

5.2 機能性オリゴ糖

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

浦島 匡

1. ウシミルクオリゴ糖

哺乳動物の乳は、糖質画分の80%以上をラクトース (Gal β 1-4Glc) が占めるが、一方で少量ながらミルクオリゴ糖と呼ばれる多種類のラクトース単位を還元末端側に有するオリゴ糖群も含んでいる^{1,2)}。ウシの場合、分娩直後の初乳は1 g/L以上のミルクオリゴ糖を含むが³⁾、常乳には痕跡量程度しか含まれない⁴⁾。一方ヒトの場合、初乳で22～24 g/L、常乳で12～13 g/Lのミルクオリゴ糖を含んでいる^{5,6)}。図1には、ウシ初乳でこれまでに報告されている12種類の酸性オリゴ糖と10種類の中性オリゴ糖の化学構造を示し

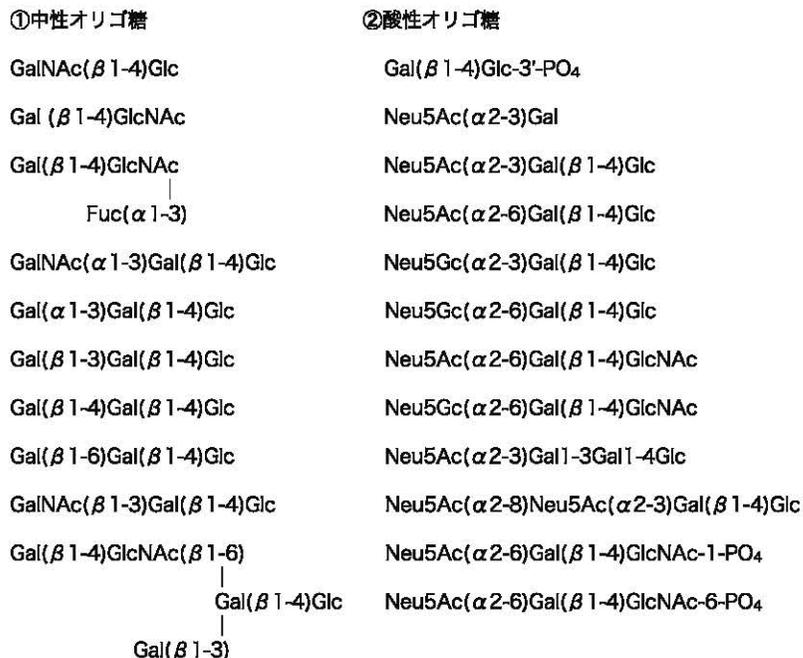


図1 これまでに構造決定されているウシ中性ならびに酸性ミルクオリゴ糖

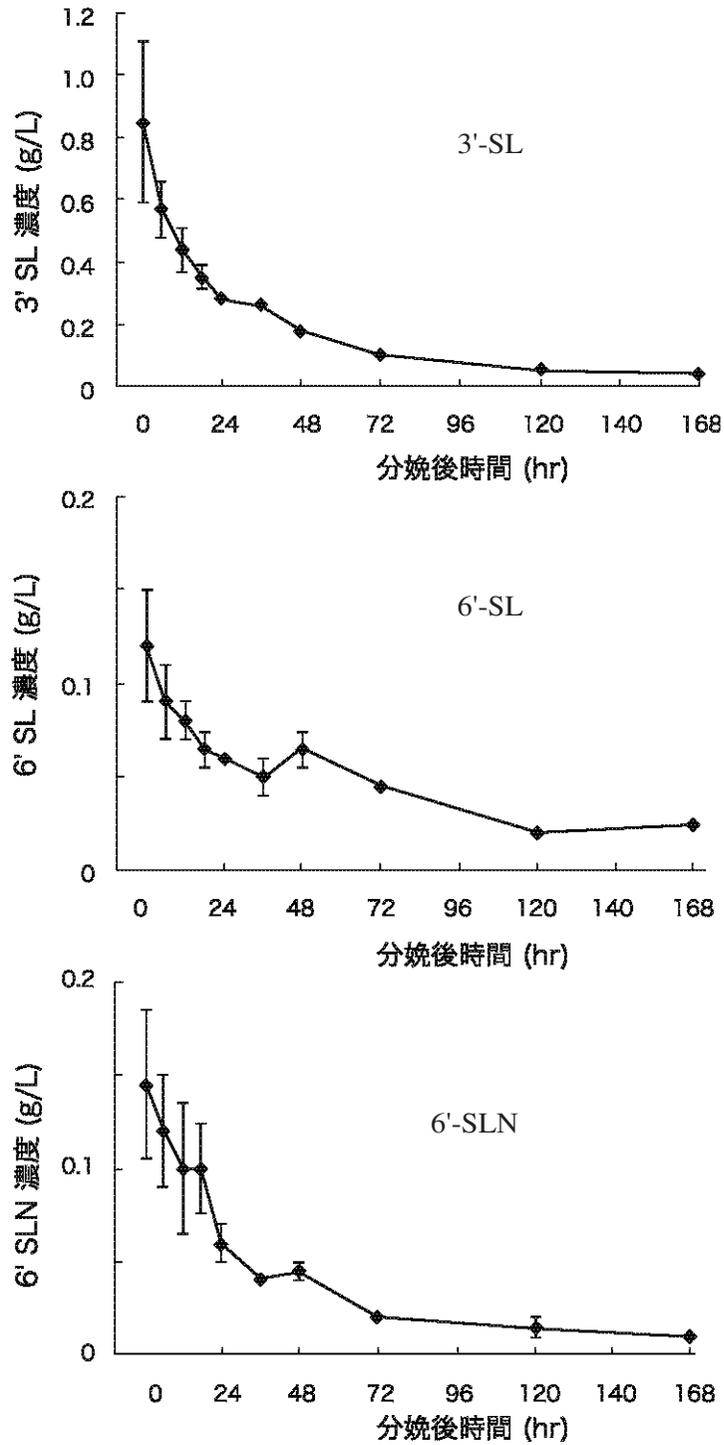


図2 泌乳初期における代表的なウシ酸性ミルクオリゴ糖含量の変動³⁾
(値は平均±SD (n=4) で表した)

た^{2,7,8)}。ミルクオリゴ糖の種類は種によって大きく異なる。人乳にはこれまでに 93 種類のミルクオリゴ糖が発見されており、130 種類以上の存在することが知られている^{5,6)}。

ウシ初乳に含まれるミルクオリゴ糖の大半は、Neu5Ac (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc (3'-SL), Neu5Ac(α 2-6)Gal (β 1-4-)Glc (6'-SL), Neu5Ac(α 2-6)Gal (β 1-4-)GlcNAc (6'-SLN) および Neu5Ac (α 2-8)Neu5Ac(α 2-3)Gal (β 1-4-)Glc (DSL) が占めるが、そのうちの 70%を 3'-SL が占めている^{3,9)}。図 2 に分娩直後から 1 週間後までのウシ初乳中の 3'-SL, 6'-SL および 6'-SLN 含量の変動を示した³⁾。それらは分娩直後に高く、48 時間以降には急激に含有量が低下する³⁾。

このようなミルクオリゴ糖をヒトが摂取した場合、それが消化・吸収されるかについては十分にはわかっていない。オリゴ糖の大部分は小腸の消化酵素には抵抗性があり、それらの一部は大腸で腸内細菌による発酵を受ける^{10,11)}。ヒトミルクオリゴ糖の一部は、レセプターが介在するエンドサイトーシスによって直接吸収されると考えられる¹²⁾。ラットの乳仔は、シアル酸含有オリゴ糖をピノサイトーシスかエンドサイトーシスによって腸管細胞内に取り込み、細胞内のリソソームにあるノイラミナーゼで消化してシアル酸を利用していると予想されている¹³⁾。ミルクオリゴ糖の一部は小腸を通過して大腸で吸収される成分もあり、下で述べるような生理機能を発揮すると予想される。

ウシミルクオリゴ糖は、その含有量から初乳より分画した成分の産業的な利用が将来的には予想されるが、一方でチーズホエイからそれらを分画・濃縮し、利用する技術の開発が期待される。3'-SL を中心とするミルクオリゴ糖には後述の生理的意義が示されており、そのことからチーズホエイより分画したミルクオリゴ糖を利用し、抗感染症や免疫機能調節、脳活性化などの機能を付与した食品また飼料の開発が期待できる。

2. ミルクオリゴ糖の感染防御効果

チーズホエイなどより分画・濃縮したウシミルクオリゴ糖の大部分は、消化・吸収を受けないことで、レセプターアナログとして病原菌や病原菌の生産する毒素が胃腸管に付着するのを阻止することが期待される。期待される機能の一つが、3'-SL による *Helicobacter (H.) pylori* の胃壁への抗付着ならびに胃壁に付着した同菌の置換作用である¹⁴⁾。胃潰瘍や胃がんを引き起こす *H. pylori* の胃壁への接着は、同菌と宿主上皮細胞表層の糖タンパク

質、糖脂質上のシアリル糖鎖との相互作用によって起こる。一方で *H. pylori* CCUG17874 株によるヒト赤血球凝集反応の阻害を、各種のシアル酸含有オリゴ糖の添加によって確認するハプテン糖試験により、3'-SL にも阻害活性のあることが発見されている¹⁴⁾。一方、6'-SL など Neu5Ac α 2-6- 残基を含むシアル酸含有オリゴ糖には、そのような阻害活性は検出されなかった¹⁴⁾。この結果は、*H. pylori* の胃壁への感染阻害や同菌の排除に、3'-SL を優先的に含むウシミルクオリゴ糖が利用できる可能性を示している。

ヒトに特異的な病原体である *Neisseria (N.) meningitidis* による感染は、タイプIV型繊毛を媒介して行われるが、その感染によって髄膜炎や敗血症が引き起こされる。*N. meningitidis* から単離されたタイプIV型繊毛のウシチログロブリンやヒト唾液腺アグルチニンに対する結合はウシ酸性ミルクオリゴ糖により阻害されるが¹⁵⁾、この結果はそれらのオリゴ糖が同菌の結腸粘膜の付着を阻害することを示唆している。

スパニッシュブラウン種のウシ初乳、移行乳、常乳および末期乳からエタノール沈殿ならびに遠心分離によって調製したミルクオリゴ糖を含む画分の添加によって、エンテロトキシン生産性大腸菌株 (K99, FK, F41, F17, B16, B23 および B64) による赤血球凝集反応の阻害されることが報告されている¹⁶⁾。これはウシミルクオリゴ糖が、これらの病原体の腸管への付着を阻害する可能性を示している。

3. ミルクオリゴ糖、カゼイノグリコペプチドによる脳活性化効果

ミルクオリゴ糖の一部は吸収されることにより栄養成分として利用される可能性もある。チーズホエイから調製したウシシアル酸含有オリゴ糖を成熟ラットに投与し、その水泳学習行動と脳内脂質組成との関係に着目した実験も行われている¹⁷⁾。その結果、シアル酸含有オリゴ糖を投与した群の水泳学習行動は、遊離シアル酸投与群やラクトース投与群と比較して向上する傾向が認められた。また、シアル酸含有オリゴ糖を投与したラットでは、脳内のリン脂質やガングリオシド GM3 が有意に増加することが明らかになった。リン脂質や GM3 は脳内脂質を構成する重要な成分であり、乳児期で急激に増加した後、一定の水準となり、その後高齢化に伴い減少することが知られている。この結果は、成熟ラットに投与したシアル酸含有オリゴ糖のシアル酸が吸収され、脳内ガングリオシドなどの生合成素材として利用される可能性を示している。さらに、育児用調製粉乳や機能性食品の脳活性化因子としてのウシミルクオリゴ糖の利用可能性を示唆しているが、シアル酸含有オリ

ゴ糖のシアル酸がラット同様にヒトでも同様に吸収利用されるか調査する必要がある。

その一方で、母乳栄養児の脳内ガングリオシドやシアル酸結合糖タンパク質に結合したシアル酸の含量は、人工栄養児のそれよりも有意に高いという報告もあり¹⁸⁾、ヒト乳児においてシアル酸含有オリゴ糖鎖のシアル酸が吸収されて、脳内物質の生合成に利用されている可能性を示唆している。人乳は、育児用調製乳の原料である牛乳よりもシアル酸含有オリゴ糖量が高いので、育児用調製乳にウシシアル酸含有オリゴ糖を添加することの必要性を示唆している。

また、チーズホエイから調製されるカゼイノグリコペプチド (CGP) を、脳活性化素材物質として活用することの有用性を示唆する報告もある¹⁹⁾。ブタの乳仔にシアル酸を結合した CGP を添加した調合乳を 35 日間投与したところ、学習行動と記憶が向上したことが示唆された。また投与した群において、前頭葉においてタンパク質結合性シアル酸の含量が向上するとともに、脳内の糖タンパク質 NCAM のポリシアル化を司る酵素 α 2,8 シアリルトランスフェラーゼ IV と UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ / N-アセチルマンノサミンキナーゼの遺伝子の mRNA 発現が上昇することが確かめられた。これらの結果は、脳活性化因子としての CGP を育児用調製乳に添加することの意義を示唆している。

4. ミルクオリゴ糖による免疫調節機能

ヒトミルクオリゴ糖の一部は吸収され、循環過程で免疫調節に係わることを予想されている。例えば、シアリル Le^a (Neu5Ac (α 2-3)Gal (β 1-3)[Fuc (α 1-4)]GlcNAc) またシアリル Le^x (Neu5Ac (α 2-3) Gal β 1-4[Fuc (α 1-3)]GlcNAc) を含むヒト酸性オリゴ糖は、P-セレクトリンを介在した血小板-内皮細胞の接着を阻害し、内皮細胞上での白血球の回転を抑制して抗炎症作用をもたらすことが示唆されている²⁰⁾。牛乳やヤギ乳を原料とするチーズホエイなどから分画したウシ酸性ミルクオリゴ糖やヤギ酸性ミルクオリゴ糖が、免疫調節機能を示唆するデータもある。

トリニトロベンゼンスルホン酸で誘導した結腸炎発症ラットに対し、誘導前に 2 日間ヤギミルクオリゴ糖を 500 mg/kg/日投与した場合、結腸の炎症はそれを与えないラットよりも小さく、また炎症性サイトカインを誘導するインデューシブルオキシドニトリックシンターゼ、シクロオキシゲナーゼ、インターロイキン-1 β およびムチン 3 などの結腸での発現レベルの低いこ

とが報告されている²¹⁾。これはヤギミルクオリゴ糖の抗炎症性を示唆するが、そのような効果は同オリゴ糖の投与による腸内細菌叢の改善、すなわちプレバイオティック作用に起因するのかもしれない。

5. ミルクオリゴ糖やラクトースを原料として調製されるオリゴ糖によるプレバイオティクス効果

母乳栄養児は、出生後1週間以内にビフィズス菌が95～99.9%を占有する腸内菌叢（ビフィズスフローラ）を形成することが知られている。牛乳を乳児に摂取させた場合に腸管内のビフィズスフローラの占有率は極めて低いので、牛乳に含まれないヒトミルクオリゴ糖に腸管内でビフィズス菌を増殖・定着させるようなプレバイオティクス作用のあることが予想されてきた。また最近、*Bifidobacterium (B.) infantis* は唯一の炭素源としてヒトミルクオリゴ糖を添加した場合、それをよく発酵する一方で、他の腸内細菌である *Lactobacillus gasseri* はそれらを全く発酵しないことも報告されている。しかしながら、実際にどのような構造のオリゴ糖にそのような作用があるのか長い間不明であった。最近 Kitaoka らは、ビフィズス菌の新規ガラクトース代謝経路に基づき、ラクト-N-ピオース I (Gal (β 1-3) GlcNAc) が真のビフィズス因子とする「ラクト-N-ピオース仮説」を提案している^{22, 23)}。

この仮説は、Derensy-Dron ら²⁴⁾ が *B. bifidum* の無細胞抽出物からラクト-N-ピオースを α -D-ガラクトピラノース-1-リン酸 (Gal-1-p) と GlcNAc に変換するラクト-N-ピオースホスホリラーゼ酵素を発見したことに着目して提案された。この酵素は同時に、ガラクトール-N-ピオースを Gal-1-P と GalNAc に変換することもできる。Kitaoka らはこの酵素を *B. bifidum* の無細胞抽出物から精製するとともに、*B. longum* JCM1217 株のゲノムから相当する遺伝子をクローン化し、大腸菌組み換え体から同酵素を発現させることに成功した。北岡と山本らは、*B. longum* のゲノムにおいて同酵素の構造遺伝子を含む遺伝子クラスターに注目し、ムチンタイプ I 型糖鎖ならびにラクト-N-ピオースを含むミルクオリゴ糖を代謝するガラクトース代謝経路 (図3) に関与する各種酵素とトランスポーターの同定を試みている。

上の仮説が実証されるためには、ラクト-N-ピオースを含むオリゴ糖を使用して *in vitro* および *in vivo* レベルでビフィズス菌の増殖促進、定着を調査することが必要であることは言うまでもない。同時に新たなプレバイオティクスへの産業的な戦略のため、ラクト-N-ピオースを含むオリゴ糖の大規模レベルへの調製技術の開発が期待される。

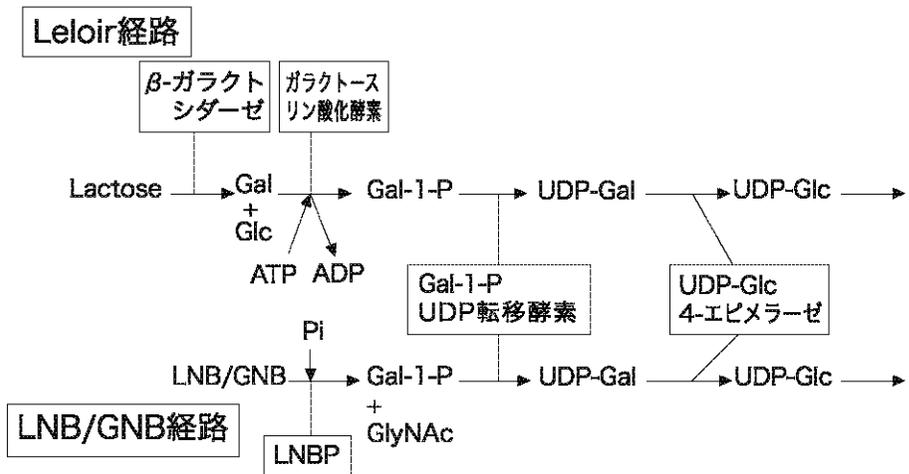


図3 Leloir経路とラクト-N-ビオースホスホリラーゼ遺伝子クラスターによるガラクトース代謝経路の比較²³⁾。

一方で、現在の技術ではラクト-N-ビオースを含むオリゴ糖やヒトミルクオリゴ糖と同様の構造をもつオリゴ糖の調製技術が産業レベルでは確立されていない。プレバイオティック素材としての代替オリゴ糖が、チーズホエイの固形分の70%を占めるラクトースを原料として調製・利用されている。それらには、4'-または6'-ガラクトシルラクトースを主成分とするガラクトオリゴ糖や、ラクチュロース、ラクトスクロースなどがある²⁵⁾。

ガラクトオリゴ糖の調製は、乳酸菌、酵母およびカビなどを起源とする各種の β -ガラクトシダーゼを使用した「ガラクトース転移反応」によって行われている。この反応では、 β -ガラクトシダーゼはラクトースの基質濃度が4～50%と高い場合は加水分解ばかりでなく、ラクトースを受容体としてガラクトース転移反応が起こる。ガラクトオリゴ糖の大量調製では、起源の異なる2種類以上の同酵素を連続的に作用させて高収率で調製している。ガラクトオリゴ糖は、100℃、3時間または120℃、30分の加熱でも分解されず、酸性下で加熱変性も少ない。

ラクチュロースは、ラクトースをアルカリ性の条件下で処理する異性化反応によって調製されている。この2糖は、ラクトースの還元末端グルコースがフルクトフラノースに変化したものであり、スクロースの48～62%の甘味性とビフィズス菌の増殖活性を示し、肝性昏睡の特効薬としても知られている。

ラクトスクロースは、ラクトースとスクロースを原料として、 β -フルクトフラノシダーゼを作用させて調製される。その化学構造はGal(β 1-4)

Glc (α 1- β 2) Fru である。市販されている乳菓オリゴ糖は、このラクトスクロースを主成分とし、その含量が55%以上の製品では、スクロースの55%の甘味度である。

上のようなオリゴ糖を育児用調製乳に添加した場合、乳児の腸内フローラの90%をビフィズス菌が占め、その占有率は母乳栄養児には及ばないものの、ビフィズス菌増殖促進活性を十分に有している。そのメカニズムはラクト-N-ピオース I 単位を含むオリゴ糖のようなガラクトース代謝経路によるものとは考えられず、ビフィズス菌によるそれらの代謝経路に興味もたれる。またオリゴ糖によるプレバイオティック効果は、定着するビフィズス菌の菌株の違いから乳児と成人では異なることも考えられる。ヒトミルクオリゴ糖は自然状態で成人によって摂取されることはなく、成人用プレバイオティクス素材としては上のようなオリゴ糖で十分に用途を満たしていることが考えられる。

6. ミルクオリゴ糖の化学修飾、医薬品への利用可能性

チーズホエイや初乳から分画した酸性ミルクオリゴ糖を化学修飾し、感染予防・治療剤として医薬品目的に使用することも期待される。細菌やウイルスまた細菌毒素に吸着する遊離のオリゴ糖をポリマーに結合させれば、それらへの吸着能は著しく向上し、遊離のものよりもはるかに低濃度で感染阻害剤として機能することが知られている。Tsuchida ら²⁶⁾ は、ミルク由来のシアル酸含有オリゴ糖をポリマーに共有結合させ、インフルエンザウイルスとの結合能の解析をしている。このようなポリマーは、抗ウイルス性のフィルターに利用することも考えられる。また Terabayashi ら²⁷⁾ はウシミルクオリゴ糖の主成分である3'-SLの還元末端にアミノ基を導入し、その塩化ラウリン酸との縮合生成物が、MDCK細胞へのインフルエンザウイルスの侵入による細胞毒性を阻害することを報告した。これはインフルエンザウイルスの宿主侵入阻害目的に、ウシ酸性ミルクオリゴ糖を原料とする同縮合生成物の利用可能性を示唆するものである。

7. ミルクオリゴ糖関連化合物調製の試み

本稿はチーズ製造に関係した機能性オリゴ糖を主題としているので、主としてチーズホエイから分画可能なミルクオリゴ糖やカゼイノグリコペプチド、またラクトースを原料として調製されるオリゴ糖の機能性を中心に記述

した。一方で、機能性素材として利用するために、ヒト型またウシ型のミルクオリゴ糖関連化合物を酵素的な方法や大腸菌組み換え体の培養によって調製する試みもある。

Murata ら²⁸⁾はウシ血清由来 β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを用い、UDP-GlcNAc 供与体からラクトースへの位置特異的 GlcNAc 転移反応を利用してラクト-N-トリオース II (GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc) を合成した。ついで、組み換え体 *B. circulans* ATCC31882 由来 β -ガラクトシダーゼを用いて、 β -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドやラクトースを供与体としてラクト-N-テトラオース (Gal (β 1-3) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc) やラクト-N-ネオテトラオース (Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc) の選択的合成に成功している。また Murata ら²⁹⁾は、ブタ肝臓由来 α -L-フコシダーゼを用いて、p-ニトロフェニル- α -L-フコピラノシドを供与体、N-アセチルラクトサミン (Gal (β 1-4) GlcNAc) を受容体とした糖転移反応を行い、ミルクオリゴ糖の部分単位である Fuc (α 1-2) Gal (β 1-4) GlcNAc の合成に成功した。この反応の位置選択性は低く、 α 1-2 結合 3 糖の他に α 1-3 と α 1-6 結合異性体も同時に生成され、その生成比は 36:27:37 であった。一方、Ajisaka ら³⁰⁾は Neu5Ac- α -pNP を糖供与体、N-アセチルラクトサミンを糖受容体として、Newcastle 病ウイルス由来のノイラミニダーゼを用いて転移反応を行い、ミルクオリゴ糖の部分単位である Neu5Ac α 2-3 Gal β 1-4 GlcNAc の合成に成功している。

Endo ら³¹⁾は、*H. pylori* の全ゲノム配列から β 1,4 ガラクトース転移酵素の遺伝子の検索を行い、発見された同遺伝子を高発現させた組み換え大腸菌を糖鎖生産システムに組み込んで、N-アセチルラクトサミンの効率的生産に成功している。また同様に、*H. pylori* に存在する α 1,3 フコース転移酵素遺伝子を高発現させた組み換え大腸菌を作成し、糖鎖生産システムに組み込むことにより、ミルクオリゴ糖の部分ユニットである Le^x (Gal β 1-4 [Fuc α 1-3]GlcNAc) の効率的生産を可能とした³²⁾。一方、Dumon ら³³⁾は *H. pylori* の α 1,3 フコース転移酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌培養法により、ミルクオリゴ糖関連化合物である Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]Glc, Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]Glc および Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]Glc の生産に成功した。

また、動物細胞の糖鎖合成系を利用して、細胞培養によって各種のオリゴ糖鎖を作らせる試みがある。Sato らは³⁴⁾、COS-7 細胞、HL60 細胞などの動物細胞の培養系に、ラクトース、N-アセチルグルコサミンおよび N-アセチ

ルラクトサミンのドアシル基を結合したアナログを添加し、ガングリオシド a 系列, alpha 系列およびグロボシド系列の約 40 種類のオリゴ糖鎖の合成を確認している。このような試みに乳腺細胞を使用するならば, ミルクオリゴ糖に類似したラクト系列, ネオラクト系列のオリゴ糖鎖を作らせることができるかもしれない。

8. 機能性オリゴ糖利用の将来展望

チーズホエイから分画されるラクトースを原料として調製されるガラクトオリゴ糖, ラクトスクロース, ラクチュロースなどは, プレバイオティクスとして実際に食品に添加されている。一方, チーズホエイから調製されるミルクオリゴ糖やカゼイノグリコペプチドは, 抗ピロリ菌素材, 大腸菌毒素中和剤, 脳活性化素材, 免疫調節素材などの点で機能性食品素材として利用される潜在的な可能性はあるが, 現状での利用は少ない。初乳に含まれるミルクオリゴ糖の利用は, 近未来の課題である。また将来においては, チーズホエイまた初乳から調製されるオリゴ糖が医薬品素材として利用できる可能性もある。また実験段階であるが, ミルクオリゴ糖関連化合物を人工的に調製する試みも行われている。

余剰乳対策などもあってチーズ増産が 2008 年より日本国内で実施されようとしているが, 同時に副生してくるチーズホエイを利用する技術の開発も求められる。チーズホエイからミルクオリゴ糖やカゼイノグリコペプチドを効率的に分画する技術の開発とともに, それらの機能性に着目して機能性素材として利用することも戦略的に必要なことであろう。

文 献

- 1) Jenness R., Regehr E.A., Sloan, R.E.: Comparative biochemical studies of milks. II . *Comp. Biochem. Physiol.* **13**, 339-352, 1964
- 2) Urashima T., Saito T., Nakamura T. *et al.*: Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconj. J.* **18**, 357-371, 2001.
- 3) Nakamura T., Kawase H., Kimura K. *et al.*: Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation. *J. Dairy Sci.* **86**, 1315-1320, 2003.
- 4) Gopal P.K., Gill H.S.: Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* **84**, Suppl. S69-S74, 2000.
- 5) Newburg D.S., Neubauer S.H.: Carbohydrates in milks: analysis, quantities and significance, in, *Handbook of Milk Composition*, Jensen, R.G. ed., Academic Press, San Diego, pp.273-249, 1995.

- 6) Boehm G., Stahl, B.: Oligosaccharides, in, Functional Dairy Products, Mattila-Sandholm, T., Saarela, M. eds. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 203-243, 2003.
- 7) Nakamura T., Urashima T.: The milk oligosaccharides of domestic farm animals. *Trends Glycosci. Glycotech.* **16**, 135-142, 2004.
- 8) Watanabe Y., Kimura K., Nakamura T. *et al.*: Concentrations and compositions of the bovine milk oligosaccharides. Proceedings. The 23rd International Carbohydrate Symposium. Whistler, Canada, p.78, 2006.
- 9) McJarrow P., van Amelsfort-Schoonbeek J.: Bovine sialyl oligosaccharides: seasonal variations in their concentrations in milk, and a comparison of the colostrums of Jersey and Friesian cows. *Int. Dairy J.*, **14**, 571-579, 2004.
- 10) Brand-Miller J.C., McVeagh P., McNeil Y. *et al.*: Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J. Pediatr.* **133**, 95-98, 1998.
- 11) Newburg D.S.: Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, S8-S17, 2000.
- 12) Gnoth M.J., Rudloff S., Kunz C. *et al.*: Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J. Biol. Chem.* **276**, 34363-34370, 2001.
- 13) Dickson J. J., Messer M.: Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. *Biochem. J.* **170**, 407-413, 1978.
- 14) Johansson P., Nilsson J., Angstrom J. *et al.*: Interaction of *Helicobacter pylori* with sialylated carbohydrates: the dependence on different parts of the binding trisaccharide Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc. *Glycobiology*, **15**, 625-636, 2005.
- 15) Hakkarainen J., Toivanen M., Leinonen A. *et al.*: Human and bovine milk oligosaccharides inhibit *Neisseria meningitidis* pili attachment *in vitro*. *J. Nutr.* **135**, 2445-2448, 2005.
- 16) Martin M.J., Martin-Sosa S., Hueso P.: Binding of milk oligosaccharides by several enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from calves. *Glycoconj. J.* **19**, 5-11, 2002.
- 17) Sakai F., Ikeuchi F., Urashima T. *et al.*: Effects of feeding sialyllactose and galactosylated N-acetylneuraminic acid on swimming learning ability and brain lipid composition in adult rats. *J. Appl. Glycosci.* **53**, 249-254, 2006
- 18) Wang B., McVeagh P., Petocz P. *et al.*: Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 1024-1029, 2003.
- 19) Wang B., Yu B., Karim M., *et al.*: Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 561-569, 2007.
- 20) Schumacher G., Bendas G., Stahl B. *et al.*: Human milk oligosaccharides affect P-selectin binding capacities: *In vitro* investigation. *Nutrition*, **22**, 620-627, 2006.
- 21) Daddaoua A., Puerta V., Requena P. *et al.*: Goat milk oligosaccharides are anti inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* **136**, 672-675, 2006.
- 22) Kitaoka M., Tian J., Nishimoto M.: Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3158-3162, 2005.
- 23) 北岡本光, 西本完: ビフィズス菌の新規ガラクトース代謝経路とビフィズス因子の関係. *ミルクサイエンス*, **55**.171-174, 2007.
- 24) Derensy-Dron D., Krzewinski F., Brassart C. *et al.*: β -1,3-Galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082: characterization, partial purification and relation to mucin degradation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 3-10, 1999.
- 25) 齋藤忠夫, 浦島 匡: 生理活性オリゴ糖の効用, ミルクの先端機能 (吉川正明, 細野

明義, 中澤勇二, 中野 覚編) pp. 175-187, 弘学出版, 東京, 1998.

- 26) Tsuchida A., Kobayashi K., Matsubara N., *et al.*: Simple synthesis of sialyllactose-carrying polystyrene and its binding with influenza virus. *Glycoconj. J.* **15**, 1047-1054, 1998.
- 27) Terabayashi T., Morita M., Ueno M., *et al.*: Inhibition of influenza-virus-induced cytopathy by sialylglycoconjugates. *Carbohydr. Res.* **341**, 2246-2253, 2006.
- 28) Murata T., Morimoto S., Zeng X. *et al.*: Enzymatic synthesis of alpha-L-fucosyl-N-acetyllactosamines and 3'-O-alpha-L-fucosyllactose utilizing alpha-L-fucosidases. *Carbohydr. Res.* **320**, 192-197, 1999.
- 29) Murata T., Inukai T., Suzuki M. *et al.*: Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose. *Glycoconj. J.* **16**, 189-195, 1999.
- 30) Ajisaka K., Fujimoto H., Isomura M.: Regioselective transglycosylation in the synthesis of oligosaccharides: comparison of β -galactosidase and sialidases of various origins. *Carbohydr. Res.* **259**, 103-115, 1994.
- 31) Endo T., Koizumi S., Tabata K. *et al.*: Cloning and expression of β 1,4-galactosyltransferase gene from *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **10**, 809-813, 2000.
- 32) Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., *et al.*: Large -scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 213-217, 2000.
- 33) Dumon C., Priem B., Martin S.L. *et al.*: *In vivo* fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* α -1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj. J.* **18**, 465-474, 2001.
- 34) Sato T., Hatanaka K., Hashimoto H. *et al.*: Synthesis of oligosaccharides using cell function. *Trends Glycosci. Glycotech.* **19**, 1-17, 2007.