

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780197

研究課題名(和文) 高品質チーズ製造に向けた放牧牛乳中糖鎖の構造及び機能解析

研究課題名(英文) Characterization of the structures and roles of glycoconjugates in pasture-based milk for manufacturing of high quality cheese

研究代表者

朝隈 貞樹 (ASAKUMA SADAHI)

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・任期付研究員

研究者番号：50374773

研究成果の概要(和文)：放牧利用率の極めて高い日本の生乳生産の約5割を占める北海道において、放牧牛乳の特徴を明らかにすることは、牛乳および乳製品の付加価値を高める上で重要である。本研究では、とくに牛乳中の糖質に着目し検討を行った。放牧草を摂食することで、牛乳中のグルコースやガラクトースを主とした中性糖、すなわちヘキソース含量は変化しない。一方、唯一の糖鎖構成酸性糖であるシアル酸は増加した。放牧牛乳のこれらの変化は、乳製品に様々な影響を及ぼす可能性があり、更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Almost 50% of milk productions in Japan have been performed in Hokkaido region, where dairy cows are mainly fed in pasture with more than 60% from May to October. However, little is known regarding the quality of this milk with respect of pasture-based feeding. The purpose of the present study was to clarify the influence, especially for sugar compositions in milk by grazing. There was no difference in hexose concentration (neutral sugar fractions) between grazing and non grazing groups during the experimental period, while total sialic acid concentration (acidic sugar fractions) in the milk of each grazing cow significantly increased compared with that at 0 d of the experimental period. These results indicate that grazing management could have increased the concentration of sialylglycoconjugates in milk. It needs to study the reason and effect of this increasing of total sialic acid concentration in milk by grazing management, near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：基礎畜産・獣医学

科研費の分科・細目：畜産物利用

キーワード：畜産学、乳、放牧飼養、糖鎖、シアル酸、複合糖質、チーズ、乳製品

## 1. 研究開始当初の背景

近年の生乳消費量の低迷や、濃厚飼料価格の高騰により日本の酪農経営は非常に厳し

い状態にある。この状況の中、チーズ消費量は増加しており、とくにナチュラルチーズの直接消費量は、この15年で約2倍になった。我が国のナチュラルチーズ消費量は欧米

の1/5程度であることから、高品質な国産ブランドが供給されれば、さらなる生乳需要拡大が期待できるが、現状その約9割が輸入ナチュラルチーズである。

多種多様な食味を持つことが、輸入ナチュラルチーズが消費者に受け入れられる要因の一つと考えられるが、これは原料乳の違いによるところが大きい。エメンタルなど世界に名だたるチーズは、古くから放牧飼養された牛乳（放牧牛乳）が原料として用いられてきた。一方、我が国においては、舎飼い飼養が乳生産の中心となっており、放牧が盛んな北海道においても、国産ナチュラルチーズ生産量の約9割を担っているが、放牧牛乳を使用した製品はほとんどなく、均一ではあるが食味やバラエティに乏しいものが多い。

放牧牛乳はチーズ製造に最も適するとされているが、一方で、発酵が早く製造過程の制御が難しいという特徴があり、深い味わいを出すには経験と技術が必要とされている。そのため我が国において、放牧牛乳を利用したナチュラルチーズ製造を可能にするには、特徴的な乳中成分の把握とそれがチーズ製造過程に及ぼす影響を明らかにし、高品質ナチュラルチーズ製造技術を理論的に構築する必要がある。

## 2. 研究の目的

放牧牛乳はチーズ製造に適するとされているが、一方で、製造過程の制御が難しいという特徴があり、深い味わいを出すには経験と技術が必要とされている。本研究では、放牧牛乳を利用した高品質なナチュラルチーズ製造を可能にするため、特徴的な乳中成分を特に糖質に着目して検討し、それがチーズ製造過程に及ぼす影響を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1)放牧時間が主要糖質に与える影響を検討するため、乳牛計9頭を用いて4,8,20時間放牧を一週間ラテン方格法により行った後、朝、夕二回搾乳時に採取した個体乳を乳量比により合乳したものをサンプルとした。対照区として放牧期間前の舎飼い期（グラスサイレージ主体飼養）の牛乳を用いた。放牧方法は草地の栄養状態が高く保つ一日輪換放牧（集約放牧技術）で行い、草丈を20cm程度に管理して試験を行った。

牛乳中の中性糖および酸性糖の濃度を明らかにするため、牛乳の希釈倍率を決定した後で、中性糖（ヘキソース）をフェノール硫酸法、酸性糖（シアル酸）をレゾルシノール過ヨウ素酸法により定量した。また、牛乳中糖質画分の抽出及び定量法を検討した後、内

部標準としてイソマルトペンタオースを用いたイオンクロマトグラフ法により乳中遊離糖鎖（ミルクオリゴ糖）濃度を測定した。

(2)放牧日数が牛乳中の糖質にどのような影響を与えるか検討するため、放牧草を主体とした20時間放牧区とグラスサイレージを主体とした0時間放牧区すなわち舎飼い区を設けて、二週間で試験区を反転するクロスオーバー試験を行い、放牧草摂取開始からの日数により乳中糖質にどのような変化が起こるか検討した。サンプル採取および放牧方法は(1)と同様に行った。測定項目は、中性糖（ヘキソース）および酸性糖（シアル酸）を(1)と同様の方法で測定し、さらに牛乳サンプル中の複合糖質としてラクトフェリンと免疫グロブリン（IgA, IgG, IgM）をELISA法により測定した。

### (3)

①(1), (2)において、乳中シアル酸濃度の解析に使用してきたレゾルシノール過ヨウ素酸法が、牛乳に用いる際、メイラード反応により濃度を過大評価する可能性が考えられた。このため、牛乳サンプルの緩和的酸加水分解によるシアル酸の脱離方法の検討及び1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB)を用いた蛍光標識法と高速液体クロマトグラフィーを組み合わせることで分子種毎（N-アセチルノイラミン酸及びN-グリコリルノイラミン酸）の定量法を検討した。この方法を用いて、(2)で測定したサンプルのうちシアル酸濃度が最小である0日目と最大となる11日目の牛乳サンプルの再測定を行った。

②初乳から抽出されたオリゴ糖画分および牛乳中に多く見られる糖鎖構造と類似した $\alpha$ 2-6及び $\alpha$ 2-3結合のシアル酸を有するオリゴ糖を用いて牛乳中に見られるシアル酸含有糖鎖の類似構造が有する機能性について検討した。培養細胞である腸管細胞株HT-29を用い、シアル酸含有糖鎖を含んだ培地により培養することで、細胞中のToll様受容体2,4及びMD2といった腸管免疫に関与する因子の遺伝子発現について検討した。さらに、一般的な商品に利用されているガラクトオリゴ糖や生理学的に最も重要であるヒトミルクオリゴ糖とその作用の比較を行った。

③放牧乳製品における特徴的な糖質、すなわちシアル酸の役割を検討するため、集約放牧により飼養されている牛乳を原料として作成されたカマンベールチーズ6個（熟成30日目および40日目各3個ずつ）をサンプルとして、対照は同時期に製造された一般的な

カマンベールチーズを用い、乳製品からのシアル酸抽出・濃度測定を行い、チーズの熟成期間中どのような変化をしているか検討した。

#### 4. 研究成果

(1)乳牛 9 頭を用い、放牧飼養時間を増加させる (4, 8, 20 時間区, ラテン方格法, 対照区は放牧前乳) と乳中ヘキソース濃度は変化しないが (図 1 上)、乳中シアル酸濃度は放牧時間依存的に有意な増加がみられた (図 1 下)。

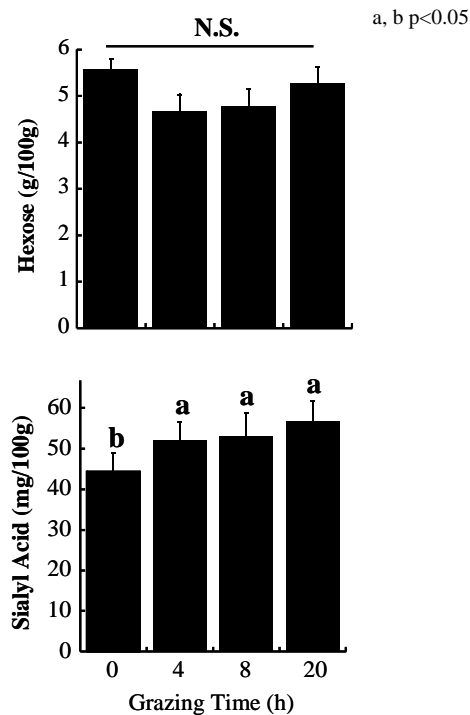


図 1 各放牧時間における牛乳中ヘキソース濃度およびシアル酸濃度

乳中シアル酸は、単独で存在することが極めて低いことからシアル酸により修飾されたミルクオリゴ糖または糖タンパク質、糖脂質などの複合糖質のいずれかが増加している可能性が考えられた。放牧飼養時間による乳中酸性オリゴ糖 (シアル酸修飾を受けているオリゴ糖) 濃度の変化を検討したところ、主要な乳中オリゴ糖である 3' シアルラクトース (3' -SL) ならびに 6' シアルラクトース (6' -SL) は放牧時間が増加するにつれ有意に減少した。

これらの結果から、放牧飼養による乳中シアル酸濃度の増加にシアル酸含有ミルクオ

リゴ糖の関与はなく、むしろ減少していたことからシアル酸修飾を受けているとされる複合糖質の中でも糖タンパク質や糖脂質の増加または、修飾するシアル酸含有糖鎖の構造が変化している可能性が考えられた。

(2)放牧時間 (一週間馴致) により乳中シアル酸が増加する可能性について示唆された。このような乳中シアル酸の増加に再現性が認められるかさらに試験を行うと共に、増加要因の一つとして考えられる複合糖質の濃度について検討するため、放牧舎飼い切り換え試験 (2 週間反転試験) の 0, 1, 3, 5, 8, 11, 14 日目の各牛乳サンプル中のヘキソースおよびシアル酸濃度を測定した。その結果、牛乳中ヘキソース濃度に変化はなかった (図 2 上)。一方、シアル酸濃度は放牧切り換え直後より増加し、11 日目以降に有意な増加が認められた (図 2 下)。

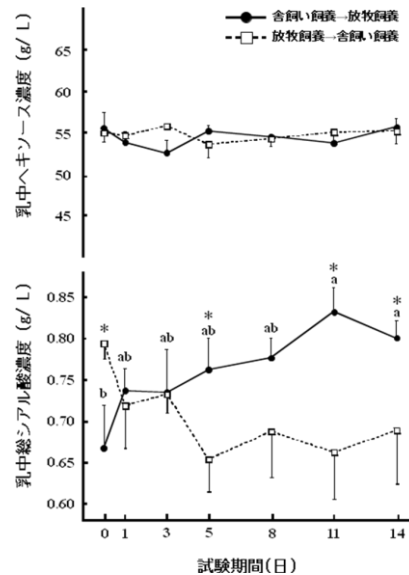


図 2 放牧-舎飼い切り換え試験における牛乳中ヘキソース濃度およびシアル酸濃度の変化

さらに、牛乳の希釈法及び希釈倍率を決定した後、ELISA 法によりシアル酸が結合していると考えられる複合糖質の一部について濃度変化を検討した。その結果、牛乳中のラクトフェリンおよび乳中免疫グロブリン (IgA, IgG, IgM) について、放牧飼養および舎飼い飼養の間に明確な違いはなかった。

牛乳中の複合糖質においてシアル酸含有率の高い糖蛋白質である  $\kappa$  カゼイン及び糖脂質であるガングリオシドについては、牛乳からの抽出方法ならびに測定方法を最適化する必要があり、現時点においても高精度な測定方法を検討している。

(3)

①牛乳中の複合糖質からのシアル酸脱離で最もポピュラーな方法は、硫酸を使用する方法であった。しかし本研究の過程で、この方法では回収率が低いことが判明した。また、回収率を高める方法として塩酸またはトリクロロ酢酸による緩和的酸加水分解が最も適していることが明らかになった。DMBを用いた蛍光標識化においては、標識化された後のHPLC測定時の蛍光シグナルの低下が早く、クロマトグラム上に夾雑物の混入が見られる場合があるため、一日で測定可能なサンプルのみをDMB化に供し分析した。

再測定を行った結果は、主要な乳中シアル酸であるNアセチルノイラミン酸(NA)は、舎飼いから放牧による有意な増加は認められず、(2)における乳中総シアル酸の測定結果を反映するものにはならなかった。一方で、放牧から舎飼いに切り換えると有意な減少がみられ、乳中総シアル酸濃度の変化と一致した。NA測定にはシアル酸の脱離方法を含めた更なる検討の余地を残しており、今後、高精度の乳中シアル酸抽出・分析方法の開発が研究の進展には必要になる。

②ウシ初乳由来オリゴ糖画分および乳中複合糖質の類似構造を有するウシミルクオリゴ糖は、いずれも腸管細胞株HT-29において、Toll様受容体及びその関連因子の遺伝子発現を増加させることが明らかになった。このことから、ビフィズス菌や乳酸菌に代表されるプロバイオティクスが腸管に働きかける際に、これら糖質が受容体の発現を惹起する可能性が考えられ、プロバイオティクスとプレバイオティクス(今回のウシ糖鎖構造)を同時に利用したシンバイオティクスにも効果が期待される。これら糖質が放牧飼養により増加する可能性が示唆されたことは、今後、放牧牛乳やこれを利用した乳製品において様々な保健機能が期待される。

③放牧牛乳を原料としたカマンベールチーズ中のシアル酸濃度は、市販品および放牧カマンベールチーズ両区間に有意な差は見られなかった。しかし、濃度測定を行ったのが、30日目および40日目であり、熟成日数により両区とも有意な減少が見られた。このことから牛乳中のシアル酸はチーズの熟成期間において何らかの役割を有していることが考えられた。今後、より早い熟成期間(例えば10日や20日)でのシアル酸濃度の変化および乳酸発酵などにもたらす役割について検討を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- ① Asakuma S, Ueda Y, Akiyama F, Uemura Y, Miyaji M, Nakamura M, Murai M, Urashima T, Effect of grazing on the concentrations of total sialic acid and hexose in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 93(2010), 4850-4 査読有り
- ② Asakuma S, Yokoyama T, Kimura K, Watanabe Y, Nakamura T, Fukuda K, Urashima T, Effect of human milk oligosaccharides on messenger ribonucleic acid expression of Toll-like receptor 2 and 4, and of MD2 in the intestinal cell line HT-29. *Journal of Applied Glycoscience* 57(2010), 177-183 査読有り

[学会発表](計3件)

- ① 朝隈貞樹, 上田靖子, 秋山典昭. 放牧飼養が牛乳及びチーズにおけるシアル酸濃度に及ぼす影響. 2008年度日本酪農科学シンポジウム(2008年8月)
- ② 朝隈貞樹, 横山朋子, 木村一雅(ヤクルト), 渡辺陽子, 中村正, 荒井威吉, 福田健二, 浦島匡. 各種ミルクオリゴ糖がヒト腸管由来細胞においてToll様受容体遺伝子発現に及ぼす影響. 第28回日本糖質学会年会(2008年8月)
- ③ 朝隈貞樹, 上田靖子, 秋山典昭, 上村祐介, 宮地慎, 中村正斗, 浦島匡. 放牧飼養及び舎飼い飼養による乳中シアル酸濃度への影響. 平成22年度日本酪農科学会シンポジウム要旨(2010年8月)

## 6. 研究組織

(1)研究代表

朝隈 貞樹 (Asakuma Sadaki)

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 集約放牧研究チーム 任期付研究員

研究者番号: 50374773