

ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(X)

Comparative Biochemistry of Milk Oligosaccharides (X)

—化学構造的特徴とその利用性—

— *Characteristics on the Chemical Structure and Their Application* —

国立大学法人 東北大学大学院農学研究科 教授 農学博士 齋藤 忠夫

TADAO SAITO Dr. Agric.
Graduate School of Agricultural Science, TOHOKU University

国立大学法人 帯広畜産大学大学院畜産学研究科 教授 農学博士 浦島 匡

TADASU URASHIMA Dr. Agric.
Graduate School of Food Hygiene, OBIHIRO University of Agriculture and Veterinary Medicine

1. はじめに

哺乳動物は、その名の通り仔に対して自ら乳(ミルク)を分泌して与える。泌乳初期に限定されて生合成・分泌される乳は、とくに「初乳(colostrum)」と呼ばれ、常乳(normal milk)とは区別される。初乳は常乳と比較して成分的に大きく異なり、多量の免疫抗体(immunoglobulin, Ig)に加えて、ラクトース(乳糖)以外に多種多様な「ミルクオリゴ糖(milk oligosaccharides, MO)」と呼ばれる特殊な糖質(炭水化物)が含まれている。

これまでに著者らは、ヒト¹⁾、ウシ²⁾、ウマ^{3),8)}、ヒツジ^{3),5)}、ヤギ⁴⁾、イヌ⁶⁾、カモノハシ⁷⁾およびツキノワグマ⁹⁾の乳に含まれるミルクオリゴ糖の化学構造解析を行い、乳中での存在意義について比較考察してきた。人乳(ヒトミルク)には、これまでに100種類以上のミルクオリゴ糖が全泌乳期に亘って存在することが知られている¹⁾。しかし、ウシなど幾つかの哺乳動物種においては、泌乳初期の非常に短い期間に分泌される初乳に限定されて含まれるミルクオリゴ糖は、その生物の初期成長に特別に必要な成分であることが考えられる。ミルクオリゴ糖には、乳仔腸管内の有用細菌であるビフィズス菌に対する特異的増殖活性(ビフィズス因子)、有害微生物の排除や毒素の中和作用などの感染防御活性(感染防御因子)などの機能が推定されているが、その存在意義を巡る全貌はいまだ解明されていない。

ヒトや各種の哺乳動物のミルクオリゴ糖には、動物組織の上皮、内皮、神経などの細胞表層に存在するスフィンゴ糖脂質に結合している糖鎖と化学構造的に同一のものが存在している。従来報告されてきたミルクオリゴ糖は、還

元末端にN-アセチラクトサミンを含むものを除いては、ラクト系列かネオラクト系列の糖脂質糖鎖構造に分類されていた。ところが、最近Uemuraらによりバンドウイルカ初乳に発見されたミルクオリゴ糖の化学構造は、ヒトなどでは脳神経系に局在するガングリオ系列スフィンゴ糖脂質のGM2の糖鎖構造と同一であるという大きな知見が含まれていた¹⁰⁾。本稿では、その構造決定にあたって威力を発揮したHSQCによる二次元核磁気共鳴スペクトル法(NMR)の解釈を中心に、イルカという陸棲動物とは異なった海獣類の乳中に存在するミルクオリゴ糖の存在意義と重要性について考察してみたい。

2. バンドウイルカミルクオリゴ糖の分離精製

バンドウイルカ(*Tursiops truncatus*)の初乳は、神戸市の須磨水族館で1999年6月に出産した個体より分娩後2日目に得られた。その15 mLを常法に従い、4倍量のクロロホルム/メタノール混液(2:1, v/v)で振とう抽出し、メタノール可溶性画分をBio Gel P-2によるゲルろ過、DEAE-Sephadex A-50による陰イオン交換クロマトグラフィーでの脱塩の後、TSK-gel Amido-80カラムによる順相高速液体クロマトグラフィー(HPLC、移動相:50%および80%アセトニトリル/15 mMリン酸緩衝液を用い、80%から50%までのアセトニトリルの直線濃度勾配溶出)によって各オリゴ糖を分離・精製した。

バンドウイルカ初乳より抽出した糖質画分のBio Gel P-2クロマトグラムを図1に示した。peak 1およびpeak2をあわせた画分のDEAE-Sephadex A-50による陰イオン交換クロマトグラフィーとBio Gel P-2によるゲルろ過によりTt1およ

びTt2を得た。その後Amido-80によるHPLCによりTt1-4、Tt2-2、2-3、2-4を調製した。また、Tt3からはAmido-80HPLC(移動相:50%および80%アセトニトリル/イオン交換水、80%から50%までのアセトニトリルの直線濃度勾配溶出)によりTt3-8を単離精製することができた。

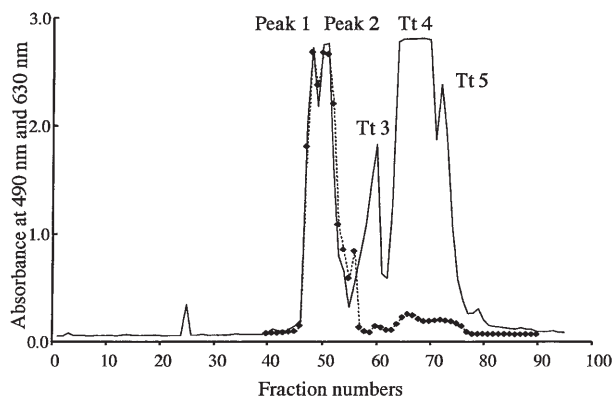


図1 バンドウイルカ初乳より抽出した糖質画分のゲルろ過溶出曲線
 全糖質画分のゲルろ過は、以下の条件で行った。
 充填剤: Bio Gel P-2 (Extra Fine)
 カラム: 2.6 X 100 cm
 移動相: 蒸留水(流速は15 mL/h)
 分画: 5mL/本
 検出: 中性糖はフェノール-硫酸法(—)
 シアル酸は過ヨウ素酸-レゾルシノール法(◆)

3. ^1H -NMRおよび ^1H - ^{13}C HSQCによるミルクオリゴ糖Tt1-4の構造決定

HPLCによって分離されたミルクオリゴ糖:Tt1-4のプロトン(^1H)-NMR解析により得られたスペクトラムを図2に示した。オリゴ糖還元末端のグルコース(D-Glc)のC-1に結合する α -および β -アノマープロトン(δ 5.219, δ 4.665)が観察された。また、*N*-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)がガラクトース単位に結合した酸性3糖である3'-シアリルラクトース[Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc, 3'-SL]のGal β 4H-1アノマープロトンと同様の δ 4.529のシグナルが観察された。また δ 4.151のダブルレットダブルレットの特徴的なシグナルの存在は、3位が置換を受けたGal β 4残基のH-3シグナルに由来するものと考えられた。以上より、このミルクオリゴ糖は置換を受けた3'-SLユニットを含んでいることが強く示唆された。

しかしながら、Gal β 4残基のH-3シグナルである δ 4.151の化学シフト値は、3'-SLの同残基の化学シフト値(δ 4.115)よりもかなり低磁場(左側)にシフトしており、Gal β 4の周辺位置がさらに他の糖質により置換を受けている可能性を示唆していた。

また、化学シフト値 δ 1.927、 δ 2.657および δ 2.030には、Neu5AcのH-3アキシアル、H-3エクアトリアルおよび*N*-アセチル基に相当するシアル酸に特徴的な3つのシグナル群が認められた。しかし、H-3アキシアルシグナルは3'-SLの同位置の化学シフト値(δ 1.800)よりも著しく低磁場シフトし、一方H-3エクアトリアルシグナルは同オリゴ糖の化学シフト値(δ 2.757)よりも著しく高磁場(右側)シフトしていた。*N*-アセチル基由来の δ 2.013の化学シフトは、シアル酸以外に*N*-アセチルヘキソサミン残基(HexNAc)の存在を示し、アノメリックプロトン領域の δ 4.732のアノマーシグナルは、この残基が β -配向性で隣接残基に結合していることを示していた。 δ 4.119の化学シフトは、置換によって通常よりも低磁場シフトしたシグナルと考えられるが、2.9 Hzの結合定数(ガラクトースのH-3、H-4間の結合定数に相当する)の値から、このシグナルはGal β 4残基のH-4残基に由来し、この位置が β -配向性の*N*-アセチルヘキソサミン残基によって置換を受けている可能性が示唆された。

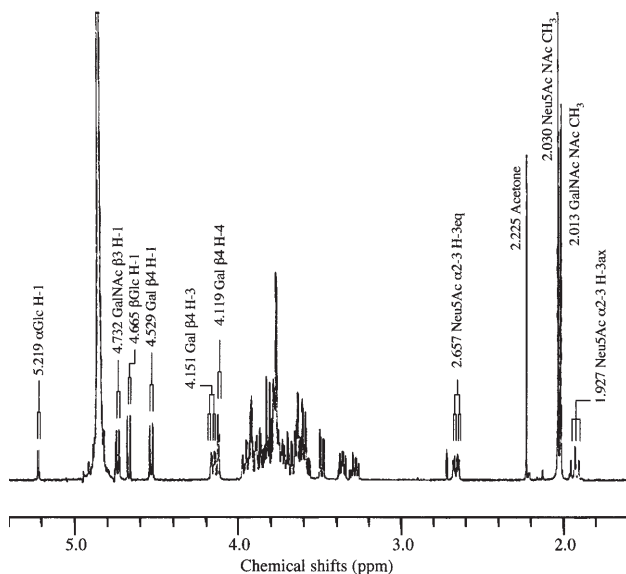


図2 バンドウイルカ初乳からのシアル酸を含む酸性ミルクオリゴ糖:Tt1-4のプロトン(^1H)-核磁気共鳴スペクトル法(NMR)で得られたスペクトラムと主要シグナルの帰属
 スペクトラムは D_2O を溶媒とし、内部標準物質にアセトンを使用した。測定は、JEOL EPC-400 FT NMRスペクトロメーターを使用して、500MHzの磁場下、室温で実施した。

同オリゴ糖の詳細な構造解析は、 ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルの解析により行った。ミルクオリゴ糖:Tt1-4の ^1H - ^{13}C HSQCスペクトラムを図3に示した。 ^{13}C シグナルの中で δ 76.65は δ 4.151の ^1H シグナルと相関しているので、Gal β 4残基のC-3に帰属された。これは3'-SLの同位置の化学シフト値(δ 78.15)よりも若干高磁場側にシフトし

ている。 $\delta 79.82$ の ^{13}C シグナルは $\delta 4.119$ の ^1H シグナルと相関しているため、Gal $\beta 4$ 残基のC-4に帰属される。このシグナルは、3'-SLの同位置の化学シフト値($\delta 70.17$)よりも大きく低磁場シフトしている。 ^{13}C -NMRにおいて、置換を受けた位置のシグナルは受けていない同位置のシグナルよりも大きく低磁場シフトし、その隣接位置のシグナルは未置換の糖の対応する位置のシグナルよりも若干高磁場シフトするというNMRの経験則がある。

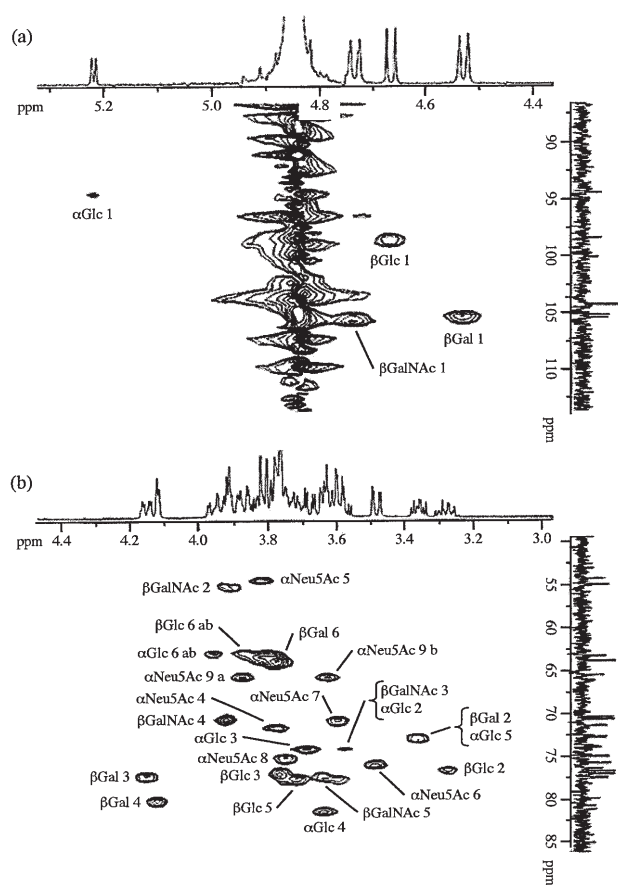


図3 ミルクオリゴ糖:Tt1-4の ^1H - ^{13}C HSQCスペクトラム
(a) アノマー領域における ^1H - ^{13}C -相関共鳴シグナル
(b) $\delta 3.0 \sim 4.4$ の一次元 ^1H -NMRスペクトラム領域における ^1H - ^{13}C -相関共鳴シグナル

以上の解釈により、このオリゴ糖のGal $\beta 4$ 残基の4位が β 結合HexNAcで置換を受けていることが証明された。このオリゴ糖に含まれる3'-SL単位の各シグナルは、3'-SLの同位置のシグナルとの比較から表1のように帰属された。ここで $\delta 76.65$ の ^{13}C シフトはGal $\beta 4$ 残基のC-5に帰属されるが、3'-SLの同位置のシグナル($\delta 77.84$)よりも若干高磁場シフトしており、ここでも置換位置の隣接位置についての ^{13}C -NMRの経験則に当てはまっていた。同オリゴ

糖の3'-SL単位に帰属されないシグナル($\delta 177.49, 105.41, 77.36, 73.66, 70.40, 54.97$ および 25.24)も、遊離の β -GalNAcの ^{13}C シグナルとの比較から帰属された。

この残基のC-3 ~ C-6の化学シフト値およびアセチル基(CH_3CO)の同値は、 β -GalNAcの対応する化学シフト値とよく一致している。 $\delta 105.41$ の化学シフト値はグリコシド結合のため、 β -GalNAcのC-1($\delta 98.08$)よりも低磁場シフトしているが、 $\delta 54.97$ の化学シフト値は β -GalNAcのC-2($\delta 56.42$)よりもC-1位のグリコシド結合の影響により若干高磁場シフトしている。これらの考察から、このオリゴ糖のHexNAc残基は β -結合したN-アセチルガラクトサミン(β -GalNAc)と決定された。もしこの残基が β -GlcNAcであれば、C-2シグナルはGlcNAc($\beta 1-6$) Gal($\beta 1-4$) Glcの β -GlcNAcの ^{13}C -NMRで観察された $\delta 58.20^{11)}$ に近い位置にあらわれることが予想されるからである。

表1

Reporter eroun	^{13}C -NMR chemical shifts of Tt1-4 (A) from bottlenose dolphin colostrum and 3'-SL (B)									
	α -Glc		β -Glc		β -Gal		Neu5Ac		GalNAc	
	A	B ^a	A	B	A	B	A	B	A	GalNAc
C-1	94.44	94.52	98.39	98.47	105.20	105.29	176.76	176.30	105.41	98.08
C-2	73.73	73.83	76.37	76.49	72.67	72.07	100.11	102.31	54.97	56.32
C-3	73.86	74.09	76.99	77.03	76.65	78.15	39.58	42.23	73.66	73.80
C-4	81.08	80.94	80.70	80.79	79.82	70.17	71.34	70.96	70.40	70.51
C-5	72.70	72.78	77.41	77.50	76.65	77.84	54.23	54.35	77.36	77.86
C-6	63.22	62.59	63.22	62.73	63.81	63.72	75.70	75.60	63.22	63.67
C-7							70.62	70.77		
C-8							74.93	74.35		
C-9							65.47	65.30		
CH ₃							24.69	24.71	25.24	24.88
CO							177.65	177.68	177.49	177.65

^a Data from reference 10

以上のような ^1H - ^{13}C HSQCの解析により、同糖の完全化学構造は、GalNAcが3'-SLのGal部位に結合したGalNAc($\beta 1-4$) [Neu5Ac($\alpha 2-3$)] Gal($\beta 1-4$) Glc (GM₂4糖)と決定された。またMALDI-TOF/MSによる質量分析では、 m/z 875.31のピークが検出され、これは $\text{M}+\text{K}^+$ イオンの質量値と良く一致していた。

これは、構造決定に ^1H -NMRならびに ^1H - ^{13}C HSQCのシグナル解析が見事に実施されたモデルケースと考えられる。その他のミルクオリゴ糖のTt2-2、Tt2-3およびTt3-8は、標準糖との ^1H -NMRのシグナルパターンの一致から、それぞれ3'-SL、Neu5Ac($\alpha 2-6$) Gal($\beta 1-4$) Glc(6'-SL)およびGal($\alpha 1-4$) Gal($\beta 1-4$) Glc(グロボトリオース、Gb₃糖)と同定された。

4. GM₂4糖および Gb₃3糖発見の意義

構造決定されたオリゴ糖の中で、GM₂4糖とグロボトリオースはとくに注目される。GM₂4糖と同一の構造をもつ糖鎖を結合したスフィンゴ糖脂質GM₂は、ヒトやラットでは主に脳神経系に局在するGM₁ {Gal (β1-3) GalNAc (β1-4) [Neu5Ac (α2-3)] Gal (β1-4) Glc-Cer} の合成中間産物である。GM₁やGM₂は、ガングリオ系列の糖脂質として分類されている。同4糖が遊離のオリゴ糖として、哺乳動物の乳中に発見されたのは本研究が初めてである。

前述したように多くのミルクオリゴ糖は、ラクト-N-テトラオース (Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc)、ラクト-N-ネオテトラオース (Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc)、ラクト-N-ヘキサオース (Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) [Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6)] Gal (β1-4) Glc)あるいはラクト-N-ネオヘキサオース (Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) [Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6)] Gal (β1-4) Glc)をコア骨格としており¹⁾、哺乳動物細胞表層に存在するラクト系列、ネオラクト系列のスフィンゴ糖脂質糖鎖と構造的に近い。ラクト系列やネオラクト系列の糖脂質は、上皮系や内皮系の細胞表層にあることから、一般的にはミルクオリゴ糖は上皮や内皮の糖鎖合成系と同一の生合成系によって合成されることが考えられる。それに対しガングリオ系列の糖脂質は神経系に多い。バンドウイルカの初乳にGM₂4糖が発見されたことは、バンドウイルカのミルクオリゴ糖生合成系は、ラットやヒトにおける神経系の糖鎖合成系に類似していることが示唆される。すでに、クマのミルクオリゴ糖にはヒトのABO式血液型抗原に類似しているものが含まれることを示したが⁹⁾、ミルクオリゴ糖は哺乳動物種により極めて固有の生合成系を反映することが再確認された。

また、グロボトリオースが遊離ミルクオリゴ糖として発見されたのも意義深い。これまで、ウシ、ヤギ、ヒツジ、クマ、ハナグマなどの広範囲な種にGal (α1-3) Gal (β1-4) Glc (イソグロボトリオース)は発見されているが^{2), 3), 4), 9)}、グロボトリオースは見出されなかった。グロボトリオースを結合したスフィンゴ糖脂質 (Gb₃)は上皮系細胞表層にあり、その糖鎖部分は病原性大腸菌O-157H7の生産するベロ毒素のレセプターである¹²⁾。バンドウイルカの初乳に遊離のグロボトリオースが発見されたことは、同毒素が乳仔腸管の上皮に付着するのを防ぐ可溶性レセプターアナログとして機能している可能性を示唆するものである。これらの発見に

よって、ミルクオリゴ糖には種による多様性が予想以上に広がっていることが再確認された。

これまでの著者らの一連の研究では、ヒツジ初乳中に抗ウイルス活性の期待される3'-シアリルラクトースラクトンの発見や⁵⁾、イヌ乳中に網膜や脳の発達に重要な無機硫酸基の供与体としての硫酸化ラクトース (ラクトース-3'-O-硫酸)の発見⁶⁾、ウマ初乳中の新規なN-アセチラクトサミン α1-二リン酸⁸⁾の発見およびクマ乳中にヒトには見出されないABH抗原構造を有するオリゴ糖群の発見などの例を紹介した⁹⁾。さらに、著者らのミルクオリゴ糖研究に関しては、原著論文を概説した総説があるので¹³⁾⁻²³⁾、興味のある方はさらに参考にいただきたい。

今後、さらに新たなミルクオリゴ糖の発見などにより、泌乳初期に限って乳中に出現するミルクオリゴ糖の存在意義が次第に明らかにされてくることが期待される。

参考文献

- 1) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 154, 13-21 (1994).
- 2) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 165, 15-20 (1997).
- 3) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 167, 3-9 (1998).
- 4) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 173, 2-8 (1999).
- 5) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 175, 3-8 (2000).
- 6) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 176, 18-21 (2000).
- 7) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 177, 11-16 (2000).
- 8) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 183, 20-24 (2002).
- 9) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 184, 2-6 (2002).
- 10) Uemura, Y., S. Asakuma, T. Nakamura, I. Arai, M. Taki, T. Urashima, *Biochim. Biophys. Acta*, **1725**, 290-297 (2005).
- 11) Urashima, T., W.A. Bubbs, T. Saito, M. Messer, Y. Tsuji, Y. Taneda., *Carbohydr. Res.*, **262**, 173-184 (1994).
- 12) Newburg, D.S., S. Ashkenazi, T.G. Cleary, *J. Infect. Dis.*, **166**, 832-836 (1992).
- 13) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *化学と生物*, **31**, 80-82 (1993).
- 14) Messer, M., 浦島 匡, *化学と生物*, **33**, 816-824 (1995).
- 15) 浦島 匡, 中村正, 齋藤忠夫, *Milk Science*, **46**, 211-220 (1997).
- 16) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **37**, 401-403 (1999).
- 17) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *バイオサイエンスとインダストリー*, **57**, 619-620 (1999).
- 18) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *畜産の研究*, **53**, 1155-1160 (1999).
- 19) 齋藤忠夫, *Milk Science*, **48**, 199-205 (1999).
- 20) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *シーブジャパン*, **33**, 11-13 (2000).
- 21) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **38**, 447-451 (2000).
- 22) 齋藤忠夫, *乳業技術(創立50周年記念号)*, **50**, 38-57 (2000).
- 23) 浦島 匡, 齋藤忠夫, 中村 正, 荒井威吉, *Milk Science*, **49**, 195-202 (2000).