[*J. Appl. Glycosci.*, Vol. 49, No. 1, p. 73–78 (2002)]

解 説

ミルクオリゴ糖の糖修飾基情報から生理活性素材を創る！ —— 糖質化学分野における新マテリアルサイエンスの創成 ——

浦島 匡*, 齋藤忠夫¹, 中村 正

帯広畜産大学生物資源科学科 (080-8555 帯広市稲田町西 2 線 11 番地)

¹ 東北大学大学院農学研究科 (981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

The Naturally Occurring Modification in Milk Oligosaccharides —— The Available Informations for Manufacturing Bio Functional Materials ——

Tadasu Urashima,* Tadao Saito¹ and Tadashi Nakamura

Department of Bio Resource Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine (Nishi-2-11, Inada-cho, Obihiro 080-8555, Japan)

¹*Department of Bio Production, Graduated School of Agriculture, Tohoku University (1-1, Tsutsumidori Amamiya-machi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan)*

It is well known that the carbohydrate moieties of glycoproteins or glycolipids, which exist on mammalian cell surfaces, are modified by sulfate or phosphate, *etc.*, in a few cases. These modifiers are recognised as possible receptors in intercellular communications. On the other hand, mammalian milk or colostrum contains many kinds of free oligosaccharides other than lactose in common. These oligosaccharides are also suggested to have biological roles such as inhibition of the adhesion of pathogenic microorganisms to the intestinal tract of infant or brain development — stimulation in infants. Recently, a few milk oligosaccharides have also been shown to be modified and the biological significance of these saccharides are assumed as follows: 1) Sialyllactose lactone: Some proportion of Neu5Gc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc was found to occur as free lactones between the carboxyl group of Neu5Gc and OH of Gal or Neu5Gc itself (sialyllactose lactone) in ovine colostrum. The sialyl oligosaccharides in milk or colostrum may attach to bacterial toxin and viruses, such as influenza virus in the intestine, thus protecting the infant. The lactone can be assumed to be resistant to virus sialidase. When the sialic acid is liberated from sialyl oligosaccharides by virus sialidase, they would lose their protective effect but the lactone should retain this effect because of its resistance to the action of virus sialidase. 2) 4-*O*-acetylated sialyllactose: Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc, whose Neu5Ac was *O*-acetylated at OH-4, was identified in the milk of echidna, one of the monotremes. Although this saccharide was assumed to be a possible inhibitor for the adhesion of viruses or bacteria whose receptors are *O*-acetylated Neu5Ac, the exact function of this saccharide is still unknown. 3) sulfated oligosaccharides: Gal(β 1-4)Glc-6'-*O*-sulphate (lactose 6'-*O*-sulfate) and Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc-3'-*O*-sulfate (*N*-acetylneuraminylactose 6'-*O*-sulfate) were identified in rat milk, whereas Gal(β 1-4)Glc-3'-*O*-sulfate (lactose 3'-*O*-sulfate) was found in dog milk. The presence of *N*-acetylneuraminylactose 6'-*O*-sulfate is suggested in human milk, too, and, in addition, this milk contained oligosaccharides whose GlcNAc residues were replaced by sulfate at OH-6 position. These compounds may permit the simultaneous delivery of two essential nutrients, sulfate and calcium, in early life, avoiding the precipitation of insoluble calcium sulfate in milk. 4) phosphorylated oligosaccharides: Bovine or mare colostrum contained phosphorylated oligosaccharides including Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc- α 1-phosphate (cow), Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)

*Corresponding author (urashima@obihiro.ac.jp).

GlcNAc-6-phosphate (cow) and Gal(β 1-4)GlcNAc- α 1-phosphate (horse). These oligosaccharides may also permit the simultaneous delivery of phosphate and calcium, avoiding the precipitation of calcium phosphate. The existence of these modified oligosaccharides in milk may offer valuable information for manufacturing bio-functional materials in the food industry.

哺乳動物の細胞表層などに存在する複合糖質の糖鎖は、しばしばある種の官能基(硫酸基やリン酸基など)で化学的な修飾(modification)を受けており、そのような「修飾基」には細胞内外への情報伝達におけるレセプターやシグナル素子としての重要な役割が示唆されている。

一方、乳腺上皮細胞により生合成・分泌されるミルク(乳汁)には、ラクトース(乳糖)以外に遊離のオリゴ糖群が存在しており、とくに「ミルクオリゴ糖(milk oligosaccharides, MO)」と呼ばれている。ミルクオリゴ糖は、たとえば人乳では12-14 g/Lもの高濃度で含まれ、その種類も100種類以上にも及ぶ¹⁾。これまでの研究で、ミルクオリゴ糖の多くは授乳した乳児の腸管において病原性細菌やウイルスまた細菌毒素が付着するのを阻止したり¹²⁾、結合シアル酸は乳児の脳神経系成分の合成素材として利用される³⁾など、重要な生理的意義を担った成分であることが示唆されている。近年、著者らの一連の研究により、ミルクオリゴ糖も複合糖質同様に、ある種の修飾基による置換を受けている場合のあることが明らかにされた。しかしながら、これらの糖修飾基についてまとめられた解説は見あたらず、その存在意義を考察する機会はきわめて少なかった。本稿では、これまでに同定されている修飾型ミルクオリゴ糖を紹介するとともに、修飾基に固有の生理的意義について考察し、その利用可能性を模索する。

ラクトン化シアル酸残基を含む ミルクオリゴ糖

複合糖質の糖鎖末端には、シアル酸と呼ばれるカルボキシル基を有する酸性糖単位の存在することが多い。シアル酸には現在までに30種類以上の分子種が報告されているが、ミルクオリゴ糖に含まれる代表的なシアル酸2種を示した(図1)。シアル酸はN-アシルノイラミン酸の総称であり多くの種類が存在するが、それぞれの分子の持つ生理的意義はまだ未解明である。シアル酸のカルボキシル基のpK値は1.6と低いいため、通常の生体pHではマイナスに荷電しており、これが生体分子間でのさまざまな機能発現の主因

となっている。

シアル酸を含む糖脂質はガングリオシドと呼ばれるが、電荷のないガングリオシドの存在が知られていた。赤血球膜などに存在するガングリオシドGM₃(Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc-Cer)やガングリオシドGD₃(Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc-Cer)では、シアル酸残基がラクトン環を形成している場合がある。これは、非還元性末端のシアル酸の1位のカルボキシル基と隣接するガラクトース残基やシアル酸残基の水酸基間で脱水反応が起こり、環状化した「ラクトン」が形成されたものである。ミンククジラの脳では、ガングリオシドGD₃の約1/1000(0.1%)がラクトン環を形成していると報告された⁴⁾。

最近筆者らは、ヒツジ初乳に含まれる遊離の3'-N-グリコリルノイラミニルラクトース(Neu5Gc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc)にラクトン体を見出し、しかも全体の約20-30%も占めることを発見した³⁾。核磁気共鳴スペクトル法(¹H-NMR)による検討では、シアルオリゴ糖のシアル酸残基のH-3のプロトンは、通常トリプレット状のアクシャル(ax)とダブルレットダブルレット状のエカトリアル(eq)の2種のシグナルが特徴的であるが、シアル酸残基がラクトン環を形成すると、とくにH-3eqのシグナルが高磁場シフトをするという経験則を持つ。ヒツジ初乳から分離された3'-N-グリコリルノイラミニルラクトースのH-3 eqシグナルは、2種の通常よりも0.15 ppmおよび0.55 ppmも高磁場シフトした特徴的なシグナルを含んでいた。3'-

N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)

N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)

図1. 2種の代表的シアル酸

図2. 3'-シアリルラクトースのラクトン化可能な3位置

シアリルラクトースなどシアリル (α 2-3) ガラクトースユニットを含むオリゴ糖には、可能なラクトン化位置は3カ所ある (図2)。すなわち、シアル酸残基の1位カルボキシル基と隣接ガラクトースの2位水酸基 (1-2 ラクトン) または4位水酸基 (1-4 ラクトン)、およびシアル酸残基の7位水酸基 (1-7 ラクトン) の3カ所であるが、ヒツジ初乳の3'-N-グリコリルノイラミニルラクトースラクトンは三つの可能なラクトンのうちの二つであることが推定されている。

また、ガングリオシド GM₃ や GD₃ を水酢酸に溶解し、室温で長時間放置するとラクトン化することが知られている⁶⁾。一方、ウシ初乳から調製した3'-N-アセチルノイラミニルラクトース (Neu5Ac (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc) を水酢酸に溶解し、20°C で3日間置いた場合も同様にラクトン化し、主成分は1-2 ラクトン、副成分は1-4 ラクトンであることが二次元 NMR による解析から明らかになっている⁷⁾。

気道や鼻粘膜などの上皮細胞表層に存在する複合糖質のシアル酸残基は、インフルエンザウイルスやロタウイルスが付着する際のレセプターであることが知られている。インフルエンザウイルス表層には、シアル酸に結合する能力を持つヘマグルチニン (HA スパイク) とともに、シアル酸を切り出す能力を持つノイラミニダーゼ (NA スパイク) を保持している。乳中に存在するシアリルラクトースなどは、同ウイルスが宿主に付着するのを阻止する役割が考えられている。ノイラミニダーゼによって3'-シアリルラクトースのシアル酸が切り放されてしまうと、それは宿主への付着阻止能を失う。しかしながら、3'-シアリルラクトースラクトン体は、GM₃ ラクトンと同様にウイルスノイラミニダーゼに対する加水分解抵抗性を持っていることが予想されるので、通常型シアリルラクトースよりも強力なウイルス付着阻止能を保持していると考えられる (図3 参照)。したがって、初乳期におけるシアリルラクトースのラクトン化は、生体の持つ巧妙な

図3. A 型インフルエンザウイルスの細胞接着に対するシアリルラクトースの競合阻害と同ラクトン体による切り出し障害による不活性化

ウイルス感染防止機構の一つであると考えられる。このような生理的意義に着目すれば、同ラクトンをインフルエンザウイルスやロタウイルス感染予防剤として育児用調製粉乳に添加するなどの利用性も拓けてくる。筆者らはウシ初乳から3'-シアリルラクトースラクトンを大量調製する方法を確立しており⁸⁾、その利用も現実的なものとなりつつある。

O-アセチル化シアル酸残基を含む ミルクオリゴ糖

リンパ球 B 細胞や胎児の脳などに存在するガングリオシド GD₃ の一部は、非還元性末端残基の N-アセチルノイラミン酸の9位が O-アセチル化されていることが知られている⁹⁾。このシアル酸は、5位のアミノ基と9位の水酸基の2カ所がアセチル化されているため、「N,O-ジアセチルノイラミン酸」とも呼ばれる。さらに、シアル酸分子内の水酸基の複数の箇所が、同時に O-アセチル化されている場合もある。牛乳からバターを製造する際の副産物であるバターミルクからは、N-アセチルノイラミン酸残基の7位や9位の水酸基、また7位と9位の水酸基が O-アセチル化されたガングリオシド GD₃ が分離されている^{10,11)}。

一方、オーストラリアやニューギニアに生息するハリモグラ (単孔類) 乳におけるミルクオリゴ糖にも、O-アセチル化シアル酸が発見されている。このミルクオリゴ糖は、4位が O-アセチル化された N-アセチルノイラミン酸残基を結合する3'-N-アセチルノイラミニルラクトース (Neu5Ac (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc) であることが¹H-NMR 解析により確認された (図4 参照)¹²⁾。9-O-アセチル化された N-アセチルノイラミン酸残基は、インフルエンザ C ウイルスやコロナウイルスのレセプターとして知られている。したがって、ハリモ

図4. ハリモグラ乳 4-O-アセチル N-アセチルノイラミニルラクトース

グラ乳中のオリゴ糖は、4-O-アセチル化された N-アセチルノイラミン酸をレセプターとするウィルスや細菌性の毒素などによる感染や進入から、乳仔を守る働きのあることが予想されるが、真の生理機能はまだ未解明である。

1950年代に、Kuhn と Brossmer により O-アセチル化 N-アセチルノイラミン酸を結合した 3'-N-アセチルノイラミニルラクトース (Neu5Ac (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc) が⁸、ウシ初乳に含まれることが報告された¹³⁾。この O-アセチル化シアリルラクトースの存在はその後再確認されていない。

硫酸基を持つミルクオリゴ糖

細胞間マトリックスに存在するコンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンや、血管内皮細胞表層の P-および L-セレクチンリガンドなど、硫酸基を持つ複合糖質の存在は従来より知られている。最近、いくつかの動物種によりミルクオリゴ糖の中に硫酸基を結合した分子の存在することが明らかになってきた。

ラット乳やラット泌乳期乳腺には、ラクトース 6'-O-硫酸 (Gal (β 1-4) Glc-6'-O-SO₃) (図5) および N-アセチルノイラミニルラクトース 6'-O-硫酸 (Neu5Ac (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc-6'-O-SO₃) の存在が示された¹⁴⁻¹⁷⁾。これらのオリゴ糖では、ガラクトース残基の 6 位が硫酸化されていた。また、人乳ではパララクト-N-ネオヘキサオースをコアとする糖鎖の還元性末端から 3 番目の内部 GlcNAc 残基の 6 位の硫酸化されたオリゴ糖が⁸、見いだされた¹⁹⁾。さらに、N-アセチルノイラミニルラクトース 6'-O-硫酸の存在も示唆されている²⁰⁾。最近、著者らの研究によりイヌ乳にはラクトース 3'-O-硫酸 (Gal (β 1-4) Glc-3'-O-SO₃) (図5) の存在が明らかにされた¹⁸⁾。このオリゴ糖では、非還元末端ガラクトース残基の 3 位が硫酸化されていた。ラクトース硫酸において、硫酸基の付加する位置がラット (6 位) とイヌ (3 位) では異なる点が非常に興味深い。

乳児への硫酸基の給源としては、タウリン (2-アミノエタンスルホン酸) が知られている。しかし、この成分以外にも硫酸基の供与体としての硫酸化ミルクオリゴ糖の存在する意義は重要である。泌乳期ラットの

ラット乳 (ラクトース 6'-O-硫酸)

イヌ乳 (ラクトース 3'-O-硫酸)

乳児の脳、網膜の形成
腸管内カルシウムの吸収促進
Salmonella typhimurium の腸管付着を阻止

図5. ラット乳ラクトース 6'-O-硫酸とイヌ乳ラクトース 3'-O-硫酸ならびに想定される生理機能

体内に [³⁵S] タウリンや [³⁵S] 無機硫酸塩を注入すると、ラット乳中に放射線活性を有する N-アセチルノイラミニルラクトース硫酸が検出されると同時に、それを授乳した乳仔ラットの肝臓、脳に [³⁵S] 無機硫酸塩による放射線活性の検出されることが報告されている²⁰⁾。このデータは、硫酸化ミルクオリゴ糖が、またタウリンとは異なった吸収機構により乳仔の脳や網膜の形成に必要な硫酸基の親から仔への運搬の役割を担っていることを示唆する。また、硫酸化オリゴ糖は乳中における硫酸カルシウムの沈澱を防ぐことで、腸管内でのカルシウムの吸収を促進し、乳仔へのカルシウムの運搬にも役割を担っているものとも考えられる。さらに、人乳に存在するラクトシルスルファチド (ラクトース-3'-O-硫酸とセラミドが結合した糖脂質) には、サルモネラ菌が上皮細胞に付着するのを阻止する働きが報告されている²¹⁾が、同様の付着阻止活性は高濃度であればラクトース-3'-O-硫酸にも期待される。

このような硫酸化オリゴ糖の機能性を考慮すれば、人工的に調製した同オリゴ糖鎖を乳児などを対象にした機能性食品素材などに利用する用途も拓けてくる。このような目的において村田らは、β-D-ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用し、4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトシド-6-O-硫酸を供与体基質、GlcNAc を受容体基質とした N-アセチルラクトサミン 6'-O-硫酸 (Gal (β 1-4) GlcNAc-6'-O-SO₃) の酵素合成法

を開発している²²⁾。また一方、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルファイトを硫酸基供与体とし、スルホリルトランスフェラーゼを用いた糖鎖の硫酸化を行った研究報告もある^{23,24)}。近い将来、安価で有効な硫酸化オリゴ糖の大量調製法の確立とその利用が期待されている。

リン酸基を持つミルクオリゴ糖

ミルク中には、リン酸化されている分子として代表的な糖ヌクレオチドがある。リン酸化分子としては糖転移酵素のドナーである糖ヌクレオチドの他に、オリゴ糖の存在も知られている。ウシ初乳中には、リン酸基を持つミルクオリゴ糖として6'-N-アセチルノイラミニルラクトサミン α 1-リン酸 (Neu5Ac (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc- α 1-PO₄) および6'-N-アセチルノイラミニルラクトサミン6-リン酸 (Neu5Ac (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc-6-PO₄) が見いだされている^{25,26)}。

最近、筆者らの研究グループは、サラブレッド種のウマ初乳からN-アセチルラクトサミン α 1-リン酸 (Gal (β 1-4) GlcNAc α 1-phosphate) の存在を確認し、しかも結合するリン酸基は「2リン酸」であると推定した (図6参照)²⁷⁾。このオリゴ糖の¹H-NMR スペクトラムでは、5.430 ppm にきわめて特徴的なダブルットダブルットの形状を持つ還元末端 GlcNAc 残基の α アノマーシグナルが存在した。この通常観察されない分裂シグナルの形状は、GlcNAc 残基の H-1, H-2 間のカップリングとともに、H-1 とリン酸基の³¹P 間における long range のカップリングが原因で生じたものと考えられた。

このように、これまでに報告されているリン酸化ミルクオリゴ糖は、いずれも還元性末端側の GlcNAc 残基がリン酸化されている。GlcNAc-1-リン酸は糖タンパク質 N 型糖鎖の生合成の必須のリピド中間体である GlcNAc-P-P-dolichol の前駆物質として知られている。GlcNAc-P-P-dolichol をアクセプターとして (Glc)₃

(Man)₄(GlcNAc)₂-P-P-dolichol が合成され、ついでそれがタンパク質のアスパラギン残基に転移され、(Glc)₃(Man)₄(GlcNAc)₂-Asn-protein が生成する。乳中に存在する N-アセチルラクトサミン-1-リン酸などは、GlcNAc-1-リン酸をアクセプターとして生合成されるか、オリゴ糖鎖が生合成され、ついでそれがリン酸化されるかは現時点では明らかではない。

リン酸基を含むミルクオリゴ糖の生理的役割としては、乳中におけるリン酸カルシウムの沈澱を防ぎ、腸管内でカルシウムの吸収を促進することで、乳仔へのカルシウムの運搬に寄与したり、乳仔へのリン酸基の運搬に関与しているかもしれないが、さらに未知の機能も考えられる。このような意義に着目するなら、酵素的な方法などで合成したリン酸化オリゴ糖を、乳児や成人を対象にした機能性食品素材として利用する展開も期待される。

以上のように、ミルクオリゴ糖は複合糖質糖鎖と同様に、糖残基がさまざまな修飾を受けている場合のことが明らかになってきた。糖修飾基には、さまざまな重要な生理機能を担っていることが予想されるが、とくに初乳に多く含まれるミルクオリゴ糖には特別な役割が示唆される。したがって、ミルクオリゴ糖の本体および修飾基に関する研究は、将来の機能性オリゴ糖の開発研究に重要なヒントを与えてくれるであろう。そして、修飾オリゴ糖を大量調製する道が拓かれれば、細菌やウイルスに対する感染予防剤、細菌毒素中和剤、腸管内ビフィズス菌増殖促進剤、腸管内カルシウム吸収促進剤、ならびに免疫調節剤などの機能性および生理活性素材として食品産業、医薬品産業における用途拡大が大いに期待されるだろう。ミルクオリゴ糖研究は、食品科学における新しいマテリアルサイエンスの構想と創成に多大な情報を供給してくれる、夢の広がる研究分野といえよう。

文 献

- 1) D.S. Newburg and S.H. Neubauer: Carbohydrates in milks: Analysis, quantities, and significance. in *Handbook of Milk Composition*, R.G. Jensen, ed., Academic Press, San Diego, pp. 273-349 (1995).
- 2) T. Idota, H. Kawakami, Y. Murakami and H. Sugawara: Inhibition of cholera toxin in human milk fractions and sialyllactose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 417-419 (1995).
- 3) J. Brand-Miller and P. McVeagh: Human milk oligosaccharides: 130 reasons to breast-feed. *Br. J. Nutr.*, **82**, 333-335 (1999).
- 4) T. Terabayashi and Y. Kawanishi: Naturally occur-

図6. ウマ初乳 N-アセチルラクトサミン α 1-リン酸および想定される生理機能

- ring ganglioside lactones in Minke whale brain. *Carbohydr. Res.*, **307**, 281–290 (1998).
- 5) T. Nakamura, T. Urashima, M. Nakagawa and T. Saito: Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum. *Biochim. Biophys. Acta*, **1381**, 286–292 (1998).
 - 6) S.B. Levery, C.E. Roberts, M.E.K. Salyan and S. Hakomori: A novel strategy for unambiguous determination of inner esterification sites of ganglioside lactones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 838–845 (1989).
 - 7) T. Nakamura, W.A. Bubb, T. Saito, I. Arai and T. Urashima: An NMR study of the lactonization of α -N-acetylneuraminy (2→3)-lactose. *Carbohydr. Res.*, **329**, 471–476 (2000).
 - 8) 伊藤敏敏, 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, 早澤宏紀, 寺口 進, 桑田英文: レアル酸化合物のラクトン体の製造方法. 特願 平11-331295 (1999).
 - 9) A. Varki: Diversity in the sialic acid. *Glycobiology*, **2**, 25–40 (1992).
 - 10) D.M. Banafeda, L.J. Macala, M. Constantine-Paton and R.K. Yu: Isolation and characterization of ganglioside 9-O-acetyl-GD₃ from bovine buttermilk. *Lipids*, **24**, 680–684 (1989).
 - 11) S. Ren, J.N. Scarsdale, T. Ariga, Y. Zhang, R.A. Klein, R. Hartmann, Y. Kushi, H. Egge and R.K. Yu: O-Acetylated gangliosides in bovine buttermilk. *J. Biol. Chem.*, **267**, 12632–12638 (1992).
 - 12) J.P. Kamerling, L. Dorland, H. van Halbeek, J.F.G. Vliegthart, M. Messer and R. Schauer: Structural studies of 4-O-acetyl- α -N-acetylneuraminy (2→3) lactose, the main oligosaccharide in echidna milk. *Carbohydr. Res.*, **100**, 331–340 (1982).
 - 13) R. Kuhn and R. Brossmer: Über O-acetyl-lactosamin-saure-lactose aus Kuh-Colostrum und ihre Spaltbarkeit durch Influenza-Virus. *Chem. Ber.*, **89**, 2013–2025 (1956).
 - 14) R. Carubelli, L.C. Ryan, R.E. Tricco and R. Caputto: Neuramin-lactose sulfate, a new compound isolated from the mammary gland of rats. *J. Biol. Chem.*, **36**, 2381–2388 (1961).
 - 15) L.C. Ryan, R. Carubelli, R. Caputto and R.E. Truccho: Studies on the structure of neuramin-lactose sulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, **101**, 252–258 (1965).
 - 16) W.C. Barra and R. Caputto: Isolation and identification of a lactose sulphate ester from rat mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta*, **101**, 367–369 (1965).
 - 17) H.U. Choi and R. Carubelli: Neuramin-lactose, neuramin-lactose sulfate, and lactose sulfate from rat mammary glands: Isolation, purification, and permethylation studies. *Biochemistry*, **7**, 4423–4430 (1965).
 - 18) W.A. Bubb, T. Urashima, K. Kohso, T. Nakamura, I. Arai and T. Saito: Occurrence of an unusual lactose sulfate in dog milk. *Carbohydr. Res.*, **318**, 123–128 (1999).
 - 19) Y. Guerardel, W. Morellem, Y. Plancke, J. Lemoine and G. Strecker: Structural analysis of three sulfated oligosaccharides isolated from human milk. *Carbohydr. Res.*, **320**, 230–238 (1999).
 - 20) J.A. Sturman, Y.Y. Lin, T. Higuchi and J.H. Fellman: N-Acetylneuramin lactose sulfate: A newly identified nutrient in milk. *Pediatr. Res.*, **19**, 216–219 (1985).
 - 21) P. Chaturdevi, B. McCormick, C.D. Warren, A.M. Siber and D.S. Newburg: in *Abstract Book of The Annual Conference of the Society for Glycobiology*, AP 155, Baltimore, MD (1998).
 - 22) T. Murata, M. Kosuge, T. Nakamura, T. Urashima and T. Usui: Enzymatic synthesis of sulfated disaccharides utilizing β -D-galactosidase-catalyzed transglycosylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
 - 23) T. Torii, M. Fukuda and O. Habuchi: Sulfation of sialyl N-acetylglucosamine oligosaccharides and fetuin oligosaccharides by keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase. *Glycobiology*, **10**, 203–211 (2000).
 - 24) K.G. Bowman, B.N. Cook, C.L. de Graffenried and C.R. Bertozzi: Biosynthesis of L-selectin ligands: Sulfation of sialyl Lewis x-related oligosaccharides by a family of GlcNAc-6-sulfotransferase. *Biochemistry*, **40**, 5282–5391 (2001).
 - 25) J. Pakkinen and J. Finne: Occurrence of N-acetylglucosamine 6-phosphate in complex carbohydrate: Characterization of a phosphorylated sialyl oligosaccharide from bovine colostrum. *J. Biol. Chem.*, **260**, 10971–10975 (1985).
 - 26) J. Pakkinen and J. Finne: Isolation of sialyl oligosaccharides and sialyl oligosaccharide phosphates from bovine colostrum and human urine. in *Methods in Enzymology*, V. Ginsburg, ed., Academic Press, New York, Vol. 138, pp. 289–300 (1987).
 - 27) T. Nakamura, S. Amikawa, T. Harada, T. Saito, I. Arai and T. Urashima: Occurrence of an unusual phosphorylated N-acetylglucosamine in horse colostrum. *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 13–18 (2001).

(2001 年 9 月 20 日 受付)