

## ミルク少糖類の比較生化学的研究

浦島 匡

家畜生産科学科酪農化学研究室

### 1. 目 的

哺乳動物の乳には、若干の例外を除いて糖質源としてラクトースが含まれる。全糖質のうちその占める割合は約95%であるが、その他に非常に微量ながらも多数の遊離少糖の存在が報告されている。その構造は例外なく、コアとしてラクトースかN-アセチルラクトサミンを含み、それ、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース (Gal)、フコース (Fuc)、N-アセチルノイラミン酸 (NANA) などが付加されたものである。またそれは、動物の血液型活性糖脂質や糖タンパク質また、胎児組織からの糖脂質、糖タンパク質の糖鎖との類似性が指摘されており、実際に、血液型活性糖タンパク質や糖脂質とその抗血清との沈降反応を阻止することも認められる。

これらのミルク少糖類は、これまでに、ヒト、ウシ、有袋類、卵性哺乳類について調べられているが、動物種間においてかなりの不均一性が観察されている。また、人乳の場合は、泌乳者の血液型に対応するようなかたちで個体変動も認められている。

馬乳の場合は、成分的には人乳との類似性が指摘されているが、ラクトース以外の遊離少糖類については報告例がない。そこで本研究は、馬初乳からえられる遊離中性少糖の構造解析をすすめ、他の動物種のミルク少糖類との相同性と不均一性を検討することを目的として行った。

### 2. 方 法

幕別町のダービースタッド牧場より入手した分娩後10時間以内のサラブレッド種馬初乳(3個体、A 1.4 l、B 2.5 l、C 2 l)を直ちに遠心分離(5,000回転)により脱脂し、透析した。ついで透析外液を凍結乾燥した後、蒸留水100 mlに溶解し、エタノール100 mlを加えて4℃で1日放置した。生じた沈殿を遠心分離(5,000回転)で除去してから、上澄部分のエタノールを減圧濃縮で除去し、ついでDowex 1×2(200-400メッシュ)による陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。吸着される酸性糖画分は0.5N NaCl溶液により溶出した。未吸着の中性糖画分は、活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、水、5%エタノール、15%エタノール、30%エタノール、50%エタノールに順に溶出した。このうち、30%エタノール画分を減圧濃縮し、ブタノール/ピリジン/水=6/4/3を展開溶媒とする調製用ペーパークロマトグラフィーに供した。分離された各少糖は切り出し溶出により回収し、AG50WX8とAG3×4Aにより脱塩した後に凍結乾燥した。

上記の方法で得られた中性少糖は、<sup>13</sup>C-NMR, secondary ion mass spectrum, メタノリシス, メチル化分析により構造決定した。メチル化分析はHakomori法で行い、さらにStellnerらの方法に基づいて部分メチル化アルジトールアセテートを調製した。メタノリシスは、NaBH<sub>4</sub>で糖を還元した後、5%塩酸メタノール0.5 mlを加えて80℃で24時間加熱した。ついでトリメチルシリル化

し、ガスクロマトグラフィー (Hitachi 163, 3% SE-30, 0.2 cm×3 m のカラムを用い, 150-250°C, 3°C/min の条件で測定) で分析した。

### 3. 結 果

えられた馬初乳中性少糖のペーパークロマトグラムを図1に示す。Rfの大きい方から順に HM-1~HM-5 と命名する。それらの相対移動距離より HM-1 および HM-2 は 3 糖, HM-3 は 4 糖, HM-4 は 5 糖, HM-5 は 6 糖と推定された。また, 収量, R<sub>Lac</sub> 値, 還元末端分析の結果を表1に示した。還元末端分析の結果, いずれも還元末端はグルコースと決定された。

HM-1 から得られる部分メチル化アルジトールアセテートは, GC-MS 分析の結果, 4-0-acetyl-1, 2, 3, 5, 6-penta-0-methylglucitol, 1, 5-di-0-acetyl-2, 3, 4, 6-tetra-0-methylgalactitol, 1, 3, 5-tri-0-acetyl-2, 4, 6-tri-0-methylgalactitol と同定された。また HM-2 由来の部分メチル化アルジトールアセテートは上記のうち最初の2つと 1, 3, 5-tri-0-acetyl-2, 4, 6-tri-0-methylgalactitol であった。以上の結果および表2に示した <sup>13</sup>C-NMR の解析より, HM-1, HM-2 と各々 Galβ 1-3 Galβ 1-4 Glc および Galβ 1-6 Galβ 1-4Glc と決定された。

HM-4 から調製された部分メチル化アルジトールアセテートは, GC-MS から 4-0-acetyl-2, 3, 5, 6-penta-0-methylglucitol, 1, 5-di-0-acetyl-2, 3, 4, 6-tetra-0-methylgalactitol 2 モル, 1, 3, 5, 6-tetra-0-acetyl-2, 4-di-0-methylgalactitol および 1, 4, 5-tri-0-acetyl-3, 6-di-0-methyl-2-N-methylacetamido-2-deoxyglucitol と同定された。また, 0.2N トリフルオロ酢酸を用いた部分酸水解後のペーパークロマトグラフィーから, 分子内に Galβ 1-3 Galβ 1-4 Glc という部分構造を有することが示された。以上の結果および表3に与えた <sup>13</sup>C-NMR の解析より Galβ 1-3

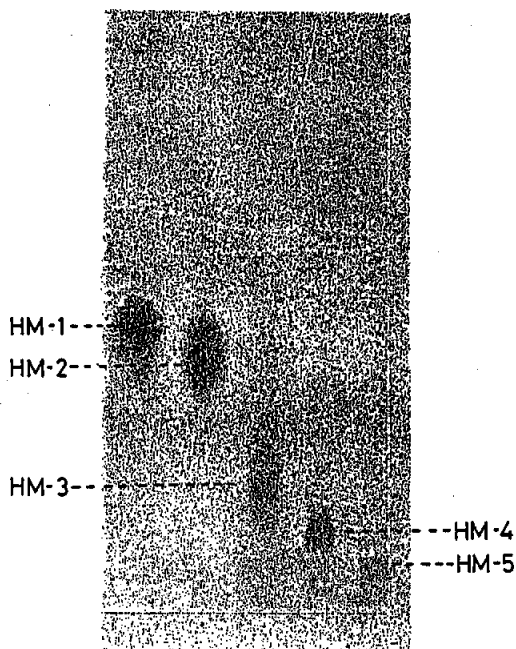


図1. 馬初乳少糖のペーパークロマトグラム

表1. 馬初乳少糖の収量, R<sub>Lac</sub> 値および還元末端分析

Oligosaccharide	Yield (mg/l)	Weight ratio (w/w %)	R <sub>Lac</sub> value	Sugar in the reduction position
HM-1	7.8	54	0.62	Glc
HM-2	4.8	33	0.52	Glc
HM-3	0.3	2	0.28	Glc
HM-4	1.1	8	0.18	Glc
HM-5	0.4	3	0.10	Glc

表2. ラクトース, HM-1およびHM-2の<sup>13</sup>C-NMR化学シフト

	Galβ1-4Glc		Galβ1-3Galβ1-4Glc			Galβ1-6Galβ1-4Glc			
	2	1	2	2	1	2	2	1	
	lactose		HM-1			HM-2			
C-1	α 94.7	β 98.6	α 94.44	β 98.46		α 94.98	β 98.34		
C-2	74.3	76.7	74.06	76.52		73.71	76.46		
C-3	74.0	77.2	74.19	77.05		74.30	77.22		1
C-4	81.3	81.4	80.91	80.91		81.90	82.14		
C-5	73.0	77.7	72.89	77.46		72.68	77.34		
C-6	63.9	63.9	62.7	62.7		62.7	62.7		
C-1	105.8		105.25			105.77			
C-2	73.8		72.89			73.48			
C-3	75.4		84.54			75.12			2
C-4	71.4		71.08			71.14			
C-5	78.2		77.69			76.64			
C-6	63.0		63.65			71.67			
C-1			106.94			106.01			
C-2			73.71			73.48			
C-3			75.18			75.29			
C-4			71.26			71.31			3
C-5			77.69			77.75			
C-6			63.65			63.65			

[Galβ 1-4 GlcNAcβ 1-6] Galβ 1-4Glc と決定された。

HM-3およびHM-5はメタリシスの結果, 各々 Glc 1分子, Gal 2分子およびGlcNAc 1分子, また Glc 1分子, Gal 3分子, GlcNAc 2分子を構成単糖とすることが示された。また, HM-4を参考として<sup>13</sup>C-NMRを帰属した結果, 各々 Galβ 1-4 GlcNAcβ 1-6 Galβ 1-4 Glc および Galβ 1-4 GlcNAcβ 1-3 [Galβ 1-4 GlcNAcβ 1-6] Galβ 1-4 Glc と決定された。

#### 4. 考 察

上記の結果解析された5種の少糖のうちHM-3, 4および5について馬乳腺細胞内での生合成経路を推定すると図2のようになる。まず, ラクトースにN-アセチルラクトサミン単位が分枝型で結合し, ついでこれにGalあるいはN-アセチルラクトサミン単位が付加される。

また, 人乳および有袋類乳において報告されている少糖類のうちで, 本研究で解析された馬乳少糖と構造的に関連のあるものを図3に示した。HM-4と同一の化合物は有袋類乳において, HM-5と同一の化合物は人乳において報告されている。HM-3に相当する化合物は, これまでにいずれの種の乳中にも報告例がない。同様に, 有袋類およびヒトの乳の場合も, 図3に示したように個々の化合物が見られる。このことは各々の種のミルク少糖類に生合成系における微視的不均一性を示すものとして注目される。特に, 馬乳少糖HM-3において, 人乳少糖Galβ 1-4 GlcNAcβ 1-3 Galβ

表3. HM-3, HM-4 および HM-5 の  $^{13}\text{C}$ -NMR 化学シフト

	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6 Gal $\beta$ 1-4Glc 2 1		Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6 Gal $\beta$ 1-4Glc 2 1		Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3 4 5		
	HM-3		HM-4		HM-5		
C-1	$\alpha$ 94.34	$\beta$ 98.55	$\alpha$ 94.54	$\beta$ 98.40	$\alpha$ 94.54	$\beta$ 98.47	
C-2	73.89	76.70	73.92	76.70	73.86	76.57	
C-3	74.19	77.13	74.09	77.11	74.18	77.12	
C-4	81.26	81.26	81.12	81.12	80.93	80.93	1
C-5	72.72	77.40	72.72	77.11	72.82	77.29	
C-6	62.77	72.77	62.72	62.68	62.84	62.72	
C-1	105.60		105.30		105.48		
C-2	73.46		72.72		72.60		
C-3	75.12		84.21		84.54		
C-4	71.26		71.20		71.16		2
C-5	76.22		76.17		76.15		
C-6	71.26		71.20		71.31		
C-1	103.49		103.61		103.72		
C-2	57.69		57.68		57.80		
C-3	76.22		76.17		76.15		
C-4	81.55		81.50		81.65		3
C-5	77.40		77.40		77.51		
C-6	63.71		63.65		63.77		
CH <sub>3</sub>	24.98		25.04		24.92		
-CO	176.69		176.63		177.26		
C-1	105.60		105.54		105.70		
C-2	73.71		73.66		73.71		
C-3	75.23		75.18		75.29		
C-4	71.26		71.20		71.31		4
C-5	78.04		77.98		78.10		
C-6	63.71		63.65		63.77		
C-1			106.94		103.72		
C-2			73.66		57.98		
C-3			75.18		76.57		
C-4			71.20		81.20		
C-5			77.75		77.51		
C-6			63.65		63.77		5
CH <sub>3</sub>					25.16		
-CO					177.61		
C-1					105.70		
C-2					73.71		
C-3					75.29		
C-4					71.31		
C-5					78.10		
C-6					63.77		6

