

The Milk Oligosaccharides of Domestic Farm Animals

家畜のミルクオリゴ糖

Nakamura, Tadashi ; and Urashima, Tadasu

Department of Animal Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

Inada-cho, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan.

FAX: 81-155-49-5577, E-mail: nakamura@obihiro.ac.jp

Key Words: milk oligosaccharides, domestic animal, lactation, cow, sheep, horse, goat

Abstract

Milk is the only food for the newborn young, and it contains many nutritious as well as biofunctional components which are available for the homeostasis and health of the immature newborn infants. People have been collecting the milk from several domestic animals such as cows, sheep, goats and horses in order to utilize them as raw foods or dairy products.

Milk oligosaccharides, which are one of milk's components, have recently been recognized as significant anti-infectious compounds against pathogenic viruses and bacteria as well as being an energy source for the newborn young. They may also be materials which are required for the postnatal biosynthesis of glycoconjugates, particularly of the nervous system.

It is concluded that the domestic animals' milk or colostrum are available to separate several biofunctional materials. Milk/colostrum of domestic animals, especially colostrum, contains large amounts of sialyl oligosaccharides as well as many kinds of neutral oligosaccharides. The colostrum should therefore be suitable as raw material for the large-scale preparation of milk oligosaccharides. Improved separation techniques will stimulate their utilisation in the pharmacological and food industries. Many types of oligosaccharides will also be used within an oligosaccharide library to help in determining the epitopes of several types of lectins or antibodies and clarifying the features of glycosyltransferases and glycosidases.

要 約

乳は新生児にとって唯一の食糧であり、そのため多くの栄養素とともに未成熟な新生児の健康や恒常性の維持に必要な生物学的機能性成分が含まれている。ヒトはウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマと言った様々な家畜から乳を採取し、市乳または乳加工品として利用している。

乳成分の1つであるミルクオリゴ糖には、近年、新生児に対する栄養源としてばかりでなく感染性のウイルスや細菌に対する抗感染物質としての意義が認められてきている。また、ミルクオリゴ糖は乳児の体内複合糖質、とくに神経系の複合糖質の生合成に必要な物質でもある。

家畜の乳は各種の生理活性物質の分離源として有用である。これらの家畜の乳、特に初乳中には数多くの中性オリゴ糖のほか、大量のシアリルオリゴ糖が含まれている。したがって、家畜の初乳はミルクオリゴ糖を大量調製するための原料として適している。分離技術の向上により、製薬や食品産業へのこれらミルクオリゴ糖の利用が可能となるであろう。多種多様なオリゴ糖からなる「オリゴ糖ライブラリー」の構築は、様々なタイプのレクチンや抗体のエピトープ解析や、糖転移酵素や糖加水分解酵素の研究にも有用であろう。

A. Introduction – Oligosaccharides in Milk –

All mammalian species have in common the feature that the females produce milk in their lactating mammary glands and their young are suckled on milk. Milk is the only food for the newborn young, and contains many nutritious as well as biofunctional components which are available for the homeostasis and health of the immature newborn infants. Figure 1 summarizes the components of milk. Most of these are synthesized in lactating epithelial cells which are under the control of various hormones including estrogen, progesterone, and somatotrophic hormone. For example, it is suggested that the mRNAs

A. 乳に含まれるオリゴ糖

哺乳類は、雌が泌乳期乳腺で乳を生産し、それを乳児が授乳するという点において共通している。乳は新生児にとって唯一の食糧であり、そのため多くの栄養素とともに未成熟な新生児の健康や恒常性の維持に必要な生物学的機能性成分が含まれている。図1に乳中の成分について示した。これらの成分のほとんどは、エストロゲン、プロゲステロン、成長ホルモンなどの複雑なホルモンによる制御のもとで乳腺上皮細胞により生合成される。例えば、ラクトースの合成に関与している β 4ガラク

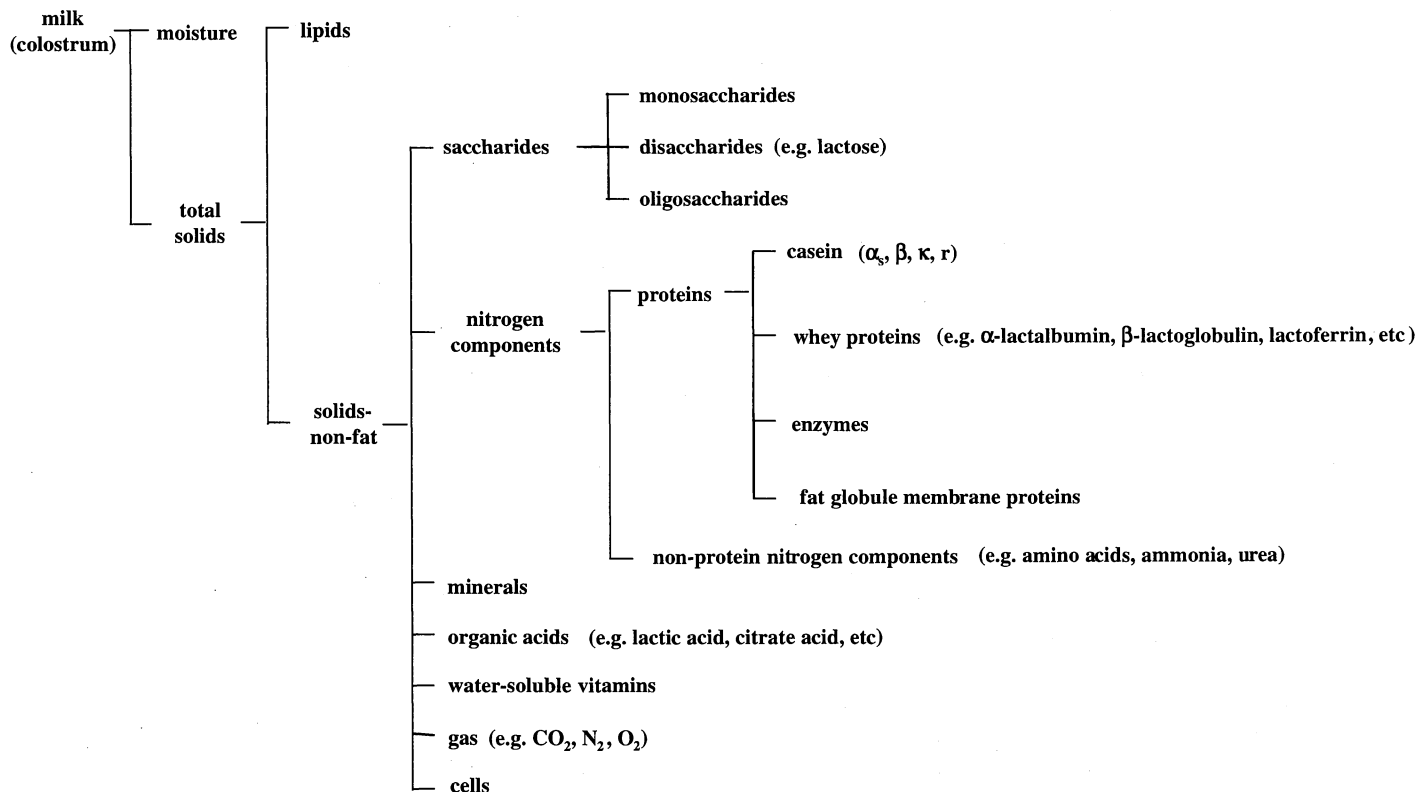


Fig. 1. The constituent of the milk.

accumulation of β 4-galactosyltransferase and α -lactalbumin, which are concerned with the synthesis of lactose, are effected by prolactin in cultured mouse mammary tissues (1). Milk compositions differ not only among different mammalian species but also during the course of lactation.

It had once been thought that the predominant saccharide in milk is always the disaccharide, lactose, which is composed of galactose and glucose joined via β 1-4 linkage, and which is contained in the milk of almost all mammals. Lactose is biosynthesized, with glucose as the acceptor and UDP-galactose as the donor, by the action of β 4-galactosyltransferase in collaboration with α -lactalbumin, which is one of the whey proteins within lactating mammary glands (2). The disaccharide, lactose, has an advantage in that a given mass exerts only about half the osmotic pressure compared with same mass of a monosaccharide such as glucose, thus reducing the risk of osmotic shock in the infant gastrointestinal tract. When the young digest their mother's milk, lactose is hydrolyzed into galactose and glucose by intestinal lactase, which is located in the outer membrane of the microvilli of the brush border of the small intestine. These monosaccharides are then transported into the enterocytes by a specific mechanism. The glucose enters the circulation and is used as an energy source, while most of the galactose is converted to glucose in the liver to be used as an energy source as well.

トシルトランスフェラーゼおよび α -ラクトアルブミンの mRNA 蓄積量がマウス由来乳腺培養細胞においてプロラクチンの作用により増加することが報告されている (1)。そのため、各哺乳動物の乳成分は動物種間だけでなく泌乳期によっても異なっている。

これまで乳中の主要な糖質は、グルコースにガラクトースが β 1-4 結合した 2 糖のラクトース (Gal(β 1-4)Glc) で、ほとんどの哺乳類の乳中に含まれていると考えられていた。ラクトースは乳腺細胞において、 β 4 ガラクトシルトランスフェラーゼとホエータンパク質の一種である α -ラクトアルブミンの共同作用により、UDP-ガラクトースを供与体(ドナー)、グルコースを受容体(アクセプター)として生合成されることが知られている(2)。2 糖であるラクトースは、同重量のグルコースのような単糖と比較した場合におよそ 1/2 の浸透圧しか生じないため、新生児腸管内での急激な浸透圧変化を招かないという利点がある。乳児により摂取されたラクトースは、小腸上皮微絨毛膜に存在するラクターゼの作用によってグルコースとガラクトースに加水分解され、それらは能動輸送によって小腸細胞膜を通過してから門脈を通って肝臓に入る。グルコースはそのまま体内循環して、体細胞の栄養源となるが、ガラクトースは肝臓でグルコースに変換されてから同様に体内循環する。

Advances in chromatographic techniques which have been made since the 1950's have resulted in the purification and also characterisation of free oligosaccharides, other than lactose, in the milk and/or colostrum of a variety of species including humans, cows and other domestic farm animals (3, 4). The synthesis of these oligosaccharides from mainly lactose within the lactating mammary gland is catalysed by a number of specific glycosyltransferases including galactosyltransferases, N-acetylglucosaminyltransferases, fucosyltransferases and sialyltransferases, whose expression is required for the synthesis of various glycoconjugates that are normally found in both lactating and non-lactating mammary tissue (5). These oligosaccharides comprise "neutral milk oligosaccharides" with no charge and "acidic milk oligosaccharides" with one or more negative charges. The negative charges originate mostly from the carboxyl group of sialic acid but also from phosphate or sulfate groups. Sialic acid is a general name for N-acetylneuraminic acid, and comprises mainly N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc). It has been found that the milk of monotremes and marsupials contains greater amounts of milk oligosaccharides than of lactose; this means that the common belief that lactose is the dominant saccharide in the milk of all mammalian species, is incorrect (4). The composition of milk oligosaccharides, as well as other milk components, differs among mammalian species and also during the course of lactation. Bovine colostrum has a relatively high content of milk oligosaccharides compared with mature bovine milk which contains only trace amounts. Human colostrum contains 2.2 to 2.4% of these oligosaccharides while mature human milk still contains 1.2 to 1.4% (3). In human colostrum obtained at premature births, the milk oligosaccharides content is significantly higher than that of full term colostrum (6). On the other hand, milk of the tammar wallaby, a marsupial, contains lower amounts of milk oligosaccharides during early or late lactation than during the mid-lactation period (7). These findings suggest that milk oligosaccharides, as well as other milk components, are synthesized in the mammary gland, to suit the requirements of the developing young.

It is still not known whether or to what extent the milk oligosaccharides are absorbed in the infant's small intestine. Human milk oligosaccharides have been shown to be resistant to enzymatic hydrolysis by brush border intestinal lactase and there is evidence that the major part survives passage through the small intestine (8) and enters the colon where they are subject to fermentation by colonic bacteria (9, 10). A small fraction of human milk oligosaccharides are absorbed intact (11), perhaps by receptor-mediated endocytosis, and are excreted in the urine (12).

These facts suggest that the milk oligosaccharides have the following biological significance.

1950年代からの分離技術の進展にともない、ヒト、ウシや他の家畜の乳からラクトース以外の様々な遊離オリゴ糖が単離・構造解析された(3,4)。泌乳期乳腺におけるラクトースからのこれらのオリゴ糖の合成には、乳腺、非乳腺組織に関わらず存在し、各種の複合糖質の糖鎖合成に関与するガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼおよびシアリルトランスフェラーゼなどの糖転移酵素群が関わっている(5)。これらミルクオリゴ糖は、電荷を持たない「中性ミルクオリゴ糖」とマイナスに荷電している「酸性ミルクオリゴ糖」に大別される。この陰電荷は、リン酸基や硫酸基に起因することがあるが、ほとんどの場合シアリ酸のカルボキシル基に由来する。シアリ酸とはN-アシルノイラミン酸の総称であり、代表的なものとしてN-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) や N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) が挙げられる。近年、単孔類や有袋類の乳では、ラクトース含量よりもミルクオリゴ糖含量が高いことが報告されており、ラクトースがすべての哺乳動物の乳中において主要糖質であるというこれまでの常識も見直す必要がでてきている(4)。また、乳中におけるミルクオリゴ糖の組成は、他の乳成分と同様に動物種や泌乳期によっても異なっている。ウシ初乳中には比較的高濃度のミルクオリゴ糖が含まれているが、常乳中には極少量しか含まれていない。ヒト初乳中に含まれるミルクオリゴ糖は2.2~2.4%であるが、常乳期であってもそれは1.2~1.4%程度含まれている(3)。また、未熟児出産では、初乳中のオリゴ糖濃度が通常出産におけるオリゴ糖濃度よりも有意に高いことも報告されている(6)。一方、有袋類の一種であるタマワラビーでは、泌乳初期や後期の乳ではミルクオリゴ糖が少なく、泌乳中期の乳中には非常に高濃度に含まれていることが報告されている(7)。これらの知見はミルクオリゴ糖が他の乳成分と同様に、乳児の成長に併せて乳腺内で合成されていることを示唆している。

また、ミルクオリゴ糖が乳児腸管内で消化吸収されるかどうかについては不明な点が多い。ヒトミルクオリゴ糖については、小腸上皮ラクターゼによる加水分解にたいして抵抗性を持ち、大部分は小腸を経由して結腸へ移行し(8)、腸管内微生物によって分解される(9,10)。また、一部のヒトミルクオリゴ糖は、恐らく受容体を介在するエンドサイトーシスによって直接吸収され(11)、体内循環をしてから尿中に排出される(12)。

これらを踏まえ、ミルクオリゴ糖には次のような機能や役割が考えられている。

B. Biological Function of Milk Oligosaccharides

The chemical structures of milk oligosaccharides are homologous to the carbohydrate units of glycoconjugates, especially of glycolipids, on cell surfaces of mammalian epithelial cells. They also somewhat resemble the carbohydrate units of κ -casein, lactoferrin and gangliosides such as GM3 (13-16). Milk components have two main biological functions for the young; one is their nutritious effect, while another is anti-infection against pathogenic microorganisms. Components such as casein, lactose and lipids mainly have the former function, while components such as immunoglobulins, lactoferrin and lysozyme etc. have the latter function. Both aspects of the functions of milk oligosaccharides have been studied.

As one of the nutritious effects, it has been suggested that the sialic acid of sialyl milk oligosaccharides promotes the development of the infant's brain. It is thought that a part of the sialyl milk oligosaccharides is directly absorbed in the small intestine of infant rats, the sialic acid being released by hydrolysis by sialidase (17, 18). It has been reported that the milk-derived sialic acid is stored in the infant rat brain during suckling (19-23). It has also been reported that the learning ability is enhanced and the ganglioside content significantly increased after administration of sialyl oligosaccharides to infant rats. Similar effects have been observed after administration of sialyl glycoconjugates to rats, whereas they were not observed after administration of free sialic acid, suggesting that the linkage of sialic acid to glycoconjugates is the key to these functions (24-26). The metabolic pathway by which the sialic acid is stored in the brain after administration of sialyl oligosaccharides requires clarification.

It has been concluded that the anti-infection effects of milk oligosaccharides are exerted by direct as well as indirect mechanisms (27-31). Milk oligosaccharides are assumed to be soluble receptor analogues, which inhibit the attachment of pathogenic viruses, bacteria or bacterial toxins to the colonic cell surface. The pathogens specifically recognize the kinds of sialic acid, their linkage positions and the sequences of the receptor glycoconjugates in the target colon epithelial cells. It is thought that the co-presence of the milk oligosaccharides and receptors decreases the attachment of pathogenic microorganisms to the target cells by competitive inhibition. In fact, it has been found that some fucosyl and sialyl milk oligosaccharides have anti-infection effects against *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Helicobacter pylori* or influenza virus.

It is thought that the milk oligosaccharides having indirect anti-infection effects act as prebiotics; namely they stimulate the growth of beneficial bacteria such as bifidobacterium in the infant colon. The activity and proliferation of these bacteria reduces the pH in the colon thus inhibiting the growth of pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*.

B. ミルクオリゴ糖の機能

ミルクオリゴ糖は、哺乳動物の細胞表層に存在する複合糖質の糖鎖、特に糖脂質の糖鎖構造単位と類似の構造をしている。また、乳中成分である κ -カゼイン、ラクトフェリンおよびガングリオシド (GM3) などの糖鎖の構造単位ともある程度の類似構造を有している (13-16)。乳中に含まれる物質には大きく分けて2つの働きがある。1つは栄養素、もう1つは感染防御因子としての働きである。カゼイン、ラクトース、脂質などは主として栄養素としての働きを、免疫グロブリン、ラクトフェリン、リゾチームなどは主に感染防御機能を果たしている。ミルクオリゴ糖の機能性もこれら2つの面から研究が進められている。

栄養素としての働きの1つとして、乳中に存在するシアリルオリゴ糖の脳神経形成因子としての働きが挙げられる。ラット乳中シアリルオリゴ糖の一部は、ラット新生仔の小腸からそのまましくはシアリダーゼによる分解を受けたあと遊離のシアル酸として吸収されることが報告されている (17, 18)。また、授乳期の新生仔ラット脳内に、乳成分由来のシアル酸が貯留されることも報告されている (19-23)。ラットへのシアリルオリゴ糖の投与試験を行った結果、学習行動の向上や脳内ガングリオシド量の有意な増加も認められている。同様の結果は、乳中に含まれるシアル酸を有する他の複合糖質においても認められているが、遊離のシアル酸を投与した場合には認められない。このことから、複合糖質へのシアル酸の結合がこの様な機能にとって重要であることが示唆される (24-26)。シアリルオリゴ糖の投与後、シアル酸がどのような代謝経路を介して脳内に貯留されるのかについては今後の解明が待たれる。

ミルクオリゴ糖の感染阻害効果には、直接および間接的機構が推察されている (27-31)。ミルクオリゴ糖は、ウイルスや病原性細菌および細菌性毒素が、消化管細胞上のレセプターに付着するのを阻止する可溶性レセプターアナログであると考えられる。これは、このような細菌やウイルスが、動物の標的細胞の表面に存在する糖鎖受容体におけるシアル酸の分子種、結合様式および糖鎖配列などを厳密に認識しており、レセプターとこれらの分子が共存していれば、競合阻害により標的細胞への付着量を確実に減少させることが可能であると考えられるからである。実際、フコシルオリゴ糖やシアリルオリゴ糖などいくつかのミルクオリゴ糖には、*Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Helicobacter pylori*, インフルエンザウイルスなどに対する抗菌、抗ウイルス作用が示されている。

間接的感染阻害効果としては、乳児結腸でビフィドバクテリウムなどの有用細菌の増殖を促進するプレバイオティクスとしての作用が挙げられる。これは、これらの細菌のミルクオリゴ糖の代謝により結腸内 pH が低下し、*Escherichia coli* の様な病原性微生物の腸管内における増殖が阻害されることによる。

C. Oligosaccharides in Milk/Colostrum of Domestic Animals, and Their Utilization

There are several species of domestic animals that are bred to provide milk in various parts of the world. These include cows, sheep, goats and horses. Table I shows the chemical structures of the milk oligosaccharides from these animals. It is seen that the

C. 家畜のミルクオリゴ糖とその利用

世界各地でさまざまな動物が乳用家畜として飼育されている。これらの代表的なものとしてウシ、ヤギ、ヒツジおよびウマが挙げられる。これまでに報告されている家畜の乳中に含まれるミルクオリゴ糖を表 I に示した。これら家畜種間でも、ミ

Table 1. The milk oligosaccharides from the domestic animal colostrum/milk.

Species	Neutral Milk Oligosaccharides	Acidic Milk Oligosaccharides
cow	GalNAc(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-3)Gal
	Gal(β1-4)GlcNAc	Gal(β1-4)Glc-3'-PO ₄
	Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]Glc	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Gc(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc	Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-6)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc
	GalNAc(α1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc
	Gal (β1-4)GlcNAc(β1-6)[Gal(β1-3)]Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc-1-PO ₄
goat		Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc-6-PO ₄
		Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-6)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc
		Neu5Ac(α2-3)[Gal(β1-6)]Gal(β1-4)Glc
sheep		Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-3)]Gal(β1-4)Glc
	Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Gc(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-6)Gal(β1-4)Glc	Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)Glc
horse	Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	Gal(β1-6)Gal(β1-4)Glc	Gal(β1-4)GlcNAcα1-diphosphate
	Gal (β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	
	Gal (β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc	
	Gal (β1-4)GlcNAc(β1-6)[Gal(β1-3)]Gal(β1-4)Glc	
	Gal (β1-4)GlcNAc(β1-6)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]Gal(β1-4)Glc	

kinds and contents of milk oligosaccharides vary among these domestic mammalian species. The bovine milk oligosaccharides have been studied in most detail in these species.

The dominant neutral milk saccharide in bovine colostrum, other than lactose, is N-acetylglucosamine (Gal(β 1-4)GlcNAc), but this saccharide is not found in the mature milk which contains galactosylactoses at concentrations of 40 to 60 mg per liter (32, 33). Mare colostrum contains Gal(β 1-4)GlcNAc (β 1-3)Gal(β 1-4)Glc (lacto-N-neotetraose) and Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)[Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glc (lacto-N-neohexaose), which are also found in human milk (34, 35). Caprine colostrum contains Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc (2'-fucosylactose), which is also one of the oligosaccharides in human milk (36). On the other hand, bovine (37), ovine and caprine colostrum contain Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc (isoglobotriose), which has not been described in human milk.

Acidic milk oligosaccharides vary among these domestic species, too. Most of these oligosaccharides contain sialic acid, but N-acetylglucosamine- α 1-phosphate is found in mare colostrum as another type of acidic oligosaccharide (38). The phosphate may stabilize the solubilisation of calcium in the colostrum, thus stimulating its absorption in the infant small intestine (39). The kinds of sialic acid of acidic milk oligosaccharides differ among these mammalian species. Sialyl oligosaccharides in bovine (40-44) and caprine (45,46) colostrum contain mainly Neu5Ac, whereas these in ovine colostrum contain mainly Neu5Gc (47). On the other hand, the sialyl oligosaccharides in equine colostrum contain only Neu5Ac. As the glycolipids of equine serum containing Neu5Gc, as well as Neu5Ac, it appears that the kinds of sialic acid are somewhat different between milk/colostrum and serum in the horse (48). The linkage positions of sialic acid also differ among these species. The sialic acid in bovine, ovine and equine milk oligosaccharides is preferentially linked to galactose by an α 2-3 linkage, whereas that in caprine milk oligosaccharides is predominantly linked via an α 2-6 linkage similar to that in human milk oligosaccharides.

These milk oligosaccharides, especially sialyl oligosaccharides, are present at higher concentrations in colostrum than in the mature milk of these species. For example, bovine colostrum, collected at 0 hr post partum, contains approximately 1 g of sialyl oligosaccharides per litre, but the content rapidly decreases after two days post partum (49). Bovine colostrum, 48 hours after parturition, contains significant amounts of immunoglobulins (50, 51). These immunoglobulins are absorbed from the small intestine of newborn calves and enter the blood circulation, thus contributing to prophylaxis. Thus, the consumption of colostrum for 1 or 2 days post partum enables the calves to receive passive immunity from their mothers. The pattern of a post partum decrease in the immunoglobulin concentration of bovine milk is similar to that of the sialyloligosaccharides. The young of domestic animals such as cows are more precocial

ルク中に含まれているオリゴ糖の種類および量は異なっている。家畜の中ではウシのミルクオリゴ糖解析が最も詳細に行われている。

ラクトース以外のウシ初乳中に含まれる主な中性ミルクオリゴ糖として N-アセチルラクトサミンが挙げられるが、これは常乳中では見出されていない。常乳中の中性オリゴ糖としては、ガラクトシルラクトースが 40~60 mg/L の量で検出されている (32,33)。また、ウマ乳中には中性ミルクオリゴ糖として、ヒト乳中にも含まれる Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc (lacto-N-neotetraose) および Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3) [Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]Gal(β 1-4)Glc (lacto-N-neohexaose) の存在が確認されている (34,35)。ヤギの初乳中でもヒトミルクオリゴ糖の 1 つである Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc (2'-フコシルラクトース) が含まれている (36)。一方、ウシ (37)、ヒツジおよびヤギの初乳中には、ヒトミルクオリゴ糖としては報告されていない Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc (isoglobotriose) も存在している。

酸性ミルクオリゴ糖においても家畜種間で違いが見られる。これらの家畜のほとんどの酸性ミルクオリゴ糖はシアル酸を有するオリゴ糖であるが、ウマ初乳中には N-アセチルラクトサミンの 1 位がリン酸化された LacNAc- α 1-phosphate のように異なったタイプの酸性オリゴ糖も報告されている (38)。このリン酸基には、乳中でのカルシウム可溶化を安定にし、新生児腸管内でのカルシウムの吸収を促進する働きが可能性が示唆される (39)。酸性ミルクオリゴ糖のシアル酸の種類は動物種によって異なっている。ウシ (40-44) およびヤギ (45,46) 初乳中のシアリルオリゴ糖は主として Neu5Ac を有するものであるのに対し、ヒツジ初乳中のシアリルオリゴ糖は主として Neu5Gc を有している (47)。また、ウマ初乳中のシアリルオリゴ糖はシアル酸として Neu5Ac だけを有しているが、ウマ血清中の糖脂質には Neu5Ac と Neu5Gc のいずれもが含まれており、シアル酸の種類の違いはウマのミルクと血清の間でも異なっている。シアル酸の結合様式にも動物種間で違いが見られる (48)。ウシ、ヒツジおよびウマのミルクオリゴ糖は主にガラクトース残基に α 2-3 結合しているが、ヤギのミルクオリゴ糖の場合にはヒトのミルクオリゴ糖と同様に主に α 2-6 結合している。

これら乳用家畜のミルクオリゴ糖、特にシアリルオリゴ糖は、常乳と較べて初乳中に高濃度に含まれている。例えば、分娩直後の初乳中にシアリルオリゴ糖が 1 g/L の高濃度で存在しているが、分娩 2 日後には急激に減少することが明らかとなっている (49)。分娩後 48 時間以内のウシ初乳中には免疫グロブリンも含まれている (50,51) が、この免疫グロブリンはウシ新生仔の腸管から吸収され体内循環に入り感染防御に寄与してい

than human infants. The higher concentration of sialyloligosaccharides in their colostrum during early lactation may therefore be related to prophylaxis against attacks by pathogenic bacteria and viruses, and also to the development of the colonic bifidus flora, before the calves acquire their own immunity, rather than to any nutritional effect. Future studies involving the administration of sialyl oligosaccharides to calves may help to clarify their detailed functions.

As the carbohydrate units of glycoconjugates have recently been recognized to have significant biological functions, their synthesis has been attempted using chemical and enzymatic methods as well as biosynthesis using bacteria or mammalian cells. As more than 100 kinds of human milk oligosaccharides are assumed to have biological significance, they have been synthesized on a large scale, as well. Attempts have been made to use milk oligosaccharide type saccharides as materials to prepare anti infectious drugs or biofunctional materials to be added to functional foods. As described above, the milk and especially colostrum of domestic animals, contains large amounts of sialyl oligosaccharides as well as many kinds of neutral oligosaccharides. The colostrum, collected immediately after parturition, should therefore be suitable as raw material for the large-scale preparation of milk oligosaccharides. Improved separation techniques will stimulate their utilisation in the pharmacological and food industries. Many types of oligosaccharides will also be used within an oligosaccharide library to help determining the epitopes of several types of lectins or antibodies. They will also be used as substrates for the studies of glycosyltransferases and glycosidases.

Acknowledgments

This study was partially supported by a grant from The 21st Century COE Program (A-1), Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

References

1. Golden, K.L., and Rillema, J.A. (1995) *Proc. Soc. Biol. Med.* **209**, 392–396
2. Brodbeck, U., and Ebner, K.E. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 762–764
3. Newburg, D.S., and Neubauer, S.H. Carbohydrates in milks: Analysis, Quantitatives, and Significance. in *Handbook of milk composition*, (Jensen, R.G., ed.) Academic Press (San Diego)
4. Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T., and Messer, M. (2001) *Glycoconj. J.* **18**, 357–371
5. Enber, K.E., and Schanbacher, F.L. (1974) In *Lactation: A Comprehensive Treatise* (Larson, B.L., and Smith, V.R. eds.), vol.2. pp.77–113, Academic Press, New York
6. Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Gabrielli, O., Carlucci, A., Catassi, C., and Giorgi, P.L. (1997) *Minerva Pediatr.* **49**, 471–475
7. Green, B., and Merchant, J.C. (1988) In *The Developing Marsupial* (Tyndale-Biscoe, C.H., and Jannssens, P.A. eds.), pp.41–54, Springer-Verlag, Berlin
8. Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., and Daniel, H. (2000) *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1589–1596
9. Brand-Miller, J.C., McVeagh, P., McNeil, Y., and Messer, M. (1998) *J. Pediatr.* **133**, 95–98
10. Newburg, D.S. (2000) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, Suppl. 2, S8–S17
11. Gnoth, M.J., Rudloff, S., Kunz, C., and Kinne, R.K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34363–34370
12. Coppa, G.V., Gabrielli, O., Giorgi, P., Catassi, C., Montanari, M.P., Varaldo, P.E., and Nichols, B.L. (1990) *Lancet* **335**, 569–571
13. Saito, T., Itoh, T., Adachi, S., Suzuki, T., and Usui, T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **729**, 309–317
14. Spik, G., Fournet, B., Bayard, B., Vandersyppe, R., Strecker, G., Bouquelet, S., and Charet, M.J. (1974) *Arch.Int.Physiol.Biochim.* **82**, 791
15. Puente, R., Garcia-Pardo, L.-A., and Hueso, P. (1992) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**, 283–288
16. Haezer, G., and Hascheke, F. Micronutrients(1989) In *Milk and Milk-based Food Products* (Renner, E., ed.) Elsevier Applied Science,

る。つまり、分娩後1日ないし2日の初乳を摂取することにより、仔ウシは母ウシからの受動免疫を獲得している。このウシ乳中の免疫グロブリン濃度の変化はシアリルオリゴ糖の濃度変化と非常に類似している。ウシのような家畜の新生仔はヒトよりも成熟していることから、泌乳初期の乳中にシアリルオリゴ糖が高濃度に存在しているのは、栄養素としてよりもむしろ仔ウシ自身が免疫を獲得するまでに、細菌やウイルスからの感染を予防し、腸内細菌叢を形成させるために機能していると考えられる。

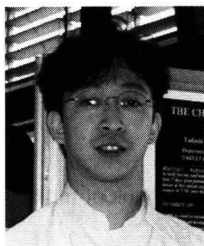
近年、複合糖質の糖鎖の重要性が広く認められ、化学合成、酵素合成および微生物や細胞を用いた手法により、様々な糖鎖の調製が試みられている。ヒトミルク中に含まれるミルクオリゴ糖は100種類以上存在することが報告されているが、上述のような機能性が示されていることから、ミルクオリゴ糖も調製の対象となっている。また、ミルクオリゴ糖型の糖を、抗感染薬を調製するための素材や機能性食品への添加を目的とした機能性成分としてとして利用する試みもなされている。上述したように、ミルク特に家畜の初乳中には多くの種類の中性オリゴ糖ともに大量のシアリルオリゴ糖が含まれている。それゆえ、分娩直後の家畜初乳はミルクオリゴ糖を大量調製するための原料として適している。分離技術の向上により、製薬や食品産業へのこれらミルクオリゴ糖の利用が可能となるであろう。多種多様なオリゴ糖からなる「オリゴ糖ライブラリー」の構築は、様々なタイプのレクチンや抗体のエピトープ解析や、糖転移酵素や糖加水分解酵素の研究にも有用であろう。

London

17. Dickson, J.J., and Messer, M. (1978) *Biochem. J.* **170**, 407–413
18. Witt, W., von Nicolai, H., and Zilliken, F. (1979) *Nutr. Metab.* **23**, 51–61
19. Vanier, M.T., Holm, M., Ohman, R., and Svennerholm, L. (1971) *J. Neurochem.* **18**, 581–592
20. Carlson, S.E., and House, S.G. (1986) *J. Nutr.* **116**, 881–886
21. Morgan, B.L., Oppenheimer, J., and Winick, M. (1981) *Br. J. Nutr.* **46**, 223–230
22. Morgan, B.L., and Winick, M. (1981) *Br. J. Nutr.* **46**, 231–238
23. Morgan, B.L., Kuyatt, B.L., and Fink, J. (1985) *J. Oral Pathol.* **14**, 37–41
24. Koketsu, M., Nakata, K., Juneja, L., Kim, M., and Yamamoto, T. (1995) *J. Applied Glycosci.* **42**, 15–18
25. Yanahira, S., and Kawakami, H. (2000) *Milk Sci.* **49**, 119–120
26. Wang, B., McVeagh, P., Petocz, P., and Brand-Miller, J. (2003) *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 1024–1029
27. Newburg, D.S. (1999) *Curr. Med. Chem.* **6**, 117–127
28. Dai, D., Nanthkumar, N.N., Newburg, D.S., and Walker, W.A. (2000) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30** Suppl.2, s22–s33
29. Gopal, P.K., and Gill, H.S. (2000) *Br. J. Nutr.* **84** Suppl. 1, S69–S74
30. Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., and Strobel, S. (2000) *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 699–722
31. Sharon, N., and Ofek, I. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 659–664
32. Davis, D.T., Holt, C., and Christie, W. W. (1983) In *Biochemistry of Lactation* (Mephram, T.B. eds.), pp. 71–117, Elsevier, Amsterdam-New York
33. Kimura, K., Watanabe, Y., Marumoto, K., and Miyagi, A. (1997) *Yakult Reports* **17**, 1–7
34. Urashima, T., Sakamoto, T., Ariga, H., and Saito, T. (1989) *Carbohydr. Res.* **194**, 280–287
35. Urashima, T., Saito, T., and Kimura, T. (1991) *Comp. Biochem. Physiol. B.* **100**, 177–183
36. Urashima, T., Bubb, W.A., Messer, M., Tsuji, Y., and Taneda, Y. (1994) *Carbohydr. Res.* **262**, 173–184
37. Urashima, T., Saito, T., Ohmisya, K., and Shimazaki, K. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1073**, 225–229
38. Nakamura, T., Amikawa, S., Harada, T., Saito, T., Arai, I., and Urashima, T. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1525**, 13–18
39. Kamasaka, H., To-o, K., and Kusaka, K. (1997) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 238–244
40. Kuhn, R., and Gauhe, A. (1965) *Chem. Ber.* **98**, 395–413
41. Schneir, M.L., and Rafelson, M.E. Jr. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 1–11
42. Veh, R.W., Michalski, J.C., Corfield, A.P., Sander-Wewer, M., Gies, D., and Schauer, R. (1981) *J. Chromatogr.* **212**, 313–322
43. Parkkinen, J., and Finne, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10971–10975
44. Parkkinen, J., and Finne, J. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 289–300
45. Urashima, T., Murata, S., and Nakamura, T. (1997) *Comp. Biochem. Physiol. B* **116**, 431–435
46. Viverge, D., Grimmonprez, L., and Solere, M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1336**, 157–164
47. Nakamura, T., Urashima, T., Nakagawa, M., Saito, T. (1998) *Biochim Biophys Acta* **1381**, 286–292
48. Menzeleev, R.F., Smirnova, G.P., Chekareva, N.V., Zvonkova, E.N., Krasnopol'skii, IuM, Shvets, V.I. (1993) *Bioorg. Khim.* **19**, 817–824
49. Nakamura, T., Kawase, H., Kimura, K., Watanabe, Y., Ohtani, M., Arai, I., and Urashima, T. (2003) *J. Dairy Sci.* **86**, 1315–1320
50. Rook, J.A.F., Campling, R.C. (1965) *J. Dairy Res.* **32**, 45–55
51. Porter, R.M., and Conrad, H.R. (1967) *J. Dairy Sci.* **50**, 505–508

Received on February 13, 2004, accepted on March 6, 2003

Profile of the Authors



Tadashi Nakamura was born in 1970 in Tokyo and graduated from the School of Agriculture, Tohoku University in 1993. He received his Ph.D. (Agricultural Science) from Tohoku University in 2002. The title of his thesis was “Structure analysis of acidic oligosaccharides in the mammalian and their utilisation”. He started his professional career in 1995 as Assistant Professor at Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine. At present, he is interested in the function of milk oligosaccharides.