

ミルクオリゴ糖の乳児に対する
生理的意義の解明

(研究課題番号09660124)

平成10年度科学研究費補助金(一般研究(C))
研究成果報告書

平成 11 年 3 月

研究代表者 浦 島 匡
(帯広畜産大学畜産学部助教授)

1 研究組織と研究経費

「研究組織」

研究代表者 : 浦島 匡
(帯広畜産大学畜産学部・助教授)

研究分担者 : 中村 正
(帯広畜産大学畜産学部・助手)

「研究経費」

平成9年度 : 1,700 千円

平成10年度 : 1,600 千円

合計 3,300 千円

2 研究発表

1) 学会誌への発表 (7編、関連論文も含む)

- 1 浦島 匡, 中村 正, 齋藤忠夫
“ミルクオリゴ糖の意義を考える一哺乳動物種における特徴とその生理機能”
Milk Science, 46(3), 211-220 (1997)
- 2 Tadashi Nakamura, Tadasu Urashima, Miyuki Nakagawa and Tadao Saito
“Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum”
Biochim. Biophys. Acta, 1381, 286-292 (1998)
- 3 Tadasu Urashima, Masaki Yamamoto, Tadashi Nakamura, Ikichi Arai, Tadao Saito, Misako Namiki, Koh-ichi Yamaoka and Kazuyuki Kawahara
“Chemical characterisation of the oligosaccharides in a sample of milk of a white - nosed coati, *Nasua narica* (Procyonidae: Carnivora)”
Comparative Biochemistry and Physiology (投稿中), 1999年
- 4 William A. Bubb, Tadasu Urashima, Kuniaki Kohso, Tadashi Nakamura, Ikichi Arai and Tadao Saito
“Occurrences of an usual lactose sulfate in dog milk”
Carbohydr. Res (投稿中), 1999年
- 5 Tadasu Urashima, Yuhko Kawai, Tadashi Nakamura, Ikichi Arai, Tadao Saito, Misako Namiki, Koh-ichi Yamaoka, Kazuyuki Kawahara and Michael Messer
“Chemical characterisation of six oligosaccharides in a sample of colostrum of the brown capuchin, *Cebus apella* (Cebidae: Primates)”
Comparative Biochemistry and Physiology (投稿中), 1999年
- 6 Tadasu Urashima, Wataru Sumiyoshi, Tadashi Nakamura, Tadao Saito Takeshi Komatsu and Toshio Tsubota
“Chemical characterization of milk oligosaccharides of the asian black bear, *Selenarctos thibetanus*”
Biochim. Biophys. Acta (投稿予定), 1999年
- 7 Tadashi Nakamura, Fumiki Mori, Ikichi Arai, Tadao Saito and Tadasu Urashima
“Identification of N-acetylneuraminyllactose lactones in bovine colostrum”
J. Dairy Res. (投稿予定), 1999年

2) 学会への口頭発表 (7題、関連発表を含む)

- 1 Tadasu Urashima, Yohko Kusaka, Tadashi Nakamura and Michael Messer
“Chemical characterization of milk oligosaccharides of the brown bear, *Ursus arctos yesoensis*”
the 14th International Glycoconjugate Symposium
平成9年9月、チューリッヒ
- 2 浦島 匡、中村 正、齋藤忠夫
“ミルクオリゴ糖の意義を考える—哺乳動物種間における異同と意義”
平成9年度酪農科学シンポジウム
平成9年9月、仙台
- 3 浦島 匡、山本雅樹、中村 正、山岡孝一、川原一志
“ハナグマミルクオリゴ糖の構造解析”
平成10年度日本農芸化学会大会
平成10年4月、名古屋
- 4 中村 正、橋本紀子、浦島 匡
“羊乳中シアリルオリゴ糖の初乳期における変動”
平成10年度日本農芸化学会大会
平成10年4月、名古屋
- 5 中村 正、橋本紀子、浦島 匡
“羊初乳中のシアリルオリゴ糖の化学構造とその経時的変動”
平成10年度糖質シンポジウム
平成10年7月、札幌
- 6 浦島 匡、中村 正、齋藤忠夫
“ミルクオリゴ糖の生理的意義と生理活性素材としての利用可能性”
平成10年度文部省科学研究費補助金(基盤研究:企画調査)による連続公開セミナー「糖鎖の新しい生理活性」第6回
平成10年12月、仙台
- 7 中村 正、森 史樹、荒井威吉、浦島 匡
“ウシ初乳中におけるシアリルラクトースラクトンの同定”
平成11年度日本畜産学会大会
平成11年3月、東京

3 研究成果

1) 研究目的

哺乳動物の乳汁に含まれている糖質の 80%以上は、一般的に 2 糖のラクトース($\text{Gal } \beta \text{ 1} \rightarrow \text{4Glc}$)である。しかしながら、ヒト、ウシなどの乳汁には、微量ながらも多種類のラクトース以外のオリゴ糖が含まれている。それらは若干の例外はあるものの還元末端側にラクトースユニットをコアとして餅、これに N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコースまたはシアル酸などが付加した構造をしており、哺乳動物の生体組織の糖脂質や糖タンパク質の糖鎖との化学構造上の一部類似性が至適されている。ラクトース以外のこれらのオリゴ糖は、泌乳期の乳腺細胞内で高濃度に存在するラクトースを、サイトゾルの可溶型の各種糖転移酵素がアクセプターと誤認した結果生合成されたもので、生理的意義を持たないとする説が一部には提唱されている。

一方で、哺乳動物種の中には有袋類のタマーワラビー、カンガルー、単孔類のカモノハシ、ハリモグラおよび真獣類食肉目のクマなど、乳汁中にラクトースよりもラクトースユニットをコアとするオリゴ糖の方が存在量の多い種もある。また、有袋類や単孔類では、乳汁中に含まれるこれらのオリゴ糖が泌乳期を通して大きく変化しているという報告もされている。これら哺乳動物種は哺乳動物の進化的位置において互いに近い存在とは考えられないが、新生児を超未熟児で出産するという共通点がある。以上をふまえると、これらラクトース以外のミルクオリゴ糖には、この様な動物種の乳仔の成長や体形成に対する役割のあることが示唆される。同様の役割が他の動物種のミルクオリゴ糖においても当てはまる可能性があり、特にヒトの場合、ウシやウマといった家畜と比べて未熟状態の新生児を出産するので、この様なオリゴ糖の生理的役割は重要であるとも考えられる。

報告者はこれまでにウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、タマーワラビー、カニクイアザラシおよびヒグマのミルクオリゴ糖の化学構造を分析し、哺乳動物種間における同糖鎖の種間差を明らかにしてきた。これまでラクトース以外のミルクオリゴ糖の生理的意義については、乳児腸管内においてビフィドバクテリウム属の増殖を促進するという以外には未解明であった。今回の研究においては、引き続き各種哺乳動物種のミルクオリゴ糖の化学構造を解析する中で、乳児へウイルスに対する感染防御能の付与したり、組織形成に役割をもつと考えられるオリゴ糖を見出したので、後述する。また、ミルクオリゴ糖に付加されているシアル酸の泌乳時期による変動を解析する中で、同糖鎖の乳児に対する生理

的役割の考察を行った。さらに、ミルクオリゴ糖の一部を線維芽細胞の培養系に添加し、増殖促進効果を解析することから、乳児への体形成の役割を推測した。それらの成果について後述する。

2) 研究方法

1. 各種哺乳動物種乳からのミルクオリゴ糖の分離ならびに構造解析

ウシ、ウマ、ヒツジの初乳、ハナグマ、ツキノワグマ、フサオマキザル、イヌの常乳に対し、4倍量のクロロホルム/メタノール(2/1, v/v)を加え、よく攪拌した。ついでこれを4℃、3500回転で遠心分離することによって、クロロホルム可溶層、変性タンパク質ならびにメタノール可溶層に分離し、メタノール可溶層を、メタノールを蒸発してからBio Gel P-2(2.5 X 100 cm)に供した。ゲル濾過によって溶出した各画分(5 ml)は、フェノール硫酸法とレゾルシノール塩酸法で検出し、えられたピークごとにプールした。

こうして分離されたハナグマ、ツキノワグマ、フサオマキザル、イヌの糖質画分は凍結乾燥してから、アセトン/イソプロパノール/0.1 M 乳酸(2/2/1, v/v)を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィー(TLC)で定性分析した。各ミルクオリゴ糖画分の中で、TLCにより複数のスポットが観察された画分は、同溶媒を展開溶媒とする調製用TLCで再分離し、Bio Gel P-2によるゲル濾過で精製した。

ウシ、ウマ、ヒツジ初乳から上記のように分離したミルクオリゴ糖は、50 mM トリス塩酸バッファー(pH 8.5)を溶媒とするDEAE - Cellulofine A-500アニオン交換クロマトグラフィー(2.6 X 20 cm)に供し、吸着画分と非吸着画分に分離した。各画分(5 ml)は、フェノール硫酸法とレゾルシノール塩酸法で検出し、ピークごとにプールし、ついでBio Gel P-2によるゲル濾過に供して脱塩した。レゾルシノール塩酸法でシアル酸を含むことが示された画分は、TSK - Gel Amido 80 カラム(0.46 X 25 cm)による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離した。移動相として50%また80%アセトニトリルを含む15 mM リン酸バッファー(pH 5.2)を用い、65%から80%までアセトニトリルの濃度勾配溶出を行った。分離したオリゴ糖は、Bio Gel P-2によるゲル濾過で脱塩した。

分離・精製した各オリゴ糖は、NMRによって構造決定した。¹H-NMRはD₂Oを溶媒、DSSを内標準としてVarian INOVA 600スペクトロメーターで測定した。二次元HMBC, HSQC, ¹H-¹³C COSY NMRはD₂Oを溶媒とし、Bruker DRX-600スペクトロメーターで測定した。またオリゴ糖によっては、Finnigan MAT LCQスペクトロメーターによる質量分析に供した。

2. 泌乳時期による乳中のシアル酸含量の変動

分娩直後から13日後まで毎日、それから一週間おきにウシ、ウマ、ヒツジ乳のシアル酸含量をレゾルシノール塩酸法によって定量した。

3. タマーワラビー乳より分離・精製したモノシアリル、ジシアリルオリゴ糖の線維芽細胞に対する増殖促進効果

ミルクオリゴ糖（とくに新生児を超未熟状態で出産する哺乳動物種のもの）が、乳児の細胞に対し増殖促進効果をもちうるかを観るために、ラット胎児から分離した3T3線維芽細胞の培養系に入れ、増殖促進性を検討した。96ウェルマイクロタイターに播いた3T3細胞は、0.2%ウシ胎児血清を添加したD-MEM培地中で、0.1~100 μ /ml濃度のタマーワラビーモノシアリル(SO-1)、ジシアリル(SO-2)またアシアロオリゴ糖を添加して24時間培養した。ついで ^3H チミジンを添加し、さらに6時間培養した。終了後、細胞をセルハーベスターでグラスフィルターに移し、シンチレーションカウンターで放射線活性を測定した。細胞増殖促進率は以下のように表した。

増殖促進率 = (試料添加時の平均 cpm 値 - バックグラウンド) \div (コントロール (試料を添加しないもの) の平均 cpm 値 - バックグラウンド) $\times 100$

3) 結果と考察

1. 各種哺乳動物乳から分離したミルクオリゴ糖の化学構造

ハナグマ、ツキノワグマ、フサオマキザル、イヌの乳からクロロホルム/メタノール抽出してえられた糖質画分の Bio Gel P-2 によるゲルクロマトグラムを図1~図4に示した。各クロマトグラムにおけるラクトースのピークは、その溶出位置と、プールしたピーク成分の TLC 上での位置から決定した。ハナグマでは、ラクトースと3糖の量がほぼ等しく、ラクトースとラクトース以外のオリゴ糖の量を比較すると、オリゴ糖の方が量が多い。ツキノワグマでは、糖質画分中にラクトースは痕跡量しか含まれておらず、泌乳時期の早い乳中では5糖が、泌乳時期の遅い乳中では3糖が優先的な糖質であった。フサオマキザルとイヌの乳では、圧倒的にラクトースが優先的な糖質であった。

各乳試料から分画されたオリゴ糖は NMR によって構造決定したが、いくつかのオリゴ糖の NMR パターンを図5~図9に、各オリゴ糖に対する帰属を表1~表6に示した。また、決定したオリゴ糖の化学構造を図10~図13に示した。

ハナグマのミルクオリゴ糖は、主要3糖が $\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ と $\text{Gal } \alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ であり、これはヒグマミルクオリゴ糖のパターンと共通する特徴を示している。また高級オリゴ糖は、ラクトーN-ネオテトラオースとラクトーN-ネオヘキサオースをコア骨格とし、末端に $\alpha 1 \rightarrow 2\text{Fuc}$ また $\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}$ を付加する化学構造を有する。これらは構造的にヒグマ高級ミルクオリゴ糖とも類似しているが、 GlcNAc 残基がフコシル化していない点において異なっている。このように食肉目クマ科のヒグマとアライグマ科のハナグマのミルクオリゴ糖間に共通する特徴がみられたことは、両種の乳仔に対するミルクオリゴ糖の生理的意義の共通性、また両種の乳腺の機能の進化的近接性の点において興味のもたれる点である。

ツキノワグマのミルクオリゴ糖は、泌乳初期で主要な5糖は $\text{Gal } \alpha 1 \rightarrow 3[\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 2]\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 3]\text{Glc}$ (B-pentasaccharide)、泌乳後期で主要な3糖は $\text{Gal } \alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ であった。高級オリゴ糖は、ラクトーN-ネオテトラオースまたラクトーN-ネオヘキサオースをコア骨格とするが、末端にB型抗原をもつオリゴ糖が存在する点、ラクトーN-ネオテトラオースをコア骨格とするオリゴ糖の一つは、還元末端が $\alpha 1 \rightarrow 3$ フコシル化している点が、ヒグマオリゴ糖の場合と異なっている。このように構造決定されたツキノワグマミルクオリゴ糖は、ヒグマミルクオリゴ糖と一部のオリゴ糖に不均一性のみられることがとくに注目される。両オリゴ糖の不均一性は両種乳腺細胞内での $\alpha 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼと $\alpha 3$ フコシルトランスフェラーゼの基質特異性の違いによってもたらされるものと考えられる。また、オリゴ糖のうちでB-pentasaccharide が大量に認められたことも注目される。このオリゴ糖はB型血液型者の妊婦の尿中には見出されているが、人乳にはこれまでに見つかっていない。B-tetrasaccharide も見出されたが、これは新規オリゴ糖である。また、ラクトースが痕跡量しか見出されなかったことも、クマ種におけるミルクオリゴ糖の生理的意義を考える上で注目される。

フサオマキザルのミルクオリゴ糖では、人乳には報告されていない $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 3[\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 6]\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ (lacto-N-novopentaose I) が見出されたことが注目される。この5糖はタマーワラビー乳やウシ、ウマの初乳中には見出されている。フサオマキザル乳では $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc } \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ (lacto-N-tetraose) や $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ (lacto-N-neotetraose) は十分に検出できなかったが、 $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 3[\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 6]\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ (lacto-N-neohexaose) は見出された。霊長目どうしであっても、これらの GlcNAc を含むオリゴ糖の存在パターンに人乳とは違いが認められた点が注目される。また、フサオマキザル乳で $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 3]\text{Glc}$ や $\text{Neu5Ac } \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ が認めら

れたにもかかわらず、 $\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ や $\text{Neu5Ac } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ は十分に検出できなかつた。これも人乳とは異なる点であり、注目される。フサオマキザル乳では糖質含量は6%と人乳とほぼ同程度であった。

イヌ乳には、 $\text{Gal}(3\text{-OSO}_3)\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ (lactose 3'-sulfate)が認められたことが注目される。硫酸基を含むミルクオリゴ糖は、ラット乳やラット泌乳期乳腺に $\text{Neu5Ac } \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}(6\text{-OSO}_3)\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ や $\text{Gal}(6\text{-OSO}_3)\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ がみつかり、また人乳中にも硫酸基を含むN-アセチルノイラミニルクトースの存在が示唆されている。硫酸基を含むオリゴ糖は腸管内で乳仔に対し硫酸基を運搬する働きが示唆されており、運搬された硫酸基は乳仔の網膜などの形成に利用されている可能性もある。イヌ乳で見出されたラクトース硫酸はガラクトースの3位が硫酸化された構造であり、ラット乳のものとは硫酸基の付加位置が異なっている点が注目される。またイヌ乳では、糖質の中でラクトースが圧倒的な優先糖質であったが、これは食肉目内でもクマやハナグマとは異なっている。このことから、食肉目内でもミルクオリゴ糖の生理的役割が異なるのか、あるいは進化的位置の違いによるものなのか興味にもたれるところである。

以上の結果と報告者のこれまでの研究結果、またシドニー大学の Messer らの研究結果から、有袋類、単孔類、真獣類食肉目クマ科のヒグマ、ツキノワグマ、同アライグマ科のハナグマの乳ではオリゴ糖の存在量がラクトースよりも多いことが明らかになった。これらの動物種は哺乳動物の進化的位置において近い存在とは考えられないが、有袋類、単孔類およびクマには新生仔を超未熟な状態で出産するという生理的共通性があり、ミルクオリゴ糖は未熟な乳仔の体形成や成長に関与する可能性が示唆された。ハナグマが未熟な新生仔を出産しているかどうかについては、議論のわかれるところである。

ヒツジ初乳から分画したオリゴ糖画分の DEAE-Cellulofine A-500 カラムによるクロマトグラムを図 14 に示した。またプールした各成分のうち、B 成分を TSK-gel Amido-80 カラムによる HPLC に供したが、そのクロマトグラムを図 15 に示した。OS-1, OS-3, OS-4 と命名した化合物の $^1\text{H-NMR}$ を図 16 に、解析された化学構造を図 19 に示した。これらのオリゴ糖の中で、 $\text{Neu5Gc } \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ ラクトンの存在がとくに注目される。このようなオリゴ糖において、ラクトン環の形成は理論上はシアル酸残基とガラクトース残基間での 1→2 または 1→4 ラクトン、シアル酸残基内での 1→4 または 1→7 ラクトンの4種類が可能であるが、本研究によりえられたラクトンは、そのうちの2つと考えられる。一般的に複合糖質の糖鎖末端に存在するシアル酸は、インフルエンザウィルスのもつヘマグルチニン(HA)に吸着能を有しており、インフルエンザウィルスが腸管に付着する場合には、腸管側のガングリオシドを受容体に行っているとされている。ヒツジ初乳中における同シアルルクトースラクトンは、同様に HA

に対し吸着能をもつと予想されることから、ウィルスが腸管ガングリオシドに付着するのを阻害すると考えられる。また一方、インフルエンザウィルスはノイラミニダーゼをも保持している。ラクトン環が形成されればノイラミニダーゼによる加水分解に抵抗性をもつと考えられることから、同ラクトンはウィルスノイラミニダーゼによって加水分解されないで、HA との結合を強く保持した状態で、ウィルスの腸管への付着を通常のシアリルラクトースよりも強固に阻止していることも予想される。したがって同ラクトンは初乳において、インフルエンザウィルスの乳仔への感染を防御する働きをもつことが考えられる。同ラクトンを初乳より分離したり、シアリルラクトースから合成して、育児用調製粉乳に添加するなどへの応用も可能性がある。

一方、ウシ初乳から分離したオリゴ糖画分の DEAE - Cellulofine A-500 によるクロマトグラムを図 17 に、そのうちの B 画分の $^1\text{H-NMR}$ を図 18 に、決定された化学構造を図 19 に示した。ウシ初乳には、 $\text{Neu5Ac } \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GI}$ の 2 種のラクトン体が認められた。これはウシ初乳における同ラクトンが、インフルエンザウィルスの乳仔腸管への感染を防御している可能性を示すものである。また、ウシ初乳は国内においても大量に回収することが可能なので、同ラクトンをウシ初乳から分離し、育児用調製粉乳などに実用的に利用することの可能性をも示唆するものである。

2. 泌乳時期による乳中でのシアル酸含量の変動

ウシ、ヒツジ、ウマ乳における総シアル酸含量を、分娩後時間によって測定した結果を、図 20~図 21 に示した。いずれの種でも、分娩前また直後においてシアル酸含量はとくに高く、3 日目で急減することが認められた。ウシ、ウマではそれ以降は一定値となるが、ヒツジではそれ以降も変動が見られた。これは、これらの種において、乳仔のシアル酸に対する要求性が出産直後にとくに高いことを示唆している。乳中のシアル酸の大半は、シアリルラクトースなどのミルクオリゴ糖に結合した形で存在する。

地上に普遍的に存在するインフルエンザ A ウィルスは、腸管や気道において、複合糖質の糖鎖と結合したシアル酸をレセプターとして付着し、感染することが知られている。一方において、自ら抗体をつくり出す能力が備わっていない新生仔期には、乳仔はウィルスの感染に対する抵抗力が弱い。このような時期に乳仔を感染から守るためには、乳汁から感染防御因子をおぎなうことが生理的な理にかなっている。乳汁におけるシアリルオリゴ糖は、インフルエンザ A ウィルスが腸管に付着するのを阻止する働きがあると考えられているが、シアル酸が分娩後 2 日以内の乳汁においてとくに高いことは、インフルエンザウイ

ルス感染防御因子としてのその役割が、出産直後の段階でとくに高いことを示唆している。

3. タマーワラビー乳から分離したモノシリアル、ジシリアルオリゴ糖の線維芽細胞に対する増殖促進効果

モノシリアルオリゴ糖(SO-1)およびジシリアルオリゴ糖(SO-2)による 3T3 細胞への ^3H -チミジンの取り込み効果を表 7 に示した。結果は、SO-2 は 3T3 細胞における DNA 合成を有為に促進するが、SO-1 は有為な促進効果をもたないことを示している。また、シアル酸をはずしたアシアロ SO-2、遊離の N-アセチルノイラミン酸、 $\alpha 2 \rightarrow 3$ および $\alpha 2 \rightarrow 6$ N-アセチルノイラミニルラクトースによる 3T3 細胞への ^3H -チミジン取り込み効果を表 8 に示したが、いずれも増殖促進効果をもたないことが認められた。また SO-2 の濃度による 3T3 細胞への ^3H -チミジン取り込み量の変動を、図 22 に示した。 ^3H -チミジンの取り込み量は $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度で最大であり、SO-2 濃度による ^3H -チミジン取り込み量の依存性を示した。

この結果は、タマーワラビーという新生仔を非常に未熟な状態で出産する哺乳動物種のシアル酸を含むミルクオリゴ糖が、授乳した乳仔の腸管上皮などの細胞の増殖を促進し、体形成や成長に対する効果をもつ可能性を示唆するものである。ヒトなどにおいても、超未熟児に対する人工栄養法として、高分子量のシリアルオリゴ糖を調合乳に添加することの有効可能性を示唆している。

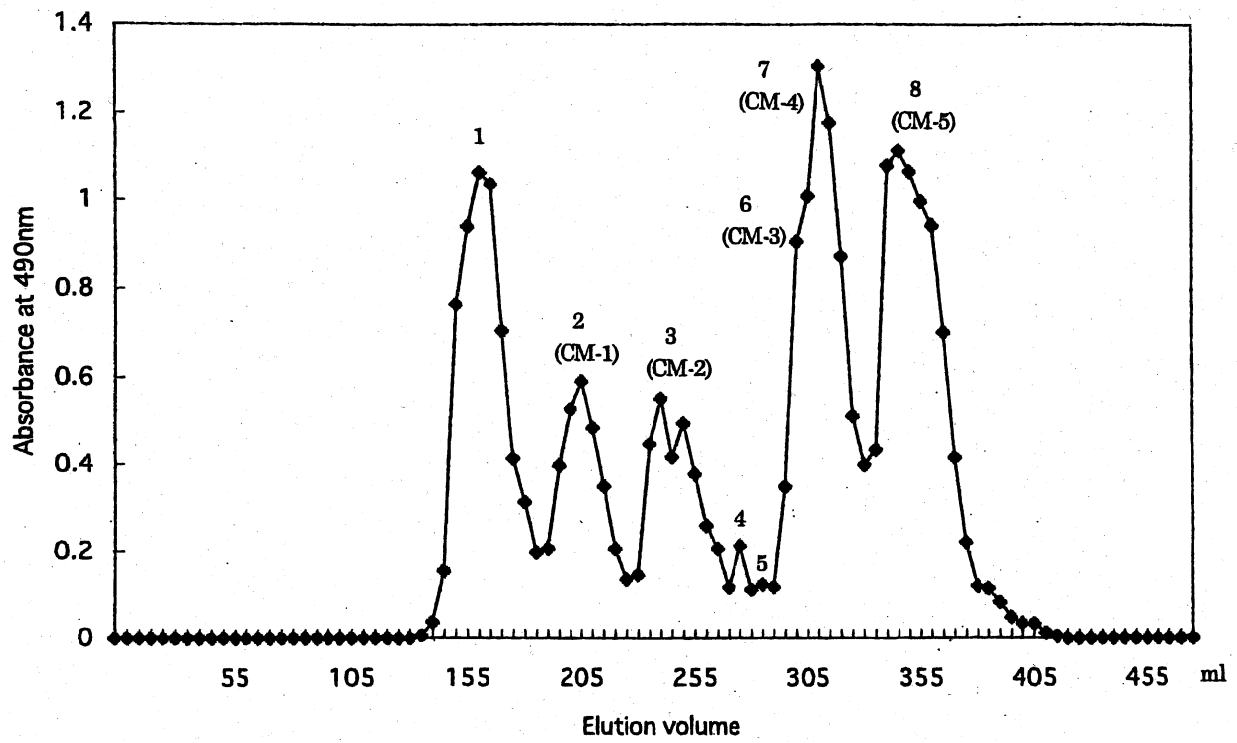


図1 ハナグマ乳より分画した画分の Bio Gel P-2 カラム(2.5 X 100 cm)による
ゲルクロマトグラム

検出：フェノール硫酸法(490 nm)

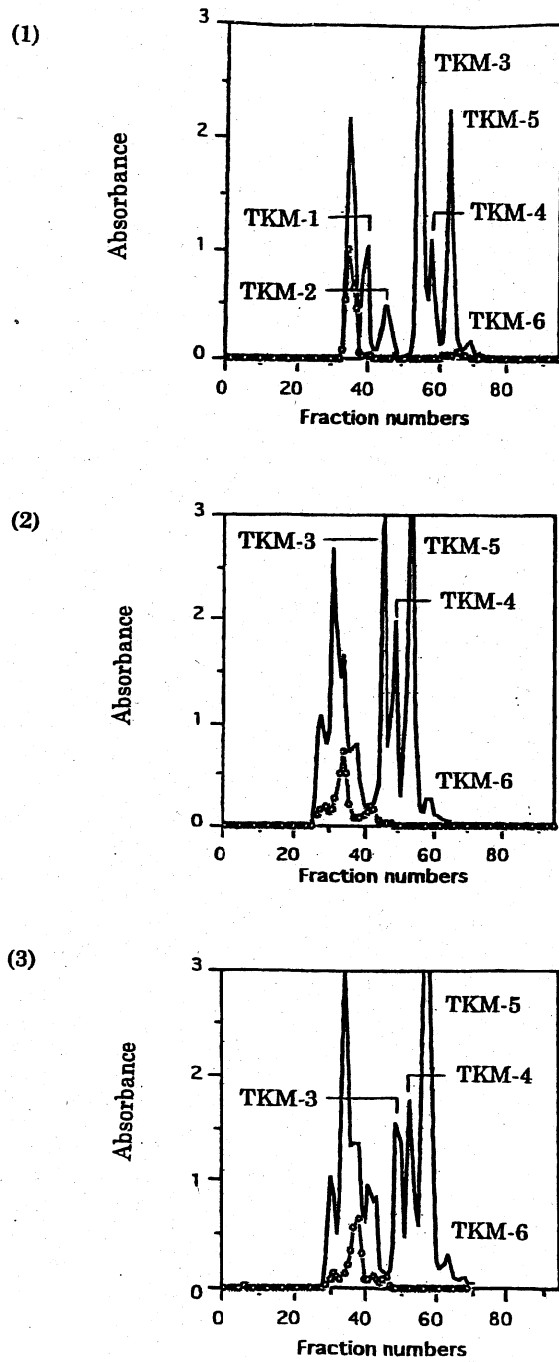


図2 ツキノワグマ乳より分画した画分の Bio Gel P-2 カラム(2.5 X 100 cm)によるゲルクロマトグラム

(1) 分婣後 37 日 (2) 分婣後 61 日 (3) 分婣後 91 日

検出：フェノール硫酸法(●, 490 nm)

過ヨー素酸-レゾルシノール法(○, 630 nm)

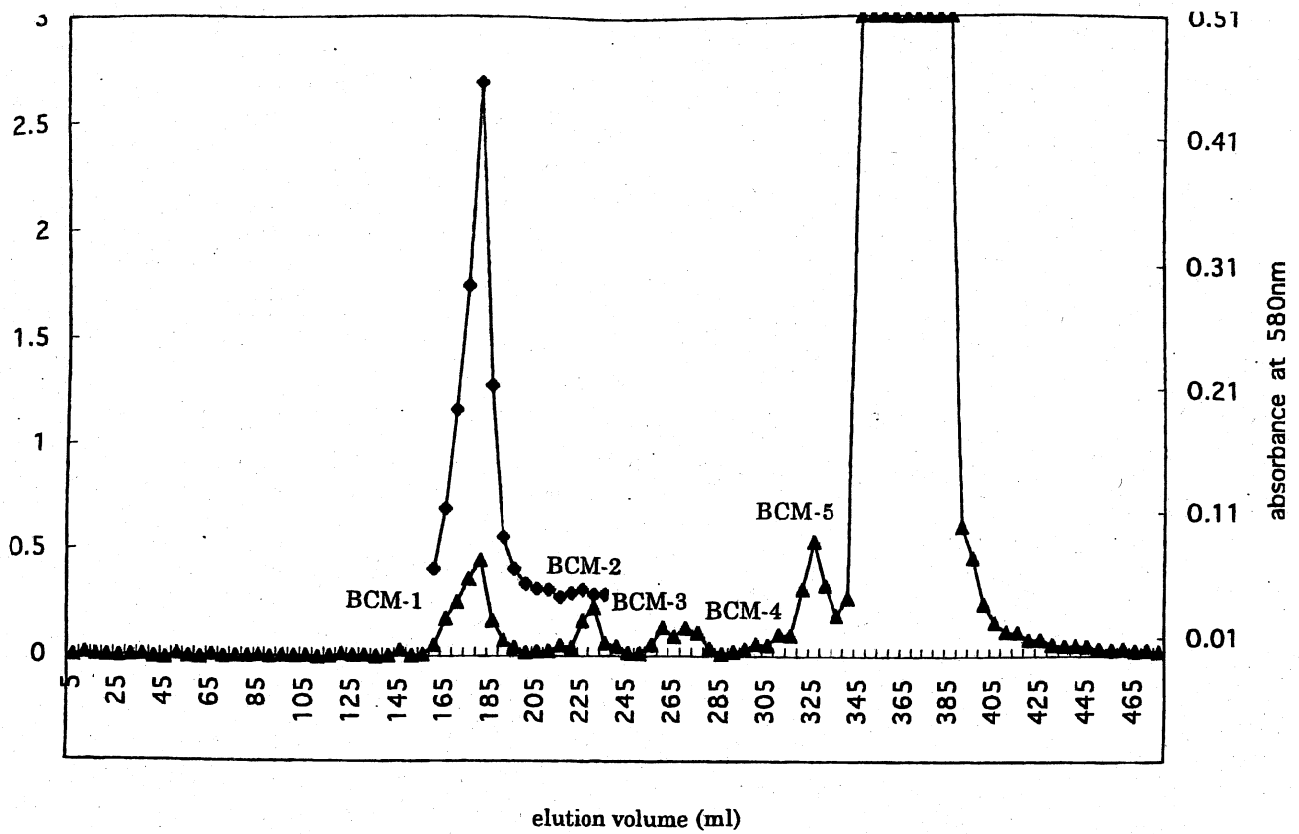


図3 フサオマキザル乳より分画した画分の Bio Gel P-2 カラム(2.5 X 100 cm)によるゲルクロマトグラム
 検出：フェノール硫酸法(▲, 490 nm)
 塩酸-レゾルシノール法(◆, 580 nm)

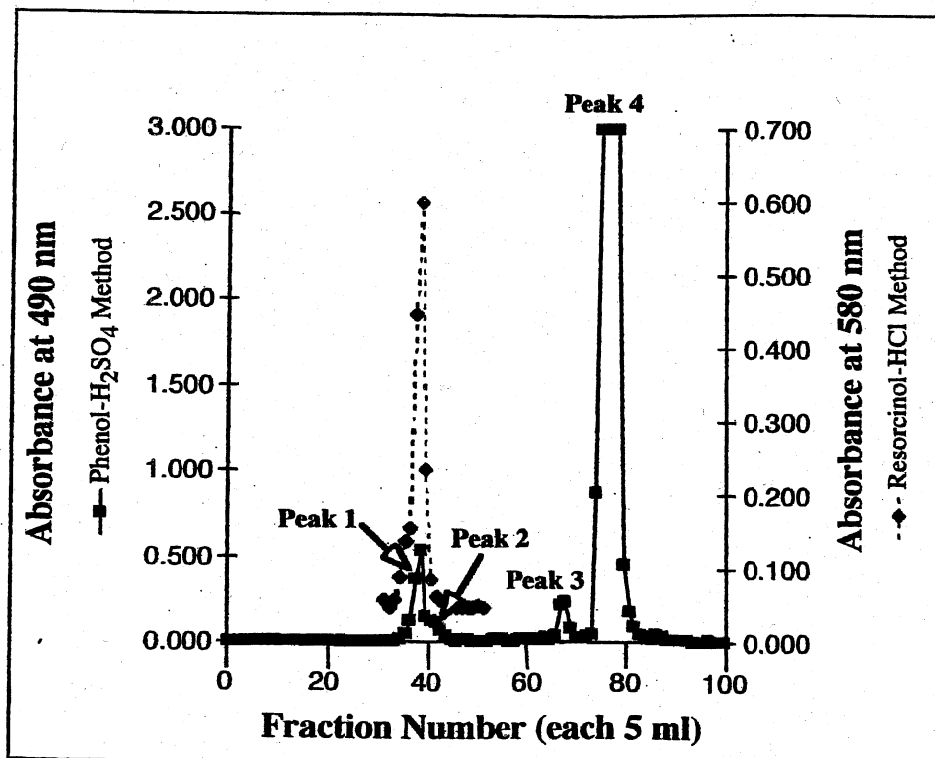


図4 イヌ乳より分画した画分の Bio Gel P-2 カラム(2.5 X 100 cm)によるゲルクロマトグラム
 検出：フェノール硫酸法(■, 490 nm)
 塩酸-レゾルシノール法(◆, 580 nm)

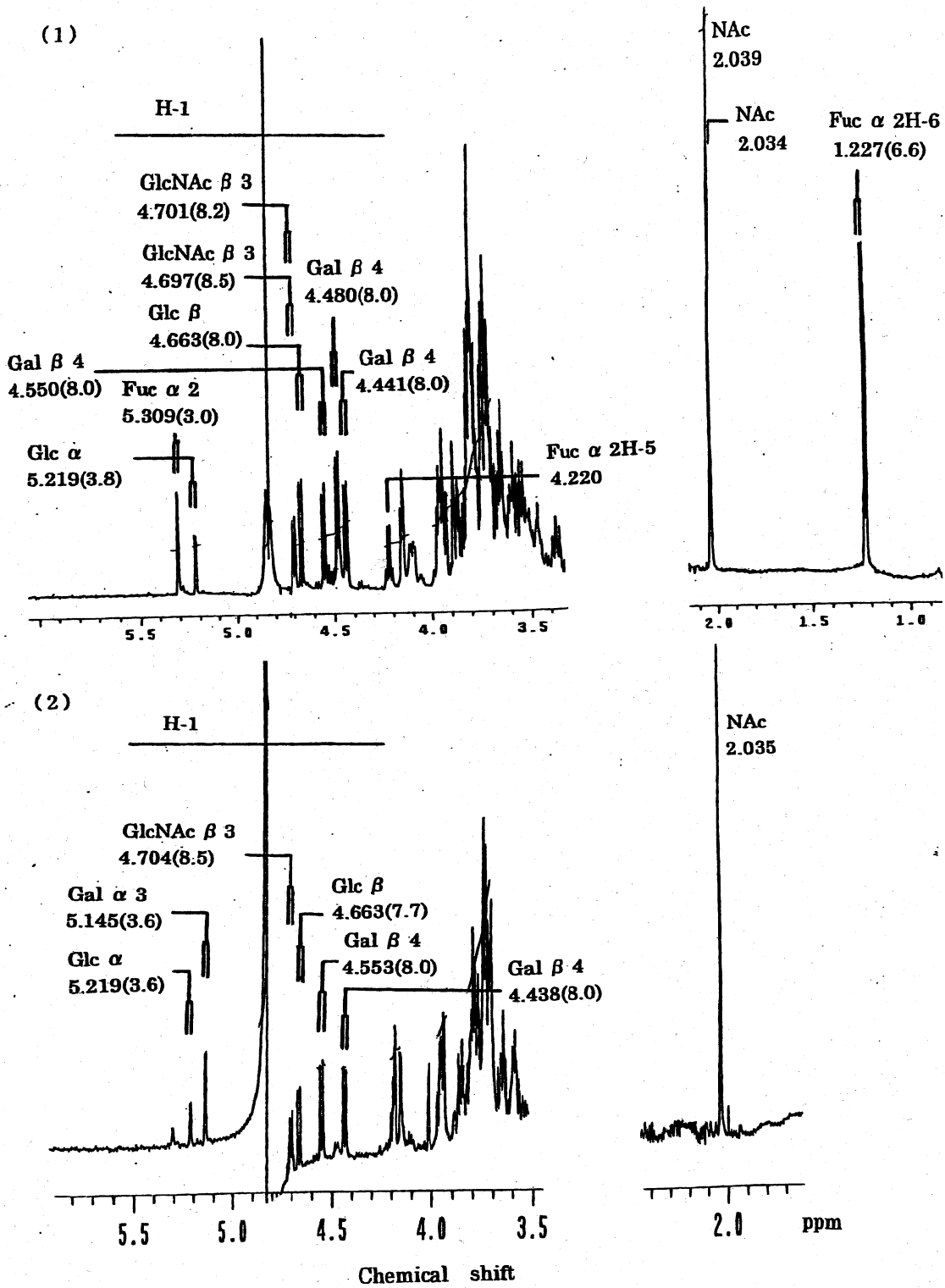


図5 ハナグマ乳より分画したオリゴ糖の¹H-NMR スペクトラム

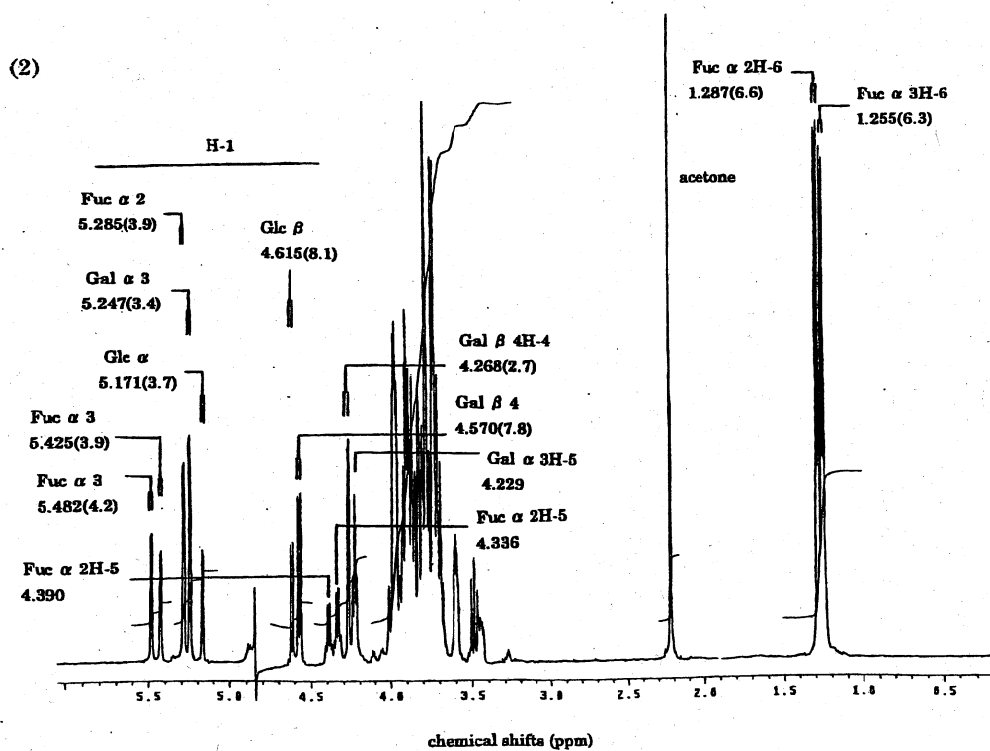
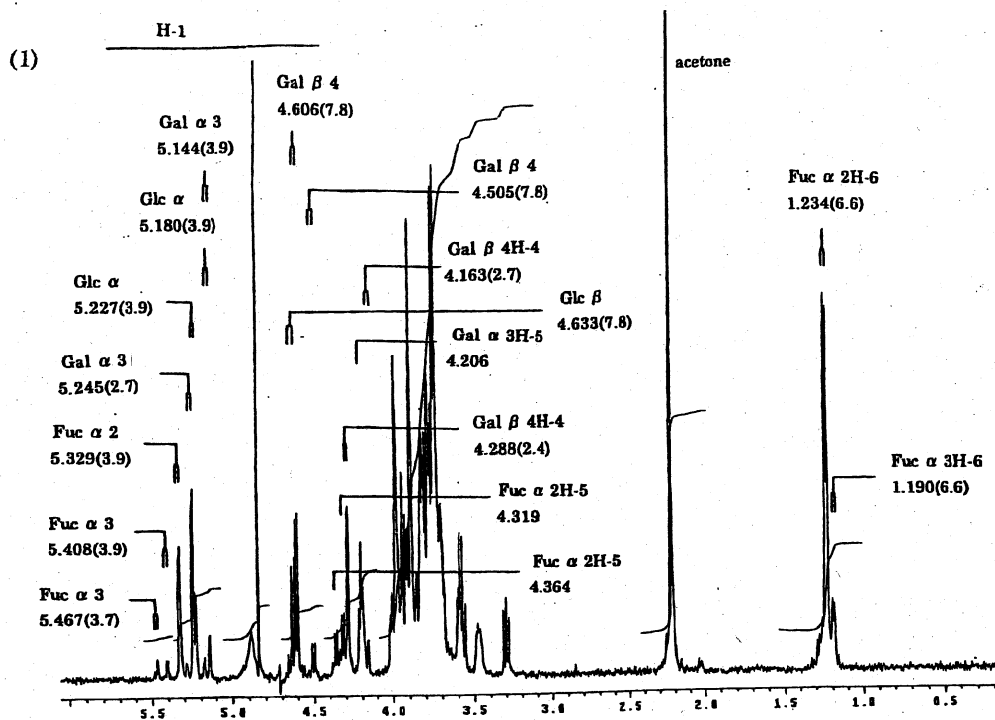


図6 ツキノワグマ乳より分画したオリゴ糖の¹H-NMR スペクトラム

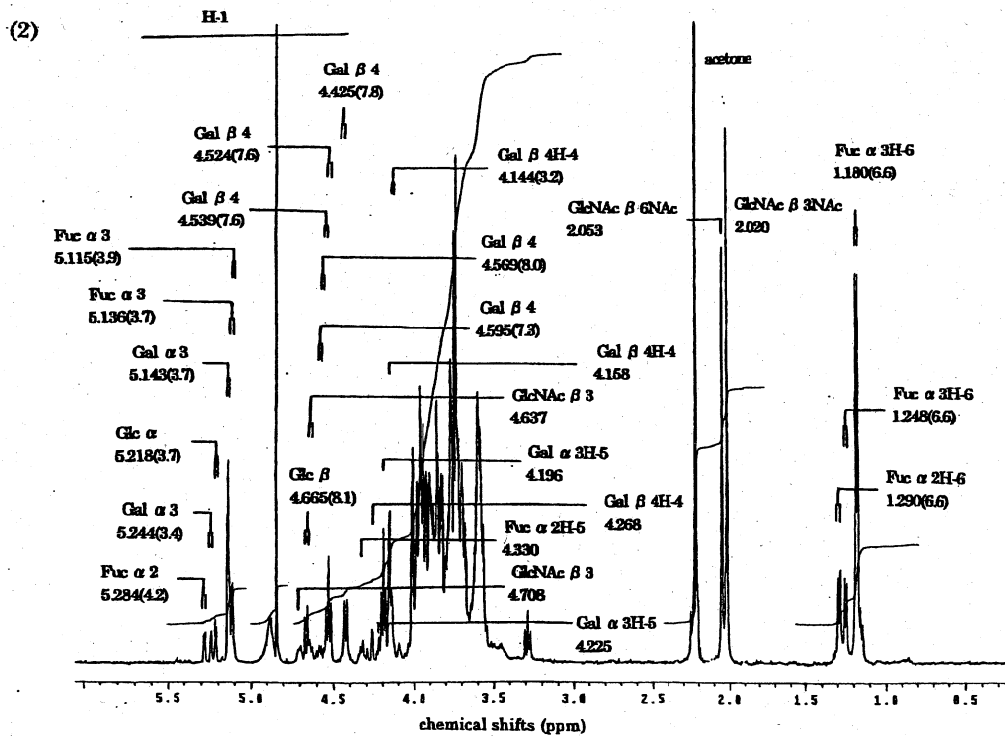
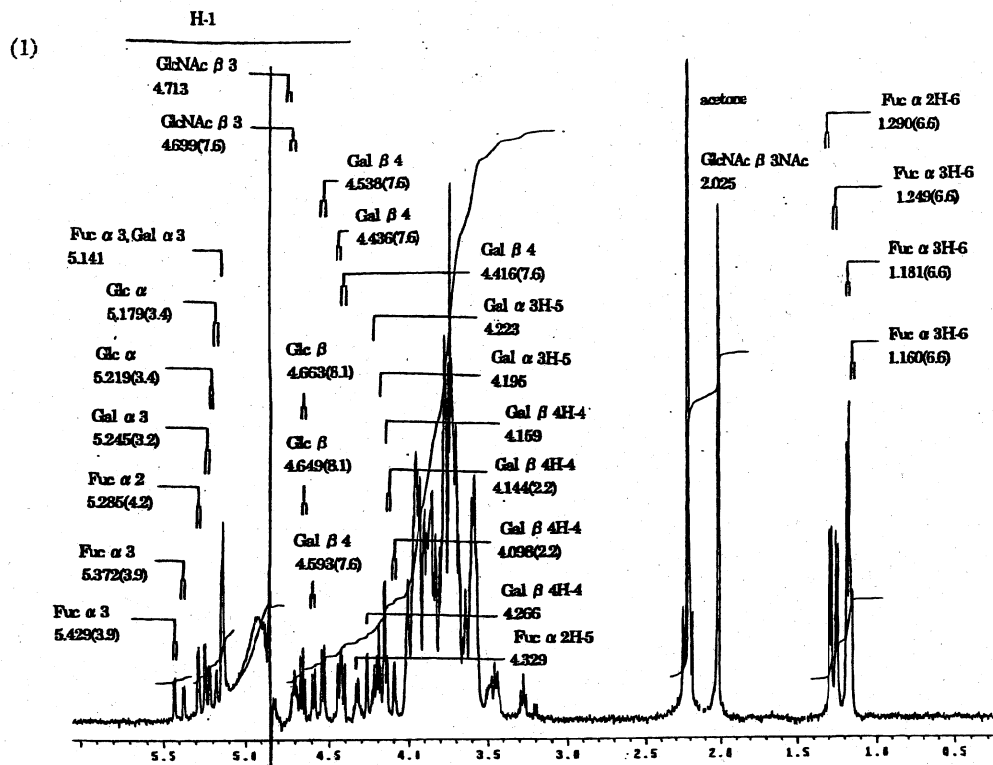


図7 ツキノワグマ乳より分画したオリゴ糖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトラム

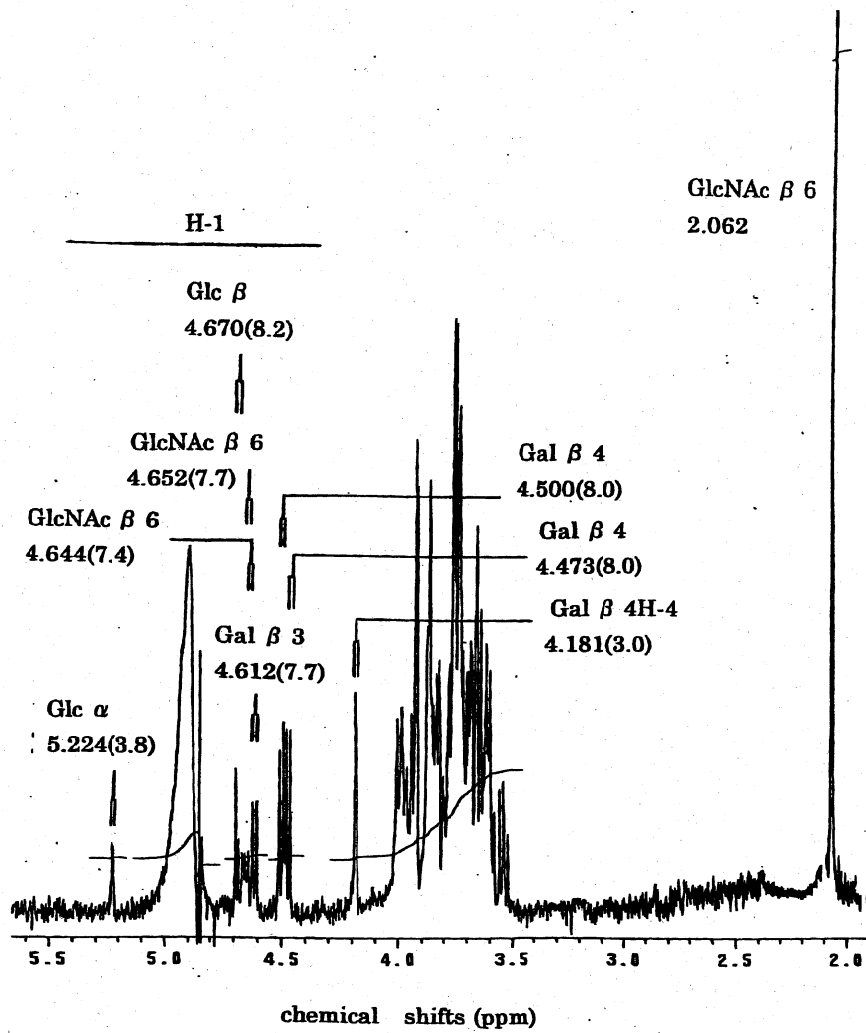


図8 フサオマキザル乳より分画したオリゴ糖の ^1H -NMR スペクトラム

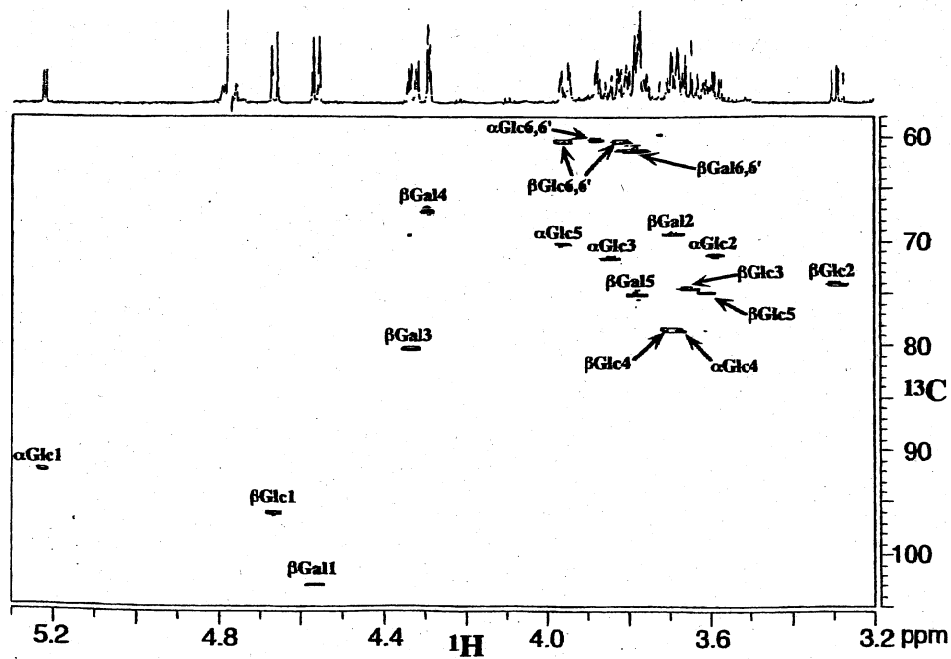


図9 イヌ乳より分画したオリゴ糖の ^1H - ^{13}C COSY スペクトラム

表1 ハナグマ乳より分画したオリゴ糖の ¹H-NMR 化学シフトの帰属

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)					
		CM-1	CM-2-1-1	CM-2-1-2	CM-2-2	CM-3	CM-4-1
H-1	Glc α	5.218(3.3)	5.219(3.8)	5.219(3.8)	5.219(3.6)	5.226(3.9)	5.225(3.8)
	Glc β	4.665(8.0)	4.663(8.0)	4.663(8.0)	4.663(7.7)	4.638(8.1)	4.668(8.1)
	Gal' β 4	4.434(7.9)	4.441(8.0)	4.441(8.0)	4.438(8.0)	4.528(7.6)	4.524(7.8)
	Gal''' β 4	4.481(7.7)	4.480(8.0)	4.550(8.0)	4.553(8.0)	-	-
		4.541(7.7)					
		4.552(6.0)					
	Fuc α 2	5.310(2.7)	-	5.309(3.0)	-	5.314	-
	Gal α 3	5.145(4.1)	-	-	5.145(3.6)	-	5.145(3.9)
	GlcNAc β 3	4.696(8.2)	4.697(8.5)	4.697(8.5)	4.704(8.5)	-	-
		4.701(8.2)	4.701(8.2)				
	GlcNAc β 6	4.642(8.6)	-	-	-	-	-
H-5	Fuc α 2	4.224	-	4.220	-	4.247	-
H-6	Fuc α 2	1.229(6.6)	-	1.227(6.6)	-	1.226(6.6)	-
NAc	GlcNAc β 3	2.031	2.034	2.039	2.035	-	-
		2.039					
	GlcNAc β 6	2.063	-	-	-	-	-

CM-1:	$\left. \begin{array}{l} \text{Fuc } \alpha \text{ 1} \rightarrow 2 \\ \text{Gal } \alpha \text{ 1} \rightarrow 3 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Gal } \beta \text{ 1} \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta \text{ 1} \\ \text{Gal } \beta \text{ 1} \rightarrow 4 \text{Glc} \end{array}$	6	CM-2-1-1: Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc
		3	CM-2-1-2: Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc
			CM-2-2: Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc
			CM-3: Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4Glc
			CM-4-1: Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc

表2 ツキノワグマ乳より分画したオリゴ糖の ¹H-NMR 化学シフトの帰属

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)					
		TKM-6	TKM-5	TKM-5-a	TKM-4-1	TKM-4-2	TKM-3
H-1	Glc α	5.223(3.9)	5.225(3.7)	5.226(3.7)	5.227(3.9)	5.180(3.9)	5.171(3.7)
	Glc β	4.665(7.8)	4.669(7.8)	4.639(7.9)	4.633(7.8)	-	4.615(8.1)
	Gal' β 4	4.451(7.8)	4.525(7.8)	4.528(7.8)	4.606(7.8)	4.505(7.8)	4.570(7.8)
	Gal'' α 3	-	5.145(3.9)	-	5.245(2.7)	5.144(3.9)	5.247(3.4)
	Fuc' α 3	-	-	-	-	5.408(3.9)	5.425(3.9)
					5.467(3.7)	5.482(4.2)	
	Fuc'' α 2	-	-	5.314	5.329(3.9)	-	5.285(3.9)
H-4	Gal' β 4	-	4.185	-	4.288(2.4)	4.163(2.7)	4.268(2.7)
H-5	Gal'' α 3	-	4.185	-	4.206	-	4.229
	Fuc'' α 2	-	-	4.24	4.364	-	4.39
					4.319		4.336
H-6	Fuc'' α 2	-	-	1.329(7.1)	1.234(6.6)	-	1.287(6.6)
	Fuc' α 3	-	-	-	-	1.190(6.6)	1.255(6.3)

TKM-6: Gal β 1 \rightarrow 4Glc
 TKM-5: Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc
 TKM-5-a: Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4Glc
 TKM-4-1: Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]Gal β 1 \rightarrow 4Glc
 TKM-4-2: Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]Glc
 TKM-3: Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]Glc

表3 ツキノワグマ乳より分画したオリゴ糖の ¹H-NMR 化学シフトの帰属

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)	
		TKM-2-1	TKM-2-2
H-1	Glc α	5.179(3.4)	5.219(3.4)
	Glc β	4.649(8.1)	4.663(8.1)
	Gal' β 4	4.416(7.6)	4.436(7.6)
	Gal''' β 4	4.593(7.6)	4.538(7.6)
	Gal''' α 3	5.245(3.2)	5.141
	Fuc' α 3	5.372(3.9)	-
		5.429(3.9)	
	Fuc''' α 3	5.141	5.141
	Fuc''' α 2	5.285(4.2)	-
	GlcNAc'' β 3	4.699(7.6)	4.713
H-4	Gal' β 4	4.098(2.2)	4.144(2.2)
	Gal''' β 4	4.266	4.159
H-5	Gal''' α 3	4.223	4.195
	Fuc''' α 2	4.329	-
H-6	Fuc' α 3	1.160(6.6)	-
	Fuc''' α 3	1.249(6.6)	1.181(6.6)
	Fuc''' α 2	1.290(6.6)	-
NAc	GlcNAc'' β 3	2.025	2.025

TKM-2-1: Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]Glc
 TKM-2-2: Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc

表4 ツキノワグマ乳より分画したオリゴ糖の ¹H-NMR 化学シフトの帰属

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (Coupling constants, Hz)	
		TKM-1-1	TKM-1-2
H-1	Glc α	5.218(3.7)	5.218(3.7)
	Glc β	4.665(8.1)	4.665(8.1)
	Gal' β 4	4.425(7.8)	4.425(7.8)
	Gal''' β 4	4.569(8.0)	4.524(7.6)
		4.595(7.3)	4.539(7.6)
	Gal''' α 3	5.244(3.4)	5.143(3.7)
	Fuc''' α 3	5.115(3.9)	5.115(3.9)
		5.136(3.7)	5.136(3.7)
	Fuc''' α 2	5.284(4.2)	-
	GlcNAc'' β 3	4.708	4.708
GlcNAc'' β 6	4.637	4.637	
H-4	Gal' β 4	4.144(3.2)	4.144(3.2)
	Gal''' β 4	4.268	4.158
H-5	Gal''' α 3	4.225	4.196
	Fuc''' α 2	4.33	-
H-6	Fuc''' α 3	1.248(6.6)	1.180(6.6)
	Fuc''' α 2	1.290(6.6)	-
NAc	GlcNAc'' β 2	2.02	2.02
	GlcNAc'' β 6	2.053	2.053

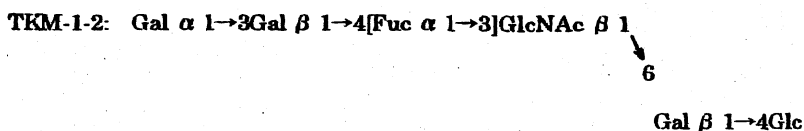
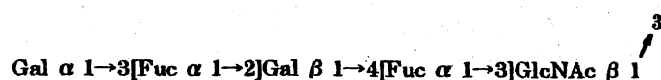
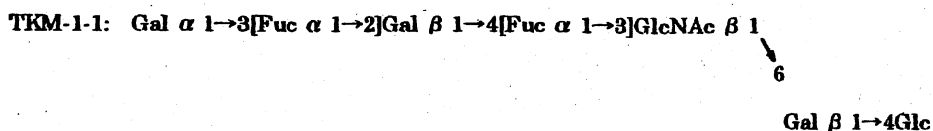


表5 ハナグマ乳より分画したオリゴ糖の ¹H-NMR 化学シフトの帰属

Reporter group	Residue	Chemical shifts, δ (coupling constants, Hz)						
		BCM-1	BCM-2	BCM-3	BCM-5-1	BCM-5-2	BCM-5-3	lacto-N-novotetraose ⁵⁾
H-1	Glc α	5.220 (3.7)	5.218 (3.8)	5.224 (3.8)	5.176 (3.3)	5.225 (3.3)	5.222 (3.3)	5.224 (3.6)
	Glc β	4.662 (7.8)	4.666 (8.0)	4.670 (8.2)	4.656 (7.6)	4.667 (7.8)	4.668 (8.1)	4.670(8.0)
	Gal' β 4	4.533 (7.8)	4.428 (8.0)	4.500 (8.0)	4.433 (7.6)	4.512 (7.8)	4.460 (7.8)	4.500(7.8)
	Gal''' β 4	-	4.472 (7.7)	4.473 (8.0)	-	-	-	-
			4.481 (8.0)					
	Gal'' β 3	-	-	4.612 (7.7)	-	4.613 (7.6)	-	4.612(7.6)
	Gal'' β 6	-	-	-	-	-	4.488 (7.8)	-
	Fuc α 3	-	-	-	5.383 (3.8)	-	-	-
					5.442 (3.6)			
	GlcNAc'' β 3	-	4.702 (8.2)	-	-	-	-	-
		4.698 (8.5)						
GlcNAc'' β 6	-	4.644 (7.7)	4.652 (7.7)	-	-	-	4.628(8.4)	
		4.637 (8.0)	4.644 (7.4)				4.623(8.4)	
H-3	Gal' β 4	4.126 (2.9) ⁴⁾						
H-3 _{ax}	Neu5Ac	1.801 (12.21 ²⁾ , -11.96 ³⁾)	-	-	-	-	-	-
H-3 _{ax}	Neu5Ac	2.758 (4.6) ¹⁾	-	-	-	-	-	-
H-4	Gal' β 4	4.106 (2.9) ⁴⁾	4.147 (3.3) ⁴⁾	4.181 (3.0) ⁴⁾		4.199 (3.0) ⁴⁾		4.181(3.4) ⁹⁾
H-6					1.184 (6.6) ⁵⁾			
NAc	GlcNAc'' β 3	-	2.031	-	-	-	-	-
	GlcNAc'' β 6	-	2.06	2.062	-	-	-	2.064
	Neu5Ac'' α 3	2.03	-	-	-	-	-	-

1) $J_{3eq,4}$; 2) $J_{3ax,4}$; 3) $J_{3ax,3eq,4}$; 4) $J_{3,4}$; 5) $J_{6,6'}$.

6) The data was from ref. (24)

表6 イヌ乳より分画したオリゴ糖の ¹H, ¹³C-NMR 化学シフトの帰属

		Designated proton/carbon and value ^a						
Quantity	Residue	1	2	3	4	5	6	6'
δ (¹ H)	α -Glc	5.225	3.59	3.84	3.68	3.96	3.88	3.88
	β -Glc	4.665	3.29	3.65	3.70	3.61	3.96	3.82
	β -Gal ^b	4.568 (β), 4.569 (α)	3.69	4.34	4.30	3.78	3.79	3.79
δ (¹³ C)	α -Glc	92.1	71.4	71.7	78.6	70.3	60.2	
	β -Glc	96.0	74.1	74.6	78.5	75.0	60.3	
	β -Gal	102.8	69.4	80.3	67.1	75.2	61.2	
¹ J _{CH}	α -Glc	169.7	144.7	144.7		142.1		
	β -Glc	161.8	144.7	144.7		143.4		
	β -Gal	163.1	147.3	144.7	148.6	143		
ⁿ J (¹³ C)	α -Glc A	A3, A5	A3	A2, A4	A3, A5, A6			
	β -Glc B		B1, B3	B2, B4	B3, B5, B6			
	β -Gal C	A4, B4	C1, C3	C2, C4	C2, C3			

^aChemical shifts in ppm from internal acetone (¹H, δ 2.225; ¹³C, δ 30.5); ¹J_{CH} in Hz; ⁿJ (¹³C), HMBC correlations between ¹H designated by column and row headings and ¹³C identified by appropriate letter and number (relatively weak correlations are italicised).

^bSmall chemical shift differences, associated with each anomer, were evident for H-1 and H-3 in ¹H spectra but were not resolved in the HSQC spectra (see Fig. 1 and projection).

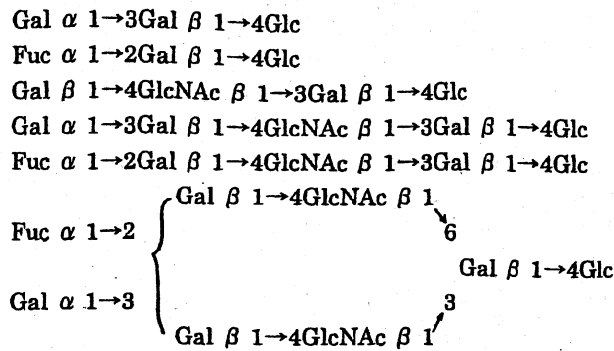
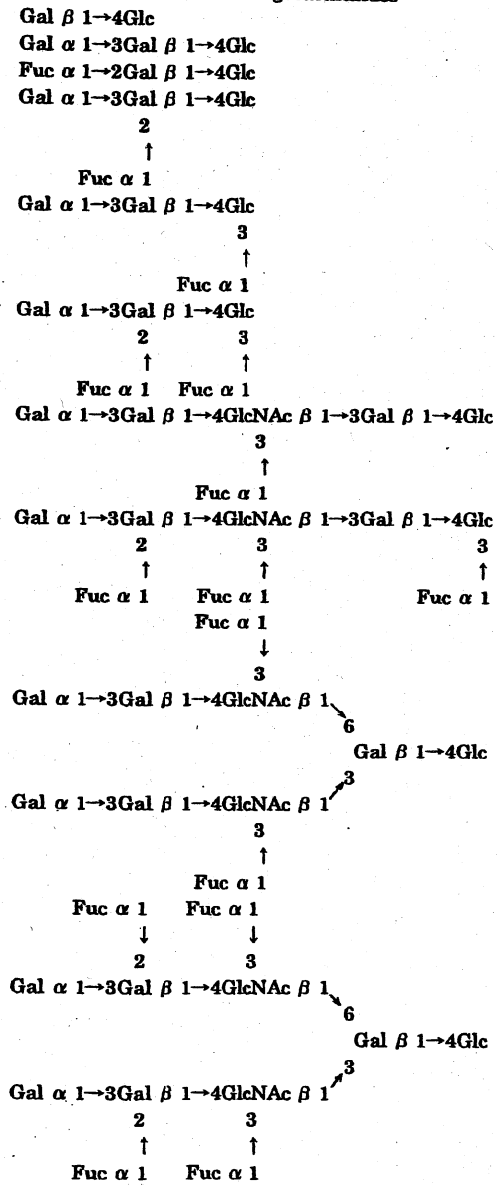


図 10 ハナグマミルクオリゴ糖の化学構造

1. asian black bear milk oligosaccharides



2. brown bear milk oligosaccharides

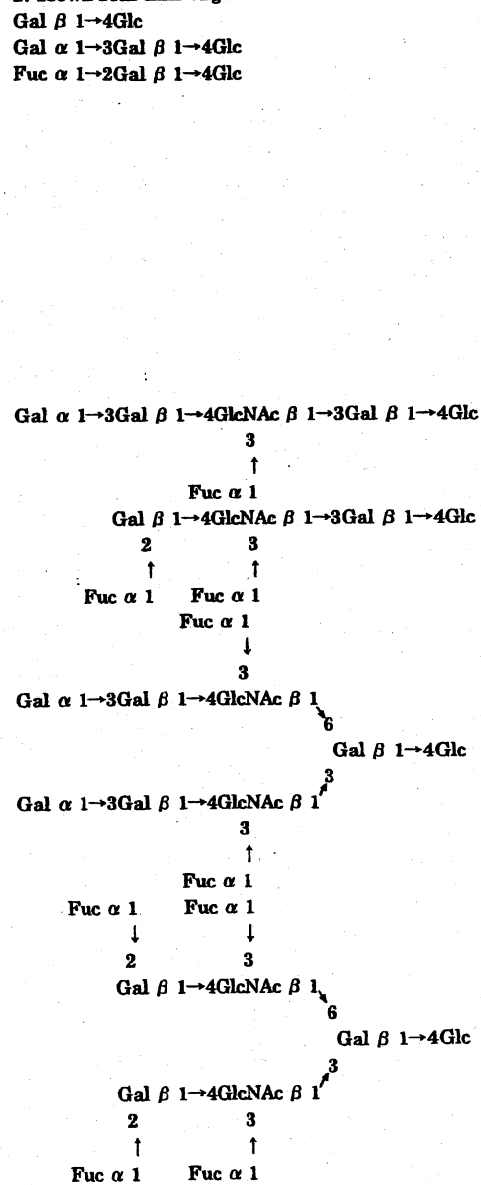


図 11 ツキノワグマミルクオリゴ糖とヒグマミルクオリゴ糖の比較

Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]Glc

Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc

Gal β 1 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 4Glc

Gal β 1 \rightarrow 3[Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6]Gal β 1 \rightarrow 4Glc

Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3[Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6]Gal β 1 \rightarrow 4Glc

Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc

図 12 フサオマキザルミルクオリゴ糖の化学構造

Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4Glc

Gal(3-OSO₃) β 1 \rightarrow 4Glc

図 13 イヌミルクオリゴ糖の化学構造

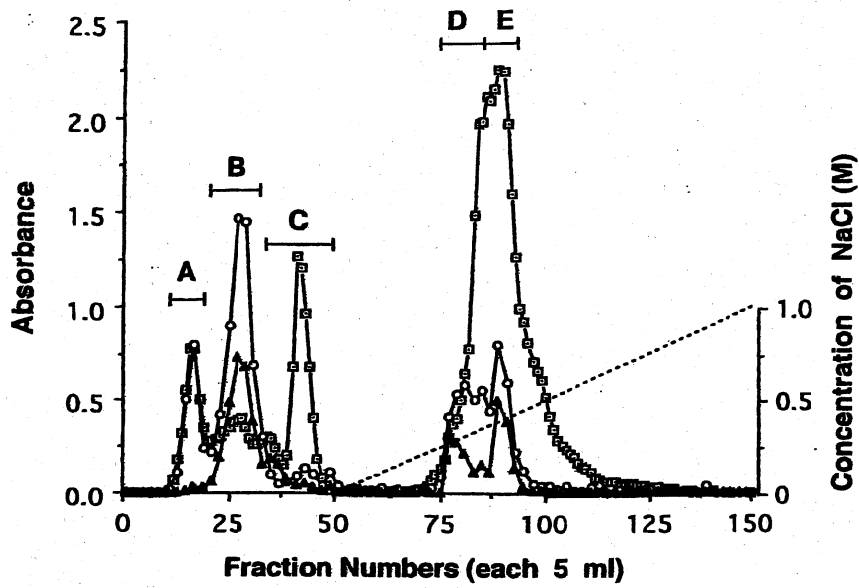


図 14 ヒツジ初乳シアリルオリゴ糖画分の DEAE-Cellulofine A-500 によるアニオン交換クロマトグラフィー

検出：220 nm での紫外吸収 (□)

フェノールー硫酸法 (490 nm, ○)

レゾルシノールー塩酸法 (580 nm, ▲)

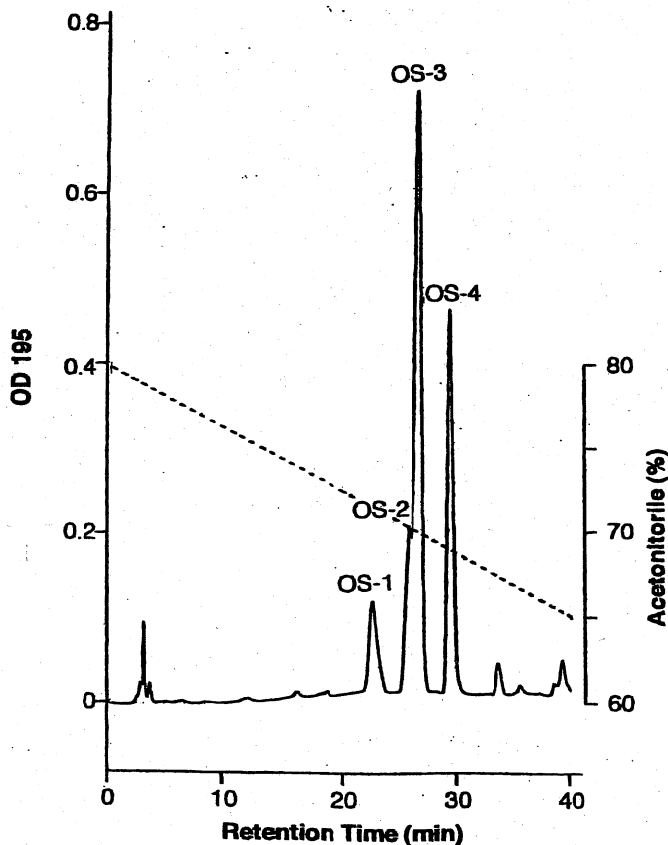
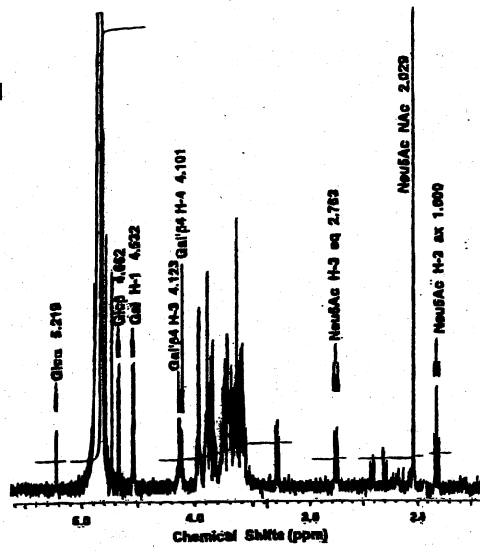


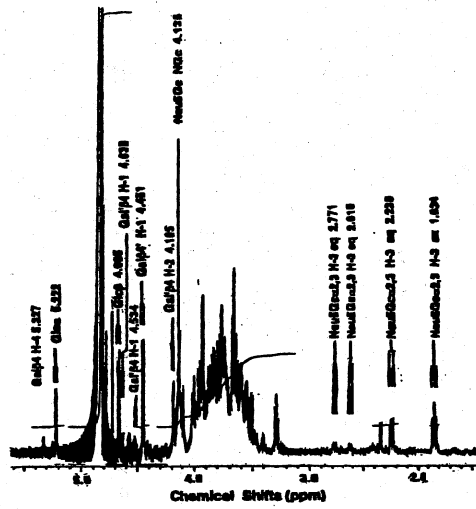
図 15 ヒツジ初乳シアリルオリゴ糖 B 画分の TSK-gel Amido-80 カラム(4.6 X 250 mm)による HPLC

検出：195 nm での紫外吸収

OS-1



OS-3



OS-4

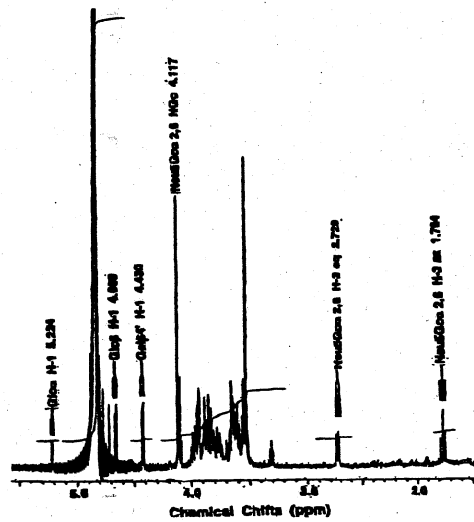


図 16 ヒツジ初乳シアリルオリゴ糖の ^1H -NMR スペクトラム

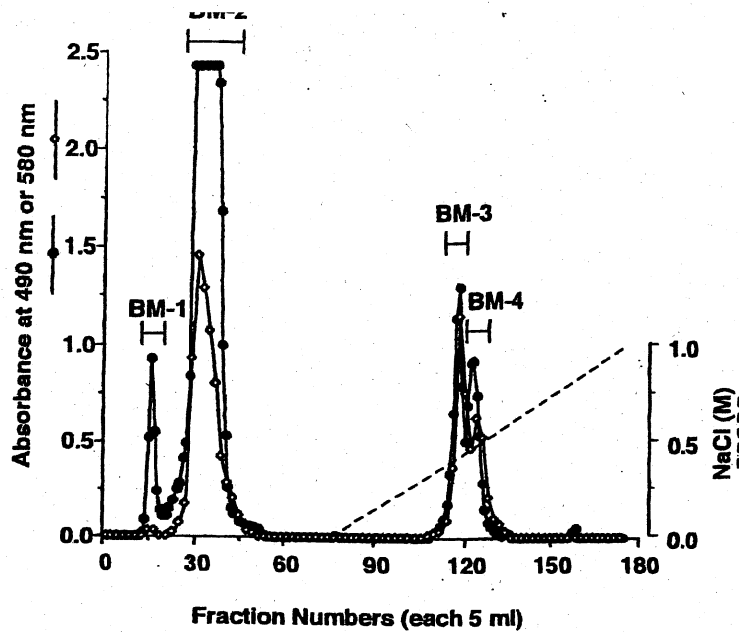


図17 ウシ初乳シアリルオリゴ糖画分の DEAE-Cellulofine A-500 によるアニオン交換クロマトグラフィー
 検出：フェノール硫酸法（490 nm, ●）
 レゾルシノール-塩酸法（580 nm, ◇）

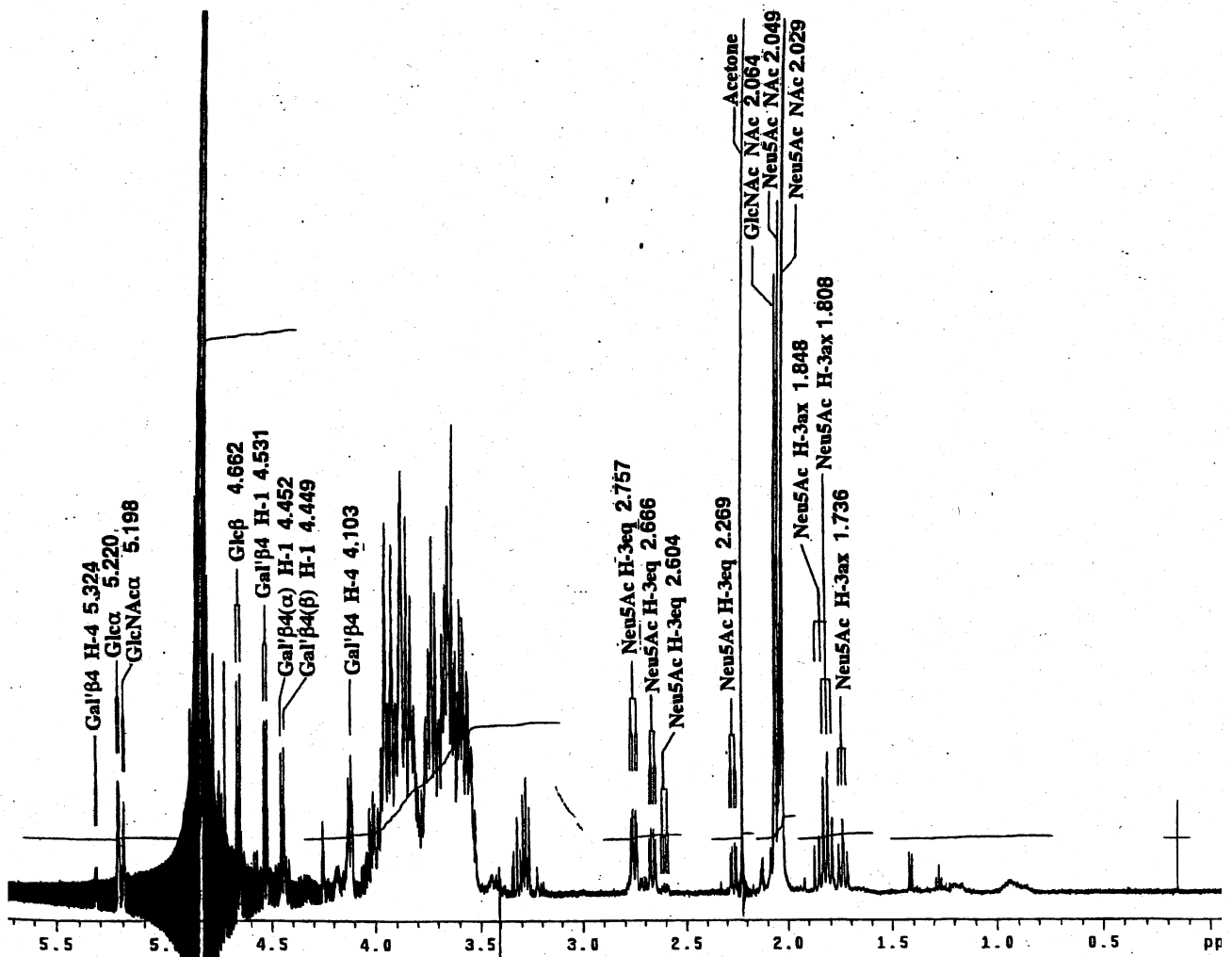


図18 ウシ初乳シアリルオリゴ糖の ^1H -NMR スペクトラム

ヒツジ

Neu5Ac α 2→3Gal β 1→4Glc

Neu5Gc α 2→6Gal β 1→4Glc

Neu5Gc α 2→3Gal β 1→4Glc

Neu5Gc α 2→3Gal β 1→4Glc のラクトン誘導体

ウシ

Neu5Ac α 2→6Gal β 1→4GlcNAc

Neu5Ac α 2→3Gal β 1→4Glc

Neu5Ac α 2→3Gal β 1→4Glc のラクトン誘導体

図 19 ヒツジおよびウシ初乳シアリルオリゴ糖

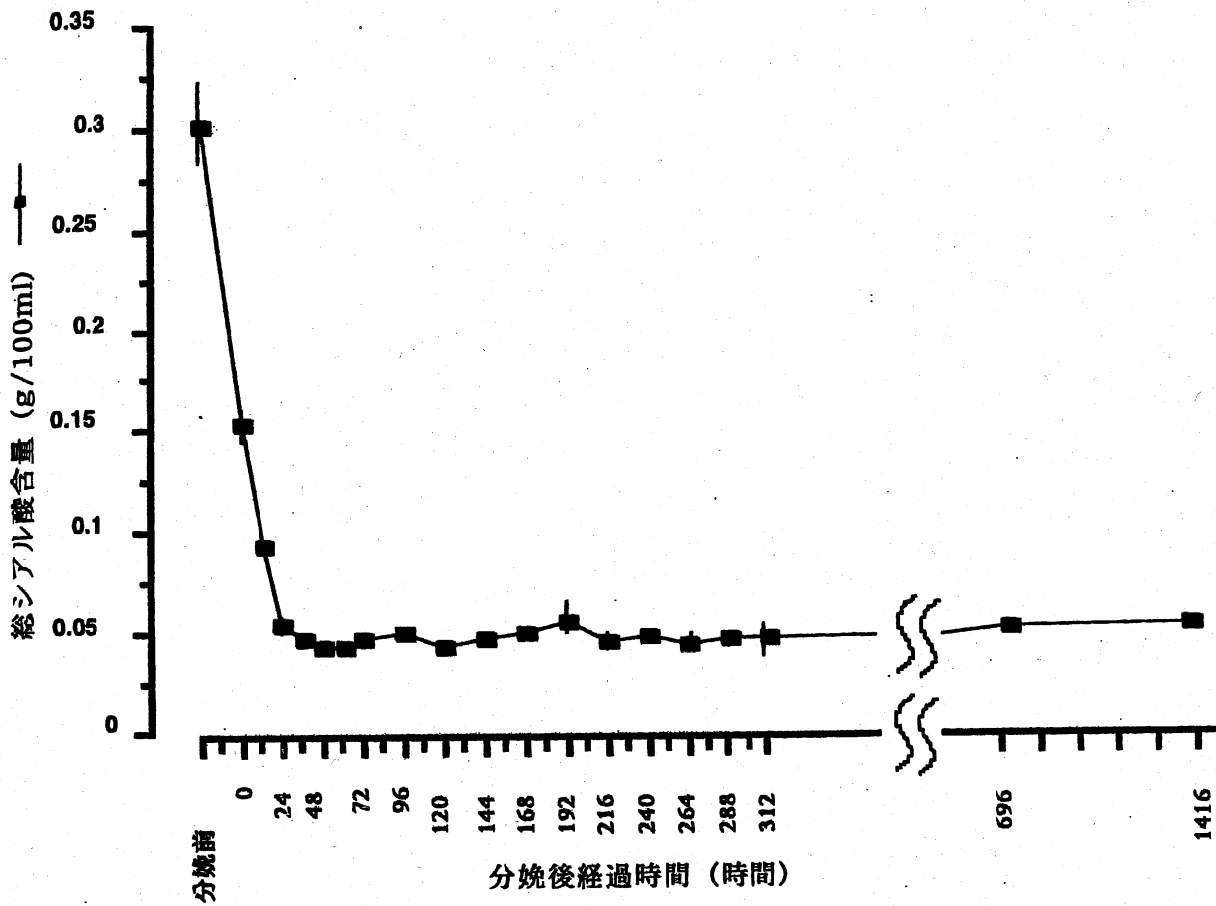


図 20 ウシ乳中でのシアル酸含量の泌乳時期による変動

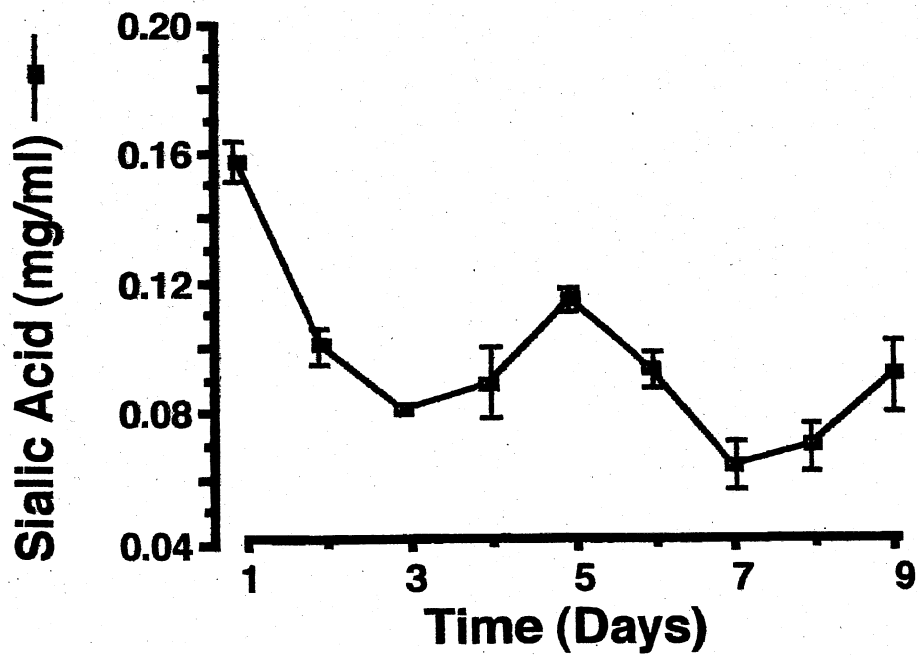


図 21 ヒツジ乳中でのシアル酸含量の泌乳時期による変動

表7 タマーワラビー乳モノシアルル(SO-1)およびジシアルルオリゴ糖(SO-2)による 3T3 細胞への DNA 合成促進効果

Sample		mean cpm \pm S.E. (Growth Ratio)			
		Exp. No.			
		1	2	3	4
SO-2	control	1540.8 \pm 80.5 (100)	1121.0 \pm 225.2 (100)	1253.5 \pm 44.3 (100)	1546.0 \pm 88.5 (100)
	1 μ g/ml	2025.8 \pm 141.4 (131.5)	2514.0 \pm 392.3* (224.3)	1938.3 \pm 71.6* (154.6)	2366.0 \pm 404.8 (153.0)
	10 μ g/ml	2499.8 \pm 98.7* (162.2)	2590.0 \pm 113.5* (231.0)	2381.0 \pm 87.8* (190.0)	2648.3 \pm 377.6* (159.6)
SO-1	control	1540.8 \pm 80.5 (100)	1121.0 \pm 225.2 (100)	1253.5 \pm 44.3 (100)	1546.0 \pm 88.5 (100)
	1 μ g/ml	1743.8 \pm 91.8 (113.2)	1411.0 \pm 130.7 (125.9)	1449.5 \pm 115.4 (115.6)	1713.0 \pm 179.5 (110.8)
	10 μ g/ml	2056.3 \pm 136.1 (133.5)	1720.0 \pm 336.4 (153.4)	1574.5 \pm 59.4 (125.6)	1919.0 \pm 285.6 (124.1)

(); Growth Ratio = (mean cpm in tested - background / mean cpm in control - background) \times 100
n = 4, *, p < 0.01

表8 タマーワラビー乳 SO-2 関連オリゴ糖による 3T3 細胞への DNA 合成促進効果

Sample		mean cpm \pm S.E. (Growth Ratio)		
		Exp. No.		
		1	2	3
Asialo-SO-2	control	1540.8 \pm 80.5 (100)	1253.5 \pm 44.3 (100)	2107.3 \pm 88.9 (100)
	1 μ g/ml	1723.8 \pm 92.3 (111.9)	1344.0 \pm 85.9 (107.2)	1817.8 \pm 83.9 (86.3)
	10 μ g/ml	2106.5 \pm 102.8 (136.7)	1587.0 \pm 91.6 (126.6)	1866.5 \pm 106.2 (88.6)
N-acetylneuraminic acid	control	1540.8 \pm 80.5 (100)	1253.5 \pm 44.3 (100)	2107.3 \pm 88.9 (100)
	1 μ g/ml	1317.5 \pm 84.3 (85.5)	1633.5 \pm 60.6 (130.3)	1905.8 \pm 56.7 (90.4)
	10 μ g/ml	1642.5 \pm 74.1 (106.6)	1304.0 \pm 101.3 (104.0)	2037.5 \pm 63.5 (96.7)
Neu5Aco2-3Gal β 1-4Glc	control	1745.8 \pm 61.0 (100)	1413.0 \pm 78.0 (100)	1341.3 \pm 49.8 (100)
	1 μ g/ml	1542.5 \pm 111.1 (88.4)	1940.5 \pm 122.4 (137.3)	1421.8 \pm 71.7 (106.0)
	10 μ g/ml	1642.5 \pm 74.1 (103.2)	1304.0 \pm 101.3 (112.5)	2037.5 \pm 63.5 (103.9)
Neu5Aco2-6Gal β 1-4Glc	control	1745.8 \pm 61.0 (100)	1413.0 \pm 78.0 (100)	1341.3 \pm 49.8 (100)
	1 μ g/ml	1877.3 \pm 77.3 (107.5)	2104.3 \pm 117.0 (148.9)	1577.3 \pm 172.8 (117.6)
	10 μ g/ml	1924.3 \pm 92.1 (110.2)	1934.3 \pm 73.3 (136.9)	1444.8 \pm 63.9 (107.7)

(); Growth Ratio = (mean cpm in tested - background / mean cpm in control - background) \times 100
n = 4, *, p < 0.01

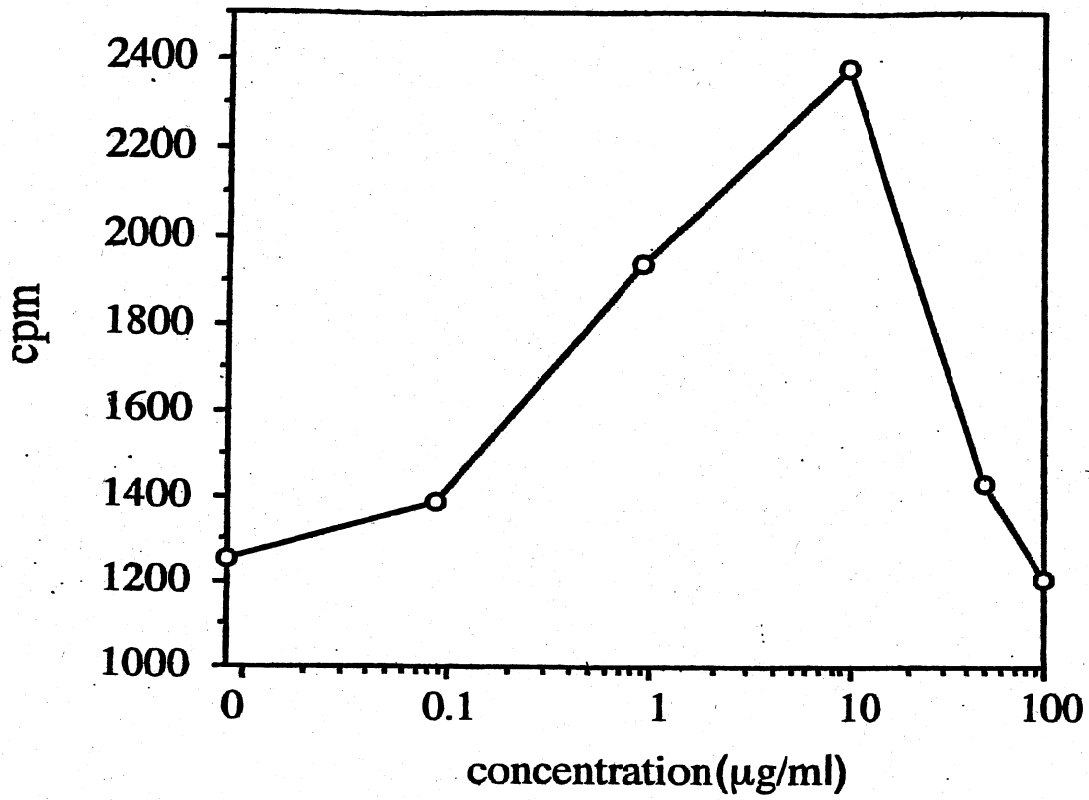


図 22 各濃度でのタマーワラビー乳ジシアリルオリゴ糖 (SO-2) による 3T3 細胞への DNA 合成促進効果

ミルクオリゴ糖の生理的意義と生理活性素材としての利用可能性

浦島 匡・中村 正・齋藤忠夫¹

帯広畜産大学生物資源利用・東北大学大学院農学研究科動物資源化学¹

(要約) ヒトミルクオリゴ糖は、1950年代から現在に至るまでに80種類以上の異なる化学構造が解析されており、ドナーのルイス式血液型による糖鎖構造の個体変動も観察されている。一方、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌなどのミルクオリゴ糖は演者らが解析し、これらの動物種間において相同性ととも不均一性が認められた。演者らが解析したオリゴ糖の中で、ウシ、ヤギ、ヒツジの初乳に認められた Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc や、ヒツジ初乳の Neu5Gc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc ラクトン、またイヌ乳の Gal β 1 \rightarrow 4Glc 3-O-sulphate は、他の研究者の成果から生理活性が示唆され、将来における生理活性素材としての利用可能性も考えられる。また、単孔類、有袋類、真獣類食肉目クマ科のように、乳中においてラクトースよりも他のオリゴ糖の方が多い動物種も存在するが、それらの種の生理的共通性として、新生仔を超未熟状態で出産することがあげられることから、ミルクオリゴ糖は未熟な乳仔の成長や体形成に役割をもつことが示唆された。

(はじめに) 哺乳動物の乳汁には一般的に主要糖質としてのラクトース(Gal β 1 \rightarrow 4Glc)の他、多種類の他のオリゴ糖(ミルクオリゴ糖)が含まれている。例えば人乳には約7%の糖質が含まれているが、そのうちの80%をラクトースが、残りの20%を数十種類ものミルクオリゴ糖群が占めており、ミルクオリゴ糖の含量は人乳1lあたり12-14gにもものぼる。それは乳児腸管内で消化されない一方で、腸管内でビフィズス菌の増殖を促進したり、病原菌やウイルスに対する感染防衛的な働きが示唆されている。ヒト以外のミルクオリゴ糖の解析は、1950年代、60年代にKuhnらがウシ初乳のシアリルオリゴ糖の解析を、またMesserらが有袋類のオリゴ糖の解析を行った他は見あたらなかったが、演者らはウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、タマーワラビー(有袋類)、ヒグマ、ツキノワグマ、イヌの中性また酸性ミルクオリゴ糖の解析を行った。従来ミルクオリゴ糖群は、泌乳期乳腺細胞内で高濃度に存在するラクトースを、複合糖質の合成酵素群がアクセプターと誤認した結果生合成されたものであり、生理的意義をもたないとする説も提出されていたが、演者らは解析された化学構造と他の研究者による関連糖鎖に対する機能の解析から、いくつかのオリゴ糖についての生理的意義と利用可能性について見解を保持している。

(材料と方法) 分娩後2日以内のウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジの初乳、分娩後77日のヒグマの乳、分娩後30日~90日のツキノワグマの乳、タマーワラビーの常乳および分娩後17日のイヌの乳を材料とした。乳からのオリゴ糖の分離方法は試料により異なるが、代表的な方法を記す。乳試料に対し4倍量のクロロホルム/メタノール(2/1, v/v)を添加し攪拌した後、4°C3500回転で遠心分離し、上層のメタノール層を糖質画分とした。メタノールを減圧除去した後、BioGel P-2によるゲル濾過に供して、各オリゴ糖の分離を行った。分離した中性オリゴ糖は、¹H-NMRで構造決定した。ゲル濾過によって中性糖と分画した酸性糖は、DEAE-Cellulofine A-500によるイオン交換クロマトグラフィーと、TSKgel Amido-80カラムによるHPLCに供して、各オリゴ糖の分離を行った。さらにゲル濾過で脱塩してから、¹H-NMRで構造決定した。

(結果および考察) 演者らは、8種のウシ中性オリゴ糖、6種のウマ中性オリゴ糖、4種のヤギ中性ならびに4種のシアリルオリゴ糖、3種のヒツジ中性ならびに5種のシアリルオリゴ糖、および1種のイヌ酸性オリゴ糖の化学構造を解析した。その中で、ウシ初乳などには、ヒトミルクオリゴ糖にはない特

徴をもつオリゴ糖の存在が示された。

この中で、ウシ、ヤギ、ヒツジの初乳に、Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc の存在が示された。同糖と同一の糖鎖には、Clostridium 属のトキシン-A に対する吸着能のあることが、名古屋大学の西田らによって報告されている。このことから、同糖はトキシン-A に対する中和剤としての利用可能性が示唆される。また、Gal α 1 \rightarrow 3Gal ユニットに対する抗体は、ヒト血中において高濃度で存在するが、同ユニットを含む糖鎖はブタなどの臓器に広く認められることから、動物臓器を原料とする人工臓器をヒトに移植した場合、抗原-抗体反応が起こる。その点に着目し、Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc は臓器移植時の免疫緩和剤として利用できる可能性が、明治乳業の修城によって示している。

ヒツジ初乳において Neu5Gc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc の 1 \rightarrow 2 および 1 \rightarrow 4 ラクトンの存在が示された。東京工業大学の佐藤らは、類似構造をもつ GM₃ のラクトン体は、インフルエンザウィルスのヘマグルチニンに対する結合能をもつ一方で、ウィルスのノイラミニダーゼによって加水分解されないことを示し、GM₃ ラクトンがウィルスの受容体となる可能性を指摘している。そのことから、ヒツジ初乳における上のラクトン誘導体は、授乳した乳仔の腸管において、インフルエンザウィルスに対する付着阻止能を保持している可能性が考えられる。

イヌ乳において、Gal β 1 \rightarrow 4Glc 3'-O-sulphate の存在が示された。従来ラットの乳および泌乳期乳腺において Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc 6'-O-sulphate および Gal β 1 \rightarrow 4Glc 6'-O-sulphate の存在と、³⁵S]タウリンを取り込ませたラットの乳に N-アセチルノイラミニラクトース硫酸 [³⁵S] の存在が報告されており、これらのオリゴ糖が乳仔に対して硫酸基の運搬への機能をもつことも示唆されている。タウリンは乳児の網膜形成に働きをもつことが知られているが、演者らのオリゴ糖も乳仔への硫酸基の運搬と、乳仔に対し網膜などの組織形成に働きをもつことが示唆される。

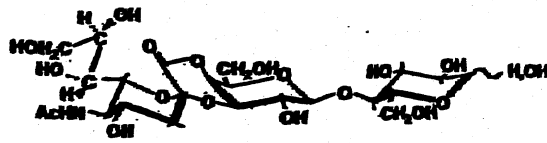
従来より、単孔類 (カモノハシ、ハリモグラ)、有袋類の乳ではラクトースよりも、ミルクオリゴ糖の方が存在量の多いことが報告されていたが、演者らはヒグマおよびツキノワグマの乳においても、ラクトースよりもミルクオリゴ糖の方が多いことを明らかにした (図2参照)。両種のミルクオリゴ糖は、¹H-NMR などから図3のように決定された。ヒグマの乳では、Fuc α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Gal および Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Gal が、ツキノワグマの乳では、B-pentasaccharide および Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc が主要糖質であった。両種のオリゴ糖鎖が、非還元末端の単糖残基などで異なる点が注目される。単孔類、有袋類と真獣類食肉目のクマ科では、哺乳動物進化の位置においては大きく隔たっているが、これらの種では母親の体重に比べて新生仔の体重が極端に少なく、超未熟な新生仔を出産する点が生理的共通点としてあげられる。このことから、ラクトース以外のミルクオリゴ糖は、未熟な乳仔の成長や体形成に働きをもつことが示唆された。

参考文献

- 1.西田芳弘、小林一清、第3回「糖鎖の新しい生理機能」セミナー講演要旨、p 65.
- 2.佐藤智典、石井恵、大竹冬華、井上裕規、岡畑恵雄、第1回「糖鎖の新しい生理機能」セミナー講演要旨、第3回講演要旨集での抜粋、p 118.
- 3.T.Urashima, T.Saito, J.Nishimura and H.Ariga, Biochim. Biophys. Acta, 992, 375 (1989).
- 4.T.Urashima, T.Saito, K. Ohmisya and K. Shimazaki, Biochim. Biophys. Acta, 1073, 225 (1991).
- 5.T.Urashima, K.Kusaka, T.Nakamura, T.Saito, N.Maeda and M.Messer, Biochim. Biophys. Acta, 1334, 247 (1997).
- 6.T.Nakamura, T.Urashima, M.Nakagawa and T.Saito, Biochim. Biophys. Acta, 1381, 286 (1998).

その他

(A)



(B)

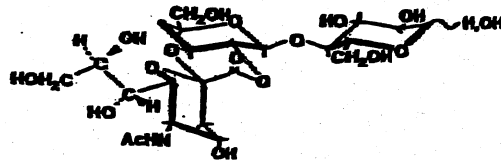
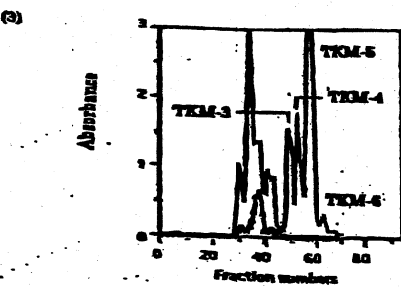
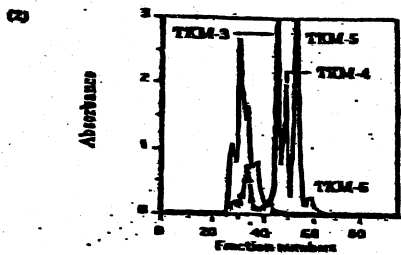
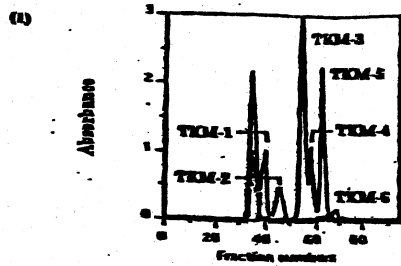


図1 ヒツジ初乳より分離した Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc ラクトン
(A) 1-4 ラクトン (B) 1-2 ラクトン



1. ツキノワグマミルクオリゴ糖
Gal β 1-4Glc

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1 Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1 Fuc α 1

2. ヒゲマミルクオリゴ糖
Gal β 1-4Glc

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc

Fuc α 1 Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1 Fuc α 1

Fuc α 1 Fuc α 1

ツキノワグマ乳糖質画分の Bio Gel P-2 カラムによるゲルマトグラム

フェノール硫酸法で発色

過ヨウ素酸-レゾルシノール法で発色

分娩後37日目の乳 (2) 分娩後61日目の乳

分娩後91日目の乳

TKM-3: B-pentasaccharide TKM-5: Gal α 1-3Gal β 1-4Glc

図3 ツキノワグマとヒゲマのミルクオリゴ糖

ミルクオリゴ糖

ヒトなどの哺乳動物の乳汁中では、主要糖質としてのラクトース(Gal β 1-4Glc)の他に、ラクトースユニットを還元末端側にもち、N-アセチルグルコサミン、D-ガラクトース、L-フコース、N-アセチルノイラミン酸などが付加した多種類のオリゴ糖が存在する。それらのオリゴ糖を総称してミルクオリゴ糖と呼ぶ。ミルクオリゴ糖は、例えば人乳では1.2-1.4%含まれ、これまでに80種類もの化学構造が解析されているが、ドナーのルイス式血液型に応じた個体変動も報告されている。80種類ものヒトミルクオリゴ糖は、コア骨格によって10系列に分類されている。ミルクオリゴ糖の化学構造は、複合糖質とくに糖脂質の糖鎖構造と類似しており、それらの生合成は複合糖質の生合成を司る糖転移酵素と同一の酵素系によって行われると考えられている。その生合成は、泌乳期乳腺細胞内サイトソルで行われているとする仮説もあるが、詳細はわかっていない。

乳中の感染防御因子

病原体が生体に侵入して感染を引き起こすには、生体細胞に吸着すること、細胞内に入って毒性を発起するなどの種々の過程が必要であるが、乳汁には授乳した乳児の腸管内でその過程を遮断する成分が含まれている。初乳にとくに多く含まれる免疫グロブリンは、母体に侵入した病原体に対して母体内で作られ抗体であるが、これは自ら抗体を産生することのできない乳児にとっては、母体から授乳で受け継ぐことにより、病原体に対する感染防御を司っている。ラクトフェリンは、乳児の腸管内で病原性大腸菌などに対し、増殖に必要な鉄イオンを奪ったり、病原性細菌の細胞膜のリポポリサッカリドを脆弱化させることにより、静菌的な作用を担っていると考えられている。ミルクオリゴ糖も感染防御因子の一つであり、その機構としては、病原性細菌やウイルスが乳児腸管に付着するのを阻止する、細菌の産生する毒素を中和する、腸管内で有用性細菌であるビフィズス菌の増殖を促進し、病原菌が腸管内に定着できないような腸内環境を作り出すなどが考えられている。育児用調製粉乳は、乳児にとっては母乳に比べて、ヒト型の抗体を添加できないという不利な面があるが、抗体以外の感染防御物質を強化することで、不利面をカバーするような調製方法がとられている。ヒト型の複雑な化学構造をもつオリゴ糖を人工的に調製し、育児用調製粉乳への添加を図っていくことは、その感染防御能を強化するための方法の一つであろう。

シアル酸

ノイラミン酸のアシル誘導体の総称で、自然界に広く分布する。一般に、糖タンパク質やガングリオシドのヘテロオリゴ糖の非還元末端を占め、酸に不安定な α -グリコシド結合で結合している。15種類以上のシアル酸の存在が知られているが、乳中の遊離シアルオリゴ糖は、N-アセチル、N-グリコリルの2種類のシアル酸でもっぱら占められている。しかしながら、牛乳中の脂肪球膜に付着しているガングリオシドには、N-アセチルノイラミン酸の7位、8位、9位がO-アセチル化された誘導体も結合している。人乳中にはN-グリコリルノイラミン酸の結合したミルクオリゴ糖は存在しないが、ウシ、ヤギ、ヒツジの初乳にはN-アセチルノイラミン酸の結合したオリゴ糖とともに、N-グリコリルノイラミン酸の結合したオリゴ糖も含まれている。乳中でのシアル酸含量は、初乳期では常乳期よりも5倍もの濃度で含まれる。乳児腸管細胞へのウイルスの感染に対し、細胞表面の複合糖質のシアル酸が何らかの役割を果たしていると考えられるが、乳中に高濃度に存在するシアルオリゴ糖は、腸管細胞へのウイルスの付着に対し阻止する働きをしているとも考えられる。

浦島 匡

うらしまただす(Urashima Tadasu)

郵便番号 080-8555

帯広市稲田町西2線11番地帯広畜産大学生物資源科学科
生物資源利用学講座助教授

TEL0155-49-5566

FAX0155-49-5577

E-mail urashima@obihiro.ac.jp

昭和55年 3月 東京農工大学農芸化学科卒業

昭和57年 3月 東北大学大学院農学研究科博士前期過程修了

昭和61年 3月 東北大学大学院農学研究科博士後期過程修了

昭和61年 4月 帯広畜産大学畜産学部助手

平成3年 3月 - 12月 文部省在外研究員(シドニー大学生化学部門)

平成6年 4月 帯広畜産大学畜産学部助教授

研究の動機と抱負

1986年に大学院を修了し、仙台から帯広に赴任してきた私は、この地域の広大な大自然と広々とした牧場風景に深い感銘を受けた。またこの地域には、ウシの牧場の他に本州地域ではほとんど飼育していないウマ、ヒツジ、ヤギの牧場もあることを知り、大学院の学生であったころに身につけた糖質化学の技術と乳に対する知識をいかして、この地域にふさわしい仕事をしようと思い立ったのが、この研究に入った至って単純な動機であった。幸いにして、ウシやヒツジの初乳で人乳には見つかっていない新規なオリゴ糖が見つかり論文にしたところ、有袋類ミルクオリゴ糖に関して1970年代から精力的な仕事をしてきたシドニー大学のDr. M.Messerから別刷り請求が届いた。私は院生時代からかれの論文に興味をもって読み直し、ミルクオリゴ糖の意義を解明するかぎは、乳中でその量の豊富な哺乳動物種を調べることにあると考えていたので、文部省在外研究員の機会を利用して1991年にシドニー大学に留学した。それ以降、ミルクオリゴ糖の量や種類の豊富な哺乳動物種を探していたが1995年来日したDr. M.Messerと道内ののぼりべつクマ牧場に観光に出かけて、「タダス、クマのミルクオリゴ糖を解析してみないか。」ということになり、その解析を行ったところ、ヒゲマ乳ではラクトースよりも3糖の方が多という事実が、真獣類でははじめて明確になった。1998年になって、岐阜大学獣医学科の坪田先生からわけていただいたツキノワグマのミルクオリゴ糖を分析して、ヒゲマミルクオリゴ糖とは化学構造に微視的不均一性のあることに気がついた。以前に読んだ山川民夫先生の著書「糖質物語」の中で、先生は西洋犬と日本犬の血中におけるN-アセチルノイラミン酸とN-グリコリルノイラミン酸の分布割合に違いのあることを述べておられたが、この事実と当方らのクマ種間のミルクオリゴ糖の微視的不均一性とか印象的に重なってくるのである。

以上のように、これまであまりアカデミックな動機において本研究を進めてきたわけではないが、これからは集めた各種のオリゴ糖を利用して、細菌毒素中和能とかウイルスの宿主細胞への付着阻止とか、ミルクオリゴ糖の機能解析に関わるような解析を、他研究室の友人とともに進めていきたいと考えている。