

# 総説 (平成13年度日本酪農科学賞受賞記念寄稿)

## ミルクオリゴ糖の比較生化学的解析

浦島 匡  
(帯広畜産大学畜産学部)

### Comparative Biochemistry of Milk Oligosaccharides

Tadasu Urashima

#### 1. はじめに

筆者がミルクオリゴ糖の解析研究に着手したのは、1986年に帯広畜産大学に着任してからである。筆者の出身大学である東北大学農学部の畜産利用学研究室（現動物資源化学研究室）では、当時の足立 達教授の指導下で須山亭三助手（現東北大学大学院農学研究科教授）、戸羽隆宏助手（現弘前大学農学部助教授）、大学院生の有原圭三氏（現北里大学獣医畜産学部助教授）、向井孝夫氏（現北里大学獣医畜産学部講師）らが乳酸菌の産生するオリゴ糖や多糖の解析研究をしており、糖の構造解析方法はかれらの研究に接することで学ぶことができた。また筆者以前に、研究室の先輩であり当時は東北福祉大学の助手であった齋藤忠夫氏（現東北大学大学院農学研究科動物資源化学研究室教授）がウシ中性ミルクオリゴ糖の研究をされていたこと、また後に留学先となったシドニー大学の Michael Messer 博士らの有袋類ミルクオリゴ糖の研究が Carbohydrate Research 誌などに次々と掲載されるのを見て、ミルクオリゴ糖研究に深い興味をいだいていた。

1986年にはじめて帯広の地を踏み、本州とは異なる広大な牧場、畑作風景にひかれ、市内や周辺地域にウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジなどを飼育している農家の多い環境の中にあって、念願であったミルクオリゴ糖研究を開始しようと思立った。また当時の帯広畜産大学酪農化学研究室内のスタッフも、試料採集には大いに協力してくれた。ミルクオリゴ糖研究も、当初は周辺地域の家畜を対象として行ったが、次第に野生動物を対象とするようになり、発見したオリゴ糖の構造に基づいて生理的意義の考察や、構造的知見に基づくオリゴ糖の産業的実用化も視野に入れてきている。

#### 2. ヒトミルクオリゴ糖

ヒトミルクオリゴ糖研究の歴史は古く、1958年に

Malpress と Hytten が10種類の中性オリゴ糖の構造を報告して以来、Kuhn, Montreuil, 木幡, Egge, 北川, Dabrowski, Grönberg らが続き、現在までに100種類以上の中性ならびに酸性オリゴ糖の化学構造が報告されている<sup>1)</sup>。MALDI-TOFMS 分析によると、1000種類ものヒトミルクオリゴ糖の存在が示唆されている<sup>1)</sup>。現在までに解析されているヒトミルクオリゴ糖は、化学構造に基づいて、Fig. 1 に示したような12系列のコア骨格に分類されている<sup>2)</sup>。それに結合するN-アセチルノイラミン酸やL-フコースの付加位置の違いによって、100種類ものバリエーションが構成される。

ヒトミルクオリゴ糖は初乳では21 g/l、常乳では12~14 g/l もの存在量があり、人乳中でラクトース、脂質につぐ3番目に多い固形分である<sup>1)</sup>。従来、その生理的役割は無視されてきたが、近年フコシルオリゴ糖には、病原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシンに対する中和作用ならびに *Campylobacter jejuni* の上皮細胞への付着阻止作用が、またラクト-N-ネオテトラオース (Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc) には *Streptococcus pneumoniae* の上皮細胞に対する付着阻止作用が認められ、病原性細菌やウィルスから乳児を守る感染防御因子と考えられている<sup>3)</sup>。また、3'-N-アセチルノイラミニルラクトース (Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc) には、*Helicobacter pylori* の上皮細胞への付着阻止やはぎとり効果が示唆されている<sup>4)</sup>。一方、酸性オリゴ糖に結合するシアル酸の一部は吸収されて、脳神経系のグリコシドへの合成素材として利用されることが示唆されている<sup>5,6)</sup>。

授乳した乳児において、ヒトミルクオリゴ糖の大半は吸収されないが、一部は吸収されて循環系を回り、その一部は尿に排泄されることが報告されている<sup>7,8)</sup>。ヒトミルクオリゴ糖の腸管吸収機構としては、一部はパラセルラー経路、一部は上皮細胞上のレセプターを介するものが考えられている<sup>9)</sup>。

ヒトミルクオリゴ糖は、すべてのドナーにおいて均一ではなく、ドナーのルイス式血液型や ABO 式血液型に

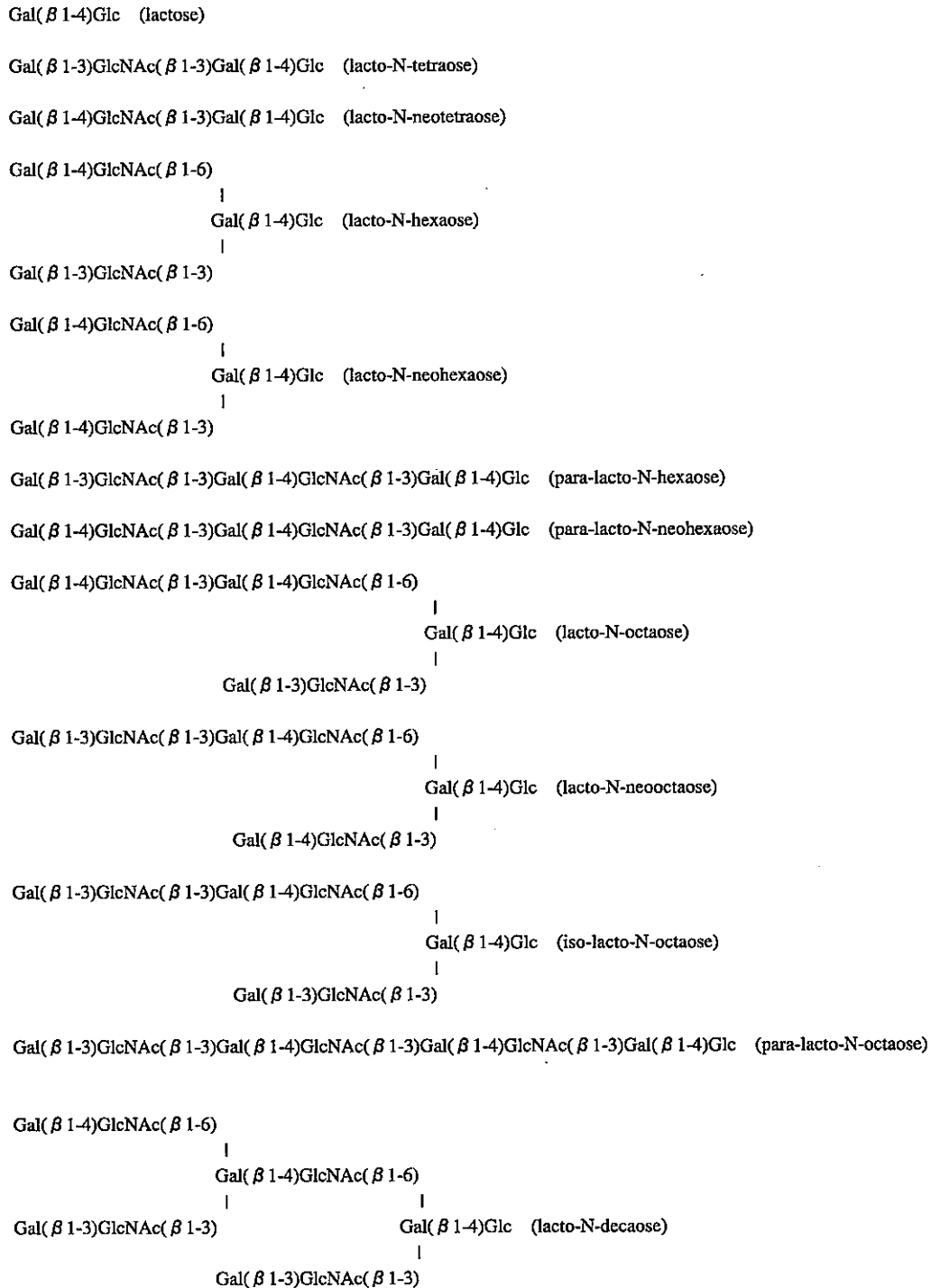


Fig. 1 12系列のヒトミルクオリゴ糖のコア構造

よる変動が知られている<sup>1)</sup>。また個々のオリゴ糖の量は、泌乳時期によって変動する<sup>10,11)</sup>。筆者らのグループも、16人のドナーを対象として12種の代表的な中性オリゴ糖を、泌乳開始後4日、10日、30日、90日の泌乳時期ごとに定量し、イタリア人の報告されているデータとは異なる各オリゴ糖の変動パターンを明らかにしている<sup>12)</sup>。

### 3. 家畜(ウシ, ウマ, ヤギ, ヒツジ)やペット(イヌ)のミルクオリゴ糖

ウシ初乳の酸性オリゴ糖については、Kuhnら、Rafelsonら、Vehら、Parkkinenらによって11種の存在が明らかにされている<sup>13)</sup>。中性オリゴ糖は、1984年

## ウシ

GalNAc(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)GlcNAc

Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc

GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-3)[Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-3)Gal

Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Gc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Gc(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc

Neu5Gc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc

Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc-α 1-PO<sub>4</sub>Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc-6-PO<sub>4</sub>

## ウマ

Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-3)[Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)[Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)GlcNAc-α 1-phosphate

## ヤギ

Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc

Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Gc(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc

Gal(β 1-3)[Neu5Ac(α 2-6)]Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-6)[Neu5Ac(α 2-3)]Gal(β 1-4)Glc

## ヒツジ

Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Gc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

Neu5Gc(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc

## イヌ

Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc

Gal(β 1-4)Glc-3'-sulfate

Fig. 2 ウシ, ウマ, ヤギ, ヒツジ初乳ならびにイヌ乳に含まれるオリゴ糖

と1987年に齋藤によって5種の化学構造が報告された<sup>14,15)</sup>。齋藤らの仕事の中で、天然界ではじめての遊離のN-アセチルラクトサミンやフコシルN-アセチルラ

クトサミン(ルイスx3糖)の発見が注目される。

ウシ, ウマ, ヤギ, ヒツジの初乳, またイヌ乳において, 上記の研究者らや筆者らによって解析されたオリゴ

糖を Fig. 2 に示した<sup>16-25</sup>)。ウシの酸性オリゴ糖において、N-アセチルノイラミン酸とともにN-グリコシルノイラミン酸の2種のシアル酸の認められる点がヒトの酸性オリゴ糖と異なる点である。またヒツジの酸性オリゴ糖では、N-グリコシルノイラミン酸の方が優先的である<sup>24</sup>)。酸性オリゴ糖の中でシアル酸の $\alpha 2-3$  また  $\alpha 2-6$  結合をもつ糖の割合において、ヒト、ヤギでは  $\alpha 2-6$  結合の方が優先的<sup>21</sup>)、ウシ、ヒツジでは  $\alpha 2-3$  結合の方が優先的であり<sup>24</sup>)、ウマでは  $\alpha 2-3$  結合のみしか検出されなかった<sup>25</sup>)。

ウシの酸性オリゴ糖含量は、分娩直後が高く、その後激減する<sup>26</sup>)。ヒトの場合も初乳期にオリゴ糖含量の高いことが知られているが、常乳期においてウシほど極端な低下は認められない。また、ウシ初乳に検出された4種のガラクトシルラクトースは、ヤクルトの木村らによると常乳期でもその存在が確認されている<sup>23</sup>)。

Neu5Gc( $\alpha 2-3$ )Gal( $\beta 1-4$ )Glc という糖鎖は、ブタなどに感染する *Escherichia coli* k99の産生するエンテロトキシンのレセプターであることが知られているが<sup>27</sup>)、ウシやヒツジの初乳に含まれる同様の糖鎖構造をもつ遊離のミルクオリゴ糖は、同トキシンに対する中和剤としてウシやヒツジの乳仔を守っていることが予想される。

上記のオリゴ糖の解析を通じて、筆者らの新規に発見したオリゴ糖の中には重要な生理的意義の示唆されるものがある。その1つは Gal( $\alpha 1-3$ )Gal( $\beta 1-4$ )Glc (イソグロボトリオース) である。その遊離オリゴ糖としては筆者らがヒツジ初乳中に見いだしたのが最初であるが<sup>16</sup>)、ウシ初乳<sup>18</sup>)、ヤギ初乳<sup>20</sup>)、クマ3種 (ヒグマ、

ツキノワグマ、シロクマ) の乳<sup>28-30</sup>)、ハナジロハナグマ乳<sup>31</sup>)、ゾウ乳<sup>32</sup>)など広範囲な種でその存在が確認された。人乳には発見されていない。この糖鎖は、家畜の激しい下痢を引き起こす *Clostridium difficile* の産生するトキシンAのレセプター構造であることが知られているので<sup>33</sup>)、乳中のイソグロボトリオースは、トキシンA中和剤として乳仔の下痢を防止していることが予想される。また、同3糖はブタからヒトへの異種臓器移植時の免疫緩和剤としての用途も期待されている。

上記のように、ウシやヒツジの初乳には Neu5Ac/5Gc( $\alpha 2-3$ )Gal( $\beta 1-4$ )Glc が存在するが、その20~30%は、シアル酸の1位カルボキシル基と隣接ガラクトースまたシアル酸自身のOH基との間で脱水したラクトン型 (シアリルラクトースラクトン) であることが、中村らによって発見された<sup>24</sup>) (Fig. 3 参照)。中村らはウシ初乳におけるシアリルラクトースラクトンの定量も行い、同ラクトンは泌乳開始後24時間以内の乳に限って存在することを明らかにした<sup>34</sup>)。シアリルラクトースには、インフルエンザウィルスやロタウィルスが上皮細胞に付着するのを阻止する働きが示唆されているが、そのシアル酸残基がウィルスのノイラミニダーゼにより遊離されると、その能力を失う。しかしながら、同ラクトンはウィルスに対する加水分解抵抗性も示唆されるので、通常型のシアリルラクトースよりも持続的な同ウィルス付着阻止効果が期待される。シアリルラクトースラクトンは、シアリルラクトースを酢酸中で3日間放置しても生成されるが<sup>35</sup>)、ウシ初乳からの同ラクトンの調製方法が齋藤らによって開発されており、その利用も

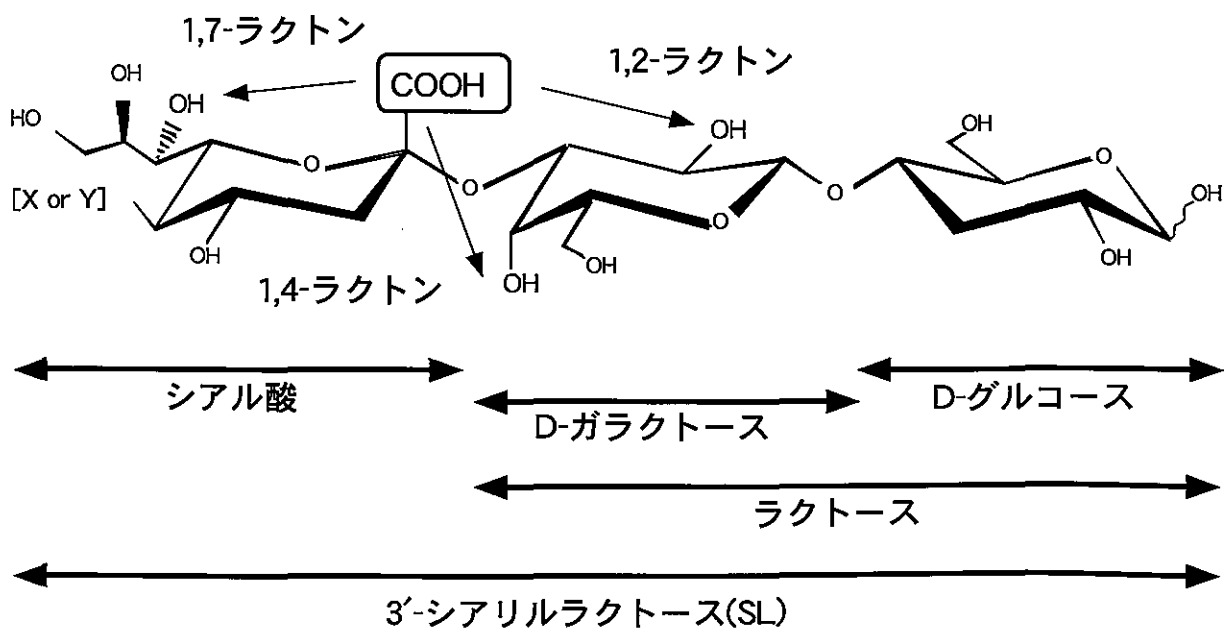


Fig. 3 3'-シアリルラクトースのラクトン化可能な3位置

現実のものになりつつある<sup>36)</sup>。

中村らは、ウマの初乳からリン酸基をもつミルクオリゴ糖として Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc- $\alpha$ 1-phosphate を発見した<sup>25)</sup>。また中村らは、MALDI-TOFMS 分析に基づいて、そのリン酸基数を2と推定している。一方、ウシ初乳からも Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc- $\alpha$ 1-phosphate ならびに Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-6-phosphate が発見されている<sup>37)</sup>。これらのリン酸化オリゴ糖の生理的意義として、乳汁中においてリン酸カルシウムの沈殿を防ぎ、乳仔腸管内でカルシウムの吸収を促進していることが示唆される。現在までにリン酸基を含むミルクオリゴ糖が検出された例は、ウシとウマの初乳においてのみであるが、その存在は特定の種に特異的であるのか、それとも広範囲な種に認められるのか興味のもたれるところである。

一方 Bubb と筆者らは、イヌ乳において Gal( $\beta$ 1-4)Glc-3'-O-sulfate を発見した<sup>38)</sup>。硫酸基を含むミルクオリゴ糖としては、これまでにラット乳で Gal( $\beta$ 1-4)Glc-6'-O-sulfate, Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc-6'-O-sulfate の存在が報告されているとともに<sup>39-41)</sup>、人乳でも同様の N-アセチルノイラミニラクトース 6'-O-sulfate の存在が示唆されている<sup>41)</sup>。さらに人乳には、GlcNAc 残基の6位が硫酸化されたフコシルオリゴ糖も同定されている<sup>42)</sup>。一方、ラットの泌乳期乳腺に放射線ラベルした無機硫酸塩を注入すると、乳中に放射線活性をもつ N-アセチルノイラミニラクトース-O-sulfate が検出されると同時に、授乳したラット乳仔の肝臓や脳に放射線活性をもつ無機硫酸塩が移行することが報告されている<sup>41)</sup>。この事実は、硫酸化ミルクオリゴ糖

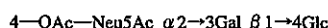
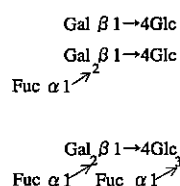
は、乳仔の脳や網膜の形成に必要な硫酸基を母親から乳仔へ運搬する役割をもっていることを示唆している。硫酸化ミルクオリゴ糖も、ヒト、イヌ、ラット以外でも広範囲な種に認められるか興味もたれる。それは牛乳には見つかっていないが、上のような役割を考慮すれば、牛乳を原料として製造されるヒト用育児用調製粉乳にも硫酸化オリゴ糖の添加が望まれる。

#### 4. 野生動物 (ワラビー、クマ、ハナグマ、アザラシ、フサオマキザル) のミルクオリゴ糖

筆者は1991年3月-12月に、単孔類 (カモノハシ、ハリモグラ) や有袋類 (タマーワラビー、アカカンガルー) のミルクオリゴ糖研究や単孔類の  $\alpha$ -ラクトアルブミン研究で非常にユニークな研究成果をあげてきた、シドニー大学生化学部門の Michael Messer 博士のところに留学し、タマーワラビー (カンガルーに似た小型の有袋類) の泌乳期乳腺における  $\beta$ 6N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの同定と性質の解析に関する研究を行った<sup>43)</sup>。ミルクオリゴ糖の生理的意義を知るためには、乳中でオリゴ糖含量、種類とも豊富な哺乳動物種に着目することが重要であると従来から考えていたが、この留学を機会に筆者のミルクオリゴ糖研究は家畜から野生動物へと展開していくこととなった。

Fig. 4, Fig. 5 に、Messer を中心として構造決定された単孔類<sup>44-48)</sup>とタマーワラビー<sup>49-55)</sup>のミルクオリゴ糖を示した。単孔類、有袋類とも乳中でラクトースよりも3糖以上のオリゴ糖の方が圧倒的に多い<sup>44,51)</sup>。タマーワラビー乳は最大で13%もの高濃度の糖質を含むが、オ

#### ①ハリモグラのミルクオリゴ糖



#### ②カモノハシのミルクオリゴ糖

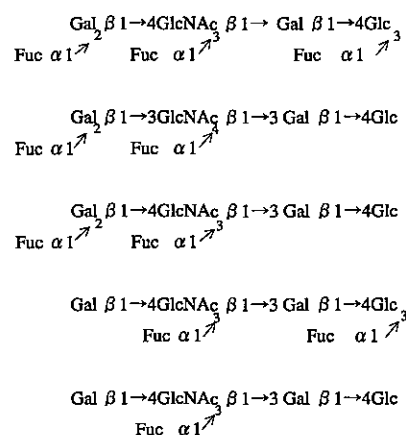
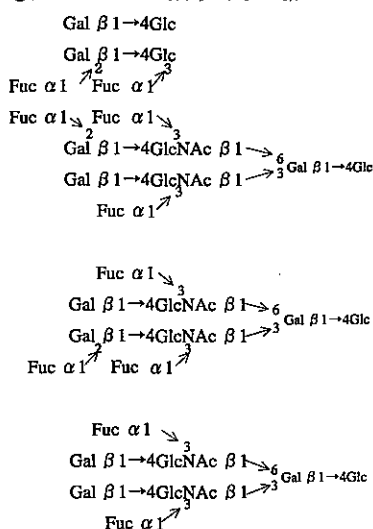


Fig. 4 単孔類のミルクオリゴ糖

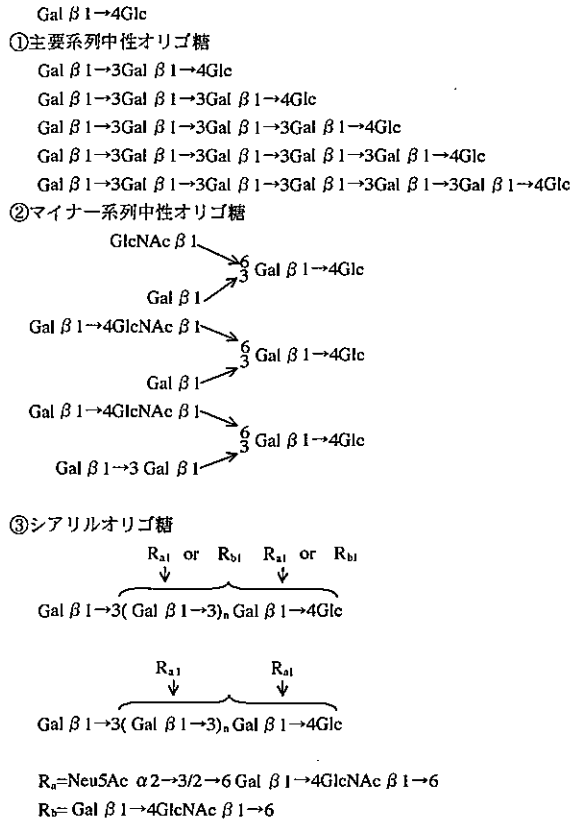


Fig. 5 タマーワラビー(有袋類)のミルクオリゴ糖

リゴ糖の平均鎖長は6糖であって、オリゴ糖の分子量の大きいことが、高濃度の糖質であっても乳の高浸透圧を招かないようなくみとなっている。ハリモグラの Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc の N-アセチルノイラミン酸の4位がO-アセチル化されている点が、多種のシアリルオリゴ糖にはない点で注目される<sup>47,48</sup>。カモノハシのラクト-N-ネオテトラオースまたラクト-N-ネオヘキサオース (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]Gal( $\beta$ 1-4)Glc) を含む高級オリゴ糖は、高度にフコシル化されているが<sup>46</sup>、構造の類似したオリゴ糖は人乳にも認められる。一方、Gal( $\beta$ 1-3)残基の2個以上つながったタマーワラビーの主要オリゴ糖は、真獣類の乳から発見されておらず、ミルクオリゴ糖に関していえば、単孔類の方が有袋類よりも真獣類に近いといえる。

単孔類、有袋類とも哺乳動物種の大半をしめる真獣類(有胎盤類)とは進化的位置において隔たっており、乳中でラクトースよりもオリゴ糖の方が多いパターンは、これらの種に限定されるものかどうかの謎が生じていた。1972年にクマの種の乳ではラクトースは少量で、3糖の方が多ことを示唆するペーパークロマトグラムを載せた論文が出版されていたので、筆者は Messer 博士の示唆の下でクマ乳に着目し、エゾヒグマ、ツキノワグマ、

シロクマの乳の糖質の分析を行った。

クマ3種の構造決定されたミルクオリゴ糖を Fig. 6, Fig. 7 に示した<sup>28-30</sup>。3種とも乳中においてラクトースは少量で、イソグロボトリオースをはじめとするオリゴ糖の方が圧倒的に存在量の多いパターンを示した。3種のミルクオリゴ糖はともにラクトース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-ネオヘキサオースをコア骨格としていたが、クマ種間においてミルクオリゴ糖の変動が観察された。糖鎖の非還元末端側に  $\alpha$ -Gal エピトープ (Gal( $\alpha$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc(NAc)) を含むオリゴ糖は3種に共通して認められたものの、非還元末端側にヒト血液型A抗原 (GalNAc( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal), B抗原 (Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal) またH抗原 (Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal) を含むオリゴ糖の存在パターンに種間差が認められた。またシロクマにおいては、分析した2個体の乳においてもABH抗原を含むオリゴ糖に違いが観察された。この分析によって、ヒグマ乳にはH抗原を含むオリゴ糖が、ツキノワグマ乳にはB抗原を含むオリゴ糖が、シロクマ乳にはA抗原を含むオリゴ糖、またA抗原やB抗原を含むオリゴ糖が発見された。このようなミルクオリゴ糖の変動は、クマの種間差によるものか個体差なのか、分析された試料数が少ないので、現段階では何ともいえない。

ABH抗原はヒトなどの赤血球膜の糖脂質の糖鎖には広く分布しているが、乳などの分泌液での遊離オリゴ糖におけるその存在に関して言えば、話は複雑である。ヒトの場合、唾液や尿に血液型物質が分泌される分泌型のドナーと分泌されない非分泌型のドナーの存在が知られている。分泌型でA型血液型の妊婦の尿からはA4糖 (GalNAc( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal( $\beta$ 1-4)Glc) とA5糖 (GalNAc( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)Glc] が、分泌型でB型血液型の妊婦の尿からはB5糖 (Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]Glc) が発見されている<sup>56</sup>。一方、分泌型かつA型の女性の乳にはA4糖は発見されているものの、A5糖、A6糖、A7糖などは検出されない<sup>57</sup>。分泌型かつB型の女性の乳には、B抗原を含むミルクオリゴ糖は報告されていない<sup>58</sup>。クマ乳における多種類のA抗原やB抗原を含むミルクオリゴ糖の存在は、極めて特徴的である。

一方、クマ乳に多い  $\alpha$ -Gal エピトープを含むミルクオリゴ糖は、人乳には見つかっていない。 $\alpha$ -Gal エピトープは、霊長目では旧世界ザル以降の進化で失われたと言われており、ヒトではミルクオリゴ糖のみならず、複合糖質糖鎖にも認められない。このユニットはヒトにとっては抗原である。

ラクトースよりもミルクオリゴ糖の方が多いパターンは、真獣類ではクマにだけ特徴的なのか、また上のような特徴的なオリゴ糖はクマにのみ認められるのか明らか

	シロクマ	ツキノワグマ	エゾヒグマ
Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2)	●	●	
GalNAc(α1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2)	▲		
Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)		●	
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2)	●		
GalNAc(α1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)	▲		
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)			■
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)		●	
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-4)Glc		●	
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)		●	
Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)			
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-4)Glc		●	
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Fuc(α1-3)			
Fuc(α1-2) Fuc(α1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-4)Glc			■
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)			

Fig. 6 シロクマ, ツキノワグマ, エゾヒグマの A(▲), B(●)および H(■)抗原を含むミルクオリゴ糖

にするために、食肉目の中でクマに系統的に近いハナジロハナグマ (アライグマ科)<sup>31)</sup>とズキンアザラシ (アザラシ科)<sup>59)</sup>のミルクオリゴ糖の解析を行った。Fig. 8 に両種のミルクオリゴ糖と、比較としてのエゾヒグマのミルクオリゴ糖を示した。

ハナジロハナグマの乳において、ラクトースと3糖の量はおよそ等量であり、また高級オリゴ糖も含まれていた<sup>31)</sup>。ハナグマミルクオリゴ糖は、ラクトース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-ネオヘキサオースをコア骨格とし、非還元末端側に α-Gal エピトープ または H 抗原を付加していた。それらは、GlcNAc 残基がフコシル化していないという点を除けば、エゾヒグマのミルクオリゴ糖と構造的によく似ている。

一方、ズキンアザラシ乳の糖質画分において、大半を占めるのは糖タンパク質/糖ペプチドと考えられる成分であり、遊離のラクトースやオリゴ糖含量は少なかったが、ラクトースと同程度量の 2'-フコシルラクトースの他、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-ネオヘキサオース、パララクト-N-ネオヘキサオース (Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)

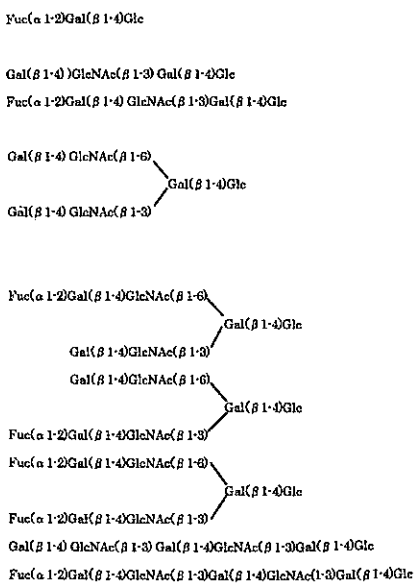
Glc) やそれに H 抗原が付加したオリゴ糖が発見された<sup>59)</sup>。α-Gal エピトープの存在が認められなかったことが、クマやハナグマのミルクオリゴ糖とは異なる点である。

一方、鯨脚目の中でもアシカ科のオーストラリアオットセイ<sup>59)</sup>やキタオットセイ<sup>60)</sup>、カルフォルニアアシカ<sup>61)</sup>の乳には、ラクトースもオリゴ糖も発見されていない。カルフォルニアアシカの乳には α-ラクトアルブミンも検出されないと報告されているが<sup>62)</sup>、アシカ科の乳におけるラクトースや遊離オリゴ糖の不在は、ラクトース合成酵素系の一つのタンパク質である α-ラクトアルブミンの乳腺中での未発現と関係あるであろう。これらの海棲哺乳動物の乳仔は、エネルギーの獲得を乳中の糖質ではなく脂質に依存していると言われていたが、アシカ科においては、α-ラクトアルブミンが発現されなくなりラクトースの合成能が失われたのに対し、アザラシ科においては若干ながらその発現が残存し、少量のラクトースやオリゴ糖が生合成されているものと予想される。この点においては、アザラシ科の方がアシカ科よりも陸棲からの進化の形跡を残しているといえる。

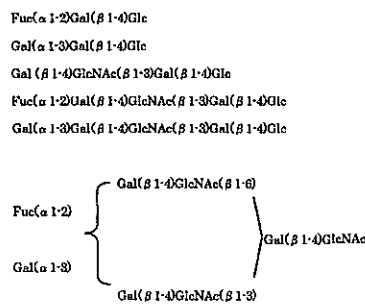
	シロクマ	ツキノワグマ	エゾヒグマ
Gal(β1-4)Glc*	△	△	△
Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc	○	○	○
Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc*	■	■	■
Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3)	○	○	
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	○		
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3)	○	○	○
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3) Fuc(α1-3)	○	○	
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-4)Glc	○		
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Fuc(α1-3)	○		
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3)	○	○	○
Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Fuc(α1-3)			

Fig. 7 シロクマ, ツキノワグマ, エゾヒグマの α-Gal エピトープ(○)を含むミルクオリゴ糖  
\*α-Gal エピトープを含まない

ズキンアザラシ



ハナジロハナグマ



エゾヒグマ

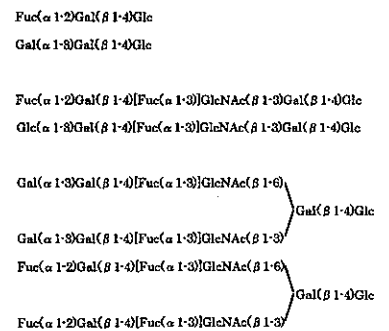


Fig. 8 ズキンアザラシ, ハナジロハナグマおよびエゾヒグマのミルクオリゴ糖



クマ科, アザラシ科とも乳中での脂質含量が高い(20~50%)一方で, 糖質含量は低い(1~2%)。その現象は, これらの乳仔が, エネルギーの獲得を糖質ではなく脂質に依存していることと関係があるであろう。しかしながらクマ乳におけるオリゴ糖の高含量と豊富な種類の存在は, クマ乳仔において, エネルギーソースとしては異なるこれらの重要な生理的意義を示唆するものである。前述のように, クマ乳にとくに多いイソグロボトリオースは, *Clostridium difficile* の産生するトキシンAに対する中和作用を保持している<sup>38)</sup>。クマの場合は新生仔を超未熟な状態で出産するが, 病原性細菌やウイルスの感染に対してとくに弱い未熟な乳仔を, イソグロボトリオースなどのミルクオリゴ糖が感染から守っていることが予想される。一方, アザラシは発達した乳仔を出産し, 泌乳期間も短いので, クマなどに比べてミルクオリゴ糖の生理的意義は少ないであろう。

このように有袋類, 単孔類, クマのように超未熟な乳仔を出産する種の乳に, ミルクオリゴ糖が豊富にあることが明らかになってきた。一方, ヒトもまたウシなどに比べると未熟な新生児を出産するが, ミルクオリゴ糖の量も種類も豊富である。感染防御因子としてのミルクオリゴ糖の意義を考慮すれば, ヒト用人工調合乳にヒト型ミルクオリゴ糖を添加することの有効性が理解される。

これまでに, 人乳に認められる高含量かつ多種類のミルクオリゴ糖は, 霊長目の他種の乳でも同様なのかどうかを調べた報告例は見あたらなかった。筆者らは, 南米に棲息する霊長目である新世界ザルの一種フサオマキザルの乳の糖質を調べ, Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc, ラクト-N-ネオヘキサオース, Gal( $\beta$ 1-3)[Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]Gal( $\beta$ 1-4)Glc(ラクト-N-ノボペンタオースI), Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcならびにGal( $\beta$ 1-6)Gal( $\beta$ 1-4)Glcの存在を明らかにした<sup>63)</sup>。一方で, Bio Gel P-2を使用したカラムクロマトグラフィーによって認められるラクトース以外のミルクオリゴ糖のピークは, 10 mlの乳を使用してようやく認められる程度であり, 1 mlからでも検出可能な人乳の場合よりも, オリゴ糖含量は極めて低いと考えられた。また, 人乳の場合よりもオリゴ糖の種類も少なく, 定性的, 定量的にヒトとは大きく異なるパターンが示された。フサオマキザル乳に検出されたラクト-N-ノボペンタオースIは, タマーワラビー<sup>54)</sup>, ウマ<sup>17)</sup>, ウシ<sup>18)</sup>などの乳の発見されているが, 人乳からは発見されていない。ヒト同様のミルクオリゴ糖の発達は, 霊長目のどの段階から見られるのか, 今後明らかにすべき課題である。

## 5. おわりに

ミルクオリゴ糖に対する世の中の関心は, 1986年に

筆者がこの課題に着手しはじめた当時とは一変している。1980年ころまでは, ミルクオリゴ糖は, 泌乳期乳腺において複合糖質の糖鎖合成系が高濃度に存在するラクトースをアクセプターと誤認した結果合成されたもので, 生理的意義をもたないとする考え方が支配的であった。しかし病原性細菌やウイルスに対する感染防御因子としてのその意義が明らかになりつつある今日, 食品素材のみならず医薬品としてもミルクオリゴ糖型糖鎖を利用しようという動きが活発化しつつある。協和発酵やヤマサ醤油などは, 糖転移酵素を大腸菌や酵母に組み換えてシアリルラクトースやN-アセチルラクトサミン, フコシルN-アセチルラクトサミン(ルイスx)の大量合成に成功している<sup>64,65)</sup>。合成原料である糖ヌクレオチドの値段が下がれば, そこから新しいビジネスが隆起してくるであろう。一方で, ミルクオリゴ糖の哺乳動物種に対する生物学的な意義を明らかにするために, 比較生化学的な地道な研究もまた必要である。同時に広範囲な種の乳仔において, 授乳後にミルクオリゴ糖がどのような代謝的運命をたどるのかも明らかにしなければならない課題である。ミルクオリゴ糖研究が, このように基礎, 応用の両面から大きく発展していくことを信じて疑わず, 今後もこの課題に取り組んでいきたいと考えている。

## 謝 辞

本稿は, 平成13年度日本酪農科学会賞を授与されたのを機会に, 対象となった「ミルクオリゴ糖の比較生化学的解析に関する研究」の研究成果を中心に, ミルクオリゴ糖に関する研究状況を解説した。糖質研究を遂行するにあたり, 大学院時代より直接ご指導を賜りました東北大学名誉教授・足立 達先生, 東北大学名誉教授・日本大学教授・伊藤敏敏先生, 東北大学教授・須山亭三先生, 弘前大学助教授・戸羽隆宏先生に心より厚くお礼申し上げます。本研究は帯広畜産大学畜産学部において行なわれたものであり, 着任当時研究の開始にあたって便宜を図って下さいました帯広畜産大学名誉教授・有賀秀子先生, 北海道大学教授・鳥崎敬一先生にお礼申し上げます。本研究の共同研究者である東北大学教授・齋藤忠夫先生, 帯広畜産大学助手・中村 正先生, 帯広畜産大学教授・荒井威吉先生, シドニー大学名誉研究員Michael Messer先生, シドニー大学NMR研究室長William A Bubbb先生に厚くお礼を申し上げます。貴重な試料の提供をしていただき, かつ共同研究をしていただきましたダービースタッドウマ牧場・麻生節子氏, 拓成ヤギ牧場・腰山通彦氏, エルバス・平林英明氏, 千葉市動物公園・並木美砂子氏, 東京動物専門学校・川原一志校長, 同山岡孝一氏, のぼりべつクマ牧場・前田菜穂子氏, 岐阜大学教授・坪田敏男先生, またぎの里クマ牧

場・小松武史氏, オスロ大学教授・Oystein Wiig 先生, ノルウェー極地研究所教授・Andrew E. Derocher 先生, 同教授・Kit M. Kovacs 先生, 同教授・Christian Lydersen 先生, マクワリー大学教授・John P. Y. Arnould 先生, 帯広畜産大学教授・福井 豊先生, 同講師・手塚雅文先生, 日本鯨類研究所・石川 創先生, アドベンチャーワールド・今津孝二氏, ならびに同・中尾建子氏に厚くお礼を申し上げます。本研究に遂行にあたり, 貴重な助言をいただきました北里大学助教授・有原圭三先生, 同講師向井孝夫先生, 東北大学助手北澤春樹先生に厚くお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) D. S. Newburg and S. H. Neubauer: In "Handbook of Milk Composition" (R. G. Jensen ed.) pp. 273, Academic Press, San Diego (1995).
- 2) S. Haeuw-Fieve, J. M. Wieruszkeski, Y. Panche, J. C. Michalski, J. Montreuil and G. Strecker: *Eur. J. Biochem.*, **215**, 361 (1993).
- 3) D. Dai, N. N. Nanthurmar, D. S. Newburg and W. A. Walker: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **30**, s23 (2000).
- 4) N. Sharon and I. Ofek: *Glycoconj. J.*, **17**, 659 (2000).
- 5) 柳平修一, 川上 浩: 平成13年度日本畜産学会大会(仙台)講演要旨集, p46 (2001).
- 6) C. Kunz, S. Rudloff, W. Schad and D. Braun: *Brit. J. Nutr.*, **82**, 391 (1999).
- 7) J. C. Brand-Miller, P. McVeagh, Y. McNeil and M. Messer: *J. Pediatr.*, **133**, 95 (1998).
- 8) D. S. Newburg: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **30**, s8 (2000).
- 9) M. J. Gnoth, S. Rudloff, C. Kunz and R. K. H. Kinne: *J. Biol. Chem.*, **276**, 34363 (2001).
- 10) G. V. Coppa, P. Pierani, L. Zamfani, I. Carloni and O. Gabrielli: *Acta Paediatr. Suppl.*, **430**, 89 (1999).
- 11) P. Chaturvedi, C. D. Warren, M. Altaye, A. L. Morro, G. Ruiz-Palacios, L. K. Pickering and D. S. Newburg: *Glycobiology*, **11**, 365 (2001).
- 12) W. Sumiyoshi, T. Urashima, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, N. Tsumura, B. Wang, I. Brand-Miller, Y. Watanabe and K. Kimura: *Brit. J. Nutr.* (投稿中).
- 13) P. K. Gopal and H. S. Gill: *Brit. J. Nutr.*, **84**, s64 (2000).
- 14) T. Y. Saito, T. Ito and S. Adachi: *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 147 (1984).
- 15) T. Saito, T. Ito and S. Adachi: *Carbohydr. Res.*, **125**, 43 (1987).
- 16) T. Urashima, T. Saito, J. Nishimura and H. Ariga: *Biochim. Biophys. Acta*, **992**, 375 (1989).
- 17) T. Urashima, T. Sakamoto, H. Ariga and T. Saito: *Carbohydr. Res.*, **194**, 280 (1989).
- 18) T. Urashima, T. Saito, K. Ohmisa and K. Shimazaki: *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 225 (1991).
- 19) T. Urashima, T. Saito and T. Kimura: *Comp. Biochem. Physiol.*, **100B**, 177 (1991).
- 20) T. Urashima, W. A. Bubb, M. Messer, Y. Tsuji and Y. Taneda: *Carbohydr. Res.*, **269**, 173 (1994).
- 21) T. Urashima, S. Murata and T. Nakamura: *Comp. Biochem. Physiol.*, **116B**, 431 (1997).
- 22) D. Viverge, L. Grimmonprez and M. Solere: *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 157 (1997).
- 23) K. Kimura, Y. Watanabe, K. Matsumoto and A. Miyagi: *Yakult Reports*, **17**, 1 (1997).
- 24) T. Nakamura, T. Urashima, M. Nakagawa and T. Saito: *Biochim. Biophys. Acta*, **1381**, 286 (1998).
- 25) T. Nakamura, S. Amikawa, T. Harada, T. Saito, I. Arai and T. Urashima: *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 13 (2001).
- 26) 中村 正, 川瀬浩和, 木村一雅, 渡邊陽子, 荒井威吉, 浦島 匡: 平成13年度日本農芸化学会大会(京都)講演要旨集, p34 (2001).
- 27) M. Kyogashima, V. Ginsburg and H. C. Kivar: *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 391 (1989).
- 28) T. Urashima, Y. Kusaka, T. Nakamura, T. Saito, N. Maeda and M. Messer: *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 247 (1997).
- 29) T. Urashima, W. Sumiyoshi, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, T. Komatsu and T. Tsubota: *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 290 (1999).
- 30) T. Urashima, T. Yamashita, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, A. E. Derocher and O. Wiig: *Biochim. Biophys. Acta*, **1475**, 395 (2000).
- 31) T. Urashima, M. Yamamoto, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Namiki, K. Yamaoka and K. Kawahara: *Comp. Biochem. Physiol.*, **123A**, 187 (1999).
- 32) C. Kunz, S. Rudloff, W. Schad and D. Braun: *Brit. J. Nutr.*, **82**, 391 (1999).
- 33) G. F. Clark, H. C. Krivan, T. D. Wilins and D. F. Smith: *Arch. Biochem. Biophys.*, **257**, 217 (1987).
- 34) 中村 正, 橋本 誠, 原田明快, 荒井威吉, 鍋田憲助, 齋藤忠夫, 浦島 匡: 平成13年度日本糖質

- 学会年会(静岡)講演要旨集, p151 (2001).
- 35) T. Nakamura, W. A. Bubb, T. Saito, I. Arai and T. Urashima: *Carbohydr. Res.*, **329**, 471 (2000).
- 36) 伊藤敏敏, 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, 早坂宏紀, 寺口 進, 桑田英文: 特願平11-331295 (1999).
- 37) J. Parkkinen and J. Finne: In "Methods in Enzymology", Academic Press, New York, p289 (1987).
- 38) W. A. Bubb, T. Urashima, K. Kohso, T. Nakamura, I. Arai and T. Saito: *Carbohydr. Res.*, **318**, 123 (1999).
- 39) H. U. Choi and R. Carukli: *Biochemistry*, **7**, 4423 (1968).
- 40) W. C. Barra and R. Caputto: *Biochim. Biophys. Acta*, **101**, 367 (1965).
- 41) J. A. Sturman, Y. Y. Lin, T. Higuchi and J. H. Fellman: *Pediatr. Res.*, **19**, 216 (1985).
- 42) Y. Guerardel, W. Morelle, Y. Planche, J. Lemoins and G. Strecker: *Carbohydr. Res.*, **320**, 230 (1999).
- 43) T. Urashima, M. Messer and W. A. Bubb: *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 223 (1992).
- 44) M. Messer and K. Kerry: *Science*, **180**, 201 (1973).
- 45) G. A. Jenkins, J. H. Bradbury, M. Messer and E. Trifonoff: *Carbohydr. Res.*, **126**, 157 (1984).
- 46) J. Amano, M. Messer and A. Kobata: *Glycoconj. J.*, **2**, 121 (1985).
- 47) M. Messer: *Biochem. J.*, **139**, 415 (1974).
- 48) J. P. Kamerling, L. Dorland, H. Van Halbeek, J. F. G. Vliegthart, M. Messer and R. Schauer: *Carbohydr. Res.*, **100**, 331 (1982).
- 49) M. Messer and G. S. Mosop: *Aust. J. Biol. Sci.*, **30**, 379 (1977).
- 50) M. Messer and B. Green: *Aust. J. Biol. Sci.*, **32**, 519 (1979).
- 51) M. Messer, E. Trifonoff, W. Stern, J. G. Collins and J. H. Bradbury: *Carbohydr. Res.*, **83**, 327 (1980).
- 52) J. G. Collins, J. H. Bradbury, E. Trifonoff and M. Messer: *Carbohydr. Res.*, **92**, 136 (1981).
- 53) M. Messer, E. Trifonoff, J. G. Collins and J. H. Bradbury: *Carbohydr. Res.*, **102**, 316 (1982).
- 54) J. H. Bradbury, J. G. Vollins, G. A. Jenkins, E. Trifonoff and M. Messer: *Carbohydr. Res.*, **122**, 327 (1983).
- 55) T. Urashima, T. Saito, Y. Tsuji, Y. Taneda, T. Takasawa and M. Messer: *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 64 (1994).
- 56) J. M. Wieruszkeski, J. C. Michalski, J. Montreil and G. Strecker: *Glycoconj. J.*, **7**, 13 (1990).
- 57) H. Sabharwal, S. Sjoblad and A. Lundblad: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **12**, 474 (1991).
- 58) H. Sabharwal, B. Nilsson, M. A. Chester, F. Lindh, G. Gronberg, S. Sjoblad and A. Lundblad: *Carbohydr. Res.*, **178**, 145 (1988).
- 59) T. Urashima, M. Arita, M. Yoshida, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, J. P. Y. Arnould, K. M. Kovacs and C. Lydersen: *Comp. Biochem. Physiol.*, **128B**, 307 (2001).
- 60) S. Dosako, S. Taneya, T. Kimura, T. Ohmori, H. Daikoku, N. Suzuki, J. Sawa, K. Kano and S. Katayama: *J. Dairy Sci.*, **66**, 2076 (1983).
- 61) M. E. Q. Pilson and A. L. Kerry: *Science*, **135**, 104 (1962).
- 62) J. P. Johnson, R. O. Christiansen and N. Kretschmer: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **47**, 393 (1972).
- 63) T. Urashima, Y. Kawai, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Namiki, K. Yamaoka, K. Kawahara and M. Messer: *Comp. Biochem. Physiol.*, **124C**, 295 (1989).
- 64) 遠藤徹夫: 化学と生物, **39**, 632 (2001).
- 65) 武田 聡, 野口利忠: 平成13年度日本糖質学会年会(静岡)講演要旨集, p109 (2001).