

令和元年6月17日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08003

研究課題名(和文) 反芻家畜乳におけるオリゴ糖ヌクレオチドの探索と腸管機能調整因子としての意義の解明

研究課題名(英文) Search of oligosaccharide nucleotides in domestic farm animal milk with the biological significance

研究代表者

浦島 匡 (Urashima, Tadasu)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：80185082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト、トナカイなどの一部の哺乳類の乳には、他のあらゆる天然ソースに発見されないユニークなオリゴ糖とヌクレオチドの結合したオリゴ糖ヌクレオチドが発見されている。ウシ、ヤギ、ヒツジなど反芻家畜の乳・初乳にオリゴ糖ヌクレオチドを探索した結果、ヒツジ初乳に2種のUDP-シアリルN-アセチルラクトサミンを始めて発見した。ウシ、ヤギの初乳にはそれは発見できなかったが、UDP-Gal, UDP-GlcNAcなどの単糖ヌクレオチドが発見された。単糖ヌクレオチドには上皮成長因子と同様に、未成熟上皮細胞の分化を促進し、乳児の腸成熟を進展させる働きが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖ヌクレオチドは通常体組織の細胞内ゴルジ体において、糖鎖の合成材料として使用されている。細胞外に分泌され、体液に含まれるのは唯一乳においてのみである。ウシ、ヤギ、ヒツジの初乳において糖ヌクレオチドの分子種を詳細に明らかにし、その中で他では検出できないUDPオリゴ糖を発見し、構造を決定したことは学術的にも意義が大きい。また乳に含まれる糖ヌクレオチドには、糖の合成材料としてではなく乳児に対する生理的な役割が予想されたが、上皮成長因子と同様の上皮細胞分化に対する機能が発見され、新生児の未熟な腸組織を成熟されるような役割が示唆された。それは乳成分による新規な機能の存在を示している。

研究成果の概要(英文)：It is known that a few species of mammalian milk, including human and reindeer, contain oligosaccharide nucleotide, which do not exist in any other natural source. During this project, oligosaccharide nucleotides were tried to be found in milk/colostrum of domestic farm animals including cow, goat and sheep. UDP-sialyl N-acetylactosamine, one of oligosaccharide nucleotides, was found in ovine colostrum, while this was not detected in those of goat and cow. It was found that cow and goat colostrum contain monosaccharide nucleotides such as UDP-Gal, UDP-GlcNAc etc. It was shown that these monosaccharides are effective to stimulate the differentiation of HIEC cell, an immature epithelial cell, without epithelial growth factor during the culture growth, suggesting that these are biologically significant for mature of the neonate colon after drinking of their mother milk.

研究分野：構造生物化学

キーワード：糖ヌクレオチド オリゴ糖ヌクレオチド 乳 初乳 上皮成長因子 ミルクオリゴ糖 反芻家畜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

報告者は 30 年に渡り反芻家畜のみならず多くの哺乳動物の乳や初乳に含まれるミルクオリゴ糖の研究を行い、乳は一般的に考えられていたよりもはるかに多種類かつ豊富な濃度でラクトースではないオリゴ糖を含むことを発見した。近年ミルクオリゴ糖の機能に関する研究が世界的にも活発に行われており、ミルクオリゴ糖は乳児が母乳を摂取した後、胃腸で消化を受けず大腸に到達し有用性腸内細菌の増殖を即成する、病原菌の一部が腸管に付着するのを防ぐ、一部の病原菌の増殖を抑制する、免疫を調整し炎症を抑える、乳児の脳神経系の活性化を図る、バリア機能を発揮し壊死性腸炎予防効果を発揮する、未熟な腸組織の成熟を促進する、などの重要な機能を証明する研究データが膨大な数で報告されている。ミルクオリゴ糖の研究を行う中で、トナカイやヒツジなどの乳や初乳にオリゴ糖の非還元末端側がヌクレオチドと共有結合した物質が含まれることを発見した。糖ヌクレオチドは通常は体組織の細胞内にゴルジ体において糖転移酵素のドナーとして糖鎖合成材料として使用され、乳以外の体液には分泌されていない。乳の中に意義のない成分は存在しないという観点から、乳/初乳に含まれるオリゴ糖ヌクレオチドまた糖ヌクレオチドには乳児に対して糖鎖合成材料とは異なる未解明の意義があると予想した。そのような背景から、とくに酪農家畜として大量の乳を活用することのできる反芻動物種の乳や初乳に含まれるオリゴ糖ヌクレオチドや糖ヌクレオチドを探索することに思い至った。

2. 研究の目的

哺乳類の乳や初乳は多くの場合は主要な糖質としてのラクトースの他に、少量ながら多種類のミルクオリゴ糖といわれる成分を含んでいる。乳児が母乳を摂取した後、ラクトースは小腸で単糖グルコースとガラクトースに分解され吸収されてエネルギー源になるのに対し、ミルクオリゴ糖は小腸では分解吸収されずに大腸に到達し、そこでプレバイオティクス、感染防御、免疫調整、腸バリア機能、脳神経系への活性化因子などの役割を果たしている。またその一方で、一部の哺乳類の乳や初乳には糖ヌクレオチドやヌクレオチドとオリゴ糖が結合したオリゴ糖ヌクレオチドも発見された。乳中の糖ヌクレオチドやオリゴ糖ヌクレオチドには、乳児に対して未解明の機能のあることが予想される。そこで本研究では、酪農家畜として乳や初乳の大量利用が可能性のある反芻動物種よりオリゴ糖ヌクレオチド、糖ヌクレオチドの分離精製と構造解析をまず行うことを第一段階とした。続いて含まれる成分を産業的に利用することを想定して、酪農家畜乳・初乳からそれらの成分を大規模に分画できる方法の開発を試みた。それらを乳児または成人用機能性食品素材として利用することを目的として、分離された成分の上皮細胞への刺激や腸管組織への刺激効果を探索することを試みた。このことによって乳成分の新たな機能性の探索と、それを食品産業や生物系特定産業に高度利用する技術の開発を行うことができると考えられる。

3. 研究の方法

研究の第一段階として、発表者が従来哺乳類の乳からミルクオリゴ糖の分離・精製に使用していた方法によって目的とする成分の分離と構造解析を試みた。つまり、北海道農業研究センターで飼育されているコリデール品種ヒツジの初乳、および姫路セントラルパークで出産したレイヨウ種アダックスの初乳より、糖質画分を抽出した後、ゲルろ過クロマトグラフィーと Amide-80 カラムを使用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によってターゲットとする成分の分離・精製を行った。単一にまで精製された成分は、核磁気共鳴スペクトル法 (NMR) や飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOFMS) に供して構造決定を行った。それらの初乳の中に目的とする物質が発見されたので、他の酪農家畜動物の乳・初乳にもそのような成分の探索を広げる目的で、大規模に分画できるような方法への改良を試みた。具体的にはウシ (ホルスタイン品種) とヤギ (日本ザーネン品種) の初乳より抽出した糖質成分を DEAE Sephadex A-50 によるアニオン交換担体に吸着し、ギ酸アンモニウム緩衝液による濃度勾配溶出を行うことで、糖ヌクレオチドと中性糖やシアル酸を含む酸性オリゴ糖との分画を行った。この方法によって分画された画分はゲルろ過による脱塩の後、順相系の HPLC に供して分離・精製し、NMR によって構造決定した。このようにしてウシやヤギの初乳に含まれていることが明らかになった糖ヌクレオチドまた糖-1-リン酸と同一の市販成分を使用し、上皮成長因子を含まない未成熟腸管上皮 HIEC 細胞の培養系に生理的濃度でそれらを添加して培養した後、細胞の増殖と分化を顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

ヒツジ (コリデール品種) の初乳より抽出した糖質画分のゲルろ過ならびに順相系 HPLC によって分離された成分を ¹H-NMR と MALDI-TOFMS によって構造解析した結果、2 種の新規なオリゴ糖ヌクレオチド Neu5Gc(2-6)Gal(1-4)GlcNAc-UDP と Neu5Gc(2-6)Gal(1-4)GlcNAc-UDP が決定された。図 1 にゲルろ過によって分画された成分の HPLC プロファイルを、図 2 に決定され

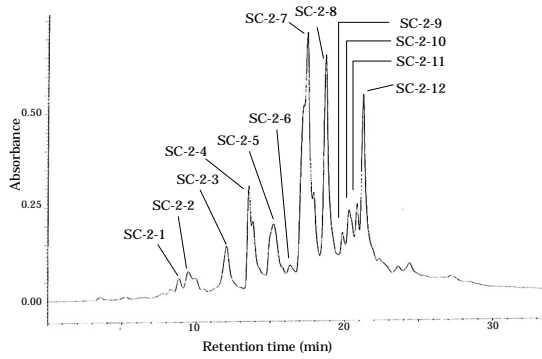


図1 ヒツジ初乳から分離した酸性糖画分のHPLC

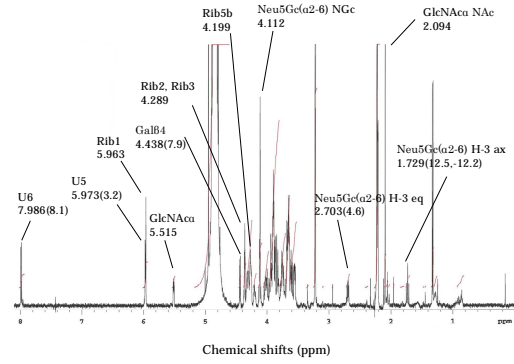


図2 SC-2-12画分の1H-NMR

たオリゴ糖ヌクレオチドの 1H-NMR、図3に MALDI-TOFMS を示した。従来ヒト乳から Fuc(1-2)Gal(1-4)GlcNAc-UDP が、ブタやトナカイの乳から Gal(1-4)GlcNAc-UDP が発見されているが、上の2種が発見されたのははじめてである。一方、レイヨウ種アダックスの初乳からも Neu5Gc(2-6)Gal(1-4)GlcNAc-UDP が発見された。

糖ヌクレオチドの大規模レベルの分離方法の開発を目的としてウシ（ホルスタイン）ならびにヤギ（日本ザネン）の初乳からイオン交換クロマトグラフィーならびに順相系 HPLC によって糖ヌクレオチドを分画した。図4、図5にはヤギ初乳より分離した画分のイオン交換クロマトグラムと HPLC のプロファイルを示した。1H-NMR による構造決定によって、ウシ初乳には GlcNAc-1-リン酸、GalNAc-1-リン酸、UDP-Gal、UDP-Glc が、ヤギ初乳には GlcNAc-1-リン酸、GalNAc-1-リン酸、UDP-Gal、UDP-Glc、UDP-GlcNAc、UDP-GalNAc が発見された。またイオン交換クロマトグラフィーによってそれらを含む画分とラクトース・中性オリゴ糖を含む画分、シアル酸を含む酸性オリゴ糖を含む画分とが分画されていた。乳や初乳よりこれらの画分を分画するためには、この方法が有用であると考えられる。

結果に基づき、初乳の中に含まれる糖ヌクレオチドと同一の市販 UDP-GlcNAc、UDP-GalNAc、GlcNAc-1-リン酸と関連化合物である Gal-1-P を生理的濃度(0.5 ~ 100 µg/ml)で HIEC 細胞の培養系に添加して培養した後、顕微鏡観察した結果、上皮成長因子の添加がなくても細胞が分化しうることが明らかになった。このことは、乳や初乳に含まれる糖ヌクレオチドや糖-1-リン酸が上皮成長因子と同様に腸管上皮細胞の分化を刺激し、新生児の腸組織の成熟に対する役割

を有することを示唆している。これはこれらの成分による新規な機能を意味しており、今後このような成分を育児用調整乳や家畜飼料素材への機能性添加物として利用できる可能性を示している。

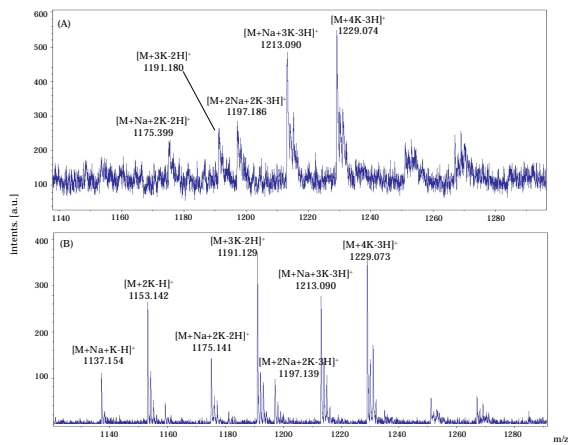


図3 SC-2-11画分とSC-2-12画分のMALDI-TOFMS

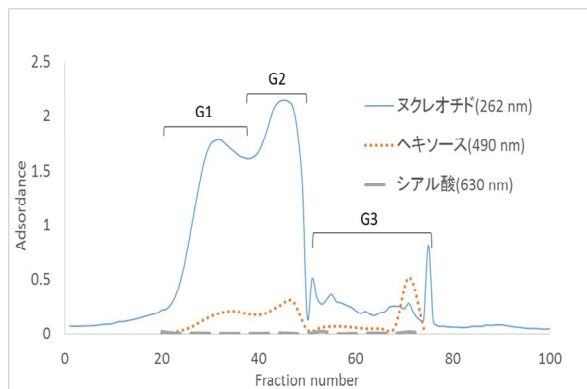


図4 ヤギ初乳から抽出した画分の陰イオン交換クロマトグラム

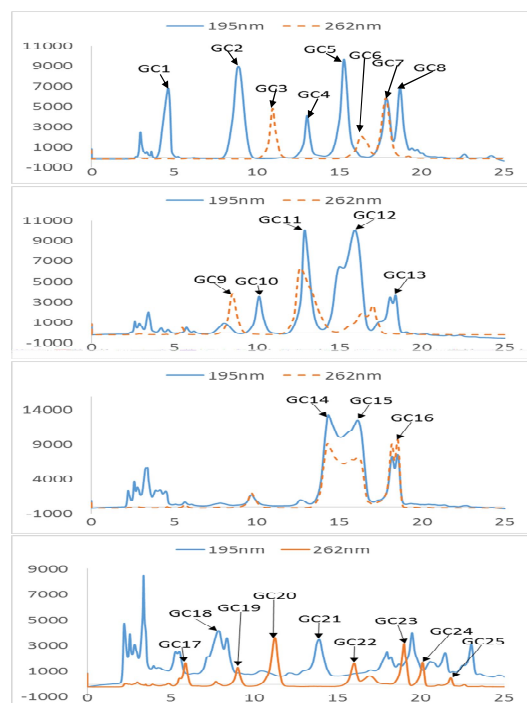


図5 ヤギ初乳から分画した糖ヌクレオチドを含む画分のHPLC

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. K. Hirayama, E. Taufik, M. Kikuchi, T. Nakamura, K. Fukuda, T. Saito, K. Newgrain, B. Green, M. Messer, T. Urashima, Chemical characterization of milk oligosaccharides of the common wombat (*Vombatus ursinus*). *Ani. Sci. J.* 87, 1167-1177, 2016. DOI: 10.1111/asj.12566 査読あり
2. M. Sasaki, T. Nakamura, K. Hirayama, T. Saito, T. Urashima, S. Asakuma, Characterization of two novel sialyl N-acetyllactosaminy nucleotides separated from ovine colostrum. *Glycoconj. J.* 33, 789-796, 2016. DOI: 10.1007/s10719-016-9672-4 査読あり
3. N.P.D. Aryantini, E. Yamasaki, H. Kurazono, I.N. Sujaya, T. Urashima, K. Gukuda, In vitro safety assessments and microbial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *Anim. Sci. J.* 88, 517-525, 2017. DOI: 10.1111/asj.12668 査読あり
4. K. Nishiyama, Y. Yamamoto, M. Sugiyama, T. Takagi, T. Urashima, S. Fukiya, A. Yokota, N. Okada, T. Mukai, *Bifidobacterium bifidum*, extracellular sialidase enhances adhesion to the mucosal surface and supports carbohydrate assimilation. *mBio*, 8, 2017. DOI: 10.1128/mbio.00928-17 査読あり
5. K. Ganzorig, T. Asakawa, M. Sasaki, T. Saito, I. Suzuki, K. Fukuda, T. Urashima, Identification of sialyl oligosaccharides including an oligosaccharide nucleotide in colostrum of an addax (*Addax nasomaculatus*) (Subfamily Antelopinae). *Ani. Sci. J.* 89, 167-175, 2018. DOI: 10.1111/asj.12899 査読あり
6. T. Urashima, J. Hirabayashi, S. Sato, A. Kobata, Human milk oligosaccharides as essential tools for basic and application studies on galectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 30, SE51-SE65, 2018. DOI: 10.4052/tigg.1734.1SE 査読あり
7. T. Urashima, E. Yamaguchi, T. Ohshima, K. Fukuda, T. Saito, Chemical structures of oligosaccharides in milk of the raccoon (*Procyon lotor*). *Glycoconj. J.* 35, 275-286, 2018. DOI: 10.1007/s10719-018-9821-z 査読あり
8. Y. Saito, N. Murata, T. Noma, H. Itoh, K. Kayano, K. Nakamura, T. Urashima, Relationship of a special acidified milk protein drink with cognitive performance: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy young adults. *Nutrients*, 10, 574, 2018. DOI:10.3390/nu10050574 査読あり
9. A. Gotoh, T. Katoh, M. Sakanaka, Y. Ling, C. Yamada, S. Asakuma, T. Urashima, Y. Tomabechi, A. Katayama-Ikegami, S. Kurihara, K. Yamamoto, G. Harata, F. He, J. Hirose, M. Kitaoka, S. Okuda, T. Katayama, Sharing of human milk oligosaccharides degradeants within bifidobacterial communities in facial cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Scientific Reports*, (, 13958-13971, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-32080-3 査読あり
10. Y. Muneguchi, M. Miyoshi, E. Taufik, A. Kawamura, T. Asakawa, I. Suzuki, K. Souma, M. Okubo, T. Saito, K. Fukuda, S. Asakuma, T. Urashima, Chemical characterization of the milk oligosaccharides of some Artiodactyla species including giraffe (*Giraffe camelopardia*), sitatunga (*Tragelaphus spekii*), deer (*Cervus nippon yesoensis*) and eater buffalo (*Bubalus bubalis*). *Glycoconj. J.* 35, 561-574, 2018. DOI: 10.1007/s10719-018-9849-0 査読あり
11. 河村あゆみ, 田中正之, 牛嶋隼也, 中井 壱, 峯口祐里, 福田健二, 浦島 匡, キリンの乳成分組成の泌乳時期による変動, *ミルクサイエンス*, 68, 44-48, 2019. DOI: 10.11465/milk.68.44 査読あり
12. 浦島 匡, 福田健二, ルクオリゴ糖の機能研究における最近の進歩(2)—抗感染、バリア機能、壊死性腸炎予防、免疫調整について—, *応用糖質科学*, 8, 145-154, 2018. 査読あり
13. 浦島 匡, 福田健二, ミルクオリゴ糖の機能研究における最近の進歩(3)—脳機能改善効果、吸収および動態、腸内細菌叢の調整—, *応用糖質科学*, 8, 155-163, 2018. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

1. K. Ganzorig, T. Asakawa, M. Sasaki, T. Saito, I. Suzuki, K. Fukuda, T. Urashima, Identification of Neu5Gc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc-UDP in colostrum of an addax (*Addax nasomaculatus*). 日本農芸化学会大会, 2017 年 3 月 (京都)

2. 浦島 匡、福田健二、朝隈貞樹, 哺乳類の乳/初乳におけるオリゴ糖ヌクレオチド, 日本糖質科学会, 2017年7月(旭川)
3. 三好真碧、トーフイック エピ、相馬幸作、大久保倫子、斉藤忠夫、福田健二、浦島 匡, オリゴ糖ヌクレオチド探索のための水牛および鹿乳の糖質の分析, 日本畜産学会, 2018年3月(東京)
4. 峯口祐里, 三好真碧, Epi Taufik, 河村あゆみ, 浅川卓也, 鈴木 勲, 相馬幸作, 大久保倫子, 斎藤忠夫, 福田健二, 朝隈貞樹, 浦島 匡, 偶蹄目キリン, シタツンガ, シカおよびスイギュウのミルクオリゴ糖解析, 日本糖質科学会, 2018年8月(仙台)
5. T. Urashima, M. Sasaki, K. Fukuda, S. Asakuma, Characterization of two novel sialyl N-acetyllactosaminyl nucleotides separated from ovine colostrum, the 29th International Carbohydrate Symposium, 2018年7月(リスボン)
6. 峯口祐里, 河村あゆみ, 福田健二, 浦島 匡, 動物園草食獣の乳分析や乳オリゴ糖分析, 飼育技術研究会, 2019年3月(東京)

〔図書〕(計3件)

1. T. Urashima, M. Messer, O.T. Oftedal, *Oligosaccharides in the Milk of Other Mammals in Prebiotics and Probiotics in Human Milk* (Mi. McGuire, Ma. McGuire, L. Bode eds), pp. 45-139, Academic Press, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-802725-7.00003-8
2. T. Urashima, M. Messer, *Evolution of milk oligosaccharides and their function in monotremes and marsupials in Evolutionary Biology: Self/nonself evolution, species and complex traits evolution, methods and concepts* (P. Pontarotti ed.), pp. 237-256, Switzerland, Springer, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-61569-1_13
3. 浦島 匡, 福田健二, 並木美紗子, おっぱいの進化史, 技術評論社, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年:
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。