上のことから、同亜目・同科に属する種のミルクオリゴ糖組成には、相違点が多く見出された。他の動物種と同様に、ハクジラ亜目のミルクオリゴ糖を特徴づけるためには、さらなるデータの蓄積が必要であると考えられた。

Table 1. Milk samples collected by four Odontoceti, bottlenosedolphin, killer whale, spotted dolphin and white whale

Species	Lactation Period	Collection Date	Days After Secretion Verified ^a	Total Volume (mL)	Content Of Hexose ^b (g/L)	Content Of Sialic acid ^b (g/L)
Bottlenose dolphin	colostrum	Jun 1999	2-3	15	28	3.0
Killer whale	mature	Jan and Mar 2001	65-119	51	8.9	-
Spotted dolphin	unknown	Mar 1989	-	15	12	-
White whale	early	16, 22, 28 Nov 2004	5-11	36.5	28	5.9
	middle	5, 10, 16, 22, 28 Mar 2005	111-134	35.0	15	6.2
	late	2, 8, 13, 19, 25 Sep 2005	290-312	36.0	12	6.8

^a The days were counted up from 11 November 2004 when the secretion was verified on.

^b The concentrations of hexose were calculated by averaging them of each days.

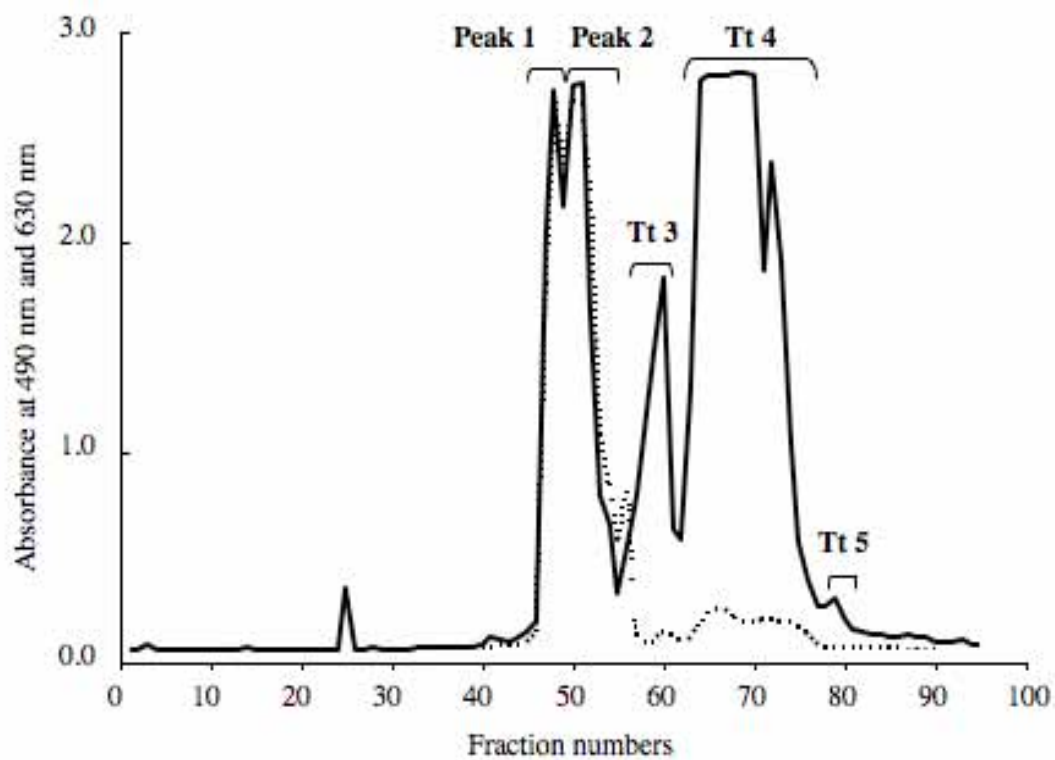


Fig. 2. Gel chromatogram of the carbohydrate fraction from bottlenose dolphin colostrum on a Bio Gel P-2 column ($\phi 2.6 \times 100$ cm). Each fraction was monitored by the phenol- H_2SO_4 method (—) and the periodate-resorcinol method (····).

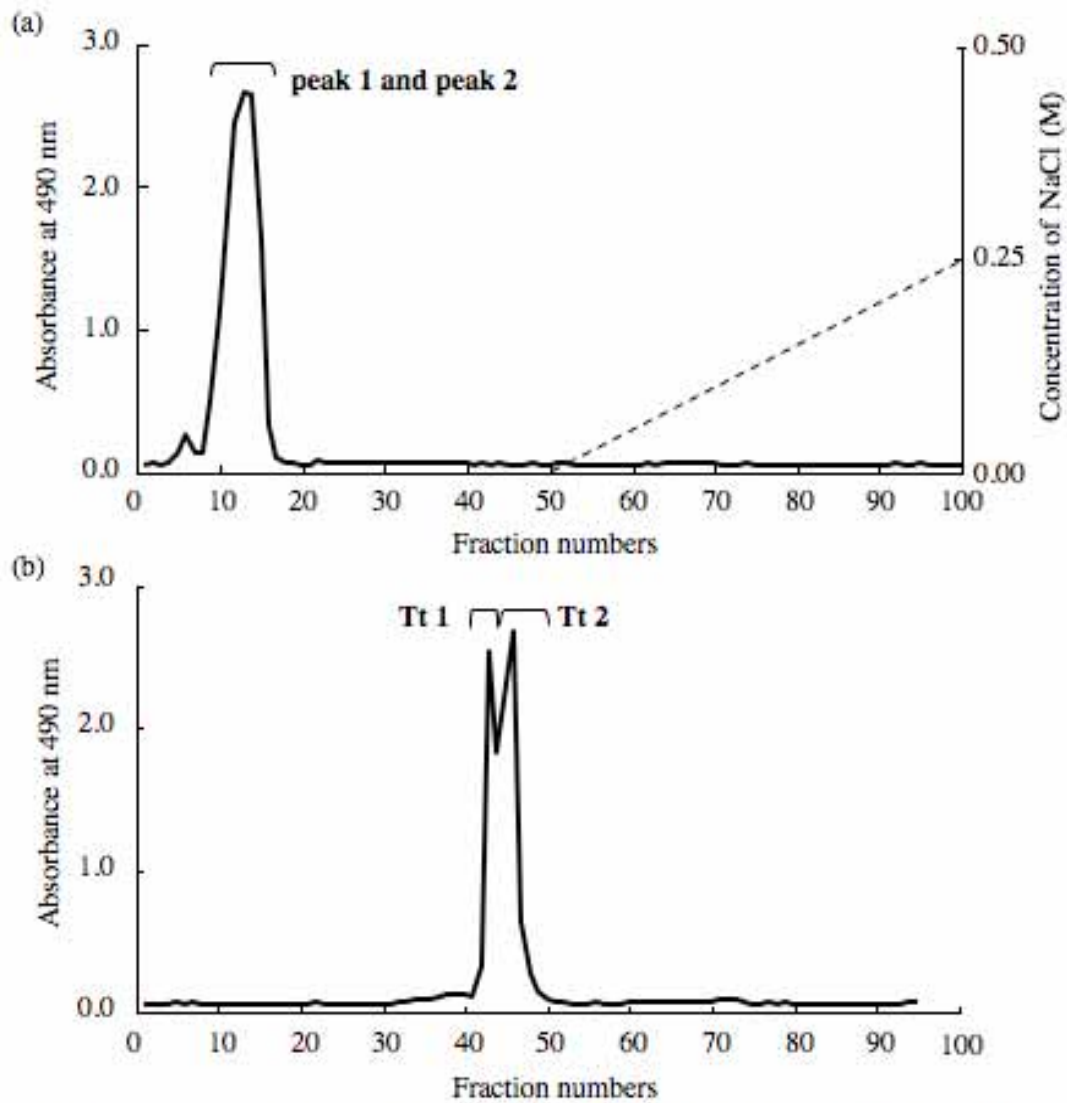


Fig. 3 (a) Anion exchange chromatogram of peak 1 and peak 2 separated from the bottlenose dolphin colostrum by gel chromatography on Bio Gel P-2 (Fig. 2), The fractions were monitored by the phenol- H_2SO_4 method (—). (b) Gel chromatogram on Bio Gel P-2 of the peak fractions from chromatogram (a).

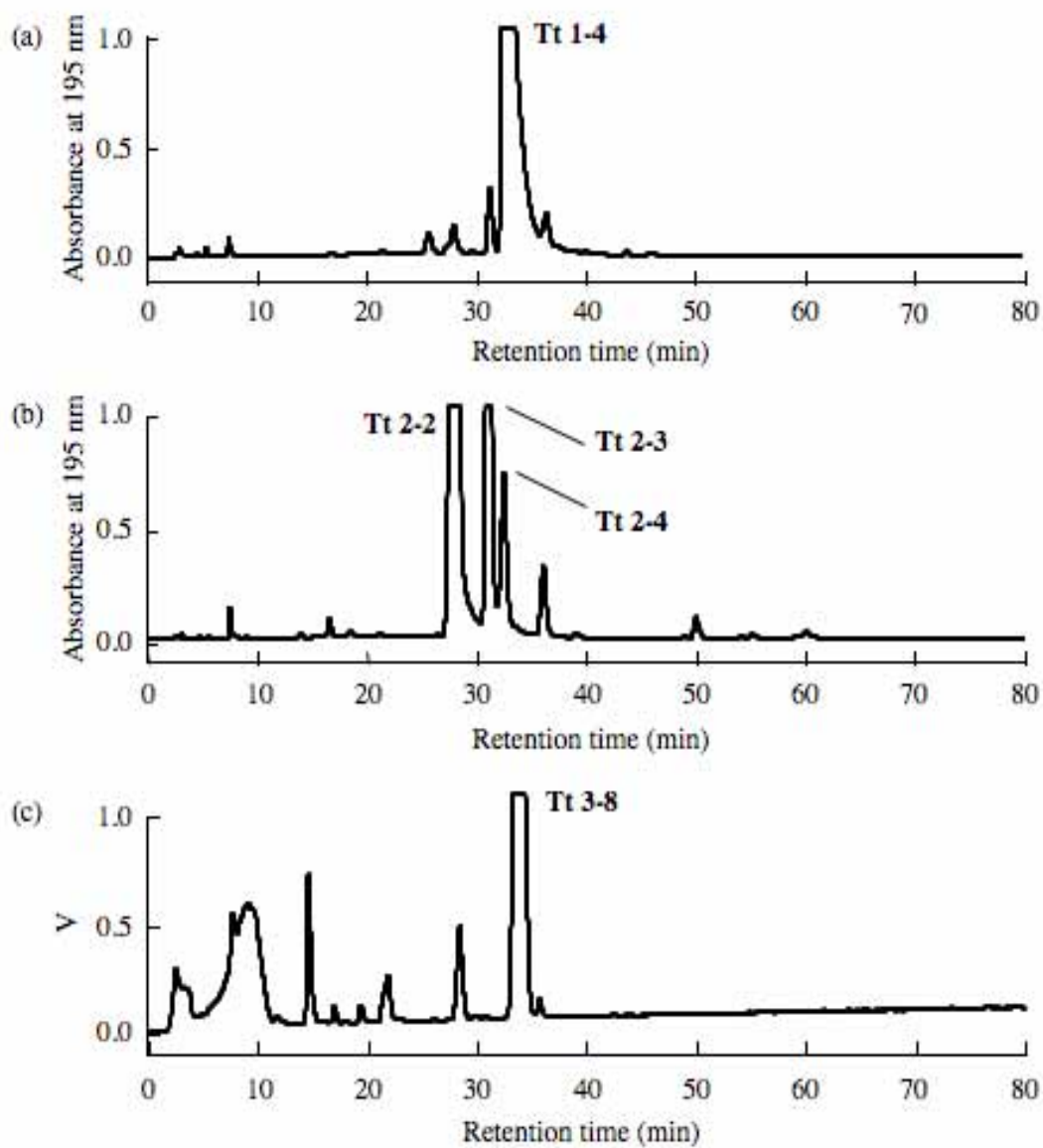


Fig. 4 HPLC of the acidic oligosaccharide fractions Tt 1 (a) and Tt 2 (b), and the neutral oligosaccharide fraction Tt 3 (c) separated from bottlenose dolphin colostrum.

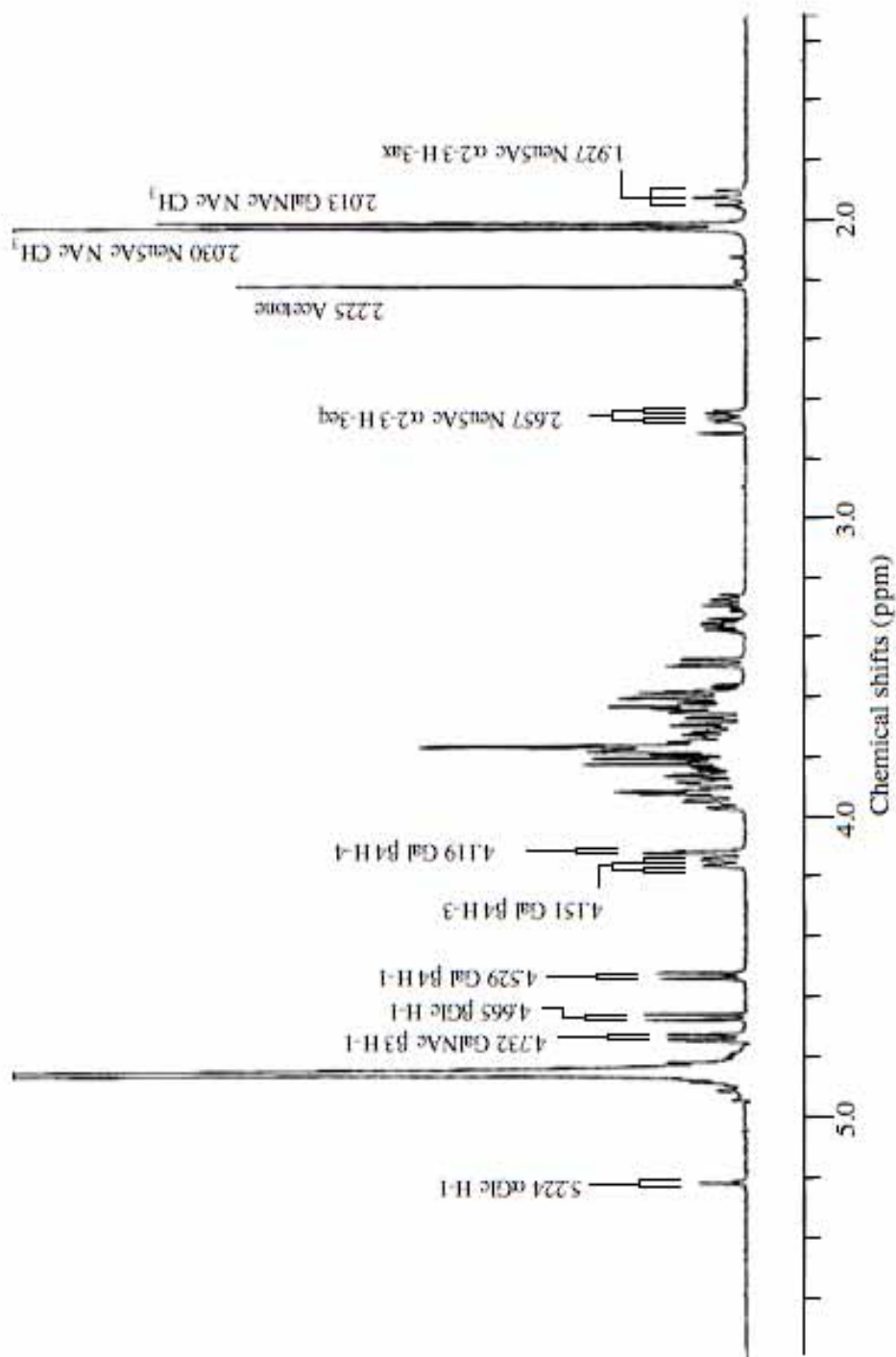


Fig. 5. 500 MHz ¹H-NMR spectrum of Tt 1-4 isolated from bottlenose dolphin colostrum

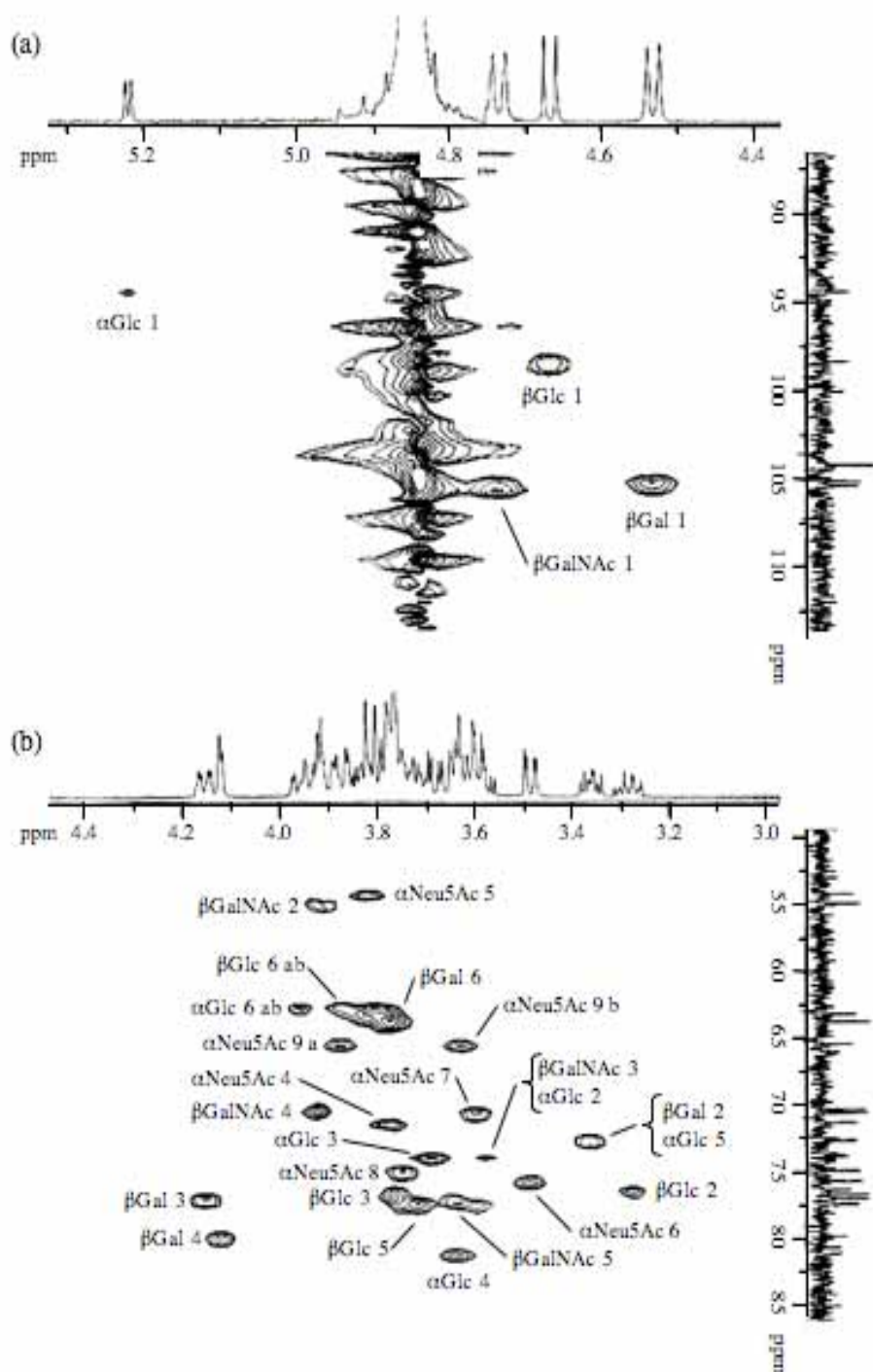


Fig. 6. ^1H - ^{13}C HSQC correlation spectrum of Tt 1-4. The appropriate part of the 1D ^1H -NMR spectrum, with proton assignments, is shown at the top of each plot. Correlated carbons are indicated next to the relevant contours. The spectra are shown (a) part of the anomeric proton spectrum and (b) part of the middle magnetic field of 1D ^1H -NMR spectrum.

Table 2. ¹H-NMR chemical shifts of the neutral and sialyl oligosaccharides separated from bottlenose dolphin colostrum

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)						
		Tt 1-4	Tt 2-2	Tt 2-3	Tt 2-4	Tt 3-8		
H-1	Glc α	5.219 (3.4)	5.220 (3.4)	5.224 (3.4)	5.220 (2.9)	5.224 (4.0)		
	Glc β	4.665 (8.0)	4.662 (8.0)	4.669 (8.0)	4.666 (8.0)	4.664 (8.0)		
	Gal(β 1-4)	4.529 (8.0)	4.531 (8.0)	4.427 (8.0)	4.530 (6.3)	4.511 (8.0)		
	GalNAc(β 1-4)	4.732 (8.6)	-	-	4.734 (8.6)	-		
H-3	Gal(α 1-4)	-	-	-	-	4.945 (4.0)		
	Gal(β 1-4)	4.151 (2.9 ^a)	4.115 (2.9 ^a)	-	4.156 (2.6 ^a)	-		
H-3ax	Neu5Ac(α 2-3)	1.927 (12.0 ^b , -12.0 ^b)	1.800 (12.0 ^b , -12.0 ^b)	-	1.927 (12.0 ^b , -12.6 ^c)	-		
	Neu5Ac(α 2-6)	-	-	1.745 (12.0-12.6)	-	-		
H-3eq	Neu5Ac(α 2-3)	2.657 (4.6 ^d)	2.757 (4.9 ^d)	-	2.659 (5.4 ^d)	-		
	Neu5Ac(α 2-6)	-	-	2.711 (5.1)	-	-		
H-4	Gal(β 1-4)	4.119 (2.9 ^e)	-	-	4.119 (2.9 ^e)	-		
	Gal(α 1-4)	-	-	-	-	4.363		
NAc	GalNAc(β 1-4)	2.013	-	-	2.013	-		
	Neu5Ac(α 2-3)	2.030	2.029	-	2.030	-		
	Neu5Ac(α 2-6)	-	-	2.028	-	-		

^a $J_{H-3, H-4}$; ^b $J_{H-3 \text{ ax}, H-4}$; ^c $J_{H-3 \text{ eq}, H-4}$; ^d $J_{H-3 \text{ eq}, H-4}$; ^e $J_{H-4, H-3}$

Table 3. ¹³C-NMR chemical shifts of Tt1-4 (A) from bottlenose dolphin colostrum and 3'-SL (B)

Reporter group	Chemical shifts (ppm)											
	α-Glc		β-Glc		β-Gal		Neu5Ac		GalNAc		GalNAc	
	A	B ^a	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
C-1	94.44	94.52	98.39	98.47	105.20	105.29	176.76	176.30	105.41	98.08		
C-2	73.73	73.83	76.37	76.49	72.67	72.07	100.11	102.31	54.97	56.32		
C-3	73.86	74.09	76.99	77.03	76.65	78.15	39.58	42.23	73.66	73.80		
C-4	81.08	80.94	80.70	80.79	79.82	70.17	71.34	70.96	70.40	70.51		
C-5	72.70	72.78	77.41	77.50	76.65	77.84	54.23	54.35	77.36	77.86		
C-6	63.22	62.59	63.22	62.73	63.81	63.72	75.70	75.60	63.22	63.67		
C-7							70.62	70.77				
C-8							74.93	74.35				
C-9							65.47	65.30				
CH ₃							24.69	24.71	25.24	24.88		
CO							177.65	177.68	177.49	177.65		

^a Data from reference 104.

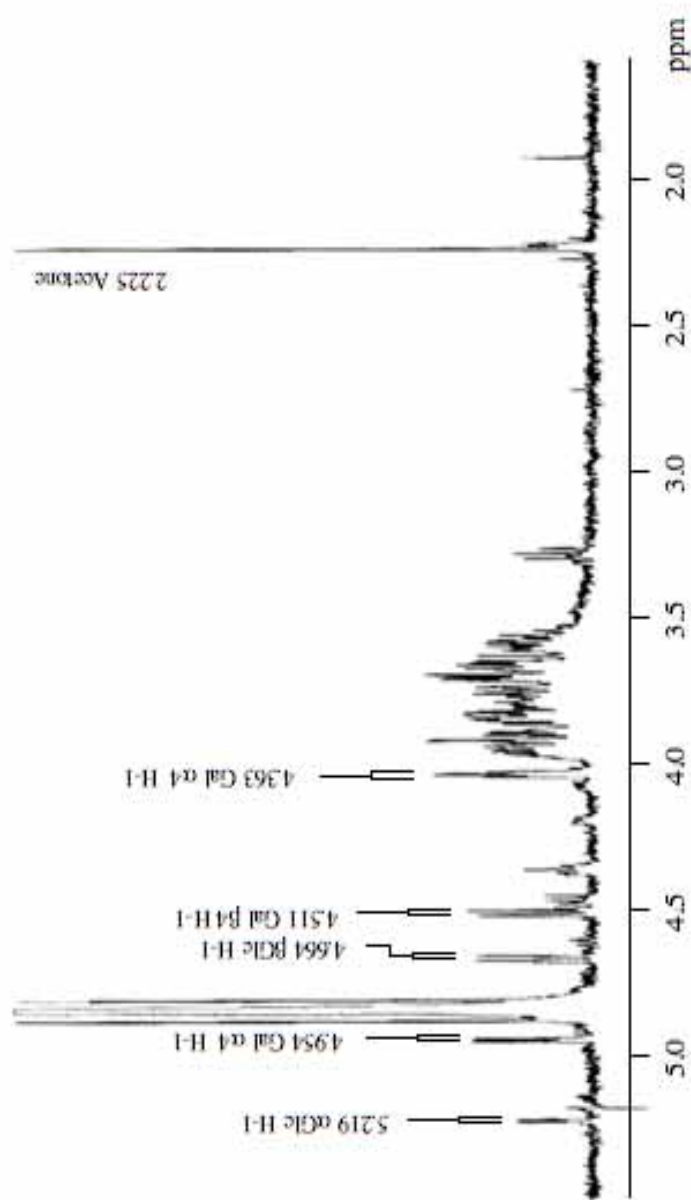


Fig. 7. 500 MHz ¹H-NMR spectrum of T1 3-8 isolated from bottlenose dolphin colostrum.

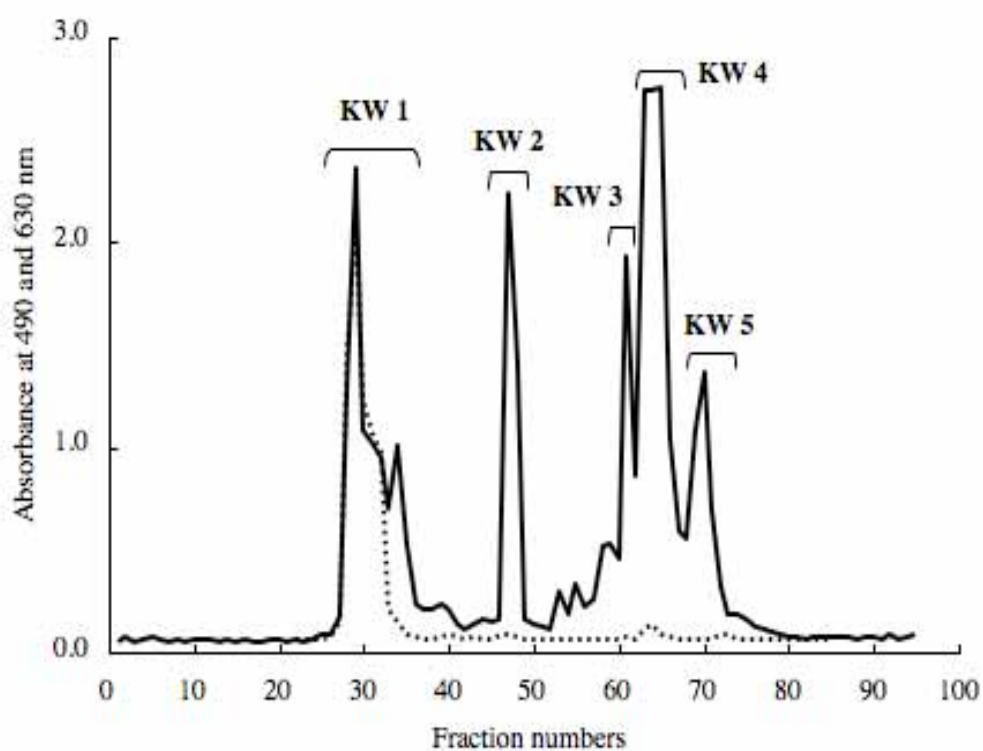


Fig. 8. Gel chromatogram of the carbohydrate fraction from killer whale milk on a Bio Gel P-2 column (ϕ 2.6x100 cm). Each fraction was monitored by the phenol-H₂SO₄ method (—) and the periodate-resorcinol method (····).

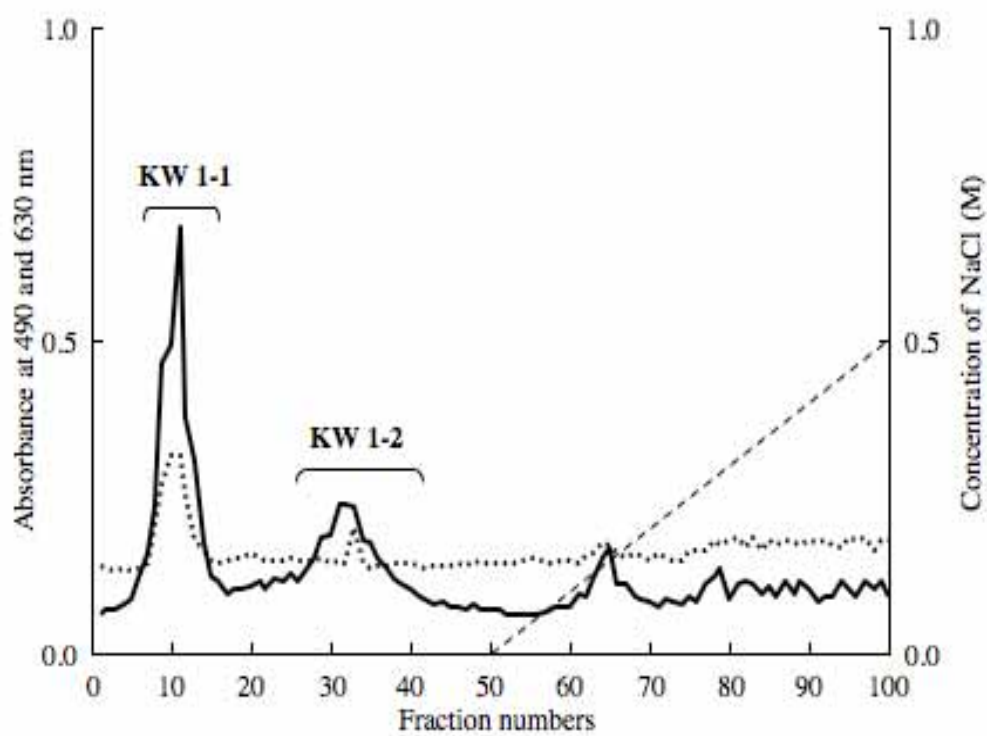


Fig. 9. Anion exchange chromatogram of KW 1 separated from killer whale milk by gel chromatography on Bio Gel P-2 (Fig. 8). The fractions were monitored by the phenol-H₂SO₄ method (—) and the periodate-resorcinol method (····).

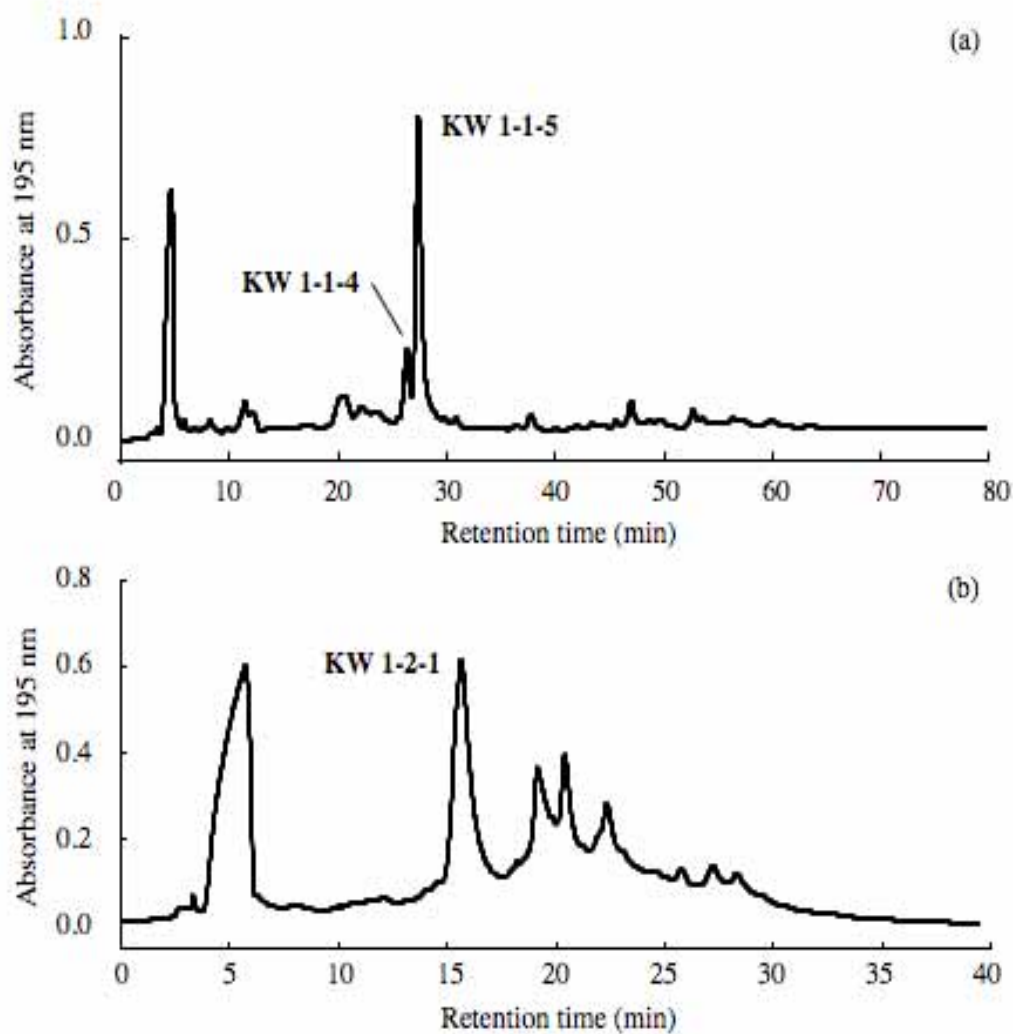


Fig. 10. HPLC of KW 1-1 (a) and KW 1-2 (b) separated from killer whale milk.

Table 4. ¹H-NMR chemical shifts of oligosaccharide and lactose in KW 1-1-4, KW 1-1-5 and KW 6 separated from killer whale milk

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)		
		KW 1-1-4	KW 1-1-4	KW 6
H-1	Glc α	5.224	5.218 (4.0)	5.223 (4.0)
	Glc β	4.667	4.665 (8.0)	4.665 (8.0)
	Gal β 4	4.427	4.530 (8.0)	4.451 (8.0)
H-3	GalNAc β 4	-	4.736 (7.4)	-
	Gal β 4	-	4.152 (2.3 ^a)	-
H-3ax	Neu5Ac α 2-3	-	1.928 (12.0 ^b , -12.0 ^c)	-
	Neu5Ac α 2-6	1.744	-	-
H-3eq	Neu5Ac α 2-3	-	2.661 (4.6 ^d)	-
	Neu5Ac α 2-6	2.723	-	-
H-4	Gal β 4	-	4.119 (2.9 ^e)	-
	GalNAc β 4	-	2.013	-
NAc	Neu5Ac α 2-3	-	2.031	-
	Neu5Ac α 2-6	2.029	-	-

^a $J_{H-3, H-4}$; ^b $J_{H-3 \text{ ax}, H-4}$; ^c $J_{H-3 \text{ eq}, H-4}$; ^d $J_{H-3 \text{ eq}, H-4}$; ^e $J_{H-4, H-3}$

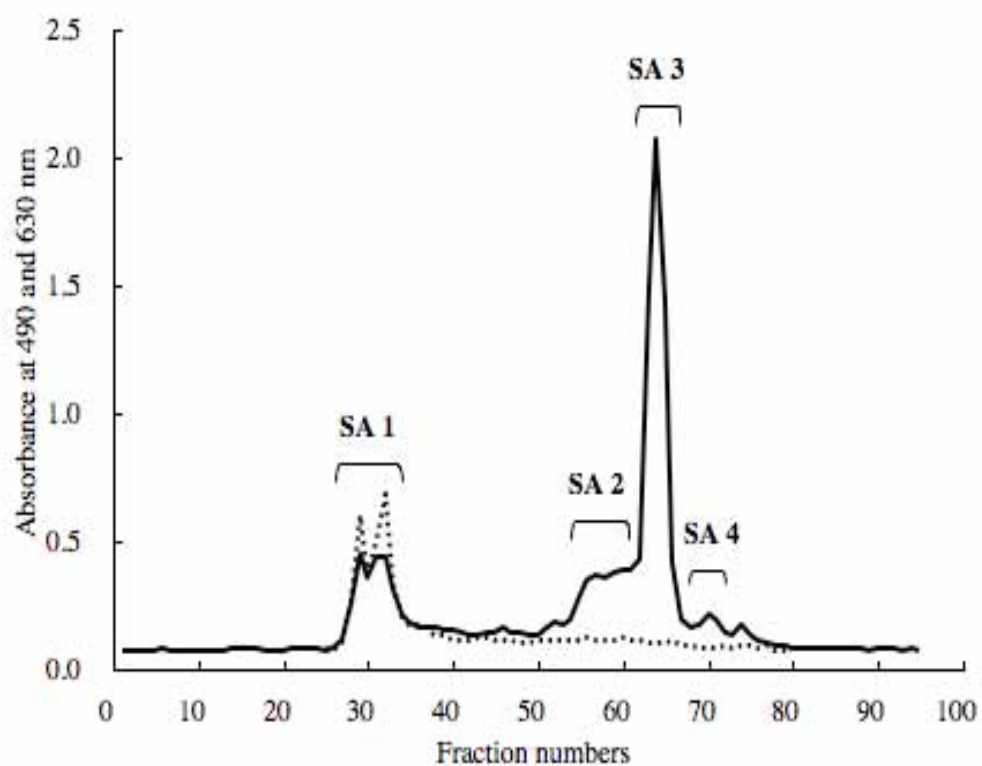


Fig. 11. Gel chromatogram of the carbohydrate fraction from spotted dolphin milk on a Bio Gel P-2 column (ϕ 2.6x100 cm). Each fraction was monitored by the phenol-H₂SO₄ method (—) and the periodate-resorcinol method (····).

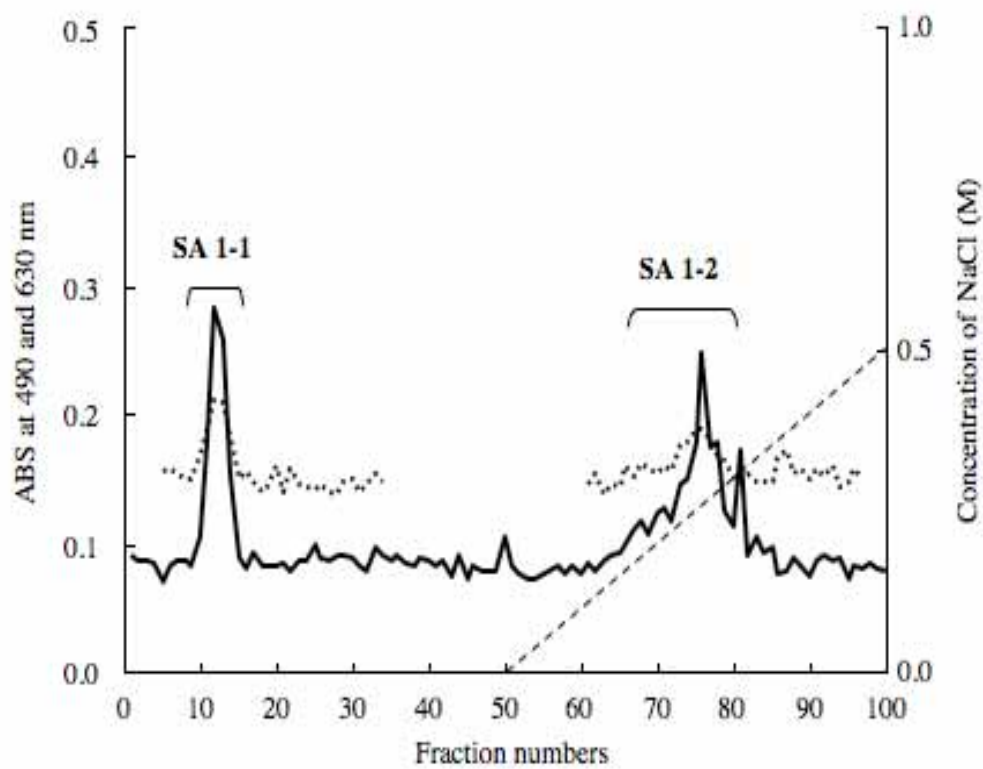


Fig. 12 Anion exchange chromatogram of SD 1 separated from spotted dolphin milk. Each fraction was monitored by the phenol-H₂SO₄ method (····) and the periodate-resorcinol method (—).

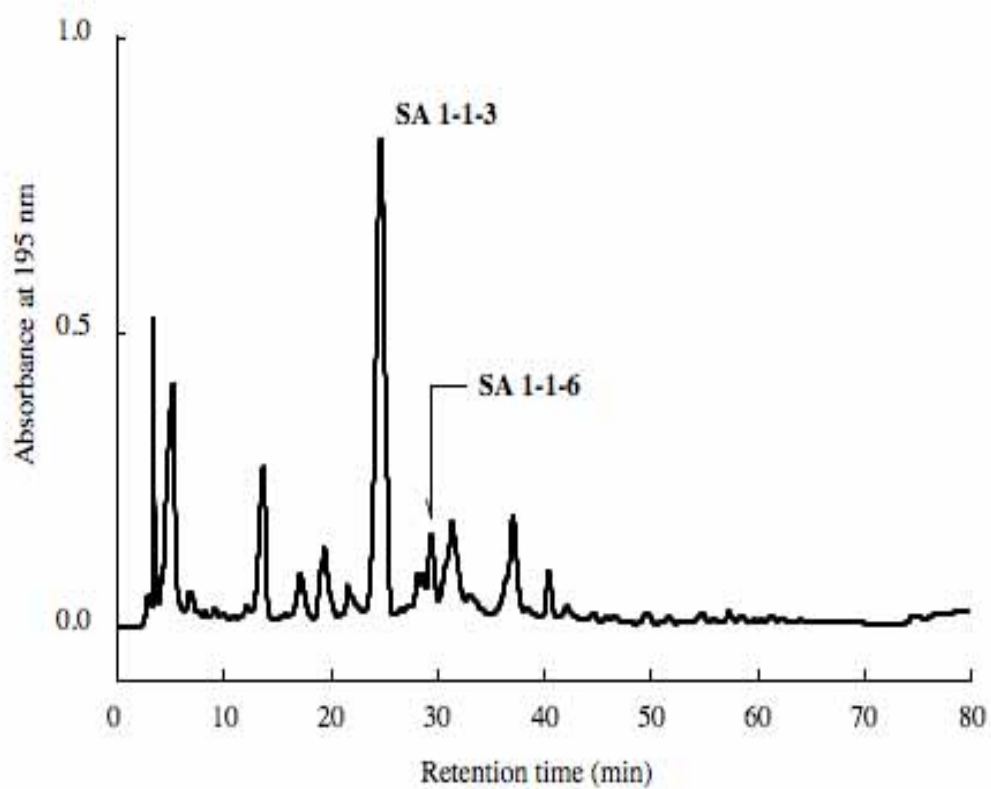


Fig. 13 HPLC of SA 1-1 separated from spotted dolphin milk.

Table 5. ¹H-NMR chemical shifts of oligosaccharides and lactose in SA 1-1-3 and SA 1-1-6, and SA 3 separated from spotted dolphin milk

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)		
		SA 1-1-3	SA 1-1-6	SA 3
H-1	Glc α	5.221 (3.7)	5.218 (4.0)	5.223 (4.0)
	Glc β	4.663 (8.0)	4.665 (8.0)	4.665 (8.0)
	Gal β 4	4.531 (7.4)	4.530 (8.0)	4.451 (8.0)
	GalNAc β 4	-	4.736 (7.4)	-
H-3	Gal β 4	4.114 (3.2 ^a)	4.152 (2.3 ^a)	-
H-3ax	Neu5Ac α 2-3	1.800 (12.0 ^b , -12.0 ^b)	1.928 (12.0 ^b , -12.0 ^b)	-
H-3eq	Neu5Ac α 2-3	2.756 (4.6 ^b)	2.661 (4.6 ^b)	-
H-4	Gal β 4	-	4.119 (2.9 ^c)	-
NAc	GalNAc β 4	-	2.013	-
	Neu5Ac α 2-3	2.029	2.031	-

^a $J_{H-3,H-4}$; ^b $J_{H-3,ax,H-4}$; ^c $J_{H-3,eq,H-4}$; ^d $J_{H-3,ax,H-4}$; ^e $J_{H-4,H-3}$

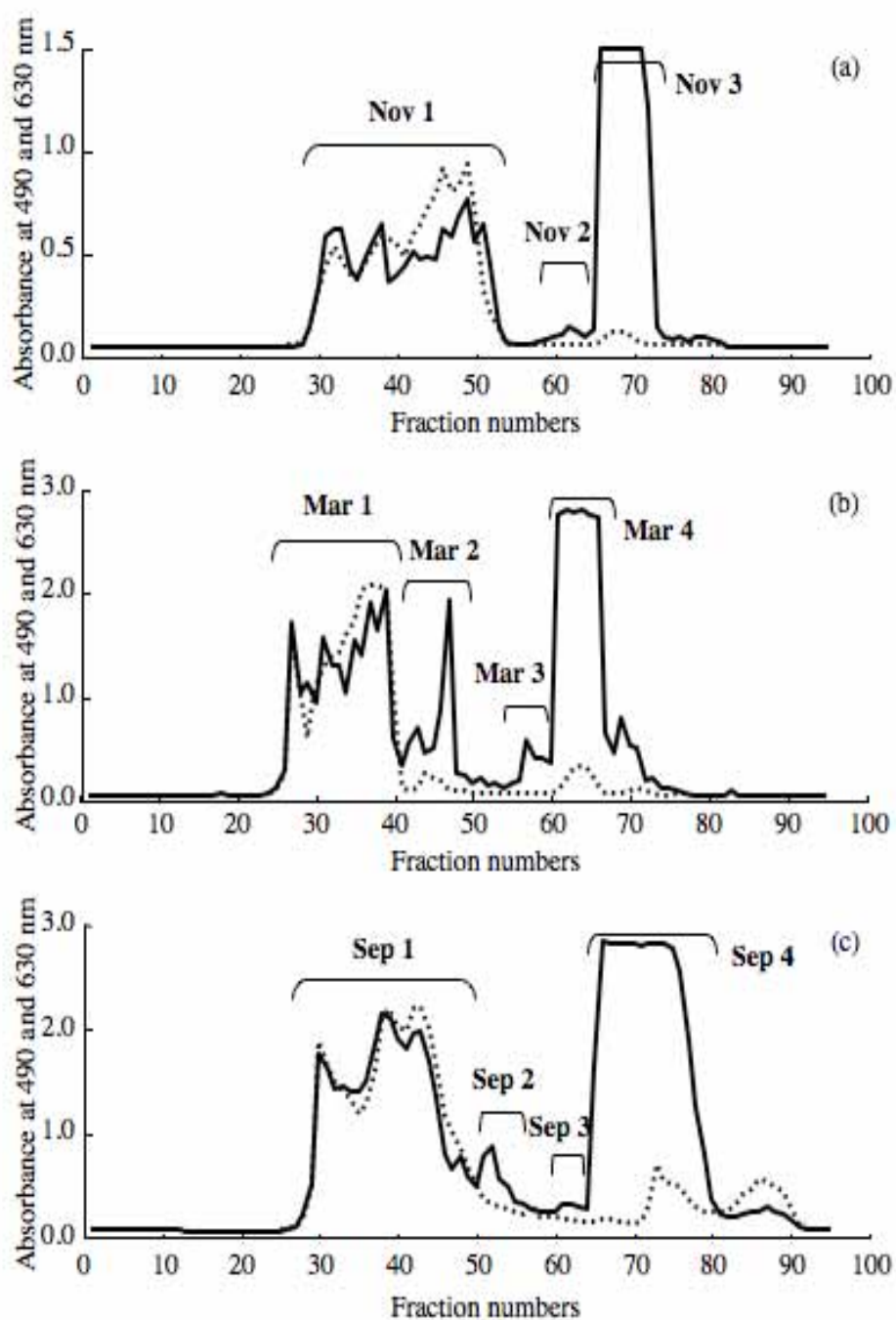


Fig. 14. Gel chromatogram of the carbohydrate fraction from white whale milk on a Bio Gel P-2 column ($\phi 2.6 \times 100$ cm). Each fraction was monitored by the phenol- H_2SO_4 method (—) and the periodate-resorcinol method (····). The carbohydrate fractions were separated from the milks at early (a), middle (b) and late (c) lactation stages.

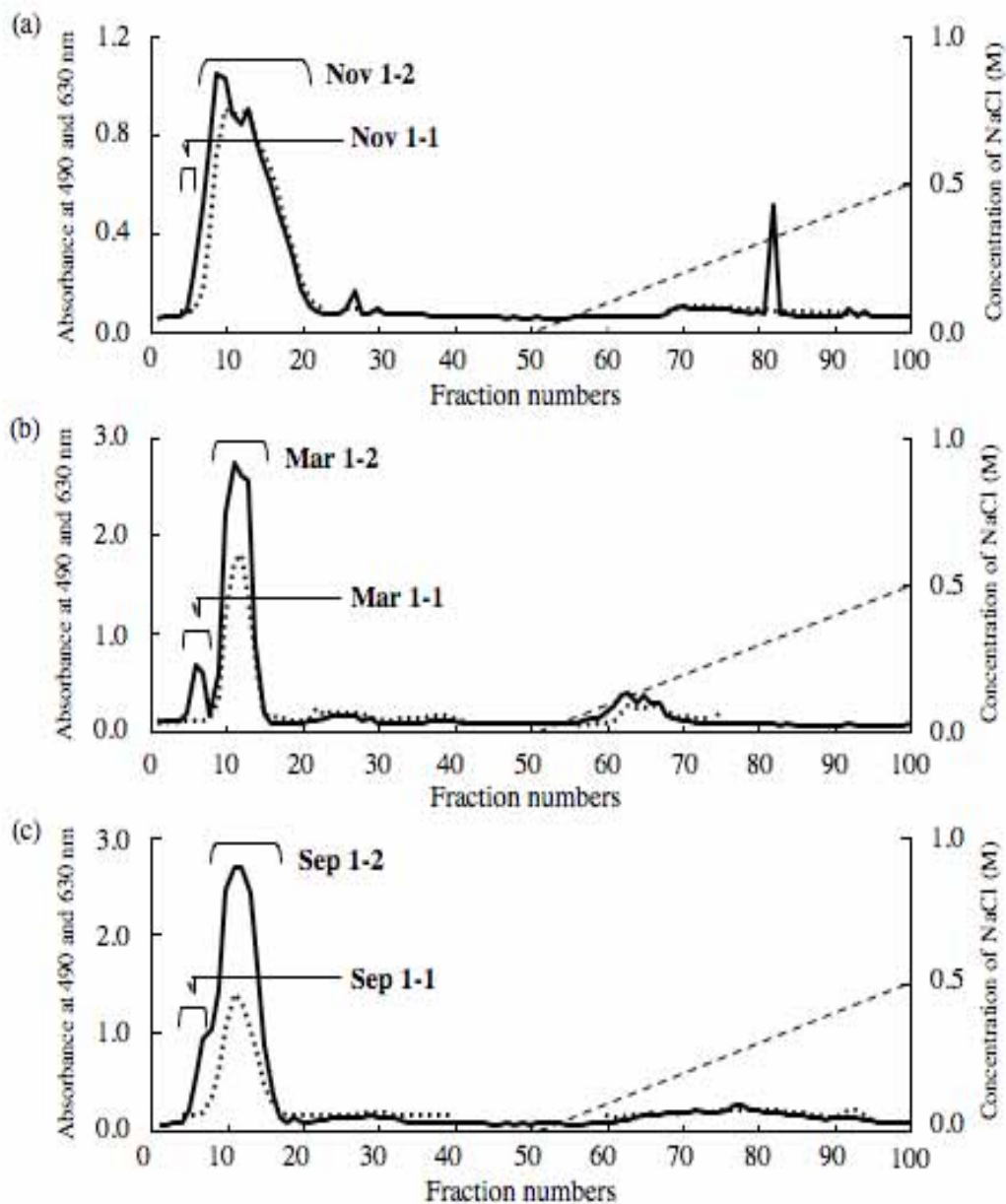


Fig. 15. Anion exchange chromatograms of Nov 1 (a), Mar 1 (b) and Sep 1 (c) separated from white whale milks by gel chromatography on Bio Gel P-2 (Fig. 14). Each fraction was monitored by the phenol-H₂SO₄ method (—) and the periodate-resorcinol method (.....).

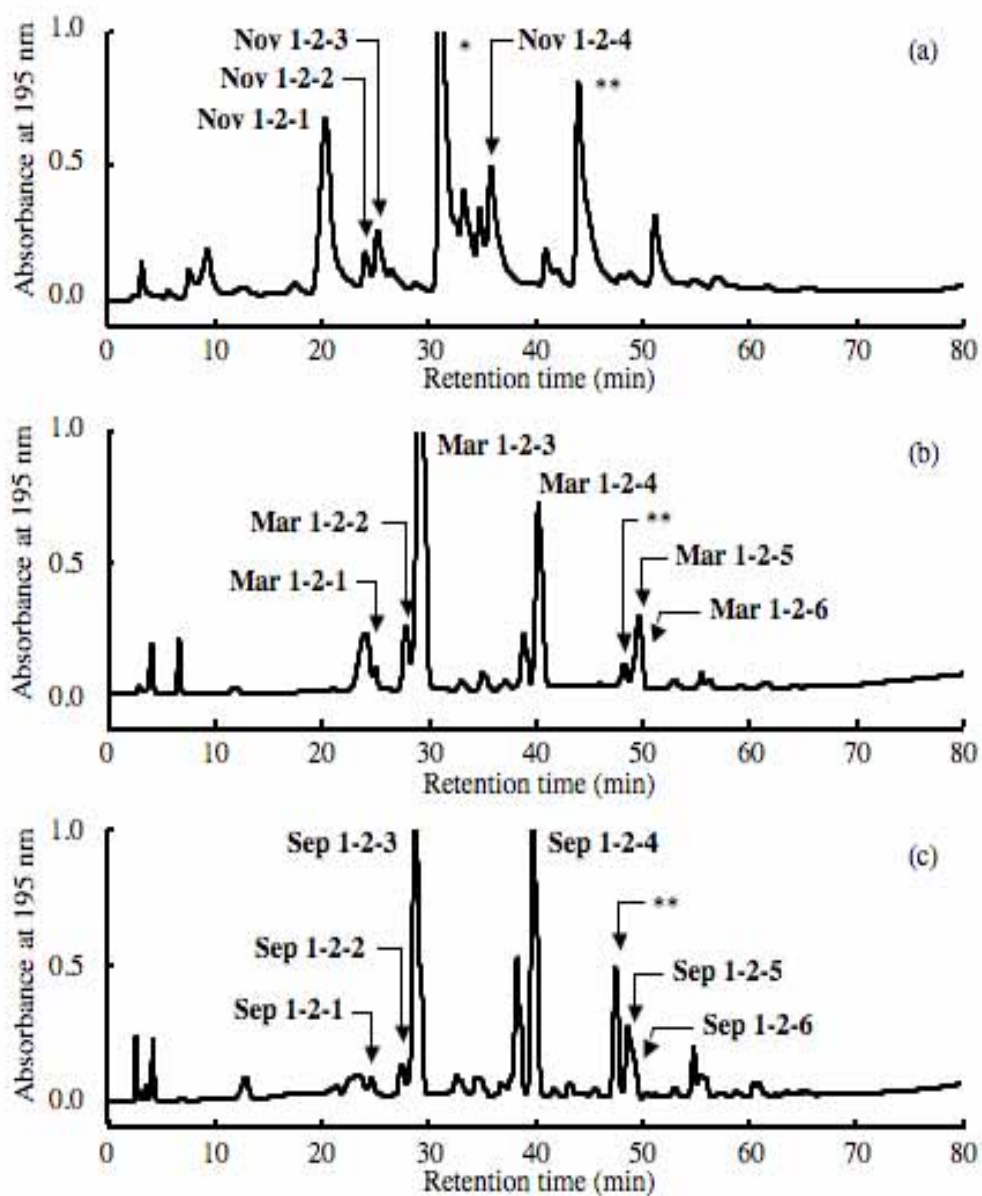


Fig. 16. HPLC of the acidic oligosaccharide fractions, Nov 1-2 (a), Mar 1-2 (b) and Sep 1-2 (c), separated from white whale milks.

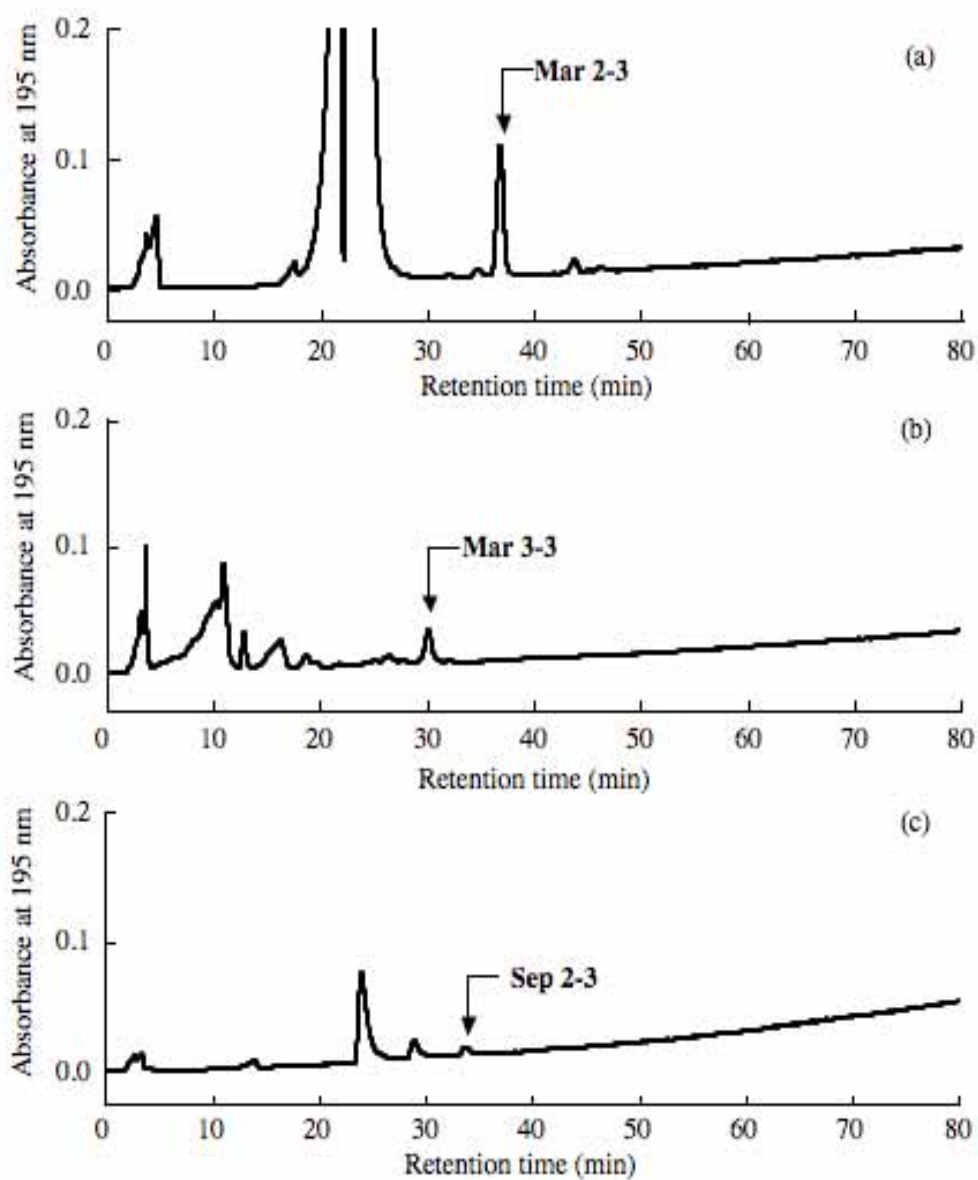


Fig. 17. HPLC of the neutral oligosaccharide fractions, Mar 2-3 (a), Mar 3-3 (b) and Sep 2-3 (c), separated from white whale milks.

Table 6. ¹H-NMR chemical shifts of lactose and oligosaccharides separated from white whale milk on the early lactation stage (November, 2004)

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)				
		Nov 1-2-1	Nov 1-2-2	Nov 1-2-3	Nov 1-2-4	Nov 3
H-1	Glc α	5.221 (4.0)	5.224 (3.5)	5.218 (3.4)	5.222 (3.8)	5.223 (4.0)
	Glc β	4.663 (8.0)	4.669 (7.9)	4.664 (8.0)	4.666 (7.9)	4.665 (8.0)
	Gal' (β 1-4)	4.529 (8.0)	4.427 (7.9)	4.529 (8.0)	4.443 (6.5)	4.451 (8.0)
	Gal'' (β 1-4)	-	-	-	4.455 (7.6)	-
H-3	GlcNAc(β 1-3)	-	-	-	4.728 (7.9)	-
	GalNAc(β 1-4)	-	-	4.734 (8.6)	-	-
	Gal' (β 1-4)	4.113 (3.2 ^a)	-	4.150 (2.3 ^a)	-	-
H-3ax	Neu5Ac(α 2-3)	1.800 (12.0 ^b , -12.0 ^c)	-	1.926 (12.6 ^b , -10.9 ^c)	-	-
	Neu5Ac(α 2-6)	-	1.745 (12.3, -12.3)	-	1.722 (12.3, -12.0)	-
H-3eq	Neu5Ac(α 2-3)	2.755 (4.6 ^d)	-	2.658 (5.2 ^d)	-	-
	Neu5Ac(α 2-6)	-	2.711 (4.8)	-	2.668 (4.8)	-
H-4	Gal' (β 1-4)	-	-	4.119	4.160 (2.9 ^e)	-
NAc	GlcNAc(β 1-3)	-	-	-	2.053	-
	GalNAc(β 1-4)	-	-	2.014	-	-
	Neu5Ac(α 2-3)	2.030	-	2.029	-	-
	Neu5Ac(α 2-6)	-	2.028	-	2.028	-

^a $J_{H-3, H-4}$; ^b $J_{H-3ax, H-4}$; ^c $J_{H-3eq, H-4}$; ^d $J_{H-3ax, H-4}$; ^e $J_{H-4, H-3}$

Table 7. ¹H-NMR chemical shifts of sialyl oligosaccharides separated from white whale milks on the middle and late lactation stages (March and September, 2005).

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)					
		Mar, Sep 1-2-2	Mar, Sep 1-2-3	Mar, Sep 1-2-4	Mar, Sep 1-2-5	Mar, Sep 1-2-6	
H-1	Glc α	5.223 (3.5)	5.217 (3.4)	5.220 (4.0)	5.219 (3.8)	5.220 (3.5)	
	Glc β	4.668 (7.9)	4.665 (8.6)	4.662 (8.0)	4.667 (7.9)	4.666 (7.9)	
	Gal ¹ (β 1-4)	4.427 (7.9)	4.529 (8.3)	4.441 (6.9)	4.438	4.433 (7.9)	
	Gal ² (β 1-4)	-	-	4.455 (7.4)	4.454 (8.5)	4.455 (8.2)	
H-3	Gal ³ (β 1-4)	-	-	-	-	4.472 (8.2)	
	GlcNAc ⁴ (β 1-3)	-	-	-	4.469	-	
	GlcNAc ⁵ (β 1-3)	-	-	4.728 (8.0)	4.689 (8.2)	4.726 (8.2)	
	GlcNAc ⁶ (β 1-3)	-	-	-	4.725 (7.6)	-	
	GlcNAc ⁷ (β 1-6)	-	-	-	-	4.640 (7.9)	
	GalNAc ⁸ (β 1-4)	-	4.735 (8.6)	-	-	-	
	Gal ⁹ (β 1-4)	-	4.149 (2.3 ^a)	-	-	-	
	Neu5Ac(α 2-3)	-	1.926 (12.0 ^b , -11.5 ^c)	-	-	-	
	Neu5Ac(α 2-6)	1.746 (12.3, -12.0)	-	1.724 (12.0, -12.6)	1.724 (12.0, -12.3)	1.724 (12.3, -12.3)	
	Neu5Ac(α 2-3)	-	2.659 (4.6 ^d)	-	-	-	
H-3eq	Neu5Ac(α 2-6)	2.712 (5.6)	-	2.669 (4.9)	2.668 (4.8)	2.668 (4.7)	
	Gal ¹⁰ (β 1-4)	-	4.117 (2.9 ^e)	4.159 (2.9 ^e)	4.158	4.155 (3.5 ^e)	
H-4	Gal ¹¹ (β 1-4)	-	-	-	4.158	-	
	GlcNAc ¹² (β 1-3)	-	-	2.053	2.030	2.052	
NAc	GlcNAc ¹³ (β 1-3)	-	-	-	2.053	-	
	GlcNAc ¹⁴ (β 1-3)	-	-	-	-	2.061	
	GlcNAc ¹⁵ (β 1-6)	-	-	-	-	-	
	GalNAc ¹⁶ (β 1-4)	-	2.014	-	-	-	
	Neu5Ac(α 2-3)	-	2.030	-	-	-	
	Neu5Ac(α 2-6)	2.028	-	2.028	2.027	2.027	

^a $J_{H-3,H-4}$; ^b $J_{H-3ax,H-3eq}$; ^c $J_{H-3ax,H-4}$; ^d $J_{H-3eq,H-4}$; ^e $J_{H-4,H-3}$

Table 8. ¹H-NMR chemical shifts of lactose and neutral oligosaccharides separated from white whale milks on middle and late lactation stages (March and September, 2005).

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)			
		Mar 2-3	Mar 3-3	Sep 2-3	Mar, Sep 4
H-1	Glc α	5.228 (3.4)	5.221 (4.6)	5.227 (4.0)	5.223 (4.0)
	Glc β	4.666 (7.4)	4.664 (8.6)	4.630 (8.6)	4.665 (7.4)
	Gal'''(α 1-3)	-	5.144 (2.9)	-	-
	Gal'(β 1-4)	4.444 (8.6)	4.523 (8.6)	4.584 (8.0)	4.451 (8.0)
	Gal''(β 1-4)	4.482 (8.0)	-	-	-
	GlcNAc(β 1-3)	4.708 (8.6)	-	-	-
H-2	GalNAc(α 1-3)	-	-	5.177 (3.4)	-
	Fuc(α 1-2)	-	-	5.351 (4.0)	-
	GalNAc(α 1-3)	-	-	4.249 (3.4) (α)	-
	-	-	-	4.222 (β)	-
	Gal'(β 1-4)	4.158 (3.4 ^a)	4.182 (2.9 ^a)	4.222	-
	Gal'''(α 1-3)	-	4.199	-	-
H-4	GalNAc(α 1-3)	-	-	4.222	-
	Fuc(α 1-2)	-	-	4.325 (5.2) (β)	-
H-5	Fuc(α 1-2)	-	-	1.245 (6.3)	-
	GlcNAc(β 1-3)	2.034	-	-	-
NAC	GalNAc(α 1-3)	-	-	2.041	-
	-	-	-	-	-

^a $J_{H-3, H-4}$

Table 9. Chemical structures and distribution of oligosaccharides separated from white whale milks during lactation.

Oligosaccharide	Chemical structure	No. of peak ^a	Lactation period		
			Early	Middle	Late
<i>Acidic oligosaccharide</i>					
3'-Sialyllactose	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc	1	○ ^b	-	○ ^b
6'-Sialyllactose	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc	2	○	○	○
GM2 tetrasaccharide	GalNAc(β1-4)	3	○	○	○
	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc				
Sialyl lacto-N-neotetraose ^c	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	4	○	○	○
	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	5	-	○	○
Sialyl lacto-N-neohexaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	6	-	○	○
	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc				
<i>Neutral oligosaccharide</i>					
Isoglobotriose	Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc		-	○	-
Lacto-N-neotetraose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc		-	○	-
A-tetrasaccharide	GalNAc(α1-3)Gal(β1-4)Glc		-	-	○
	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc				

^a The numbers of sialyl oligosaccharides express those of peaks on HPLC in Fig. 15.

^b ○; identified, -; not identified.

Table 10. Comparison of milk oligosaccharide composition between four Odontoceti (toothed whale) and three Mysticeti (baleen whale).

Oligosaccharide	Chemical structure	Odontoceti				Mysticeti ^a		
		Tt ^b	SA ^b	KW ^b	DL ^b	MW ^b	BW ^b	SW ^b
<i>Acidic oligosaccharide</i>								
3'-Sialyllactose	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc	○	○	-	○	○	○	○
6'-Sialyllactose	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc	○	-	○	○	○	○	○
GM2 tetrasaccharide	GalNAc(β1-4)	○	○	○	○	-	-	-
	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	-	-	-	-
Sialyl lacto- <i>N</i> -neotetraose ^c								
	Neu5Ac(α2-3/6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	○	○	○	○
Sialyl para lacto- <i>N</i> -neohexaose								
	Neu5Ac(α2-3/6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	○	○	-	-
Sialyl lacto- <i>N</i> -neohexaose								
	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	○	-	-	-
Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)								
	Gal(β1-4)Glc	-	-	-	○	-	-	-
<i>Neutral oligosaccharide</i>								
Isoglobotriose	Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc	-	○	-	○	-	-	-
Globotriose	Gal(α1-4)Gal(β1-4)Glc	○	-	-	-	-	-	-
2'-Fucosyllactose	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc	-	○	-	-	○	-	-
Lacto- <i>N</i> -neotetraose								
	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	○	-	-	-
A-tetrasaccharide								
	GalNAc(α1-3)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	○	○	-	-
	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	-	-	-	-
para Lacto- <i>N</i> -neohexaose								
	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	-	-	-	-	-	○	-

^a Data of three baleen whales are excerpted from reference No. 75 and 76.

^b Tt: bottlenose dolphin; SA: spotted dolphin; KW: killer whale; DL: white dolphin; MW: minke whale; BW: Bryde's whale; SW: sei whale.

第 III 章 アジアゾウ (*Elephas maximus*) 乳中のミルクオリゴ糖組成

3.1 緒論

これまでの研究結果から，アフリカゾウ (*Loxodonta africana*) とアジアゾウの乳は各々 3.7% および 4.0 ~ 8.4% の糖質を含んでいることが知られている^{119, 120)}．Osthoffら¹²⁰⁾ は，アフリカゾウ乳中のラクトース含量は分娩後 4 日から 47 日の間に 52.5 から 11.8 g/kg に減少する一方で，ミルクオリゴ糖含量は 11.8 から 15.2 g/kg に増加すると報告した．このことは，47 日目の乳中ではミルクオリゴ糖がラクトースよりも優勢であることを示している．また，Kunzら⁷⁷⁾ は，アジアゾウ乳中糖質は 60% のラクトースと 40% の様々なミルクオリゴ糖から成ると報告した．これらのミルクオリゴ糖が，ヒト乳児の場合と同様に，アジアゾウ乳仔においても重要な生理学的機能を持つかどうかは興味深い．ゾウ乳中のミルクオリゴ糖画分には高い割合のシアリルオリゴ糖が含まれていることから，授乳中の乳仔において，それが吸収・代謝されてガングリオシドのような脳構成物質の形成に寄与することが考えられる³⁴⁾．

Kunzら⁷⁷⁾ はアジアゾウミルクオリゴ糖を同定する際，高 pH 陰イオン交換クロマトグラフィー-パルスアンペロメトリック検出器 (HPAEC-PAD) 分析を使用し様々なヒトミルクオリゴ糖との保持時間と比較することにより行った．これにより，アジアゾウ乳中では II 型 (Gal(β 1-4)GlcNAc) 構造で構成されるオリゴ糖が主要である一方，ヒトミルク中からしか報告例がないタイプ I 型 (Gal(β 1-3)GlcNAc) 構造を有するオリゴ糖も同定しているが，これ

は疑問が残る結果であった。

そこで本研究では、 $^1\text{H-NMR}$ 法を用いることで、アジアゾウ乳中のミルクオリゴ糖のより詳細な構造解析を行った。

3.2 試料と方法

3.2.1 試料

乳試料は、タイ王国アユタヤ市にあるアユタヤエレファントキャンプで飼育されている 1 個体より得た。2003 年 10 月 4 日に手搾りにより採集された分娩後 11 目のものを試料とし、分析まで -20°C で凍結保存した。

糖標準品として、糖標準品として、ラクトース 1 水和物 Kishida Kagaku (Osaka, Japan) から、3'-SL, 6'-SL は Sigma (St. Louis, USA) から、LST c は Seikagaku (Tokyo, Japan) から購入した。モノフコシル-モノシアリル-ラクトース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)$ [Fuc($\alpha 1-3$)]Glc), モノガラクトシル-モノシアリル-ラクト-N-ネオヘキサオース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)$ [Gal($\alpha 1-3$)Gal($\beta 1-4$)GlcNAc($\beta 1-6$)]Gal($\beta 1-4$)Glc) およびモノガラクトシル-モノフコシル-モノシアリル-ラクト-N-ネオヘキサオース ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-6)$ Gal($\beta 1-4$)GlcNAc($\beta 1-3$){Gal($\alpha 1-3$)Gal($\beta 1-4$)[Fuc($\alpha 1-3$)]GlcNAc($\beta 1-6$)} Gal($\beta 1-4$)Glc) は、それぞれジャイアントパンダ⁶⁸⁾、ミンク⁷⁰⁾およびツキノワグマ⁶⁵⁾の乳から精製したものをを用いた。同様に、イソグロボトリオース (Gal($\alpha 1-3$)Gal($\beta 1-4$)Glc) はジャイアントパンダ⁶⁸⁾、ミンク⁷⁰⁾の乳から精製したものをを用いた。

3.2.2 ミルクオリゴ糖の抽出と分離・精製

(a) ミルクオリゴ糖画分の抽出

乳試料は 5 mL を使用し、オリゴ糖の抽出は 2.2.2 (a) に準じた。

(b) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離

2.2.2 (b)に準じてオリゴ糖の分離を行い，ヘキソースおよびシアル酸の呈色反応には 20 μL ずつ使用した．

(c) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離

カラムとして 1.5 \times 3.5 cm のものを使用した以外は 2.2.2 (c)に準じてオリゴ糖の分離を行い，ヘキソースの呈色反応には 50 μL を使用した．

(d) 高速液体クロマトグラフィーによる精製

カラム温度を 40 $^{\circ}\text{C}$ に設定したこと以外は 2.2.2 (d)に準じてオリゴ糖の精製を行った．

3.2.3 核磁気共鳴スペクトル分析によるミルクオリゴ糖の構造解析

2.2.3 (a)に準じて ^1H -NMRスペクトラムを測定した．

3.3. 結果

アジアゾウ乳中に含まれるヘキソースおよびシアル酸含量は、ラクトースおよび N-アセチルノイラミン酸を用いた検量線を作成して算出した結果、それぞれ 91 g/L および 3.0 g/L であった。

Fig. 18 に示した通り、糖質画分はゲル濾過クロマトグラフィーにより様々なピークに分離された。画分 Em 1 からのみシアル酸陽性反応が検出された。また、Fig. 18 における溶出位置から、Em 2、Em 3 および Em 4 は、それぞれ三糖、二糖および単糖を含むことが推定された。Em 3 に含まれる糖質に関しては、¹H-NMRの結果ラクトースと同一とされた (Table 11)。

(a) 中性オリゴ糖・画分 Em 2

Table 11 に画分 Em 2 に含まれるオリゴ糖の¹H-NMRにおける化学シフトを示した。δ 5.222, 4.668, 5.147 および 4.524 シグナルはそれぞれ α-Glc, β-Glc, α(1-3)結合 Gal および β(1-4)結合 Gal 残基のアノメリックシフトとして帰属された。また、H-5 を示す特徴的な α(1-3)結合 Gal の δ 4.197 および、α(1-3)結合 Gal と結合した β(1-4)結合 Gal 残基の H-4 に相当する δ 4.183 シグナルが帰属された。

以上のシグナル帰属と、イソグロボトリオース標品および文献値と比較した結果、本オリゴ糖の構造は Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc であると同定された。

(b) 酸性オリゴ糖

シアル酸を含む画分 Em 1 は陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに分離され、非吸着画分として Em 1-1, Em 1-2 および Em 1-3

が得られた (Fig. 19). シアル酸含有粗画分 Em 1-2 を Bio Gel P-2 カラムにより脱塩し ,HPLCによりさらにオリゴ糖を精製して(Fig. 20), 得られた全てのピークを $^1\text{H-NMR}$ により構造決定した . 一方で , 画分 Em 1-1 および Em 1-3 に関しては , HPLCでの十分な分離が得られなかったことから本研究では構造決定しなかった .

Em 1-2 を HPLC に供した結果得られた全てのピークにおいて , 構造決定されたオリゴ糖は以下の通りであった .

(1) Em 1-2-2

本画分が示す $^1\text{H-NMR}$ スペクトラム (Table 12) は 3'-SL標品が示すスペクトラムと完全に一致することから , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glcであると同定された .

(2) Em 1-2-3

本画分が示す $^1\text{H-NMR}$ スペクトラム (Table 12) は 6'-SL標品が示すスペクトラムと完全に一致することから , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)Glcであると同定された .

(3) Em 1-2-4

本画分が示す $^1\text{H-NMR}$ スペクトラム (Table 12) は 3'-シアリル-3-フコシルラクトースに関する文献⁶⁸⁾と完全に一致することから , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]Glcであると同定された .

(4) Em 1-2-7

本画分が示す¹H-NMRスペクトラム (Table 12) はLST cに関する文献⁷⁵⁾と完全に一致することから , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Glcであると同定された .

(5) Em 1-2-8

本画分が示す¹H-NMR (Table 12 , Fig. 21) におけるシグナルのうち δ 5.219 , 4.663 , 4.702 , 4.532 および 4.434 は ,それぞれ α-Glc , β-Glc , β(1-3)結合GlcNAcおよび二つのβ(1-4)Gal残基のアノマーシフトとして帰属された . このことから , このオリゴ糖にLNnTユニットが含まれることが示された . 本スペクトラムにはFuc残基のH-1 およびH-6のシグナル δ 5.121 および 1.167 が示されている . ルイス x (Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R; Le^x)ユニットを含む糖鎖の場合のように , シグナル δ 5.121 はGlcNAc残基に対するFucα(1-3)の結合性を示している¹²¹⁾ . δ 2.020 におけるβ(1-3)結合GlcNAc残基由来のN-アセチル基シグナルは , このα(1-3)結合Fucの置換を受けて高磁場シフトしていると考えられた . Neu5Ac残基のH-3ax , H-3eqおよびN-アセチル基は , シグナル δ 1.794 , 2.764 および 2.030 に帰属された . さらに , β(1-4)結合Gal残基のH-3のダブルット-ダブルットシグナルは δ 4.087 に帰属された . このシグナルパターンから , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α2-3)Galユニットを含んでおり , δ 4.532 におけるβ(1-4)結合GalのH-1 シグナルの通常よりもやや低磁場側のシフトは , このα(2-3)結合Neu5Ac残基による置換を受けたものと示唆された .

以上のシグナル帰属から , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc であると同定された .

(6) Em 1-2-11

本画分に含まれるオリゴ糖の構造は, Em 1-2-7(LST c)の¹H-NMRスペクトラムと比較して解析した(Table 13, Fig. 22). 本オリゴ糖のスペクトラムから, シグナル δ 5.219, 4.663, 4.726, 4.455 および 4.438 は α -Glc, β -Glc, β (1-3)結合GlcNAcおよび二つの β (1-4)結合Gal残基のアノメリックシフトとして帰属された. またEm 1-2-7のLNnTユニットと同様に, β (1-3)結合GlcNAc残基の置換を受けた β (1-4)結合Gal残基のH-4はシグナル δ 4.159に帰属された. しかし, δ 4.697 および 4.469のシグナルは, β (1-3)結合GlcNAcおよび β (1-4)結合Gal残基のH-1に帰属されることに加え, δ 4.159のシグナル強度からここに帰属されるプロトン数は2個であることが示された. このことから, 本オリゴ糖にはGal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)ユニット、つまりパラLNnHユニット(Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc)が含まれていることを示している. また, シグナル δ 1.725, 2.669 および 2.028 はそれぞれ H-3_{ax}, H-3_{eq} および N-アセチル基に帰属されることから, α (2-6)結合性の Neu5Ac 残基が示された.

以上のシグナル帰属から, 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc であると同定された.

(7) Em 1-2-17

本画分に含まれるオリゴ糖の構造は, Em 1-2-11の¹H-NMRスペクトラムと比較して解析した(Table 13, Fig. 23). 本オリゴ糖のスペクトラムから, シグナル δ 5.219, 4.663, 4.721, 4.708, 4.451 および

4.434 は α -Glc , β -Glc , 二個の β (1-3)結合GlcNAcおよび二個の β (1-4)結合Gal残基のアノメリックシフトとして帰属された . また , β (1-3)結合GlcNAc 残基の置換により δ 4.158 および 4.104 に帰属される二個の β (1-4)結合Gal残基のH-4 シグナルからはパラLNnH構造が含まれることが示された . 本スペクトラムにはFuc残基が示すH-1 およびH-6 のシグナル δ 5.116 および 1.153 が存在することから , このFuc残基が β (1-3)結合GlcNAc残基に α (1-3)結合性で付加していることが示された . δ 4.708 に帰属される β (1-3)結合GlcNAcのH-1 シグナルがEm 1-2-11 における δ 4.697 よりもさらに低磁場シフトしている一方 , δ 2.021 に帰属される β (1-3)結合GlcNAcのN-アセチル基シグナルはEm 1-2-11 における同アセチル基の δ 2.028 よりも高磁場シフトしていた . このシフトは , この糖残基に α (1-3)結合Fucが結合していることによると考えられた . また , シグナル δ 1.725 , 2.667 および 2.028 はそれぞれH-3ax , H-3eqおよびN-アセチル基に帰属されることから , α (2-6)結合性のNeu5Ac残基の存在が示された .

以上のシグナル帰属から , 本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc のいずれかのGlcNAc残基に一つの α (1-3)結合Fuc残基が結合したものであると同定された .

(8) Em 1-2-18

本画分が示す¹H-NMRスペクトラム (Table 13) がモノガラクトシル-モノシアリル-ラクト-N-ネオヘキサースに関する文献⁷⁰⁾と完全に一致することから , 本オリゴ糖の構造はNeu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)[Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glcで

あると同定された。

(9) Em 1-2-19

本画分に含まれるオリゴ糖の構造は，Em 1-2-8 の¹H-NMRスペクトラムと比較して決定した (Table 13, Fig. 24)。本オリゴ糖のスペクトラムから，シグナル δ 5.218, 4.662, 5.126, 4.707, 4.535, および 4.432 は α -Glc, β -Glc, α (1-3)結合Fuc, β (1-3)結合GlcNAcおよび二個の β (1-4)結合Gal残基のアノメリックシフトとして帰属された。Em 1-2-8 と同様に， α (1-3)結合Fuc残基のH-6 シグナルは δ 1.167 に， β (1-3)結合GlcNAc による置換を受けた β (1-4)結合Gal残基のH-4 シグナルは δ 4.156 にそれぞれ帰属され，本オリゴ糖の構造にはGal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glcユニットが含まれることを示している。しかし，さらに α (1-3)結合Fuc残基のH-1 およびH-6 が示すシグナル δ 5.114 および 1.146, β (1-3)結合GlcNAcのH-1 のシグナル δ 4.692, β (1-4)結合Gal残基のH-1 に由来する δ 4.443 シグナル，そして β (1-3)結合GlcNAc置換を受けた β (1-4)結合Gal残基のH-4 に由来するシグナル δ 4.097 が帰属されることから，本オリゴ糖の構造にはさらにGal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)ユニットが含まれていることが明らかである。 β (1-3)結合GlcNAc残基の二つのN-アセチル基シグナルが示す δ 2.014 および 2.019 は， α (1-3)結合Fuc残基の置換を受けて高磁場シフトしたものと考えられた。また，シグナル δ 1.793, 2.764 および 2.030 はそれぞれH-3_{ax}, H-3_{eq}およびN-アセチル基に帰属されることから， α (2-3)結合性のNeu5Ac残基の存在が示された。この α (2-3)結合Neu5Ac残基による置換を受けた β (1-4)結合Gal残基のH-3 のシグナル δ 4.084 は， β (1-4)結合Gal残基のH-4 シグナ

ルの一部分と重なっていた。

以上のシグナル帰属から，本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc であると同定された。

(10) Em 1-2-21

本画分が示す $^1\text{H-NMR}$ スペクトラム (Table 13) がモノガラクトシル-モノフコシル-モノシアリルラクト-N-ネオヘキサオースに関する文献のデータ⁶⁵⁾と完全に一致することから，本オリゴ糖の構造は Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3){Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6)}Gal(β 1-4)Glc であると同定された。

3.4 考察

本研究で用いたアジアゾウ乳には 91 g/Lの糖質が含まれており，ヒト（約 70 g/L）やウシ（45 g/L）の乳中糖質よりも高濃度であった．糖質の中では，多くの動物種と同様にラクトースが主要糖質である一方，様々なミルクオリゴ糖が含まれていることが示され（Fig. 18），Kunzら⁷⁷⁾の報告とも一致していた．本研究で用いた分娩後 11 日目のアジアゾウ乳には，Fig. 1 のピーク面積比から算出して，全ミルクオリゴ糖，ラクトース，および単糖はそれぞれ 53.7, 36.4 および 0.9 g/L 含まれていることが示された．Peters ら¹¹⁹⁾は，アジアゾウ乳中のラクトース含量は，脱脂乳からタンパク質含量を差し引いた値で算出しており，分娩後 5 日目では 40 g/L，141 日目では 83.6 g/Lと報告したが，実際にはこれらの値はミルクオリゴ糖とラクトースの合計値に相当する．Kunzら⁷⁷⁾の報告では，ミルクオリゴ糖とラクトース含量は，分娩後 45 日目の乳には 21.0 g/Lおよび 25.8 g/L，72 日目の乳には 21.8 g/Lおよび 29.6 g/L，そして 234 日目の乳には 19.3 g/Lおよび 30.7 g/Lがそれぞれ含まれていた．一方，同じ *Elephantidae* に属するアフリカゾウ乳に関する MacCullagh and Widdowsonの報告¹¹⁸⁾では，ラクトース定量法としてアンスロン法¹²¹⁾を用いた定量で，その含量は最大で 80 g/Lに達すること示した．しかし，この値にはオリゴ糖も含まれていると考えられる．Osthoff ら¹²⁰⁾は，アフリカゾウ乳中に，ミルクオリゴ糖およびラクトースが，分娩後 4 日目の乳には 11.8 g/Lおよび 52.5 g/L，47 日目の乳には 15.2 g/Lおよび 11.8 g/L含まれると報告した．ヒトミルク常乳中のミルクオリゴ糖とラクトース含量は 12-14 g/lと 60 g/lであるので¹³⁾，ヒトと比較すると，本研究結果を含めたこれらの報告から，アジアおよ

びアフリカゾウ乳中に含まれる糖質（ラクトースおよびミルクオリゴ糖）含量は，ヒトに近い高い値を示すことが明らかである．特にラクトースは，哺乳類同様新生仔の重要なエネルギー源であるが，ゾウやヒトの乳仔ではその必要量が非常に高いことが示された．

Table 14 に示した通り，本研究で同定されたミルクオリゴ糖は，中性糖 1 種と酸性糖 10 種であった．ラクトースに次いで含量の高いイソグロボトリオースはヒト乳では発見されていないが，ウシ⁵³⁾，ヒツジ⁵⁷⁾，ヤギ⁵⁹⁾，ヒグマ⁶³⁾，ツキノワグマ^{64, 65)}，シロクマ^{66, 67)}，ジャイアントパンダ⁶⁸⁾，ハナグマ⁶⁹⁾やミンク⁷⁰⁾などの他の哺乳類の乳にも含まれていることがわかっている．同様に，3'-SLと 6'-SLもウシ^{46, 49, 49)}，ヤギ⁶⁰⁾やヒト¹³⁾を含めた数多くの常乳または初乳中より分離同定されており，Kunzら⁷⁷⁾もアジアゾウ乳中から見いだしている．3'-sialyl-3-fucosyllactose (Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]Glc, Table 14) は，ヒト乳¹²²⁾やジャイアントパンダ乳⁶⁸⁾からも同定されたが，この糖はシアリルLe^xの最小単位であり，Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc (Em 1-2-8, Fig. 8)や Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc (Em 1-2-19, Table 14) のように，LNnTやpara-LNnHをコア骨格とし，末端にシアリルLe^x抗原基を含むオリゴ糖が発見されたのはあらゆる哺乳動物種の乳で初めてである．これらのミルクオリゴ糖は，いずれも各種セレクチンのリガンド¹²⁴⁾として知られるシアリルLe^x抗原基を非還元末端側に有していることから，乳仔消化管において消化あるいは吸収されて，循環過程での抗炎症因子として働いているのかもしれない．さらに，LST c (Table 14) は，ヒト⁴⁶⁾，

ミンククジラ⁷⁵⁾などの他の動物種からも分離されており，アジアゾウ乳中でも報告されている⁷⁷⁾が，para-LNnHをコアとする Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc (Em 1-2-11, Table 14) の発見はあらゆる哺乳類乳中では初めてである．また，モノガラクトシル-モノシアリル-LNnH (Em 1-2-18) とモノガラクトシル-モノフコシル-モノシアリル-LNnH (Em 1-2-21, Table 14) は，それぞれミンク⁷⁰⁾とツキノワグマ⁶⁵⁾の乳中からも発見されている．

以上のように，本研究で同定したミルクオリゴ糖は，ラクトース，LNnTおよび para-LNnHをコアとして，シアリルLe^xや α (2-3)結合型 Neu5Ac残基，また α (1-3)結合型Gal残基が結合した構造を有していた．興味深いことに，これらはタイプII型 (Gal(β 1-4)GlcNAc) 構造のみで構成され，Fuc残基の結合様式は α (1-3)結合に限られていた．Kunzら⁷⁷⁾は，ヒトミルクオリゴ糖の高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) およびHPAECにおける保持時間に基づいた分析で，アジアゾウ乳中にタイプI型 (Gal(β 1-3)GlcNAc) 構造を含むオリゴ糖を同定していた．これに反して，このタイプのオリゴ糖は，本研究で解析されたものには見いだされなかった．また，シアリルLe^xを含む高級オリゴ糖や α -Galエピトープを含むオリゴ糖は人乳中に発見されていないことから，ヒトとアジアゾウにおけるミルクオリゴ糖組成の違いが明らかになった．以上の研究結果から，アジアゾウのミルクオリゴ糖の合成は，乳腺上皮細胞内において， β 1,4-ガラクトース転移酵素および α 1,3-フコース転移酵素が優先的に作用していると推察された．

乳中に含まれるラクトースとミルクオリゴ糖は，乳仔にとって

各々栄養源および感染防御因子としての作用をしている¹⁸⁻³³⁾。ヒトとゾウの乳仔は、それぞれ 12 ヶ月、22 ヶ月の授乳期間を通して成長し、離乳する。彼らの比較的長い泌乳期間において、乳児（仔）は相当量の糖質を摂取することとなる。一方で、ヒトとゾウのミルクオリゴ糖組成の違いは、病原体への感染防御能の違いを反映しているのかもしれない。加えて、ヒトミルクオリゴ糖^{125, 126)}で示唆されているように、アジアゾウ乳中のシアル酸含有オリゴ糖が、乳仔の小腸から吸収されて脳の発達に重要な役割を果たしているのかもしれない。

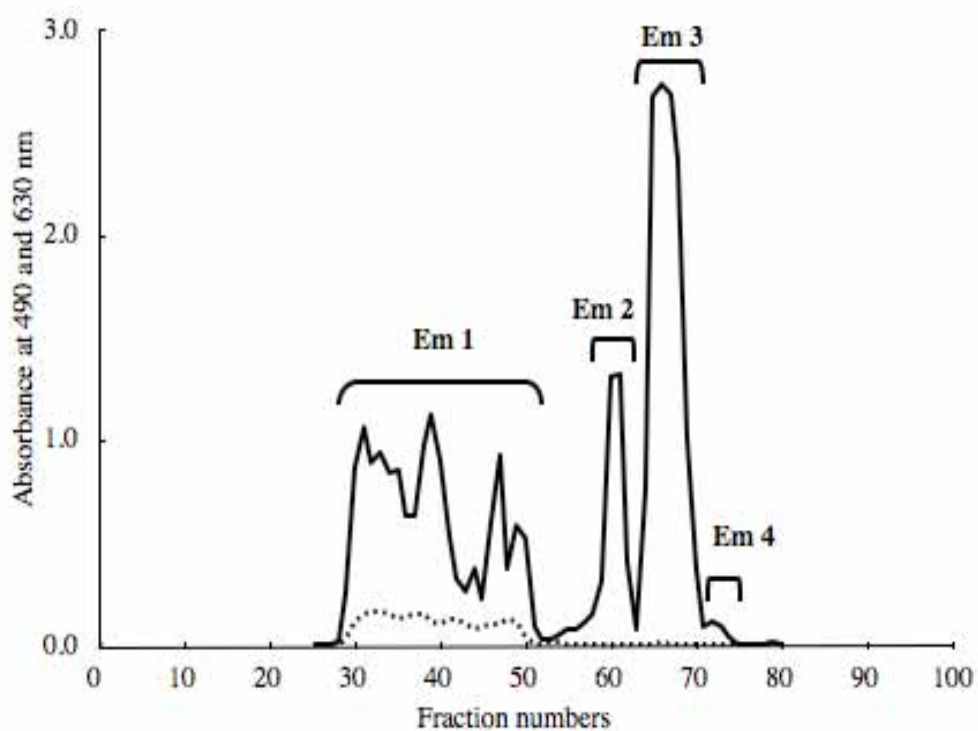


Fig. 18. Gel chromatogram of the carbohydrate fraction from Asian elephant milk on a Bio Gel P-2 column (ϕ 2.6x100 cm). Each fraction was monitored by the phenol-H₂SO₄ method (—) and the periodate-resorcinol method (.....).

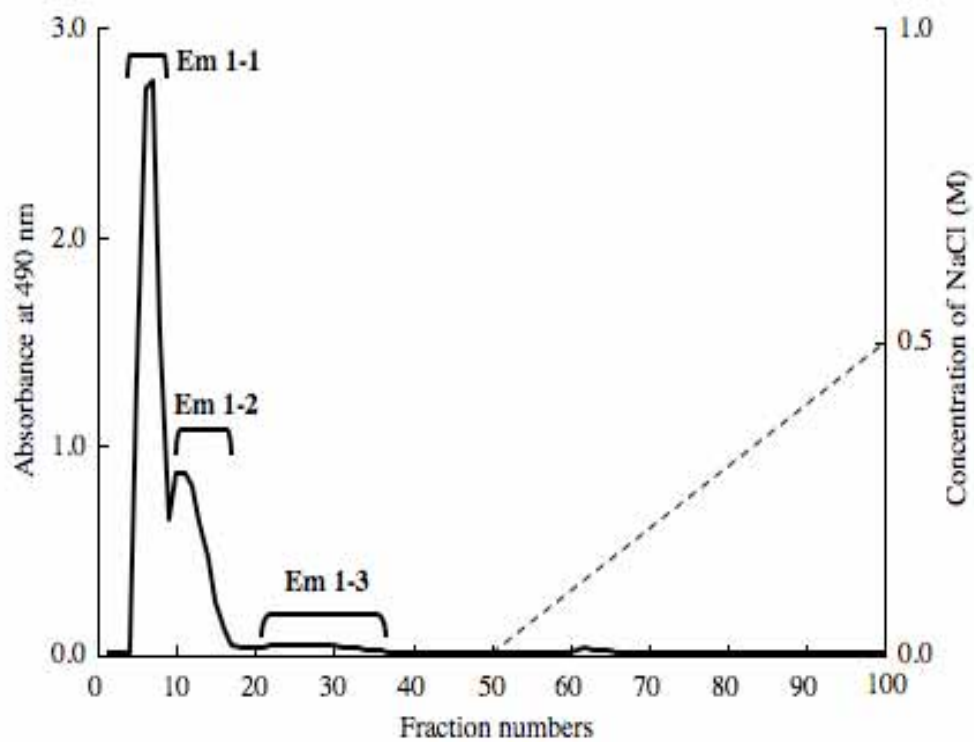


Fig. 19. Anion exchange chromatogram of Em 1 separated from Asian elephant milk by gel chromatography on Bio Gel P-2 (Fig. 18). Each fraction was monitored by the phenol- H_2SO_4 method (—).

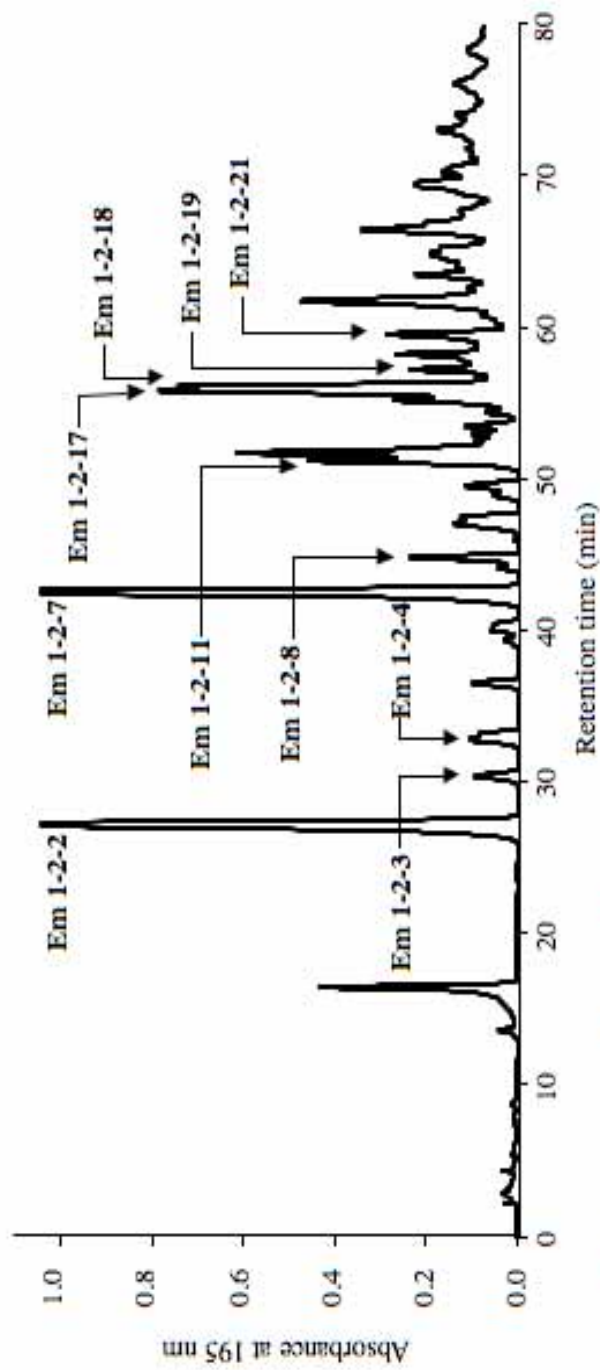


Fig. 20. HPLC of the carbohydrate fraction EM 1-2 separated from Asian elephant milk.

Table 11. ¹H-NMR chemical shifts of saccharides in Em 2 and Em 3

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)	
		Em 2	Em 3
H-1	Glc α	5.225 (3.6)	5.222 (3.8)
	Glc β	4.668 (8.0)	4.665 (7.8)
	Gal β 4	4.524 (7.6)	4.451 (7.8)
	Gal α 3	5.147 (2.1)	-
H-4	Gal β 4	4.183 (2.9 ^a)	-
H-5	Gal α 3	4.197 (5.2, -6.3) ^b	-

^a $J_{H-3, H-4}$; ^b $J_{6, 5}$.

Table 12. ¹H-NMR chemical shifts of acidic oligosaccharides Em 1-2-2, 3, 4, 7 and 8 isolated from Asian elephant milk

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)				
		Em 1-2-2	Em 1-2-3	Em 1-2-4	Em 1-2-7	Em 1-2-8
H-1	Glc α	5.220 (4.0)	5.223 (4.2)	5.176 (3.8)	5.220 (3.4)	5.219 (4.0)
	Glc β	4.663 (8.0)	4.668 (7.9)	4.652 (7.9)	4.665 (8.0)	4.662 (8.0)
	Gal' β 4	4.531 (8.0)	4.427 (7.9)	4.502 (7.9)	4.442 (7.4)	4.434 (8.0)
	Gal'' β 4	-	-	-	4.457 (7.4)	4.532 (7.4)
H-3	GlcNAc β 3	-	-	-	4.728 (8.0)	4.702 (8.6)
	Fuc α 3	-	-	5.377 (3.8)	-	5.121 (4.0)
	Fuc α 3	-	-	5.435 (4.1)	-	-
	Gal' β 4	4.115 (2.9 ^a)	-	-	-	-
H-3ax	Gal'' β 4	-	-	-	-	4.087 (3.1 ^a)
	Neu5Ac α 2-3	1.801 (12.0 ^b , -12.6 ^c)	-	1.798 (12.3 ^b , -12.3 ^c)	-	1.795 (13.2 ^b , -11.5 ^c)
H-3eq	Neu5Ac α 2-6	-	1.746 (12.3 ^b , -12.3 ^c)	-	1.726 (12.0 ^b , -12.0 ^c)	-
	Neu5Ac α 2-3	2.757 (4.9 ^d)	-	2.763 (4.2 ^e)	-	2.764 (4.9 ^d)
H-4	Neu5Ac α 2-6	-	2.713 (4.7 ^e)	-	2.670 (4.6 ^e)	-
	Gal' β 4	-	-	-	4.160 (2.9 ^c)	4.163 (2.9 ^c)
H-6	Fuc α 3	-	-	1.177 (6.5 ^f)	-	1.168 (6.3 ^f)
	Fuc α 3	-	-	1.182 (6.5 ^f)	-	-
NAc	Neu5Ac α 2-3	2.030	-	2.029	-	2.030
	Neu5Ac α 2-6	-	2.028	-	2.028	-
	GlcNAc β 3	-	-	-	2.054	2.020
		-	-	-	-	-

^a $J_{H-3, H-4}$; ^b $J_{H-3ax, H-4}$; ^c $J_{H-3eq, H-4}$; ^d $J_{H-3, H-4}$; ^e $J_{H-4, H-3}$; ^f $J_{6, 5}$.

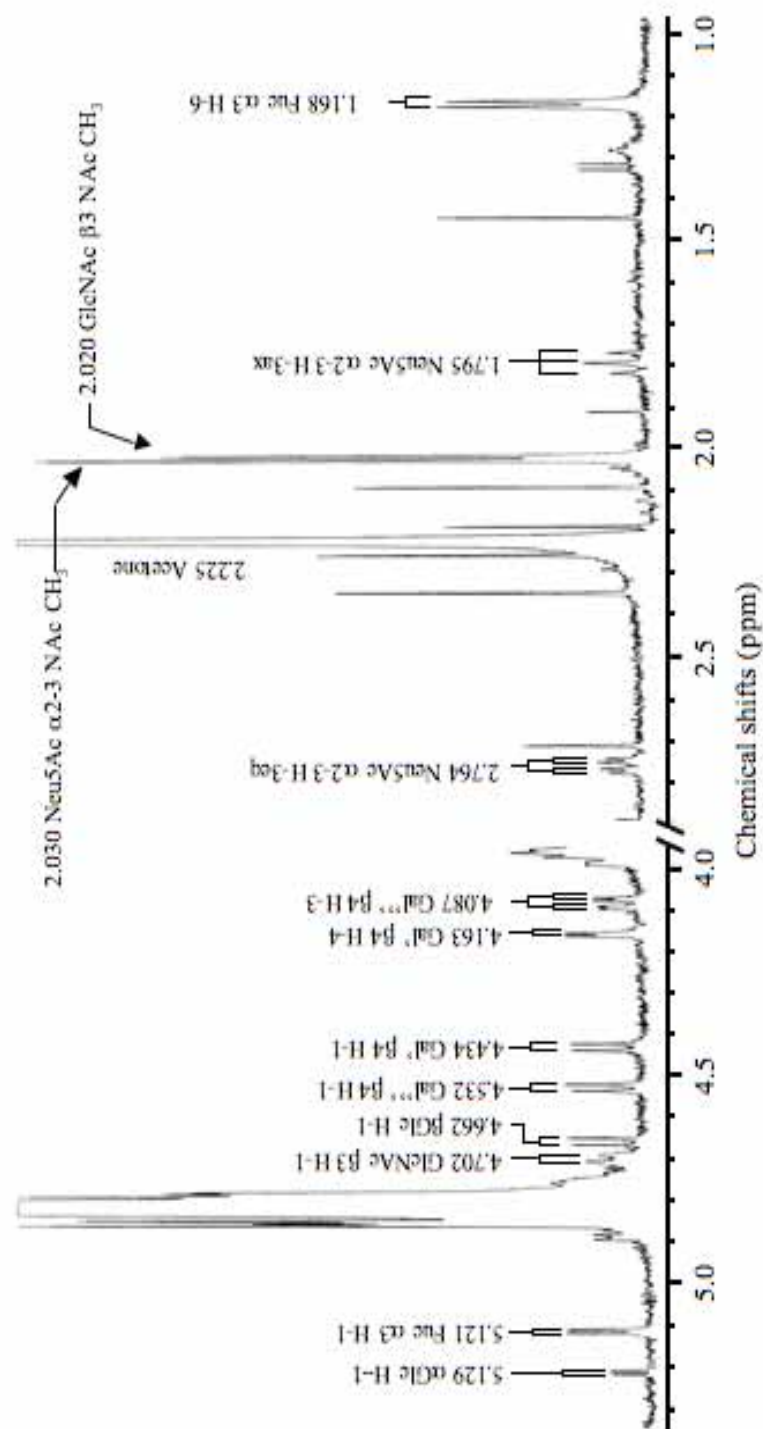


Fig. 21. 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Em 1-2-8 isolated from Asian elephant milk.

Table 13. ¹H-NMR chemical shifts of acidic oligosaccharides Em 1-2-11, 17, 18, 19 and 21 isolated from Asian elephant milk

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)					
		Em 1-2-11	Em 1-2-17	Em 1-2-18	Em 1-2-19	Em 1-2-21	
H-1	Glc α	5.219 (3.5)	5.219 (3.5)	5.219 (3.0)	5.218 (3.5)	5.219 (4.1)	
	Glc β	4.663 (8.2)	4.662 (8.2)	4.668 (8.3)	4.662 (8.2)	4.668 (8.2)	
	Gal' β 4	4.438 (8.8)	4.434 (8.2)	4.433 (8.1)	4.432 (7.1)	4.433 (7.9)	
	Gal'''' β 4	4.455 (8.5)	4.451 (8.2)	4.455 (8.3)	4.443 (6.5)	4.455 (7.9)	
	Gal'''' β 4	-	-	4.545 (7.8)	-	4.525 (7.6)	
	Gal'''''' β 4	4.469 (8.5)	4.456 (7.6)	-	4.535 (8.2)	-	
	Gal α 3	-	-	5.145 (3.4)	-	5.143 (3.8)	
	GlcNAc' β 3	4.697 (7.9)	4.708 (7.8)	4.730 (7.4)	4.692 (8.4)	4.725 (7.9)	
	GlcNAc'''' β 3	4.726 (7.9)	4.721 (7.6)	-	4.707 (9.6)	-	
	GlcNAc β 6	-	-	4.648 (5.5)	-	4.642	
H-3	Fuc' α 3	-	5.116 (3.8)	-	5.114 (4.2)	5.115 (3.8)	
	Fuc'' α 3	-	-	-	5.126 (3.6)	-	
	Gal'''''' β 4	-	-	-	4.087 (3.0 ^a)	-	
	Neu5Ac α 2-3	-	-	-	1.794 (12.6 ^b , -10.9 ^c)	-	
	Neu5Ac α 2-6	1.725 (12.3 ^b , -12.0 ^c)	1.725 (12.0 ^b , -12.3 ^c)	1.723 (12.2 ^b , -11.7 ^c)	-	1.725 (12.3 ^b , -12.3 ^c)	
	Neu5Ac α 2-3	-	-	-	2.763 (3.3 ^d)	-	
	Neu5Ac α 2-6	2.669 (4.4 ^e)	2.667 (4.5 ^e)	2.669 (4.6 ^e)	-	2.668 (4.5 ^e)	
	Gal' β 4	4.159	4.104 (3.2 ^e)	4.149 (2.2 ^e)	4.097	4.147	
	Gal'''' β 4	4.159	4.158 (3.0 ^e)	4.184	4.156 (2.4 ^e)	4.157	
	Gal α 3	-	-	4.193	-	4.196 (6.2, -6.7) ^f	
H-3eq	Fuc' α 3	-	1.153 (6.2 ^g)	-	1.146 (6.5 ^g)	1.179 (6.5 ^g)	
	Fuc'' α 3	-	-	-	1.167 (6.7 ^g)	-	
	Neu5Ac α 2-3	-	-	-	2.030	-	
	Neu5Ac α 2-6	2.028	2.027	2.028	-	2.027	
	GlcNAc' β 3	2.028	2.021	2.052	2.014	2.052	
	GlcNAc'''' β 3	2.054	2.047	-	2.019	-	
	GlcNAc β 6	-	-	2.062	-	2.052	
	H-4	NAC					

^a $J_{H-3, H-4}$; ^b $J_{H-3ax, H-4}$; ^c $J_{H-3ax, H-3eq}$; ^d $J_{H-3, H-4}$; ^e $J_{H-4, H-3}$; ^f $J_{5, 6}$; ^g $J_{6, 5}$.

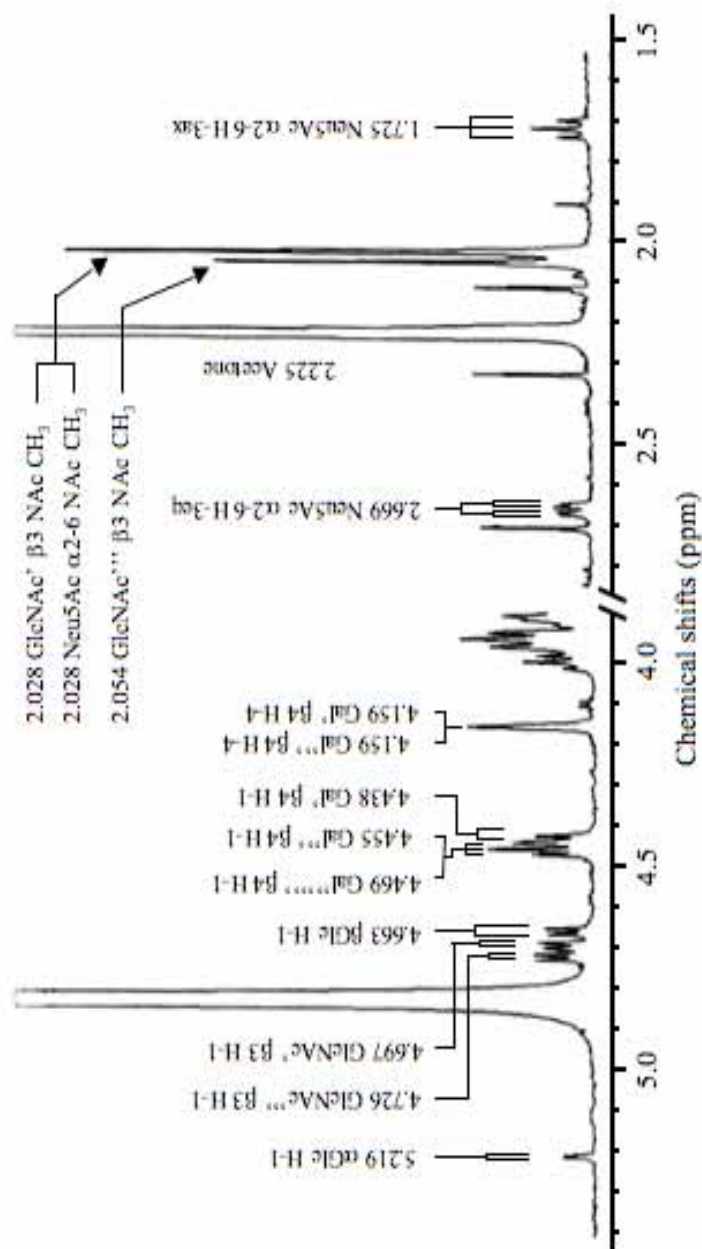


Fig. 22. 600 MHz ¹H-NMR spectrum of Em 1-2-11 isolated from Asian elephant milk.

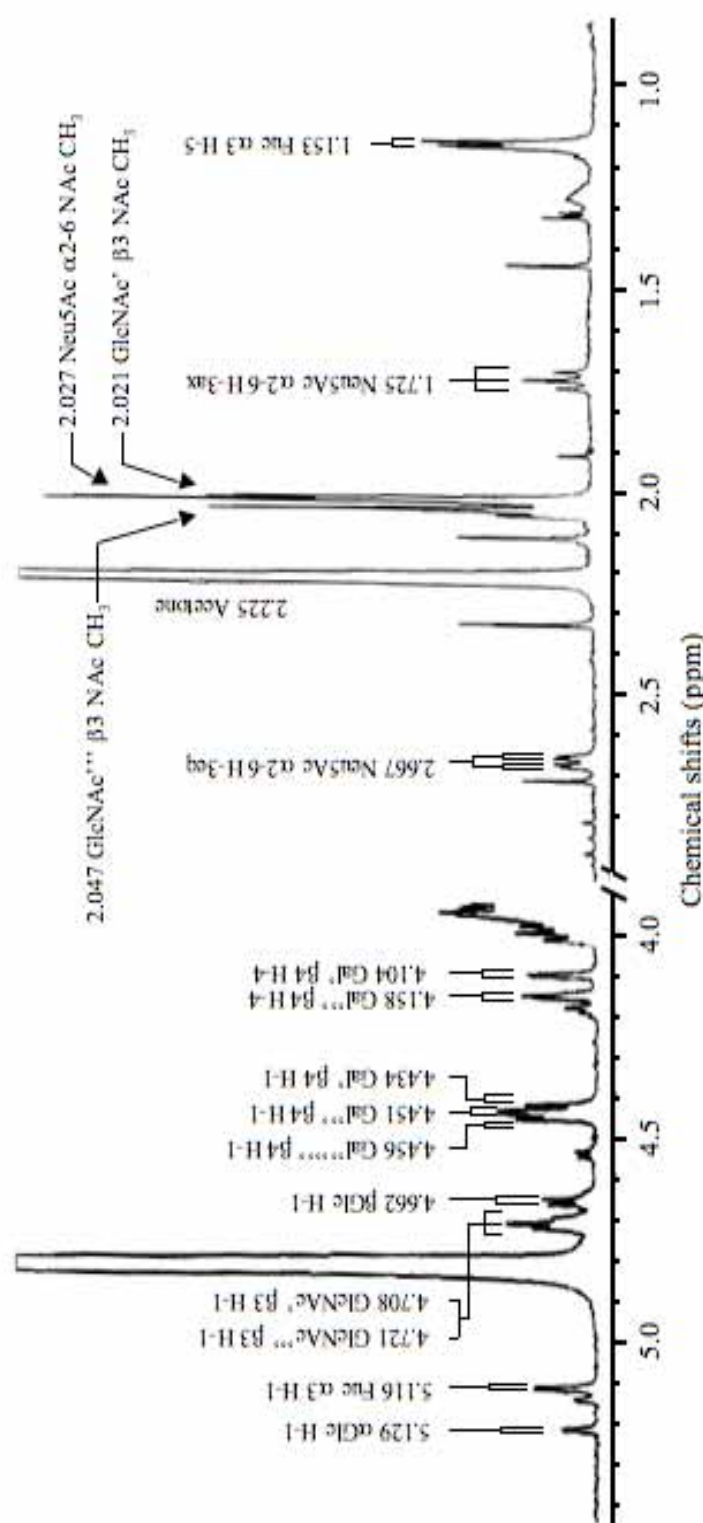


Fig. 23. 600 MHz ¹H-NMR spectrum of Em 1-2-17 isolated from Asian elephant milk.

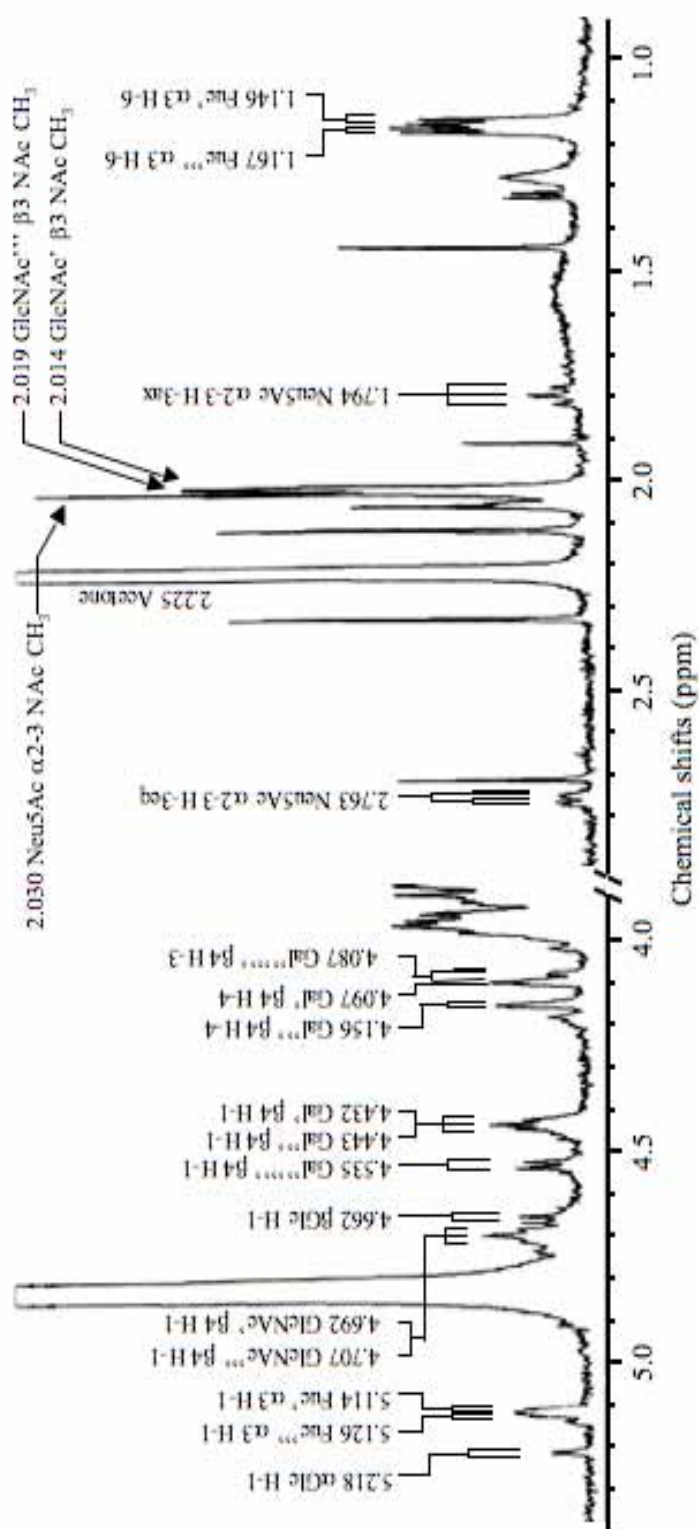


Fig. 24. 600 MHz ¹H-NMR spectrum of Em 1-2-19 isolated from Asian elephant milk.

Table 14. Structures of the oligosaccharides and lactose separated from Asian elephant milk.

Fraction (trivial name)	Chemical structure
<i>Acidic oligosaccharide</i>	
Em 1-2-2 (3'-Sialyllactose)	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-3 (6'-Sialyllactose)	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-4 (3'-Sialyl-3-fucosyllactose)	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4) Fuc(α1-3)Glc
Em 1-2-7 (Sialyl lacto-N-neotetraose c)	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-8	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4) Fuc(α1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-11	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-17	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4) Fuc(α1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-18	Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)
Em 1-2-19	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4) Fuc(α1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4) Fuc(α1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Em 1-2-21	Gal(α1-3)Gal(β1-4) Fuc(α1-3)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)
<i>Neutral oligosaccharide</i>	
Em 2 (isoglobotriose)	Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc
Em 3 (lactose)	Gal(β1-4)Glc

第 IV 章 総括

哺乳動物の乳に含まれるミルクオリゴ糖の種類や組成は多種多様を極める。しかし、それらに関する科学的知見は、ヒトや家畜以外の乳試料は入手困難なため少ない。また、ミルクオリゴ糖の研究は、ヒトミルクオリゴ糖で示唆されているような接着阻害による抗感染作用などの生理学的機能が、他の動物種のおいても発揮されるかどうかを解明する手がかりを与える。さらに、絶滅危惧種などの希少種の乳成分を調査することで、人工調合乳を調製する際の基礎的データを得ることができる。そこで本研究では、ハクジラ亜目に属するマイルカ科 3 種（飼育下バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*)、野生下シャチ (*Orcinus orca*) およびマダライルカ (*Stenella attenuata*)）とイッカク科 1 種（飼育下シロイルカ (*Delphinapterus leucas*)）、乳中のミルクオリゴ糖組成を調査した。これにより、以下の結果が明らかになった。

1. バンドウイルカ乳からは、ラクトース以外に、3'-SL、6'-SL、GM2 四糖 (GalNAc(β 1-4)[Neu5Ac(α 2-3)]Gal(β 1-4)Glc) およびグロボトリオースが同定された。GM2 四糖およびグロボトリオースは、哺乳動物種の乳中から遊離糖鎖として初めて発見された。
2. シャチおよびマダライルカ乳からは、ラクトース以外に、6'-SL、GM2 四糖および、3'-SL、GM2 四糖がそれぞれ同定された。
3. シロイルカ乳中の糖質組成は、ラクトースを主要糖質としている

他，酸性オリゴ糖として，泌乳初期乳では 3'-SL，6'-SL，GM2 四糖および LST c が，泌乳中期乳と泌乳後期乳では初期に含まれるものと同様の 4 種に加えて，シアリルパラ-LNnH とシアリル LNnH がそれぞれ同定された．また，中性オリゴ糖として，泌乳中期から LNnT とイソグロボトリオースが，泌乳後期から A 四糖が同定された．

4. 過去の報告と併せて，クジラ目のミルクオリゴ糖組成とその化学構造は，分類学上近縁である有蹄目と食肉目と比較して，とてもシンプルであった．この傾向は，クジラ目の進化の過程において獲得されたものであると推察された．

上記の研究目的と併せて，文献データに示された構造解析に疑問が残された，アジアゾウ (*Elephant maximus*) 乳中のミルクオリゴ糖組成を調査した．

5. アジアゾウ乳には 91 g/L もの高濃度で糖質が含まれており，ミルクオリゴ糖として中性オリゴ糖としてイソグロボトリオース，酸性オリゴ糖として 6 種類の既知オリゴ糖と共に，4 種類の新規ミルクオリゴ糖が同定された．

本研究により，ハクジラ亜目のミルクオリゴ糖組成の特徴が明らかにすると共に，種間での違いを明らかにした．また，4 種に共通して中性オリゴ糖に比べて酸性オリゴ糖が極めて優勢であることを明らかにした．一方，糖質を豊富に含むアジアゾウ乳からは，多様

なシアリル化された高級オリゴ糖が同定され，その中には血液型抗原であるシアリルLe^x構造をもつものが特徴的に含まれることを明らかにした．さらに，本研究における合計 5 種類の新規ミルクオリゴ糖の発見により，レクチンのエピトープ解析などに利用されるオリゴ糖ライブラリーの充実に寄与した．

謝辞

本研究を行うにあたり，終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました帯広畜産大学大学院畜産学研究科教授 浦島匡 先生，同講師 中村正 先生，同助教 福田健二 先生，新潟青陵大学短期大学部人間総合学科教授 荒井威吉 先生，北海道農業研究センター研究員 朝隈貞樹 博士ならびに本論文作製にあたり，御教示と御助言を賜りましたシドニー大学教授 Michael Messer 先生，弘前大学農学生命科学部生物資源学科教授 戸羽隆宏 先生，帯広畜産大学畜産学研究科教授 小田有二 先生，岩手大学農学部動物科学課程准教授 小田伸一 先生に深甚の謝意を表します．

また，本研究を遂行するにあたり，貴重な試料の採集と提供をしていただいた神戸市立須磨海浜水族園 滝導博 氏，財団法人名古屋港水族館 内田至 氏，三島秀規 氏，阿久根雄一郎 氏，伊藤美穂 氏，スミソニアン研究所国立動物学公園 Olav T. Oftedal 博士，カリフォルニア大学デービス校 Lisa Yon 氏，ならびに NMR スペクトラムの測定において御指導，御協力を賜りました東北大学大学院農学研究科教授 齋藤忠夫 先生，帯広畜産大学大学院畜産学研究科准教授 橋本誠 先生に心より感謝を申し上げます．

参考文献

1. R. Jenness, E.A. Regehr and R.E. Sloan (1964) Comparative biochemical studies of milks: II. Dialyzable carbohydrates.
Comparative Biochemistry and Physiology, 13: 339-362.
2. O.T. Oftedal and S.J. Iverson (1995) Comparative analysis of nonhuman milks.
Handbook of milk composition (R.G. Jensen Ed.), Academic Press, New York: pp. 749-834.
3. U. Brodbeck and K.E. Ebner (1966) Resolution of a soluble lactose synthetase into two protein components and solubilization of microsomal lactose synthetase.
Journal of Biological Chemistry, 241: 762-764.
4. U. Brodbeck, W.L. Denton, N. Takahashi and K.E. Ebner (1964) The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as α -lactalbumin.
Journal of Biological Chemistry, 242: 1391-1397.
5. G.Y. Wiederschain and D.S. Newburg (1996) Compartmentalization of fucosyltransferase and α -L-fucosidase in human milk.
Biochemical and Molecular Medicine, 58: 211-220.

6. B.A. Macher, E.H. Holmes, S.J. Swiedler, C.L.M. Stuls and C.A. Srnka (1991) Human α 1-3 fucosyltransferases.
Glycobiology 1: 577-584.
7. M.M. Palcic (1994) Glycosyltransferases in glycobiology.
Methods in Enzymology, 230: 300-317.
8. Z. Guo and P.G. Wang (1997) Utilization of glycosyltransferases to change oligosaccharide structures.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 68: 1-20.
9. A. Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, M.A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien and P. Delannoy (2001) The human sialyltransferase family.
Biochimie, 83: 727-737.
10. C. Kunz, S. Rudloff, W. Baier, N. Klein and S. Strobel (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects.
Annual Review of Nutrition, 20: 699-722.
11. T. Urashima, S. Asakuma and M. Messer (2007) Milk oligosaccharides.
Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology, Vol.4 (J. Kamerling, G.-J. Boons, Y. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi

and A.G.J. Joragen Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands: pp. 694-724.

12. S. Haeuw-Fievre, J.M. Wieruszeski, Y. Plancke, J.C. Michalski, J. Montreuil and G. Strecker (1993) Primary structure of human milk octa-, dodeca- and tridecasaccharides determined by a combination of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the para-lacto-*N*-octaose.

European Journal of Biochemistry, 215: 361-371.

13. D.S. Newburg and S.H. Neubauer (1995) Carbohydrates in milk: analysis, quantities, and significance.

Handbook of Milk Composition (R.G. Jensen Ed.), Academic Press, New York: pp. 273-349.

14. H. Yoshioka, K. Iseki and K. Fujita (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants.

Pediatrics, 72: 317-321.

15. H. Sakata, H. Yoshioka and K. Fujita (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns.

European Journal of Pediatrics, 144: 186-190.

16. B. Kleessen, H. Bunke, K. Tovar, J. Noack and G. Sawatzki (1995) Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants.
Acta Paediatrica, 84: 1347-1356.
17. S. Fanaro, R. Chierici, P. Guerrini and V. Vigi (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development.
Acta Paediatrica Supplementum, 91: 48-55.
18. B. Andersson, O. Porras, L.A. Hanson T. Lagergård and C. Svanborg-Edén (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides.
Journal of Infectious Diseases, 153: 232-237.
19. I.J. Rosenstein, M.S. Stoll, T. Mizuochi, R.A. Childs, E.F. Hounsell and T. Feizi (1988) New type of adhesive specificity revealed by oligosaccharide probes in *Escherichia coli* from patients with urinary tract infection.
Lancet, 2 (8624): 1327-1330.
20. G.V. Coppa, O. Gabrielli, P. Giorgi, C. Catassi, M.P. Montanari, P.E. Varaldo and B.L. Nichols (1990) Preliminary study of breastfeeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells.

Lancet, 335 (8689): 569-571.

21. A. Cravioto, A. Tello, H. Villafán, J. Ruiz, S. del Vedovo and J.R. Neeser (1991) Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *Journal of Infectious Diseases*, 163: 1247-1255.
22. I.J. Rosenstein, C.T. Yuen, M.S. Stoll and T. Feizi (1992) Differences in the binding specificities of *Pseudomonas aeruginosa* M35 and *Escherichia coli* C600 for lipid-linked oligosaccharides with lactose-related core regions. *Infection and Immunity*, 60: 5078-5084.
23. N. Devaraj, M. Sheykhnazari, W.S. Warren and V.P. Bhavanandan (1994) Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins. *Glycobiology*, 4: 307-316.
24. T. Idota, H. Kawakami, Y. Murakami and M. Sugawara (1995) Inhibition of cholera toxin by human milk fractions and sialyllactose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59: 417-419.
25. J.B. Miller and P. McVeagh (1997) Human milk oligosaccharides: only the breast.

Journal of Paediatrics and Child Health, 33: 281-286.

26. J.V. Mysore, T. Wigginton, P.M. Simon, D. Zopf, L.M. Heman-Ackah and A. Dubois (1999) Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound.

Gastroenterology, 117: 1316-1325.

27. G.V. Coppa, S. Brui, L. Zampini, T. Galeazzi, R. Capretti, B. Facinelli and O. Gabrielli (2000) Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* and *Salmonella fyris*.

20th *International Carbohydrate Symposium*, C-029.

28. N. Sharon and I. Ofek (2000) Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases.

Glycoconjugate Journal, 17: 659-664.

29. S. Martín-Sosa, M.J. Martín and P. Hueso (2002) The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains.

Journal of Nutrition, 132: 3067-3072.

30. G.M. Ruiz-Palacios, L.E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia and D.S. Newburg (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and

fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection.

Journal of Biological Chemistry, 278: 14112-14120.

31. A.L. Morrow, G.M. Ruiz-Palacios, X. Jiang and D.S. Newburg (2005) Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea.

Journal of Nutrition, 135: 1304-1307.

32. D.S. Newburg, G.M. Ruiz-Palacios and A.L. Morrow (2005) Human milk glycans protect infants against enteric pathogens.

Annual Review of Nutrition, 25: 37-58.

33. M.A. Naarding, I.S. Ludwig, F. Groot, B. Berkhout, T.B. Geijtenbeek, G. Pollakis and W.A. Paxton (2005) Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4⁺ T lymphocytes.

Journal of Clinical Investigation, 115: 3256-3264.

34. T. Urashima, T. Saito, T. Nakamura and M. Messer (2001) Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals.

Glycoconjugate Journal, 18: 357-371.

35. M. Messer and K.R. Kerry (1973) Milk carbohydrates of the echidna and the platypus.

Science, 180: 201-203.

36. M. Messer, P.A. Gadiel, G.B. Ralston and M. Griffiths (1983)
Carbohydrates of the milk of the platypus.

Australian Journal of Biological Science, 36: 129-137.

37. G.A. Jenkins, J.H. Bradbury, M. Messer and E. Trifonoff (1984)
Determination of the structures of fucosyl-lactose and
difucosyl-lactose from the milk of monotremes, using ^{13}C -n.m.r.
spectroscopy.

Carbohydrate Research, 126: 157-161.

38. J. Amano, M. Messer and A. Kobata (1985) Structures of the
oligosaccharides isolated from milk of the platypus.

Glycoconjugate Journal, 2: 121-135.

39. M. Messer (1974) Identification of N-acetyl-4-O-acetylneuraminyl-
lactose in echidna milk.

Biochemical Journal, 139: 415-420.

40. J.P. Kamerling, L. Dorland, H. van Halbeek, J.F. Vliegthart, M.
Messer and R. Schauer (1982) Structural studies of
4-O-acetyl-alpha-N-acetylneuraminyl-(2 goes to 3)-lactose, the
main oligosaccharide in echidna milk.

Carbohydrate Research, 100: 331-340.

41. M. Messer, E. Trifonoff, W. Stern, J.G. Collins and J.H. Bradbury (1980) Structure of a marsupial-milk trisaccharide. *Carbohydrate Research*, 83: 327-334.
42. J.G. Collins, J.H. Bradbury, E. Trifonoff, M. Messer (1981) Structures of four new oligosaccharides from marsupial milk, determined mainly by ^{13}C -n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 92: 136-140.
43. M. Messer and E. Trifonoff (1982) Structure of a branched tetrasaccharide from marsupial milk. *Carbohydrate Research*, 102: 316-320.
44. J.H. Bradbury, J.G. Collins, G.A. Jenkins, E. Trifonoff, M. Messer (1983) ^{13}C -N.m.r. study of the structures of two branched oligosaccharides from marsupial milk. *Carbohydrate Research*, 122: 327-331.
45. T. Urashima, T. Saito, Y. Tsuji, Y. Taneda, T. Takasawa and M. Messer (1994) Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from tammar wallaby (*Macropus eugenii*) milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1200: 64-72.
46. R. Kuhn and A. Gauhe (1965) Determination of the bonding-site of

sialic acid reduces by periodate oxidation.

Chemische Berichte, 98: 395-413.

47. F.A. Cumar, P.A. Ferchmin and R. Caputto (1965) ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A LACTOSE PHOSPHATE ESTER FROM COW COLOSTRUM.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 18: 60-62.

48. M.L. Schneir and M.E. Rafelson Jr. (1966) Isolation and characterization of two structural isomers of N-acetylneuraminyllactose from bovine colostrum.

Biochimica et Biophysica Acta, 130: 1-11.

49. R.W. Veh, J.C. Michalski, A.P. Corfield, M. Sander-Wewer, D. Gies and R. Schauer (1981) New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides.

Journal of Chromatography, 212: 313-322.

50. T. Saito, T. Itoh and S. Adachi (1984) Presence of two neutral disaccharides containing N-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms.

Biochimica et Biophysica Acta, 801: 147-150.

51. J. Parkkinen and J. Finne (1985) phosphorylated sialyl oligosaccharide from bovine colostrum.

Journal of Biological Chemistry, 260: 10971-10975.

51. J. Parkkinen and J. Finne (1987) Isolation of sialyl oligosaccharides and sialyl oligosaccharide phosphates from bovine colostrum and human urine.

Methods in Enzymology, 187: 289-300.

52. T. Saito, T. Itoh and S. Adachi (1987) Chemical structure of three neutral trisaccharides isolated in free form from bovine colostrum.

Carbohydrate Research, 165: 43-51.

53. T. Urashima, T. Saito, K. Ohmisya and K. Shimazaki (1991) Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrum, including the novel trisaccharide; GalNAc alpha 1-3Gal beta 1-4Glc.

Biochimica et Biophysica Acta, 1073: 225-229.

54. T. Urashima, T. Sakamoto, H. Ariga and T. Saito (1989) Structure determination of three neutral oligosaccharides obtained from horse colostrum.

Carbohydrate Research, 194: 280-287.

55. T. Urashima, T. Saito and T. Kimura (1991) Chemical structures of three neutral oligosaccharides obtained from horse (thoroughbred) colostrum.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 100: 177-183.

56. T. Nakamura, S. Amikawa, T. Harada, T. Saito, I. Arai and T. Urashima (2001) Occurrence of an unusual phosphorylated N-acetyllactosamine in horse colostrum.

Biochimica et Biophysica Acta, 1525: 13-18.

57. T. Urashima, T. Saito, J. Nishimura and H. Ariga (1989) New galactosyllactose containing alpha-glycosidic linkage isolated from ovine (*Booroola dorset*) colostrum.

Biochimica et Biophysica Acta, 992: 385-378.

58. T. Nakamura, T. Urashima, M. Nakagawa and T. Saito (1998) Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum.

Biochimica et Biophysica Acta, 1381: 286-292.

59. T. Urashima, W.A. Bubb, M. Messer, Y. Tsuji and Y. Taneda (1994) Studies of the neutral trisaccharides of goat (*Capra hircus*) colostrum and of the one- and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR spectra of 6'-N-acetylglucosaminyllactose.

Carbohydrate Research, 262: 173-184.

60. T. Urashima, S. Murata and T. Nakamura (1997) Structural determination of monosialyl trisaccharides obtained from caprine colostrum.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 116: 431-435.

61. D. Viverge, L. Grimmonprez and M. Solere (1997) Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from goat (*Capra hircus*) milk.

Biochimica et Biophysica Acta, 1336: 157-164.

62. W.A. Bubb, T. Urashima, K. Kohso, T. Nakamura, I. Arai and T. Saito (1999) Occurrence of an unusual lactose sulfate in dog milk.

Carbohydrate Research, 318: 123-128.

63. T. Urashima, Y. Kusaka, T. Nakamura, T. Saito, N. Maeda and M. Messer (1997) Chemical characterization of milk oligosaccharides of the brown bear, *Ursus arctos yesoensis*.

Biochimica et Biophysica Acta, 1334: 247-255.

64. T. Urashima, W. Sumiyoshi, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, T. Komatsu and T. Tsubota (1999) Chemical characterization of milk oligosaccharides of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*.

Biochimica et Biophysica Acta, 1472: 290-306.

65. T. Urashima, T. Nakamura, K. Teramoto, I. Arai, T. Saito, T. Komatsu and T. Tsubota (2004) Chemical characterization of sialyl oligosaccharides in milk of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus*

japonicus.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 139: 587-595.

66. T. Urashima, T. Yamashita, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, A.E. Derocher and O. Wiig (2000) Chemical characterization of milk oligosaccharides of the polar bear, *Ursus maritimus*.

Biochimica et Biophysica Acta, 1475: 395-408.

67. T. Urashima, H. Nagata, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, K. Imazu, T. Hayashi, A.E. Derocher and O. Wiig (2003) Differences in oligosaccharide pattern of a sample of polar bear colostrum and mid-lactation milk.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 136: 887-896.

68. T. Nakamura, T. Urashima, T. Mizukami, M. Fukushima, I. Arai, T. Senshu, K. Imazu, T. Nakao, T. Saito, Z. Ye, H. Zuo and K. Wu (2003) Composition and oligosaccharides of a milk sample of the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 135: 439-448.

69. T. Urashima, M. Yamamoto, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Namiki, K. Yamaoka and K. Kawahara (1999) Chemical characterisation of the oligosaccharides in a sample of milk of a white-nosed coati, *Nasua narica* (Procyonidae: Carnivora).

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 123: 187-193.

70. T. Urashima, T. Nakamura, A. Ikeda, S. Asakuma, I. Arai, T. Saito and O.T. Oftedal (2005) Characterization of oligosaccharides in milk of a mink, *Mustela vison*.
Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 142: 461-471.
71. T. Urashima, Y. Hiramatsu, S. Murata, T. Nakamura and M. Messer (1997) Identification of 2'-fucosyllactose in milk of the crabeater seal (*Lobodon carcinophagus*).
Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 116: 311-314.
72. T. Urashima, M. Arita, M. Yoshida, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, J.P. Arnould, K.M. Kovacs and C. Lydersen (2001) Chemical characterisation of the oligosaccharides in hooded seal (*Cystophora cristata*) and Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) milk.
Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 128: 307-323.
73. T. Urashima, T. Nakamura, K. Yamaguchi, J. Munakata, I. Arai, T. Saito, C. Lydersen and K.M. Kovacs (2003) Chemical characterization of the oligosaccharides in milk of high Arctic harbour seal (*Phoca vitulina vitulina*).
Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 135: 549-563.
74. T. Urashima, T. Nakamura, D. Nakagawa, M. Noda, I. Arai, T. Saito,

- C. Lydersen and K.M. Kovacs (2004) Characterization of oligosaccharides in milk of bearded seal (*Erignathus barbatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 138: 1-18.
75. T. Urashima, H. Sato, J. Munakata, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Tetsuka, Y. Fukui, H. Ishikawa, C. Lydersen and K.M. Kovacs (2002) Chemical characterization of the oligosaccharides in beluga (*Delphinapterus leucas*) and Minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) milk. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 132: 611-624.
76. T. Urashima, M. Kobayashi, S. Asakuma, Y. Uemura, I. Arai, K. Fukuda, T. Saito, T. Mogoe, H. Ishikawa and Y. Fukui (2007) Chemical characterization of the oligosaccharides in Bryde's whale (*Balaenoptera edeni*) and Sei whale (*Balaenoptera borealis lesson*) milk. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 132: 611-624.
77. C. Kunz, S. Rudloff, W. Schad and D. Braun (1999) Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *British Journal of Nutrition*, 82: 391-399.
78. Y. Uemura, S. Asakuma, L. Yon, T. Saito, K. Fukuda, I. Arai and T. Urashima (2006) Structural determination of the oligosaccharides in

the milk of an Asian elephant (*Elephas maximus*).

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 145: 468-478.

79. J.A. Sturman, Y.Y. Lin, T. Higuchi, J.H. Fellman (1985)
N-acetylneuramin lactose sulfate: a newly identified nutrient in
milk.

Pediatrics Research, 19: 216-219.

80. H. U. Choit and R. Carubelli (1968) Neuramin-lactose,
Neuramin-lactose sulfate, and lactose sulfate from rat mammary
glands. Isolation, purification, and permethylation studies.

Biochemistry, 7: 4423-4430.

81. H.S. Barra and R. Caputto (1965) Isolation and identification of a
lactose sulphate ester from rat mammary gland.

Biochimica et Biophysica Acta, 101: 367-369.

82. N.J. Kuhn (1972) The lactogenic action of human chorionic
gonadotrophin in the rat.

Biochemical Journal, 129: 495-496.

83. W.F. Naccarato, R.E. Ray and WW. Wells (1975) Characterization
and tissue distribution of 6-O-beta-D-galactopyranosyl myo-inositol
in the rat.

Journal of Biological Chemistry, 250: 1872-1876.

84. P. Purdie (1885) Chemical composition of milk of the porpoise.
Chemical News Journal of Physics and Science, 52, 170.
85. P.B. Best, P.A.S. Canham, N. Macleod (1984) Patterns of reproduction in sperm whales, *Physeter macrocephalus*.
Reports of the International Whaling Commission (Special issue), 132, 1-84.
86. P.B. Best (1982) Seasonal abundance, feeding, reproduction, age and growth in minke whales off Durban (with incidental observations from the Antarctic).
Reports of the International Whaling Commission, 32, 759-786.
87. S. Ridgway, T. Kamolnick, M. Reddy and C. Curry, (1995) Orphaned-induced lactation in *Tursiops* and analysis of collected milk.
Marine Mammal Science, 11, 172-182.
88. R. Jenness and D.K. Odell (1978) Composition of milk of the pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*).
Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 61, 383-386.
89. V.M. Peddemors, H.J.H. de Muelenaere and K. Devchand (1989) Comparative milk composition of the bottlenose dolphin (*Tursiops*

truncatus), humpback dolphin (*Sousa plumbea*) and common dolphin (*Delphinus delphis*).

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 94, 639-941.

90. S. Pervaiz and K. Brew (1986) Composition of the milks of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*).

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 84, 357-360.

91. B.H. Lauer and B.E. Baker (1969) Whale milk. I. Fin whale (*Balaenoptera physalus*) and beluga whale (*Delphinapterus leucas*) milk: gross composition and fatty acid constitution.

Canadian Journal of Zoology, 45, 95-97.

92. D.E. Ullrey, C.C. Schwartz, P.A. Whetter, T. Rajeshwar Rao, J.R. Euber, S.G. Cheng and J.R. Brunner (1984) Blue-green color and composition of Stejneger's beaked whale (*Mesoplodon stejnegeri*) milk.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 79, 349-352.

93. P.F. Frankland and F.J. Hambly (1890) The composition of the milk of the bottle-nose dolphin (*Globicephalus melas*).

Chemical News Journal of Physics and Science, 61, 63.

94. L. Eichelberger, E.S. Fetcher, E.M.K. Geiling and B.J. Vos (1970)

The composition of dolphin milk.

Journal of Biological Chemistry, 134, 171-176.

95. J.C.D. White (1953) Composition of whales' milk.

Nature, 171, 612.

96. M.E. Gregory, S.K. Kon, S.J. Rowland and S.Y. Thompson (1955)

The composition of the milk of the blue whale.

Journal of Dairy Research, 22, 108-112.

97. K. Ohta, T. Watarai, T. Oishi, Y. Ueshiba, S. Hirose, T. Yoshizawa, Y. Akikusa, M. Sato and H. Okano (1955) Composition of fin whale milk.

The Scientific Reports of the Whales Research Institute, 10, 151-167.

97. H.W. Symons and R.D. Weston (1958) Studies on the humpback whale (*Megaptera nodosa*) in the Bellingshausen Sea.

Norsk Aalfongst-Tidende, 47, 53-81.

98. O.T. Oftedal (1993) The adaptation of milk secretion to the constraints of fasting in bears, seals, and baleen whales.

Journal of Dairy Science, 76, 3234-3246.

99. O.T. Oftedal (1997) Lactation in whales and dolphins: evidence of divergence between baleen- and toothed-species.

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2: 205-230.

100. 宮原弘和, 植田啓一 (2002) 飼育下における鯨類の繁殖.
勇魚, 36: 5-10.
101. K. West, J. Carpenter, S. Atkinson, J. Sweeney, B. Krames and J. Krames (2001) Changes in milk composition during lactation and the relationship to reproductive status in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*.
14th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, pp. 231-232.
102. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Revers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Analytical Chemistry, 28: 350-356.
103. G.W. Jourdian, L. Dean and S. Roseman (1971) The sialic acids XI. a periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides.
Journal of Biological Chemistry, 246: 430-435.
104. T. Nakamura, W.A. Bubb, T. Saito, I. Arai and T. Urashima (2000) An NMR study of the lactonization of alpha-N-acetylneuraminy1-(2--> 3)-lactose.

Carbohydrate Research, 329: 471-476.

105. Y. Uemura, S. Asakuma, T. Nakamura, I. Arai, M. Taki and T. Urashima (2005) Occurrence of a unique sialyl tetrasaccharide in colostrum of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).

Biochimica et Biophysica Acta, 1725: 290-297.

106. L. May-Collado and I. Agnarsson (2006) Cytochrome *b* and Bayesian inference of whale phylogeny.

Molecular Phylogenetics and Evolution, 38: 344-354.

107. T. Nakamura, H. Kawase, K. Kimura, Y. Watanabe, M. Ohtani, I. Arai and T. Urashima (2003) Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation.

Journal of Dairy Science, 86: 1315-1320.

108. S.I. Macvie, J.A. Morton and M.M. Pickles (1967) The reactions and inheritance of a new blood group antigen Sd a.

Vox Sanguinis, 13: 485-492.

109. P.H. Renton, P. Howell, E.W. Ikin, C.M. Giles and K.L.G. Goldsmith (1967) Anti-Sd a, a new blood group antibody.

Vox Sanguinis, 13: 493-501.

110. J.A. Morton, M.M. Pickles and A.M. Terry (1970) The Sd^a blood group antigen in tissues and body fluids.
Vox Sanguinis, 19: 472-482.
111. S. Spitalnik, M.T. Cox, J. Spennacchio, R. Guenther and N. Blumberg (1982) The serology of Sd^a effects of transfusion and pregnancy.
Vox Sanguinis, 42: 308-312.
112. J.A. Morton, M.M. Pickles and R.I. Vanhegan (1988) The Sd^a antigen in the human kidney and colon.
Immunological Investigations, 17: 217-224.
113. F. Seranfini-Cessi (1996) The Sd^a Antigen and Its Biosynthetic Enzyme: Differentiation-dependent and Onco-developmentally Regulated Expression.
Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 8: 279-295.
114. C.E. van Elk, M.W. van Dep Bildt, B.E. Martina, A.D. Osterhaus and T. Kuiken (2007) *Escherichia coli* septicemia associated with lack of maternally acquired immunity in a bottlenose dolphin calf.
Veterinary Pathology, 44: 88-92.
115. V. Zappulli, S. Mazzariol, L. Cavicchioli, C. Petterino, L. Bargelloni and M. Castagnaro (2005) Fatal necrotizing fasciitis

- and myositis in a captive common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) associated with *Streptococcus agalactiae*.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17: 617-622.
116. J.J. Evans, D.J. Pasnik, P.H. Klesius and S. Al-Ablani (2006) First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).
Journal of Wildlife Diseases, 42: 561-569.
117. C.M. Harper, C.A. Dangler, S. Xu, Y. Feng, Z. Shen, B. Sheppard, A. Stamper, F.E. Dewhirst, B.J. Paster and J.G. Fox (2000) Isolation and characterization of a *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins, *Lagenorhynchus acutus* and *Delphinus delphis*.
Applied and Environmental Microbiology, 66: 4751-4757.
118. A.P. Oxley, J.A. Argo and D.B. McKay (2005) *Helicobacter* spp. from captive bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.) and polar bears (*Ursus maritimus*).
Veterinary Journal, 170: 377-380.
119. K.G. McCullagh and E.W. Widdowson (1970) The milk of the African elephant.
British Journal of Nutrition, 24: 109-117.
120. J.M. Peters, R. Maier, B.E. Hawthorne and C.A. Storvick (1972)

Composition and nutrient content of elephant (*Elephas maximus*) milk.

Journal of Mammalogy, 53: 717-724.

121. G. Osthoff, H.O. De Waal, A. Hugo, M. de Wit and P. Botes (2005) Milk composition of a free-ranging African elephant (*Loxodonta africana*) cow during early lactation.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 141: 223-229.

122. G. Gronberg, P. Lipniunas, T. Lundgren, F. Lindh and B. Nilsson (1992) Structural analysis of five new monosialylated oligosaccharides from human milk.

Archives of Biochemistry and Biophysics, 296: 597-610.

123. J.E. Slater, (1961) Retentions of nitrogen and minerals by babies 1 week old.

British Journal of Nutrition, 15: 83-97.

124. G. Gronberg, P. Lipniunas, T. Lundgren, K. Erlansson, F. Lindh and B. Nilsson (1989) Isolation of monosialylated oligosaccharides from human milk and structural analysis of three new compounds.

Carbohydrate Research, 191: 261-278.

125. D. Vestweber and J.E. Blanks (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands.

Physiological Reviews, 79: 181-213.

126. M.J. Gnoth, S. Rudloff, C. Kunz and R.K.H. Kinne (2001) Investigation of the invitro transport of humanmilk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 34363-34370.

127. B. Wang, P. McVeagh, P. Petocz and J. Brand-Miller (2004) Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 1024-1029.