ウシをはじめとする家畜ミルクオリゴ糖研究の最近の進歩

浦島 匡^{*1}，朝隈貞樹^{*2}，福田健二^{*1}，齋藤忠夫^{*3}

人乳にはラクトース以外のミルクオリゴ糖が初乳で22～24 g/L，常乳で12～13 g/L含まれ，これまでに115種類もの構造が解析されている．一方でウシでは分娩直後の初乳で1 g/L以上のミルクオリゴ糖が含まれ，そのうちの70%は3'-シアリルラクトースなどの酸性オリゴ糖が占めるが，とくに酸性オリゴ糖の含有量は分娩後48時間以降の乳では急減し，常乳中にはごく少量しか含まれていない．ウシミルクオリゴ糖の構造研究は，含まれる量がごく少量であることが原因でヒトミルクオリゴ糖の構造研究に比べて著しく遅れていたが，近年親水性相互作用高速液体クロマトグラフィーやエキソグリコシダーゼ消化・質量分析の組み合わせによる構造解析方法の進歩によって微量での解析が可能となった．一方で，新たな各ウシミルクオリゴ糖の定量分析方法も開発された．本解説では，ウシを中心とする家畜ミルクオリゴ糖構造研究の歴史的な展開，新たな構造情報や定量分析方法・定量分析値，ならびにウシミルク糖タンパク質糖鎖の解析方法・構造情報を紹介するとともに，将来的な家畜ミルクオリゴ糖やミルク複合糖質の産業面での利用可能性について展望する．

Recent Advances of the Study on Milk Oligosaccharides of Domestic Farm Animals Including Cows

Tadasu URASHIMA, Sadaki ASAKUMA, Kenji FUKUDA, Tadao SAITO, ^{*1}帯広畜産大学大学院畜産学研究科, ^{*2}独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター酪農研究領域, ^{*3}東北大学大学院農学研究科

ヒト乳にはミルクオリゴ糖が初乳で22～24 g/L，常乳で12～13 g/L含まれ，ラクトース，脂質に次ぐ3番目の固形分である．現在までに115種類の化学構造が報告されているが⁽¹⁾，微流体高速液体クロマトグラフィーチップ質量分析（Microfluidic HPLC-chip mass spectrometry）を用いた分析では200種類以上の存在が示されている⁽²⁾．115種類のヒトミルクオリゴ糖は，コア骨格に基づいて13の系列（表1）に分類される⁽¹⁾．

一方，ウシでは分娩直後の初乳には1 g/L以上のミルクオリゴ糖が含まれるが，分娩後48時間以降ではその含有量は著しく低下する⁽³⁾．近年ヒトミルクオリゴ糖は，乳児腸管内でのビフィズス菌増殖・定着促進作用（プレバイオティクス作用），病原菌に対する腸管付着阻害作用，循環過程での免疫調節作用などの機能性が認められ，国際シンポジウムが開催されるほどに活発な研究領域になっている．一方でウシなどの家畜ミルクオリゴ糖における研究の展開はやや遅れている感があつた．それでもここ2～3年間グリコームやグライコミクスと言われる糖鎖の網羅的微量分析方法の進歩に伴って，とくに構造分析面での進展が著しい．育児用調合乳は牛乳を原料として製造されるが，ヒトミルクオリゴ糖の生理的

表1 ■ 13系列のヒトミルクオリゴ糖コア構造

構造	名称
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lactose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-tetraose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-neotetraose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-hexaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-neohexaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	<i>para</i> -Lacto-N-hexaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	<i>para</i> -Lacto-N-neohexaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-octaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-neooctaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	<i>iso</i> -Lacto-N-octaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	<i>para</i> -Lacto-N-octaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-decaose
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) $\searrow$ Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc	Lacto-N-neodecaose

意義を考慮した場合、それと同様の機能を有する素材の添加が望まれる。ガラクトオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、それらの混合物、ラクチュロースなどがプレバイオティクス素材として添加されているが、ウシ初乳やチーズホエー、またウシ以外の乳用家畜の乳などから分画されたオリゴ糖も、将来的には育児用調合乳を含む食品への機能性添加素材として利用されることが期待される。そのためには、ミルクオリゴ糖や複合糖質の化学構造や各オリゴ糖の含有量などの情報が求められている。本解説では、ウシを中心とする家畜ミルクオリゴ糖のこれまでの研究状況の紹介に努めるとともに、将来的なその産業への利用可能性についても考察する。

ウシミルクオリゴ糖研究の歴史的展開

ウシ初乳における酸性ミルクオリゴ糖の研究は、ヒトミルクオリゴ糖研究とほぼ同時期に Kuhn らによって開始された。1956年に Kuhn と Brossmer はウシ初乳から、*N*-アセチルノイラミン酸に *O*-アセチル基を含む Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc を分離し、構造決定した⁽⁴⁾。その後長くにわたり、ウシ初乳においてシアル酸に *O*-アセチル基を含むオリゴ糖は報告されず、その存在は疑われていたが、最近それ再確認する発見が行われた⁽⁵⁾。次いで1965年に Kuhn と Gauhe はウシ初乳からの、Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal, Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc(6'-SL), Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc(3'-NGc-SL), Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(6'-SLN) および Neu5Ac(α 2

$\rightarrow$ 8)Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc(DSL) の分離と構造解析を⁽⁶⁾、1966年に Schneier と Rafelson は6'-SLとともに Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc(3'-SL)の構造解析を行った⁽⁷⁾。つづいて、1981年に Veh らは開発した薄層クロマトグラフィーのシステムから、これらのオリゴ糖とともに Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc(6'-NGc-SL) および Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(6'-NGc-SLN)の存在を示した⁽⁸⁾。ここでは、ヒトでは発見されていない *N*-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)を含むオリゴ糖の存在が注目される。ヒトにおけるそのようなタイプのオリゴ糖の不在は、あらゆる組織における CMP-Neu5Ac を CMP-Neu5Gc に変換する酵素活性の不在と関係すると思われる。リン酸基を含む酸性オリゴ糖については、1965年に Cumar らによって Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc-3'-PO₄が⁽⁹⁾、1985年と1987年に Parkkinen と Finne によって Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc-1-PO₄ならびに Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc-6-PO₄の分離と構造解析が報告されている^(10, 11)。リン酸基を含むミルクオリゴ糖はヒトでは発見されていないが、ウマの初乳においては Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc- α 1 $\rightarrow$ 2リン酸が報告されている⁽¹²⁾。

酸性オリゴ糖に比べてウシ初乳中の中性オリゴ糖の研究開始は遅く、1984年になってようやく Saito らによって、GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc と Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(*N*-アセチルラクトサミン, LacNAc)の分離と構造解析が行われた⁽¹³⁾。この2つのオリゴ糖の発見は興味深い。*N*-アセチルラクトサミンは糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の単位

としては広範囲に発見されているものの、遊離型が天然において発見されたのは初めてであった。またGalNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)Glcは、牛乳の糖タンパク質の糖鎖の単位として特徴的に発見されるGalNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc(LacdiNAc)に関連した遊離のオリゴ糖である。引き続いて、1987年にSaitoらにより、Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(3'-GL), Gal($\beta 1 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(6'-GL), および Gal($\beta 1 \rightarrow 4$) [Fuc($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GlcNAc(3-F-LacNAc) が⁽¹⁴⁾, 1991年にUrashimaらによって3'-GLと6'-GLに加えてGal($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc (イソグロボトリオース), GalNAc($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc および Gal($\beta 1 \rightarrow 3$) [Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(ラクト-N-ノボペンタオースI) が分離され構造決定された⁽¹⁵⁾。3'-GL, 6'-GL以外のこれらの中性オリゴ糖は、いずれもヒト乳の中には発見されていない。イソグロボトリオースやGalNAc($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glcなど、 α -Gal, α -GalNAcを含むミルクオリゴ糖の存在は興味深い。一方ラクト-N-ノボペンタオースIはヒト乳では発見されていないが、ブタ、ラクダおよびウマなど家畜の乳においては発見され⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, ラクト-N-ネオテトラオース(LNnT, Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc)やラクト-N-ネオヘキサオース(LNnH, Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$) [Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc)とともに主要なミルクオリゴ糖のコア骨格を構成している。ウシの酸性ならびに中性オリゴ糖の構造研究は、これ以降2000年代の後半になるまで見当たらず、これらの成果はウシミルクオリゴ糖における先駆的な報告である。

近年におけるウシミルクオリゴ糖の構造研究

従来におけるミルクオリゴ糖の構造研究は、ペーパークロマトグラフィー(PC), 薄層クロマトグラフィー(TLC), 順相系・逆相系高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるオリゴ糖の分離・精製, 単糖組成分析, メチル化分析, 核磁気共鳴スペクトル(NMR)分析, 連続的エキソグリコシダーゼ消化とゲルろ過などの組み合わせなどによって行われてきた。しかしこれらの方法であれば、オリゴ糖の分析に1 mg以上が必要であり、大量の出発試料を必要として低濃度のオリゴ糖の構造研究には限界があった。一方で近年質量分析器を駆使したグリコム解析方法が主に糖タンパク質や糖脂質の糖鎖構造解析を中心に発達し、ミルクオリゴ糖研究にも拡がりを見せてくるようになった。

2008年にTaoらは、クロロホルム-メタノール抽出によってホルスタインまたジャージー牛の0.5 mLの初乳

から糖質画分を分画し、NaBH₄による還元と固相抽出によってオリゴ糖画分を分離した⁽¹⁹⁾。次いで極性グラファイトカーボンカラムを用いた3%アセトニトリル-0.1%ギ酸および90%アセトニトリル-0.1%ギ酸を溶媒とする二相グラジエント溶出によるHPLC-chip分離と、ナノエレクトロスプレーならびにイオンサイクロトロン共鳴質量分析装置によって、分離されるオリゴ糖の質量分析(MS)を行った。その結果39種のオリゴ糖の組成式が決定された。オリゴ糖の約70%はシアリル化されており、そのうちの約5%はNeu5Gcを含んでいた。シアリルラクトースとシアリルラクトサミンが優先的な主成分であり、シアリルラクトース種(3'-SLと考えられる)の一種は全オリゴ糖の50%以上を占めていた。MSによる組成式情報とナノLCクロマトグラム上の保持時間からLNnTとLNnHの存在は確認されたが、ラクト-N-テトラオース(LNT, Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc)とラクト-N-ヘキサオース(LNH, Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$) [Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc)は確認されなかった。LNnHにNeu5Acを1残基付加した組成式を有するオリゴ糖や、1991年のUrashimaらの報告同様ラクト-N-ノボペンタオースIの組成式に相当するオリゴ糖とそのNeu5AcまたNeu5Gcによるシアリル誘導体が発見された。得られた各オリゴ糖の組成式から、N-アセチルノイラミニルラクトースとN-グリコリルノイラミニルラクトースの各々2種ずつの異性体や、6'-SLN, 6'-NGc-SLN, DSLなどそれまでの文献既知のオリゴ糖と同一と考えられるオリゴ糖が検出された。本分析において、フコースを含むオリゴ糖は検出されなかった。これらの分析結果は、従来の方法では検出できなかった超微量のオリゴ糖まで検出したことに重要な意義はあるが、完全な構造決定とはみなされない。

また、2009年にBarileらはゴルゴンゾーラチーズ製造時のホエーに含まれるオリゴ糖を、超ろ過膜による限外ろ過と上と同様の抽出操作によって分画して、質量分析に供した⁽²⁰⁾。その結果、8種の中性オリゴ糖と7種の酸性オリゴ糖(6種はNeu5Acを含むオリゴ糖, 1種はNeu5Gcを含むオリゴ糖)を検出し、その組成式を求めた。ゴルゴンゾーラチーズはウシの常乳を原料として製造され、初乳よりも低濃度に含まれる超微量オリゴ糖を検出したことに意義が認められる。

一方、2010年にBarileは分娩後3日以内のホルスタインの初乳0.5 mLからTaoらと同様のオリゴ糖の分画・抽出・分離、ならびにMS分析を行って、16種の中性オリゴ糖と24種の酸性オリゴ糖の組成式を報告した⁽²¹⁾。Taoらは分子量709の中性オリゴ糖として唯一LNnTと

表2 ■ 構造決定されたウシ中性ミルクオリゴ糖 (文献5より)

1.	GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
2.	GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
3.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
4.	Fuc(α 1 $\rightarrow$ 2)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
5.	GalNAc(α 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
6.	GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
7.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
8.	Gal(α 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
9.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
10.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
11.	Fuc(α 1 $\rightarrow$ 2)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc GalNAc(α 1 $\rightarrow$ 3)
12.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
13.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
14.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
15.	Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc

考えられるオリゴ糖を検出したが⁽¹⁹⁾, Barileらは同一分子量の4つの構造異性体を発見した. Taoらは検出した24種の酸性オリゴ糖のうち7種のNeu5Gcを含むオリゴ糖を発見したが, Barileらはいずれの24種の酸性オリゴ糖のうち2種しかNeu5Gcを含むオリゴ糖を見いだせなかった. この違いはウシの個体によるミルクオリゴ糖の不均一性によるものかもしれない.

2011年には, 緻密な方法に基づくウシミルクオリゴ糖の構造解析がMarinoらによって行われた⁽⁵⁾. Marinoらは分娩後1日目の初乳から遠心分離による脱脂, カゼイン等電点沈殿, 超ろ過ならびにゲルろ過によってオリゴ糖画分を分画した. 次でペプチドフリー・低ラクトースのオリゴ糖画分を2-アミノベンズアルデヒドで誘導体化してから, Vydac 301 VHP575カラムと, 溶出液として0.1 M酢酸アンモニウム(pH 7.0)-20%アセトニトリルと20%アセトニトリルを使用したWAXクロマトグラフィーによって中性および酸性オリゴ糖の分離を行った. そしてTSK Gel Amide80カラムと溶出液としてアンモニア水溶液-50 mMギ酸ならびにアセトニトリルを使用した親水性高速液体クロマトグラフィーを用いて各オリゴ糖の分離・精製を行った. 各オリゴ糖は, エレクトロスプレー質量分析とエキソグリコシダーゼによる消化, および親水性高速液体クロマトグラフィーの保持時間情報の組み合わせによって構造決定された. 決定された各オリゴ糖の構造は表2, 表3に示した. Marinoらの構造解析は, MSによる単糖組成情報のほかに, 基質特異性の厳密なエキソグリコシダーゼ消化と消化物のHPLC保持時間に基づいているので, 信頼性は高い.

表3 ■ 構造決定されたウシ酸性オリゴ糖 (文献5より)

16.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
17.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
18.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
19.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
20.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
21.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
22.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
23.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3) Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
24.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
25.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc

表3 ■ 構造決定されたウシ酸性ミルクオリゴ糖 (文献5より) 続き

26.	Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
27.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
28.	Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
29.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
30.	Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
31.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)
32.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
33.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)
34.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
35.	Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
36.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 8)Neu5Gc(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc
37.	Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc

Marinoらの結果は, 従来報告されているウシミルクオリゴ糖の化学構造を再検証するとともに, いくつかの新規構造を示した. 中性2糖は, Saitoらが報告したGalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc, LacNAcとともにLacdiNAcが遊離のオリゴ糖として初めて発見された. 3糖画分は, 従来の報告と同様3'-GL, 4'-GL, 6'-GL, イソグロボトリオース, GalNAc(α 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc のほかに GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc (ラクト-N-トリオースII)が発見された. またFuc(α 1 $\rightarrow$ 2)Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc(2'-FL), GalNAc(α 1 $\rightarrow$ 3)[Fuc(α 1 $\rightarrow$ 2)]Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc (A4糖)という2種類のフコースを含む中性オリゴ糖が発見された. フコースを含むオリゴ糖は, TaoらやBarileの研究においては発見されていない. A4糖と同一と考えられるオリゴ糖は, Nakajimaらによってウシ初乳に発見されている⁽²²⁾. また, Taoらと同様に, LN n T, ラクト-N-ノボペンタオースI, LN n Hが発見される一方, LNT, LNHは発見されなかった.

酸性オリゴ糖画分からは5~7糖の8種のモノシアリ

ルオリゴ糖が発見された。その中でLNnTの($\alpha 2 \rightarrow 3$) また($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル誘導体が発見されたが、Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glcはこれまでにミンクジラの乳にのみ発見されている⁽²³⁾。もう一方のNeu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(LST c)は、ヒトを含む広範囲の種の乳／初乳に発見されている⁽²⁴⁾。ラクト-N-ノボペンタオースIの($\alpha 2 \rightarrow 3$) また($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル化合物は、後述する2種のラクダ初乳に発見されているオリゴ糖と同一の構造と予想される⁽¹⁷⁾。一方でLNnHの($\alpha 2 \rightarrow 3$) また($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル誘導体も同定された。モノシアリル3糖・4糖画分には3'-SL, 6'-SL, 6'-SLNのほか、($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル LacdiNAc, Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$) [GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc, Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(($\alpha 2 \rightarrow 3$)シアリル4'-GL), Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$) [Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル3'-GL)など新規なオリゴ糖が発見された。($\alpha 2 \rightarrow 3$)シアリル4'-GL, ($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル3'-GLは、ラクダ初乳に発見されている Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc(($\alpha 2 \rightarrow 3$)シアリル3'-GL)の関連オリゴ糖である⁽¹⁷⁾。高陰電荷画分には、DSL, ジシアリルラクトサミンのほか、リン酸化シアリルオリゴ糖と思われるオリゴ糖が溶出した。Neu5Gcを含むオリゴ糖は5%以下含まれ、そのほかシアリルラクトース, シアリルラクトサミンなど特定のオリゴ糖に少量のO-アセチルシアル酸が検出された。

以上のように、Marinoら研究報告は従来解析されたウシミルクオリゴ糖を再確認するとともに、興味深い新規オリゴ糖の化学構造を明らかにした。従来ミルクオリゴ糖の精製と構造解析を行うために、1 L以上のサンプルを必要とし、精製にも時間がかかったことを考えれば、少量のサンプルを使用した簡易な構造解析方法の進

歩には驚かされる。

ヒトミルクオリゴ糖とウシミルクオリゴ糖の違い

これらの構造研究によって、ヒトミルクオリゴ糖とウシミルクオリゴ糖間の構造的特徴的な違いが明らかになった。ヒトミルクオリゴ糖は表1のような13種のコア骨格をもつオリゴ糖シリーズに分類され、それにシアル酸やフコースが付加されて100種類以上のバリエーションが形成される⁽¹⁾。LNTをコア骨格とするオリゴ糖が最も優先的であるが、Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc(ラクト-N-ビオースI, LNB)を含むタイプI型オリゴ糖が、LacNAcを含むタイプII型オリゴ糖よりも優先的である⁽¹⁾。それに対し、ウシミルクオリゴ糖はラクトースをコア骨格とするもの以外では、LNnT, ラクト-N-ノボペンタオースI, LNnHをコア骨格とするタイプII型オリゴ糖が存在する一方で、タイプI鎖を含むオリゴ糖は発見されなかった。ラクト-N-ノボペンタオースIをコア骨格とするオリゴ糖は、ヒトミルクオリゴ糖の中にも1例 (Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$))Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)[Fuc($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$))Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc)が発見されているが⁽²⁵⁾、超微量であってウシとは状況が異なる。ウシミルクオリゴ糖にはガラクトシルラクトースをコア骨格とするシアリルオリゴ糖が発見されたが、ヒトミルクオリゴ糖にはこのようなタイプのオリゴ糖は見いだされていない。ヒトミルクオリゴ糖では中性オリゴ糖のほうが酸性オリゴ糖よりも優先的であり、またフコースを付加するオリゴ糖の割合が高いが⁽¹⁾、ウシミルクオリゴ糖ではフコースを含むオリゴ糖は発見されたものの、存在量は非常に低い。ウシミルクオリゴ糖の中には、LacNAc, LacdiNAc, GalNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)Glcなどヒトには発見されない分子種が

表4 ■ ウシ初乳, 常乳, 育児用調合乳中の各オリゴ糖濃度 (文献7より転用)

	3'-SL (g/L)	6'-SL (g/L)	6'-SLN (g/L)	DSL (g/L)	GNL (g/L)
脱脂乳1	51 ± 4	6.3 ± 0.4	0.13 ± 0.02	1.5 ± 0.1	2.6 ± 0.3
脱脂乳2	55 ± 4	9 ± 0.2	0.10 ± 0.02	2.1 ± 0.3	3.4 ± 0.4
ホモゲナイズ乳	48 ± 4	9.6 ± 0.8	0.1 ± 0.03	3.1 ± 0.2	2.4 ± 0.1
未低温殺菌乳	47 ± 4	3.6 ± 0.3	検出限界以下	0.54 ± 0.01	検出限界以下
常乳 (文献27)	94-119	67-88	145-176	41-77	
常乳 (文献26)	35-50	14-25	9-12	2-7	3-4
分娩後7日乳 (文献3)	30	25	12		
2回目搾乳初乳	1245 ± 82	85 ± 6	119 ± 7	126 ± 8	1 ± 0.1
4回目搾乳初乳	739 ± 53	73 ± 2	117 ± 10	80 ± 7	1 ± 0.1
初乳 (文献27)	354	147	210	135	
初乳 (文献26)	261-867	92-243	97-239	166-283	20-65
初乳 (文献31)	850	141	117		
育児用調合乳1	17 ± 4	3.8 ± 0.2	検出限界以下	0.8 ± 0.1	検出限界以下
育児用調合乳2	19 ± 1	4.6 ± 0.5	検出限界以下	0.5 ± 0.02	検出限界以下

含まれる。ウシミルクオリゴ糖には、ヒトでは発見されていないイソグロボトリオースや GalNAc($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc など、 α -Gal や α -GalNAc を含む分子種がある。

ヒトとウシのこのような特徴的なミルクオリゴ糖間の違いは、将来ウシミルクオリゴ糖を生理活性素材として産業的に利用する際には考慮されるべきであろう。

ウシミルクオリゴ糖定量分析の最近の進歩

人乳ではミルクオリゴ糖の含有量は12～13 g/Lであり⁽¹⁾、ラクトース (55～70 g/L)、脂質 (30～60 g/L) に次ぐ3番目の固形分である。それに対しウシ乳では、優先的なミルクオリゴ糖 (3'-SL, 6'-SL, 6'-SLN および DSL) の濃度は60～94 mg/L から349～460 mg/L であって、含量は低い。表4にはウシ初乳、常乳、脱脂乳、ならびにウシ常乳を原料として調製された育児用調合乳における主要なオリゴ糖含量の文献値を示した (文献28より転用)。従来の定量分析は、オリゴ糖を含む画分の2-アミノピリジンなどによる誘導体調製後の逆相 HPLC や、高 pH アニオン交換高速クロマトグラフィーとアンペロメトリー検出 (HPEAC-PAD) によって行われている^(3, 26, 27)。

図1には、分娩直後から分娩後168時間までのウシ初乳／移行乳における3'-SL, 6'-SL および6'-SLN の濃度変化を示した (文献3より転用)。これらのオリゴ糖の濃度は、分娩後48時間を境として急激に低下している⁽³⁾。ヒトにおいて、ミルクオリゴ糖の量は常乳で初乳よりも約2倍低いものの、常乳にも一定量存在するのとは大きく状況が異なっている。

2011年にFongらは、質量分析のトータルイオンモニターを利用した高速液体クロマトグラフィー-高分解選択反応モニターリングマスマススペクトロメトリー (LC-MRSM-MS) によるウシミルクオリゴ糖に対する新しい定量分析方法を報告した⁽²⁸⁾。Fongらはウシ常乳脱脂乳、ホモゲナイズした常乳、低温殺菌していない常乳、初乳ならびに育児用調製乳において、5種のウシミルクオリゴ糖 (3'-SL, 6'-SL, 6'-SLN, DSL, *N*-アセチルガラクトサミニルラクトース (GNL)) の定量分析を行った。サンプルからクロロホルム-メタノールならびにアセトニトリルでオリゴ糖画分を抽出した後、Kintex HILIC (親水性相互作用) カラムと50 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.5) および100%アセトニトリルを溶媒とする親水性相互作用高速液体クロマトグラフィーによって各オリゴ糖を分離してから、各成分の加熱エレクトロスプレー

図1 ■ 泌乳初期における3'-SL, 6'-SL および6'-SLN 濃度の変化値は平均±標準偏差 ($n=4$)。文献3より引用した。

イオン化 (ESI) 質量分析を行った。一方で定量分析する5種のオリゴ糖に対し、オリゴ糖スタンダードを使用してマスマススペクトロメトリーのイオンモニターに対するピーク面積の濃度依存性や回収率を測定した。

本論文の中で、ほかの研究でしばしば使用されるグラファイトカーボンカラムを使用したHPLCでは、オリゴ糖のピーク幅の広がりや不対称性また保持時間の再現性の問題が生ずるが、Kintex HILICカラムを使用した分離ではピークの重なりがなく、これらは改善されることが示された。得られた定量値は、ウシ常乳試料 (脱脂乳、ホモゲナイズした乳、低温殺菌していない乳) では

3'-SLは47～55 mg/L, 6'-SLは3.6～9.6 mg/L, 6'-SLNは0.13 mg/L以下, DSLは0.54～3.1 mg/L, GNLは3.4 mg/Lであった(表4参照)。搾乳2回目および4回目の初乳では、3'-SL, 6'-SL, 6'-SLNおよびDSLの濃度は常乳脱脂乳よりもはるかに高いが、GNLの濃度は低かった(表4参照)。3'-SLの濃度は、2回目搾乳の初乳で4回目搾乳の初乳よりも約2倍高いが、6'-SLと6'-SLNの場合搾乳2回目から4回目にかけて濃度の大きな低下は観察されなかった。育児用調製乳においては、各オリゴ糖濃度は常乳よりも30～50%低いことが示された。この定量分析方法はオリゴ糖の誘導体化を必要としないので、オリゴ糖濃度の損失は少なく今後広く使用されるかもしれない。

ウシ乳糖タンパク質糖鎖研究の最近の進歩

ウシ乳タンパク質の約80%を占めるカゼイン成分(α_{S0} , α_{S1} , α_{S2} , α_{S3} , α_{S4} , α_{S6} , β , および κ -カゼイン)の中で、 κ -カゼインのみが糖鎖を付加していることはよく知られた事実である。それは少なくとも6カ所のO-グリコシル化位置、すなわち Thr142, Thr152, Thr154, Thr163, Thr166, および Thr186を有している。ウシ常乳 κ -カゼインの5種の糖鎖構造、すなわち GalNAc, Gal(β 1→3)GalNAc, Neu5Ac(α 2→3)Gal(β 1→3)GalNAc, Neu5Ac(α 2→6)[Gal(β 1→3)]GalNAc, および Neu5Ac(α 2→6)[Neu5Ac(α 2→3)]Gal(β 1→3)GalNAcは、1980年に Saitoらによって報告された⁽²⁹⁾。また、初乳 κ -カゼインの4種の糖鎖構造、すなわち Neu5Ac(α 2→6)[GlcNAc(β 1→3)Gal(β 1→3)]GalNAc, Gal(β 1→3)[Gal(β 1→4)GlcNAc(β 1→6)]GalNAc, Neu5Ac(α 2→3)Gal(β 1→3)[Gal(β 1→4)GlcNAc(β 1→6)]GalNAc, および Neu5Ac(α 2→3)Gal(β 1→3)[Neu5Ac(α 2→3)Gal(β 1→4)GlcNAc(β 1→6)]GalNAcは、1981年、1982年に Saitoらによって構造決定された^(30～32)。

ウシラクトフェリンは83 kDaの分子量を有し、約11%の糖含量を有している。それはN-グリカンが潜在的に付加することが可能な5個のアスパラギン残基を有し、そのうちの4カ所、すなわち Asn233, Asn368, Asn476, および Asn545はハイマンノース型N-グリカンを付加している。ラクトフェリンのアイソフォーム形は加えて5番目の潜在的なN-グリカン付加位置、すなわち Asn281に、複合型N-グリカンを有している⁽³³⁾。

ラクトフォリン(Lactophorin)は27 kDaの分子量を有するリン酸化糖タンパク質であり、1カ所のN-グリカン付加位置(Asn77)と2カ所のO-グリカン付加位置

(Thr16とThr86)を有する。N-グリカンビアンテナ(二又)構造を有するN-アセチルラクトサミン型であり、そのうちのいくつかはLacdiNAc単位またNeu5Ac(α 2→6)GalNAc(β 1→4)GlcNAc単位を含んでいた。一方3種のO-グリカン、すなわちGalNAc, Gal(β 1→3)GalNAc, Gal(β 1→3)[Gal(β 1→4)GlcNAc(β 1→6)]GalNAcが報告されている⁽³⁴⁾。2010年にInagakiらは、フコースの付加した形あるいは付加しない形においてLacNAc単位あるいはLacdiNAc単位を含んだモノシアルビトリ、およびテトラアンテナ構造の複合型N-グリカンの存在を示した⁽³⁵⁾。

ウシ乳の脂肪球膜には、乳腺細胞の細胞膜に由来する多くの糖タンパク質が局在している。乳脂肪球膜(MFGM)糖タンパク質の一種であるMUC1は、GalNAc, GlcNAc, Gal, Man, シアル酸, Fucを含むNおよびO-グリカンを有する高度にグリコシル化された糖タンパク質である。1993年にSatoらは、大半のMFGMに局在するウシの糖タンパク質はLacdiNAc単位を含むことを報告した⁽³⁶⁾。また1995年にSatoらは、主要なMFGM糖タンパク質であるビューチロフィリン(butyrophilin)に、Asn55に付加したLacdiNAc単位を含む唯一の複合型グリカンとAsn215に付加した唯一の混成型グリカンの構造を報告した⁽³⁷⁾。

2011年にTakemoriらは、泌乳初期(分娩後1日, 1週, 2週, 3週, 4週)でのウシ乳全N-グリコム分析を行った⁽³⁸⁾。ウシ乳サンプル20 μ LをNaBH₄で還元した後、トリプシンおよびPNGase F消化した。次いでそれをヒドラジンを結合したBlotGlycoRビーズに滴下して、ビーズ上でのN-グリカンの吸着とシアル酸のカルボキシ基のメチルエステル化を行ってから、糖鎖の回収と精製を行った。得られた糖鎖は、マトリックス支援レーザー脱イオン化法-飛行時間型質量分析(MALDI-TOFMS)に供して分析された。Takemoriらはウシミルク糖タンパク質のN-グリコムの泌乳経過に伴う変化を観察し、MALDI-TOFMSによる糖組成分析では1週, 2週, 3週, 4週のサンプルのN-グリカンプロファイルはかなり一定しているものの、分娩後1日のサンプルでは大きく異なっていることを明らかにした。1週, 2週, 3週, 4週のサンプルでは主要成分は(Hex)₂(HexNAc)₃(deoxyhexose)₁, (Neu5Ac)₁(Man)₃(GlcNAc)₂, (HexNAc)₄(deoxyhexose)₁, (Neu5Ac)₁(Man)₃(GlcNAc)₂を単糖組成とする1あるいは2のLacdiNAcを含むモノシアルビアンテナ糖鎖であったが、分娩後1日サンプルではLacdiNAcを含まないビアンテナ糖鎖が主要成分であった。N-グリカンの量は分娩後1

日サンプルで多くかつ高度にシアリル化している一方、Neu5Gc/Neu5Ac比が以後のサンプルよりも高く、泌乳経過とともに段階的に低下することが示された。

また彼らはホエータンパク質の*N*-グリカンの解析のため、乳試料から酸性ホエーを調製し、ホエータンパク質をSDS電気泳動で分離した。次いで染色によって各バンドを検出した後、染色部分の切り出し、ゲル中でのトリプシン消化、ペプチドの抽出・ZipTipC18による精製、ならびにPNGaseF消化を行ってから、MSによって*N*-グリカンの解析を行った。その結果、ラクトフェリンの*N*-グリカンはハイマンノース型 (Man5-Man9) が優先的であり、その相対的な優先性は泌乳経過を通じて一定であること、IgGの*N*-グリカンは初乳ではシアリル種が50%以上を占めるが、その後の泌乳期では激減することなどが示された。

この研究は乳のN型糖タンパク質を対象にした最初のグリコム解析研究であり、それらの網羅的な組成分析や、個別の各糖タンパク質における*N*-グリカンの組成を解析する方法を構築した点で大変に興味深い。またκ-カゼインO-グリカンのみならず、IgGなどN型糖タンパク質でも初乳と常乳では糖鎖が変化する点を明らかにした点でも意義は大きい。

ウシ以外の乳用家畜のミルクオリゴ糖

世界のローカルな地域では、ウシ以外にもヤギ、ヒツジ、ウマ、ラクダなどの乳を利用する文化圏がある。また、健康志向の点からウマやヤギの乳を積極的に利用しようという試みも国際的に広がっているため、ウシ以外の乳用家畜のミルクオリゴ糖を研究することには意義が認められる。

乳用家畜のミルクオリゴ糖研究は、1989年にUrashimaらがウマの中性ミルクオリゴ糖の化学構造を発表するまでは報告は見当たらない⁽¹⁸⁾。つづいてヒツジ [Urashimaら⁽³⁹⁾, Nakamuraら⁽⁴⁰⁾], ウマ [Urashimaら⁽⁴¹⁾, Nakamuraら⁽¹²⁾], ヤギ [Urashimaら⁽⁴²⁾, Urashimaら⁽⁴³⁾, Vivergeら⁽⁴⁴⁾] のミルクオリゴ糖の化学構造が報告された。Urashimaらの研究は、透析、ラクトースや一部のタンパク質のエタノール沈殿、活性炭カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーによるオリゴ糖の分離・精製、ならびにNMRと単糖組成分析、メチル化分析の組み合わせという古典的な方法によって行われた。酸性オリゴ糖に対するNakamuraらの研究は、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) による糖質の抽出、ゲルろ過、アニオン交換クロマトグラフィー、な

らびにAmide80カラムを使用した順相系HPLCによるオリゴ糖の分離・精製と、NMRによる構造解析によって行われた。

これらの分析によって、ヤギ初乳また常乳からは3'-GL, 6'-GL, 2'-FL, イソグロボトリオース, 3'-SL, 6'-SL, 6'-SLN, 6'-NGc-SL, Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$) [Gal($\beta 1 \rightarrow 6$)] Gal($\beta 1 \rightarrow 4$) Glc($(\alpha 2 \rightarrow 3)$ シアリル 6'-GL), ($\alpha 2 \rightarrow 6$) シアリル 3'-GLが、ヒツジ初乳からは3'-GL, 6'-GL, イソグロボトリオース, 3'-SL, 3'-NGc-SLとそのラクトン体、および6'-NGc-SLが、ウマ初乳からは3'-GL, 6'-GL, LN n T, Gal($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$) Gal($\beta 1 \rightarrow 4$) Glc, ラクト-*N*-ボペンタオースI, LN n H, 3'-SLならびにGal($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc $\alpha \rightarrow 1-2$ リン酸が構造決定された。ここで興味深いのは、ウマ初乳に見出されたGal($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc $\alpha \rightarrow 1-2$ リン酸である。これまでにリン酸基を含むミルクオリゴ糖は、前述のようにウシ初乳には発見されているが、ヒトを含む他種の乳／初乳には発見されていない。ヒツジの初乳ではNeu5Gcを含むミルクオリゴ糖のほうがNeu5Acを含むものよりも優先的であること、ヤギ初乳ではヒト同様に6'-SLのほうが3'-SLよりも優先的であることも興味深い。

また2006年にMartinez-Ferezらはヤギ乳から分画したミルクオリゴ糖画分を高pHアニオン交換クロマトグラフィーパルスアンペロメトリー検出 (HPEAC-PAD) で分離し、高速原子衝撃イオン化質量分析 (FAB-MS) に供して分析して、6'-SL, 3'-SL, DSL, *N*-グリコリルノイラミニルラクトース, 3'-ガラクトシルラクトース, *N*-アセチルグルコサミニルラクトース, LNHならびに他の高分子オリゴ糖の存在を明らかにした⁽⁴⁵⁾。Martinez-Ferezらはヤギ乳におけるミルクオリゴ糖濃度を0.25 ~ 0.30 g/Lと算出し、ウシ乳 (0.03 ~ 0.06 g/L), ヒツジ乳 (0.02 ~ 0.04 g/L) よりも高いこと、またオリゴ糖の種類もヤギのほうが豊富であることを報告した。一方で炎症性結腸炎を誘導させたラットにヤギミルクオリゴ糖を経口投与すると炎症が緩和されたという報告もあり^(46, 47)、育児用調製乳などへの添加も含めて、ヤギミルクオリゴ糖を濃縮した画分の産業面での利用が注目される。

中東や中央アジアでは乳用、疫用の家畜として広範囲に飼育されているラクダのうち、フタコブラクダの初乳-乳に含まれるミルクオリゴ糖は、2010年にFukudaらによって化学構造が決定された⁽¹⁷⁾。Fukudaらはクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 抽出、ゲルろ過、アニオン交換クロマトグラフィー、Amide80カラムによる順相系HPLCによって分離・精製した中性ならびに酸性

オリゴ糖を、¹H-NMRとMALDI-TOFMSによって構造決定した。決定されたオリゴ糖は、初乳では3'-GL, 6'-GL, 3-FL, 3'-SL, 6'-SL, ($\alpha 2 \rightarrow 3$) シアリル 3'-GL, LST c, Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc (シアリルラクト-N-ノボペンタオース a), Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)[Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc (シアリルラクト-N-ノボペンタオース b), ならびに Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc (シアリルLNnH), 常乳では3'-GL, ラクト-N-ノボペンタオースI, および3'-SLであった。ラクダミルクオリゴ糖のコア骨格は、ラクトースのほかにはLNnT, ラクト-N-ノボペンタオースI, LNnHであり、発見されたオリゴ糖はすべてタイプII型であること、またガラクトシルラクトースをコアとする酸性オリゴ糖が含まれる点など、ウシミルクオリゴ糖との共通性が認められる。ウシミルクオリゴ糖との相同性は高いが、初乳での4糖以上の酸性オリゴ糖の含量はウシよりも高いので、ミルクオリゴ糖の産業用素材としての供給源としてはウシよりもラクダのほうが実用的になる可能性もある。

乳用家畜ではないが2010年にTaoらはウシミルクオリゴ糖の構造の分析に用いたのと同様の方法で、ブタミルクオリゴ糖の解析を行った⁽¹⁶⁾。その結果、ガラクトシルラクトース, LNnT, ラクト-N-ノボペンタオースI, LNnHやそれをコア骨格とする酸性オリゴ糖が発見され、ウシやラクダのミルクオリゴ糖との相同性が認められた。ウマのミルクオリゴ糖にもLNnT, ラクト-N-ノボペンタオースI, LNnHが発見されているので、これらの家畜ミルクオリゴ糖にはヒト型とは異なる共通したパターンがあるように思われる。一方でブタミルクオリゴ糖の場合、フコースを含むミルクオリゴ糖の存在割合はウシよりも高かった。

ウシをはじめとする家畜ミルクオリゴ糖利用の今後の展望

前述のように、ウシ常乳におけるオリゴ糖濃度はヒト乳におけるオリゴ糖の濃度よりも著しく低く、またオリゴ糖の種類もヒトとは著しく異なる。それは、生理活性素材や食品添加素材としてのウシミルクオリゴ糖の利用への大きな制限要因である。それでも初乳に限定して言えば、分娩直後乳で1 g/L以上のミルクオリゴ糖を含んでいる。現在乳等省令によって分娩後5日以内の初乳は食品として出荷制限されているが、ウシ初乳は酪農家で自己消費されているようにその安全性は保証されてお

り、将来的には初乳や初乳成分を利用できるように出荷制限を撤廃することが期待される。

ウシミルクオリゴ糖には、例えば下記のような生理活性を示唆する報告がある。ヒトに髄膜炎を引き起こす *Neisseria meningitidis* はタイプIV 纖毛を使用して上皮タンパク質に付着して感染を引き起こすが、マイクロターターウェルを使用した結合阻害実験で、ウシの中性または酸性ミルクオリゴ糖の添加は1~2 g/Lの濃度でチログロブリンへの *Neisseria* 纖毛の付着阻止作用を示した⁽⁴⁸⁾。ウシミルクオリゴ糖の主要成分である3'-SLは、*in vitro* 実験で腸管病原性大腸菌のCaco-2細胞への付着を約50%阻止した⁽⁴⁹⁾。スパニッシュブラウン牛の初乳や常乳からエタノール沈殿によってオリゴ糖を含む成分を分画した画分は、仔ウシの下痢便から分離した7種の腸管病原性大腸菌株 (K99, FK, F41, F17, B16, B23, およびB64) により引き起こされる赤血球凝集反応を *in vitro* 実験で阻害した⁽⁵⁰⁾。これらの報告は、ウシミルクオリゴ糖をヒトや家畜への感染防御剤として利用できる可能性を示唆している。

一方、Terabayashiらは3'-SLの還元末端のOH-1をアミノ基で修飾し、次いで脂肪酸を縮合させたシアリルグリコサイドに、MDCK細胞へのヒトインフルエンザウィルスの侵入を阻止する効果を発見した⁽⁵¹⁾。これは、ウシ初乳から分画したオリゴ糖のこのような化学的修飾物が、抗インフルエンザ剤として利用できる可能性を示している。

ヒトに胃潰瘍を引き起こす起因菌である *Helicobacter pylori* は、胃上皮の複合糖質の糖鎖に対して、BabおよびSabという2種類のレクチンの糖鎖結合能力によって付着することが知られている。この2種のレクチンはルイス b (Le^b, Fuc($\alpha 1 \rightarrow 2$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)[Fuc($\alpha 1 \rightarrow 4$)]GlcNAc), およびシアリルルイス x (sia Le^x; Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)[Fuc($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GlcNAc) という糖鎖単位を結合へのエピトープとしているが、Le^bあるいはシアリルLe^xを共有結合させたヒト血清アルブミンへの *H. pylori* の付着はブタ乳によって阻害されたという報告がなされている⁽⁵²⁾。この論文の著者らは、これはブタ乳に豊富なLe^b またシアリルLe^x を含む糖タンパク質による阻害効果であると考察している。もちろんブタ乳を *H. pylori* 付着阻止の実用目的で利用することは不可能であるが、シアリルLe^x の含有量の高い糖タンパク質を多く含む乳用家畜の乳を探索したならば、*H. pylori* の除菌目的でそれを利用できる可能性がある。一方、シアリルLe^x を含む遊離のミルクオリゴ糖はアジアゾウ、アフリカゾウの乳において一定割合で存在しているの

で^(53, 54), 使役動物であるアジアゾウの乳から分画した画分が, このような目的で利用できるかもしれない。

また, ヒト赤血球への *H. pylori* による凝集阻害反応を行った実験において S-3-PG (Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc-Cer), シアリル Le^x 4糖, Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc(3'-SLN) また Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc の添加が, 同凝集反応の 50% 阻害を示すことが観察されている⁽⁵⁵⁾。上述のように Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc は, 超微量ながらウシ初乳にも発見されているが, 乳用家畜の乳におけるミルクオリゴ糖やガングリオシドの糖鎖構造の探索によって, *H. pylori* の付着阻止目的に利用できる乳成分が発見されるかもしれない。

また, 腸管毒性を有する大腸菌 K99, シガ毒素を生産する病原性大腸菌, トキシン A 生産 *Clostridium difficile* は, 各々 Neu5Gc($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal, Gal($\alpha 1 \rightarrow 4$)Gal, Gal($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc をレセプターとしている。ヒツジ初乳は 3'-NGc-SL を主要なオリゴ糖として含むが⁽⁴⁰⁾, 広範囲な家畜乳におけるミルクオリゴ糖の探索によって, これらの病原菌や病原菌毒素の付着阻止や中和のために利用可能なミルクオリゴ糖の発見が期待される。

ヒトの常乳は 0.9 g/L のシアル酸を含み, ウシ常乳を原料として調製された育児用調合乳中のシアル酸量 (0.2 g/L 以下) よりも多い。母乳栄養児の脳におけるシアル酸を結合したガングリオシドやシアロ糖タンパク質の量が人工栄養児よりも多いという報告があるが⁽⁵⁶⁾, これは育児用調合乳にシアル酸を含むオリゴ糖や複合糖質を添加することの必要性を示唆している。チーズホエーから分画したシアル酸を結合したカゼイノグリコマクロペプチドを摂取させた仔ブタは, コントロールと比べて学習能力が高いという報告がある⁽⁵⁷⁾。この研究において, カゼイノマクロペプチドを摂取させた仔ブタにおいて, 脳にシアル酸を含む糖タンパク質やガングリオシド量の増加とともに, 海馬において, シアリル複合糖質の生合成に対するキー酵素であるポリシアリルトランスフェラーゼ IV やシアル酸のデノボ合成に対するキー酵素である UDP-*N*-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼの mRNA レベルの上昇が観察された。一方で 35 日間カゼイノグリコマクロペプチドを連続摂取させた仔ブタを, 8 カ所の入り口を設置した円筒形のルームに入れ, 入り口の 1 カ所に餌をおいた探索試験において, カゼイノマクロペプチドの摂取量に依存して学習能力が向上したと報告された⁽⁵⁷⁾。

また一方で, 成獣ラットにウシ初乳にも高濃度に含ま

れるシアリルラクトースを摂取させた場合, コントロールと比べて脳内の GM₃ (Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc-Cer) などのガングリオシド量が向上するとともに, ラットの水泳学習能力が向上したという報告例もある⁽⁵⁸⁾。これらの結果から, シアリルオリゴ糖やシアリル複合糖質がどのようなメカニズムで腸管吸収と循環過程でのシアル酸の代謝を受け, 脳関門をくぐり抜けて脳内でのシアル酸を結合したシアリル複合糖質の合成に利用されるか探索するという研究課題が浮かび上がる。一方, ウシ初乳やチーズホエーなどから分画したシアリルオリゴ糖やシアリル複合糖質を, 脳活性化素材として育児用調合乳や機能性食品素材に添加することの可能性を示している。

集約放牧によって飼養したウシから採集した乳は, 舎飼によって飼養したウシから採集した乳よりも高濃度のシアル酸を含むという報告もあり⁽⁵⁹⁾, 生理活性素材としてのシアル酸含有糖鎖の供給源としての放牧牛乳の有効利用可能性が示される。

以上のデータが示すように, 今後ウシや乳用家畜のミルクオリゴ糖や糖タンパク質を含む画分を, 生理活性素材として利用できる可能性が広がっている。そのための基礎情報として, 蓄積されてきたウシや家畜のミルクオリゴ糖や糖タンパク質の糖鎖構造情報や定量分析情報は, これからいっそう重要になっていくであろう。筆者らは, ミルクオリゴ糖やミルクの糖タンパク質・糖脂質を活用したより先端的な食品産業が立ち上がっていくことを願ってやまない。

本文中で命名したオリゴ糖の化学構造 (本文中での順序に従って記載)

Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : 6'-SL
Neu5Gc($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : 3'-NGc-SL
Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc : 6'-SLN
Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 8$)Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : DSL
Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : 3'-SL
Neu5Gc($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : 6'-NGc-SL
Neu5Gc($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc : 6'-NGc-SLN
Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc : *N*-アセチルラクトサミン, LacNAc
GalNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc : LacdiNAc
Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : 3'-GL
Gal($\beta 1 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : 6'-GL
Gal($\beta 1 \rightarrow 4$) [Fuc($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GlcNAc : 3-F-LacNAc
Gal($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc : イソグロボトリオース
Gal($\beta 1 \rightarrow 3$) [Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)
Glc : ラクト-*N*-ノボペンタオース I

Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ラクト-*N*-ネオテトラオース, LN n T
 Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ラクト-*N*-ネオヘキサオース, LN n H
 Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ラクト-*N*-テトラオース, LNT
 Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ラクト-*N*-ヘキサオース, LNH
 GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ラクト-*N*-トリオース II
 Fuc($\alpha 1 \rightarrow 2$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: 2'-FL
 GalNAc($\alpha 1 \rightarrow 3$)[Fuc($\alpha 1 \rightarrow 2$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: A4糖
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: LST c
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ($\alpha 2 \rightarrow 3$)シアリル 4'-GL
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ($\alpha 2 \rightarrow 6$)シアリル 3'-GL
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ($\alpha 2 \rightarrow 3$)シアリル 3'-GL
 Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc: ラクト-*N*-ビオース I, LNB
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: ($\alpha 2 \rightarrow 3$)シアリル 6'-GL
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: シアリルラクト-*N*-ノボペンタオース a
 Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)[Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: シアリルラクト-*N*-ノボペンタオース b
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 6$)]Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc: シアリル LN n H
 Fuc($\alpha 1 \rightarrow 2$)Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)[Fuc($\alpha 1 \rightarrow 4$)]GlcNAc: ルイス b, Le^b
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)[Fuc($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GlcNAc: シアリルルイス x, sia Le^x
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc-Cer: S-3-PG
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc: 3'-SLN
 Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc-Cer: GM₃

質量分析によって分析されたが完全な構造決定に至っていないオリゴ糖は、本文の中で3'-ガラクトシルラクトース, *N*-アセチルグルコサミニルラクトースなどの表現を用いて表示した。

文献

- 1) T. Urashima, M. Kitaoka, T. Terabayashi, K. Fukuda, M. Ohnishi & A. Kobata: "Oligosaccharides: Sources, Properties and Applications," ed. by N. S. Gordon, Nova Science, New York, USA, 2011, pp. 1-58.
- 2) M. R. Ninonuevo, Y. Park, H. Yin, J. Zhang, R. E. Ward, B. H. Clowers, J. B. German, S. L. Freeman, K. Killeen, R. Grimm & C. B. Lebrilla: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7471 (2006).
- 3) T. Nakamura, H. Kawase, K. Kimura, Y. Watanabe, M. Ohtani, I. Arai & T. Urashima: *J. Dairy Sci.*, **86**, 1315 (2003).
- 4) R. Kuhn & R. Brossmer: *Chem. Ber.*, **89**, 2013 (1956).
- 5) K. Marino, J. A. Lane, J. L. Abrahams, W. B. Struwe, D. J. Harvey, M. Marotta, R. M. Hickey & P. M. Rudd: *Glycobiology*, **21**, 1317 (2011).
- 6) R. Kuhn & A. Gauhe: *Chem. Ber.*, **98**, 395 (1965).
- 7) M. L. Schneir & M. E. Rafelson: *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 1 (1966).
- 8) R. W. Veh, J. C. Michalski, A. P. Corfield, M. Sander-Wewer, D. Gies & R. Schauer: *J. Chromatogr.*, **212**, 313 (1981).
- 9) F. Cumar, P. Ferchmin & R. Caputto: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 60 (1965).
- 10) J. Parkkinen & J. Finne: *J. Biol. Chem.*, **260**, 10971 (1985).
- 11) J. Parkkinen & J. Finne: *Methods Enzymol.*, **138**, 289 (1987).
- 12) T. Nakamura, S. Amikawa, T. Harada, T. Saito, I. Arai & T. Urashima: *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 13 (2001).
- 13) T. Saito, T. Itoh & S. Adachi: *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 147 (1984).
- 14) T. Saito, T. Itoh & S. Adachi: *Carbohydr. Res.*, **165**, 43 (1987).
- 15) T. Urashima, T. Saito, K. Ohmisa & K. Shimazaki: *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 225 (1991).
- 16) N. Tao, K. L. Ochonick, J. B. German, S. M. Donovan & C. B. Lebrilla: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4653 (2010).
- 17) K. Fukuda, A. Yamamoto, K. Ganzorig, J. Khuukhenbaatar, A. Senda, T. Saito & T. Urashima: *J. Dairy Sci.*, **93**, 5572 (2010).
- 18) T. Urashima, T. Sakamoto, H. Ariga & T. Saito: *Carbohydr. Res.*, **194**, 280 (1989).
- 19) N. Tao, E. J. DePeters, S. Freeman, J. B. German, R. Grimm & C. B. Lebrilla: *J. Dairy Sci.*, **91**, 3768 (2008).
- 20) D. Barile, N. Tao, C. B. Lebrilla, J. D. Coisson, M. Arlorio & J. B. German: *Int. Dairy J.*, **19**, 524 (2009).
- 21) D. Barile, M. Marotta, C. Chu, R. Mehra, R. Grimm, C. B. Lebrilla & J. B. German: *J. Dairy Sci.*, **93**, 3940 (2010).
- 22) K. Nakajima, M. Kinoshita, N. Matsushita, T. Urashima, M. Suzuki, A. Suzuki & K. Kakehi: *Anal. Biochem.*, **348**, 105 (2006).
- 23) T. Urashima, H. Sato, J. Munakata, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Tetsuka, Y. Fukui, H. Ishikawa, C. Lydersen & K. M. Kovacs: *Comp. Biochem. Physiol.*, **B132**, 611 (2002).
- 24) T. Urashima, S. Asakuma & M. Messer: "Comprehensive Glycosciences," ed. by J. P. Kamerling, G. J. Boons, Y. C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi & A. G. J. Voragen, Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 2007, pp. 695-724.
- 25) G. Gronberg, P. Lipniunas, T. Lundgren, F. Lindh & B.

- Nilsson : *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 597 (1992).
- 26) P. McJarrow & J. van Amelsfort-Schoonbeek : *Int. Dairy J.*, **14**, 571 (2004).
 - 27) S. Martin-Sosa, M. J. Martin, L. A. Garcia-Pardo & P. Hueso : *J. Dairy Sci.*, **86**, 52 (2003).
 - 28) B. Fong, K. Ma & P. McJarrow : *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 9788 (2011).
 - 29) T. Saito, T. Itoh & S. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1023 (1980).
 - 30) T. Saito, T. Itoh & S. Adachi : *Biochim. Biophys. Acta*, **673**, 487 (1981).
 - 31) T. Saito, T. Itoh, S. Adachi, T. Suzuki & T. Usui : *Biochim. Biophys. Acta*, **678**, 257 (1981).
 - 32) T. Saito, T. Itoh, S. Adachi, T. Suzuki & T. Usui : *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 309 (1982).
 - 33) Z. Wei, T. Nishimura & S. Yoshida : *J. Dairy Sci.*, **83**, 683 (2000).
 - 34) B. Coddeville, J. M. Girardet, Y. Plancke, S. Campagna, G. Linden & G. Spik : *Glycoconj. J.*, **15**, 371 (1998).
 - 35) M. Inagaki, S. Nakaya, D. Nohara, T. Yabe, Y. Kanamaru & T. Suzuki : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 447 (2010).
 - 36) T. Sato, K. Furukawa, D. E. Greenwalt & A. Kobata : *J. Biochem.*, **114**, 890 (1993).
 - 37) T. Sato, K. Takio, A. Kobata, D. E. Greenwalt & K. Furukawa : *J. Biochem.*, **117**, 147 (1995).
 - 38) S. Takimori, H. Shimaoka, J. Furukawa, T. Yamashita, M. Amano, N. Fujitani, Y. Takegawa, L. Hammarstrom, I. Kacsokovics, Y. Shinohara & S. Nishimura : *FEBS J.*, **278**, 3769 (2011).
 - 39) T. Urashima, T. Saito, J. Nishimura & H. Ariga : *Biochim. Biophys. Acta*, **992**, 375 (1989).
 - 40) T. Nakamura, T. Urashima, M. Nakagawa & T. Saito : *Biochim. Biophys. Acta*, **1381**, 286 (1998).
 - 41) T. Urashima, T. Saito & T. Kimura : *Comp. Biochem. Physiol.*, **100B**, 177 (1991).
 - 42) T. Urashima, W. A. Bubbs, M. Messer, Y. Tsuji & Y. Taneda : *Carbohydr. Res.*, **262**, 173 (1994).
 - 43) T. Urashima, S. Murata & T. Nakamura : *Comp. Biochem. Physiol.*, **166B**, 431 (1997).
 - 44) D. Viverge, L. Grimmonprez & M. Solere : *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 157 (1997).
 - 45) A. Martinez-Ferez, S. Rudloff, A. Guadix, C. A. Henkel, G. Pohlentz, J. J. Boza, E. M. Guadix & C. Kunz : *Int. Dairy J.*, **16**, 173 (2006).
 - 46) A. Daddaoua, V. Puerta, P. Requena, A. Martinez-Ferez, E. Guadix, Sanchez de Medina, A. Zarzuelo, M. Dolerez Svarez, J. Josa Boya & O. Martinez-Augustin : *J. Nutr.*, **136**, 672 (2006).
 - 47) F. Lara-Villoslada, E. Debras, A. Nieto, A. Concha, J. Galvez, E. Lopez-Huertas, J. Boza, C. Obled & J. Xuas : *Clin. Nutr.*, **25**, 477 (2006).
 - 48) J. Hakkarainen, M. Toivanen, A. Leinonen, L. Frangsmyr, N. Stronberg, S. Lapinjoki, X. Nassif & C. Tikkanen-Kaukanen : *J. Nutr.*, **135**, 2445 (2005).
 - 49) S. Angeloni, J. L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, D. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist & N. Sprenger : *Glycobiology*, **15**, 31 (2005).
 - 50) M. J. Martin, S. Martin-Sosa & P. Hueso : *Glycoconj. J.*, **19**, 5 (2002).
 - 51) T. Terabayashi, M. Morita, M. Ueno, T. Nakamura & T. Urashima : *Carbohydr. Res.*, **341**, 2246 (2006).
 - 52) A. Gusteffson, A. Hultberg, R. Sjostrom, I. Kaczkovica, M. E. Breiner, T. Boren, L. Hammarstrom & J. Holgerström : *Glycobiology*, **16**, 1 (2006).
 - 53) Y. Uemura, S. Asakuma, L. Yon, T. Saito, K. Fukuda, I. Arai & T. Urashima : *Comp. Biochem. Physiol.*, **A145**, 468 (2006).
 - 54) G. Osthoff, L. Dickens, T. Urashima, S. L. Bonnet, Y. Uemura & J. H. van der Westuizen : *Comp. Biochem. Physiol.*, **B150**, 74 (2008).
 - 55) P. Johansson, J. Nilsson, J. Angstrom & H. Miller-Pandraza : *Glycobiology*, **15**, 625 (2005).
 - 56) B. Wang, P. McVeagh, P. Petocz & J. Brand-Miller : *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 1024 (2003).
 - 57) B. Wang, B. Yu, M. Karim, H. Hu, Y. Sun, P. McGreevy, P. Petocz, S. Held & J. Brand-Miller : 2007. *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**, 561 (2007).
 - 58) F. Sakai, F. Ikeuchi, T. Urashima, M. Fujiwara, K. Ohtsuki & S. Yanahira : 2006. *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 249 (2006).
 - 59) S. Asakuma, Y. Ueda, F. Akiyama, Y. Uemura, M. Miyaji, M. Nakamura, M. Murai & T. Urashima : *J. Dairy Sci.*, **93**, 4850 (2010).