



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	鶏卵卵黄シアリルオリゴ糖の酵素利用による分離とその生理機能(本文(Fulltext))
Author(s)	纈纈, 守; 榎木, 裕子; ジュネジャ, L. R.; 金, 武祚; 山本, 武彦
Citation	[応用糖質科学 : oyo toshitsu kagaku = Journal of applied glycoscience] vol.[43] no.[2] p.[283]-[287]
Issue Date	1996-06-30
Rights	Japanese Society of Applied Glycoscience (日本応用糖質科学会)
Version	出版社版 (publisher version) postprint
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/39869

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

鶏卵卵黄シアリルオリゴ糖の酵素利用による分離とその生理機能*

瀬戸 守**, 榎木裕子, L. R. ジュネジャ, 金 武祚, 山本武彦

太陽化学(株)総合研究所 (510 四日市市宝町 1-3)

Isolation of Sialyloligosaccharides from Egg Yolk Using Enzymes and Some Biofunctional Activities of the Oligosaccharides Isolated

Mamoru KOKETSU,** Yuko ENOKI, Lekh Raj JUNEJA, Mujo KIM and Takehiko YAMAMOTO

Central Research Laboratories, Taiyo Kagaku Co., Ltd. (1-3, Takaramachi, Yokkaichi 510, Japan)

Measurement of sialic acid in various structural fractions of hen's egg showed that it is distributed in all parts of the egg. Quantitatively, sialic acid was mainly found in the yolk fraction. A suspension of delipidated egg yolk was treated with protease and purified by column chromatography. The obtained sialyloligosaccharide fraction was subjected to structural characterization, and there were three major types of biantennary sialyloligosaccharides. The sialyloligosaccharides were absorbed and distributed to various tissues, when orally administrated to rats. The sialyloligosaccharide fraction was shown to inhibit infection of rotavirus *in vitro* and was effective in lowering the incidence of diarrhea in rats infected with rotavirus. Also, the sialyloligosaccharide fraction was found to be effective in promotion of learning performance in infant rats when examined by the maze test.

シアリ酸はノイラミン酸のアシル誘導体の総称で自然界には15種以上の誘導体が確認され、植物を除く動物由来の糖タンパク質、酸性ムコ多糖および糖脂質に結合型として存在し、非還元末端位という特定の位置を占めている。シアリ酸の中で最も量が多く代表的なものが、*N*-アセチルノイラミン酸 (Fig. 1) である。これは、分子式 $C_{11}H_{19}NO_9$ 、分子量 309.28、ケトースで、カルボキシル基を持つため酸として働き pK_a は 2.6 である。次いで、*N*-グリコシルノイラミン酸 (Fig. 1) である。また、シアリルオリゴ糖は、生体成分の糖タンパク質や、ガングリオシドに結合型糖鎖として存在する。

最近、シアリ酸およびシアリルオリゴ糖は、細胞表面の末端に存在し、負電荷を有するため細胞毒素、ウイルスのレセプターとしての機能や細胞接着、マスキング作用、ガン化などの生命現象にも深く関与していることが明らかとなり、生理学的に重要な分子として

の認識が高まってきた。

シアリ酸およびシアリルオリゴ糖の応用開発には、かなりの量の純品標品が必要である。これまで、化学合成や酵素合成あるいは天然物からの単離等、種々の方法が試みられてきたが、大量調製のための良好な方法が見出されず、生理作用に関する基礎的研究も遅れていた。そこで著者らは、まず鶏卵に含まれるシアリ酸を分析し、卵黄がシアリ酸原料として優れていることを確認した^{1,2)}。次いで、卵黄のシアリルオリゴ糖の構造を解析するとともに調製法も検討した。また、調製したシアリルオリゴ糖を経口投与し、生体内での動態を調べる一方、シアリルオリゴ糖画分のロタウイルス阻害作用とラットの学習能力に及ぼす影響について調べた。

シアリ酸の鶏卵中における分布

鶏卵に含まれるシアリ酸の分布とその量を調べるために鶏卵各成分中のシアリ酸含量を測定した。その結果、すべての画分がシアリ酸を含有することがわかった。含有率は、カラザ、卵黄膜が高くそれぞれ 2.40、

* "Proceedings of the Symposium on Amylase and Related Enzymes, 1995."

** Corresponding author.

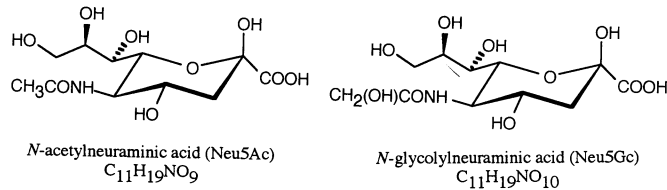


Fig. 1. The structures of *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc).

Table 1. Sialic acid contents in various fractions of hen's egg.

Fractions	Qty.		Sialic acid	
	kg/ton egg wet wt. basis	g	% in dry matter	
Egg shell	104.8	2.98	0.004	
Shell membrane	6.2	1.22	0.07	
Egg white	603.5	60.35	0.10	
Egg yolk	281.0	267.0	0.19	
Egg yolk membrane	2.3	3.52	1.80	
Chalaza	2.2	3.96	2.40	

1.80%であった。また、最も絶対量の多い画分は、卵黄であり、鶏卵全体のシアル酸の78.8%を占めた (Table 1)。微量成分であるシアル酸を大量に調製するためには、原料が大量に調達できしかも安価であることが必要である。この点から卵黄がシアル酸の調製原料として最適であると判断した。

鶏卵卵黄のシアリルオリゴ糖の構造と調製

1. 卵黄シアリルオリゴ糖の構造³⁾

シアル酸は、代謝の一時的な過程を除いてほとんどの場合、遊離の形ではなくグリコシド結合したシアリルオリゴ糖として存在する。卵黄中でのシアル酸の存在形態を明らかにするため主要なシアリルオリゴ糖の構造解析を行った。解析は、卵黄タンパクの水溶性画分を回収し、ヒドラジン分離を行った後、オリゴ糖鎖の還元末端をUV吸収試薬 (*p*-アミノ安息香酸エチル, ABEE) でラベル化した。ラベル化したオリゴ糖を、Bio-gel P-4, HPLCカラム (DEAE-5PW, ODS) によって分画し、3種 (SI-1, SI-2, SII-1) のシアリルオリゴ糖をそれぞれ単離精製した。3種のシアリルオリゴ糖は、¹H-NMRによって構造解析し、それぞれ Fig. 2 に示す構造であった。脱脂卵黄水溶性画分のすべてのシアリルオリゴ糖の中で、SI-1, SI-2 お

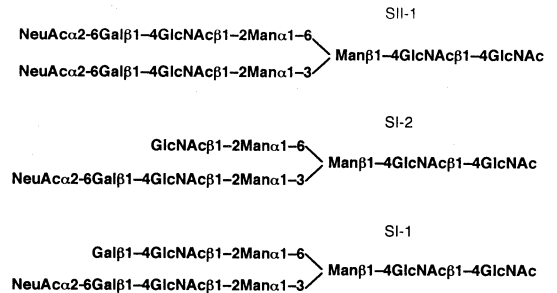


Fig. 2. Structures of egg yolk sialyloligosaccharides.

および SII-1 の含有量は、それぞれ 9.6, 6.5 および 17.5% であった。

2. 卵黄シアリルオリゴ糖ペプチドの大量調製と同定⁴⁾

卵黄シアリルオリゴ糖ペプチドの大量調製と同定を行った。まず、脱脂卵黄タンパクをプロテアーゼ消化し、オリゴ糖ペプチドを水溶化した。次いで、各種クロマトグラフィー (Dowex MSA-1, GS-520, DEAE-Toyopearl 650M) により 2 種 (A-I, A-II) を単離精製した。A-I, A-II は、それぞれ複合型の 2 本鎖糖鎖でアミノ酸を平均で 1.2 と 2.5 個含有していた。また、脱脂卵黄タンパクにアンズ種子より調製したグライコペプチダーゼを作用させ、ペプチドを有しないシアリルオリゴ糖鎖を得ることができた。

シアリルオリゴ糖の生体への取り込み

卵黄から調製したシアリルオリゴ糖を経口摂取し、生体内での挙動を調べた。まず、卵黄シアリルオリゴ糖ペプチド (A-II) を *Arthrobacter ureafaciens* 由来のノイラミニダーゼで消化して、アシアロ A-II を得、これと CMP-[³H]NeuAc の混液に α 2-6 シアリルトランスフェラーゼを作用させ [³H]A-II を酵素合成した。 [³H]A-II を SD ラットに投与し、投与 24 時間後の取り込み量について調べた。その結果、臓器、脳、血清、尿を含め体内に取り込まれた [³H]A-II 由

来の放射活性は58.7%であった。この結果は、消化管内におけるシアリルオリゴ糖ペプチド由来の放射活性が血清に経時的に移行したことを示す。また、脳や臓器には、3, 6, 24時間後にいずれも約2.5%が存在していた。これらの結果は、経口投与されたシアリルオリゴ糖の一部が生体内に取り込まれ生合成に利用されたことを示唆した。生合成されたシアリルオリゴ糖の機能解明において本研究のデータを有効に活用する必要がある。

シアリルオリゴ糖のロタウイルス感染阻害効果⁵⁾

シアリルオリゴ糖の生理機能探索を目的として、小児性下痢症の最大原因ウイルスであるロタウイルスに対する卵黄由来のシアリルオリゴ糖の感染阻害効果について調べた。その結果、卵黄タンパクをプロテアーゼ消化して得たオリゴ糖含有画分およびこの中にある陰イオン交換樹脂吸着画分であるシアリルオリゴ糖画分に感染阻害活性を認めた。感染阻害活性を示したオ

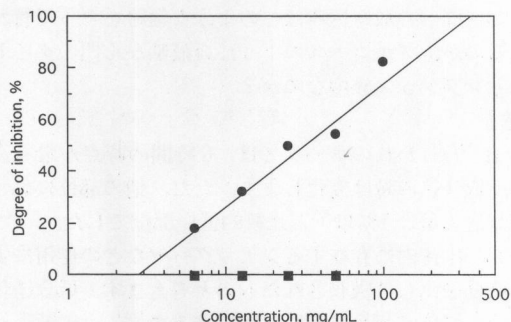


Fig. 3. Effects of sialyloligosaccharide and neutral oligosaccharide fractions on rotavirus (SA-11) inhibition. Sialyloligosaccharide fraction (●); neutral oligosaccharide fraction (■).

The ability of each fraction to inhibit rotavirus infection was measured by an indirect immunofluorescence staining method. Briefly, MA-104 cells were grown to confluence on 96-well tissue culture microplates (Nunc Microwell Plate 96F with Lid) in the presence of Eagle's minimum essential medium (EMEM) and 10% fetal bovine serum at 37°C in a CO₂ environment. Aliquots of sample were diluted in EMEM, mixed with an equivalent volume of rotavirus (SA-11, 1×10⁵-10⁶ FCFU/ml), and incubated at 37°C for 1 h. This mixture was absorbed onto the cells. After cells were washed with PBS, FITC-labeled goat IgG against guinea pig IgG was added and incubated at 37°C for 30 min. Cells were washed and air-dried, and the number of positively fluorescent cell focus forming units (FCFU) were counted under a fluorescence microscope.

リゴ糖高含有画分とシアリルオリゴ糖画分をシアリダーゼ処理によってシアリル酸を除去すると同阻害活性は完全に消失し、ロタウイルス感染阻害活性においてシアリル酸分子の存在が必須であることがわかった (Fig. 3)。また、乳飲み子マウスを用いた *in vitro* 実験においてもロタウイルス感染下痢症に対してシアリルオリゴ糖画分は下痢発生を抑制することが認められた (Fig. 4)。

ロタウイルスは、乳幼児のウイルス性下痢症の最大の原因ウイルスであり、ロタウイルスにかかった乳幼児は、嘔吐をとめない、激しい脱水症状に陥り場合によっては死に至る。発展途上国では、毎年100万人以上もの乳幼児が死亡すると報告されている。発展途上国でも比較的入手が容易な鶏卵の成分がロタウイルス感染阻害効果を示すことは、ロタウイルス予防のためにも意義深いことである。とくに、同ウイルスを抗原として注射した鶏は同ウイルス抗体を含むことがすでに明らかになっているので⁶⁾、卵黄を与えることでロタウイルス感染下痢症の治療ができるかもしれない。

また、シアリルオリゴ糖の生理機能探索の一端としてSDラットにシアリルオリゴ糖画分を経口投与し、迷路を用いた試験で学習能力に対する影響を調べた⁷⁾。Fig. 5に示す実験スケジュールにしたがい14~21日齢にシアリルオリゴ糖画分を与え、次いで42~49日齢の時点で迷路実験を行った。その結果、シア

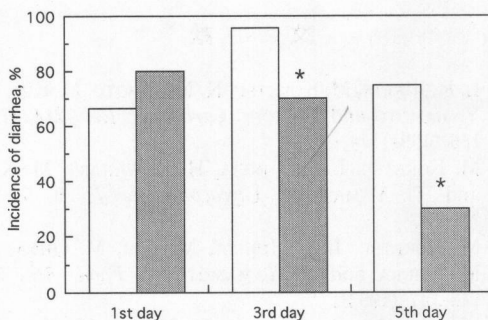


Fig. 4. Effects of administration of sialyloligosaccharides fraction to suckling mice inoculated with rotavirus (SA-11).

Saline, left bar; the sialyloligosaccharide fraction, right bar. **p* < 0.05. 2.5 mg of the sialyloligosaccharide fraction was orally administered to 6-day-old mice (30 mice/group) and was inoculated with 50 ml of 8.8×10⁶ FCFU of rotavirus. Control group was administered with saline and rotavirus. All the groups were inspected daily for diarrhea by gentle palpitation of the abdomen, and the incidence of diarrhea was counted.

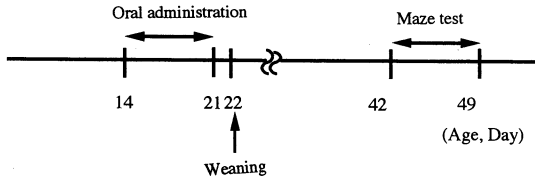


Fig. 5. Experimental schedule.

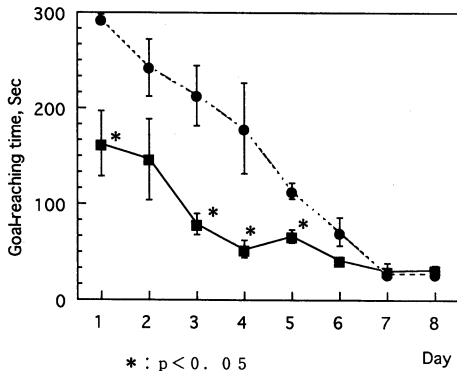


Fig. 6. Effects of oral administration of sialyloligosaccharide fraction on goal-reaching time of rats in the maze test.

■, sialyloligosaccharide fraction; ●, saline.

リルオリゴ糖画分投与群は、対照群に比べゴールへの到達率および到達時間において有意に迷路学習に対する効果を示した (Fig. 6).

文 献

- 1) L. R. JUNEJA, M. KOKETSU, K. NISHIMOTO, M. KIM, T. YAMAMOTO and T. ITOH: *Carbohydr. Res.*, **214**, 179-186 (1991).
- 2) M. KOKETSU, L. R. JUNEJA, H. KAWANAMI, M. KIM and T. YAMAMOTO: *Glycoconjugate J.*, **9**, 70-74 (1992).
- 3) M. KOKETSU, L. R. JUNEJA, M. KIM, M. OHTA, F. MATSUURA and T. YAMAMOTO: *J. Food. Sci.*, **58**, 743-747 (1993).
- 4) M. KOKETSU, A. SEKO, L. R. JUNEJA, M. KIM, N. KAWAMURA and T. YAMAMOTO: *J. Carbohydr. Chem.*, **14**, 833-841 (1995).
- 5) M. KOKETSU, T. NITODA, L. R. JUNEJA, M. KIM, N. KASHIMURA and T. YAMAMOTO: *J. Agric. Food, Chem.*, **43**, 858-861 (1995).
- 6) H. HATTA, K. TSUDA, S. AKACHI, M. KIM, T. YAMAMOTO and T. EBINA: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1077-1081 (1993).
- 7) 纈纈 守, 中田勝康, L. R. ジュネジャ, 金 武祥, 山本武彦: 応用糖質, **42**, 15-18 (1995).

【質問】

北大 千葉

卵黄の中に含まれる糖鎖は生合成の過程でみられるあらゆる鎖長の糖鎖が認められますのでしょうか。最小の鎖長の糖鎖はどの程度でしょうか。

【答】

非常に多くの種類の糖鎖が報告されています [*J. Biochem.*, **113**, 677-682 (1993); *Glycoconjugate J.*, **8**, 400-413 (1991); *Biochemistry*, **29**, 5574-5583 (1990)]. 最小鎖長としては、単糖としてグルコースが卵黄中には約0.7%存在することが報告されています。

【質問】

京都工織 橋本

シアリルオリゴ糖の脳への取り込みについてお答え下さい。

(1) 他の部位と異なり投与初期から取り込み量がほとんど変化していないように思えるが、どのように考えておられるのか？

(2) かなりシアリルオリゴ糖の分子量は大きいですが、そのままの形で脳内へ取り込まれるのか？

(3) 脳への取り込みはどのような経路をとって行われるのか、グルコースのように血液脳かん門のタイトジャンクション経由なのか？

【答】

(1) われわれのデータでは、6時間の時点が最も高く、取り込み量は変化します。ただ、他の部位に比べ取り込み量は1%以下と比較的低い部位でした。

(2) 生体内に存在するシアリダーゼなどの作用により低分子化して吸収されたものと考えます。低分子化については、ゲル濾過にて確認済みです。

(3) そのように考えます。

【質問】

野田産研 小熊

ロタウイルス感染阻害および学習能力向上効果においてこのシアリルオリゴ糖の構造が重要なのでしょうか？ シアル酸単独では効果がないのでしょうか？

【答】

今回の動物実験では、粗精製品を用いて行っているため構造との相関までは言及できません。しかし、シアリダーゼ処理によって活性がなくなる点からシアリルオリゴ糖鎖中のシアル酸の重要性は確認されました。また、シアル酸単独での効果については、ロタウイルス感染実験においてシアル酸単独で活性を確認しております。しかし、モル比から見ればシアリルオリゴ糖鎖と比べ弱いものでした。

【質問】

明治乳業 藤本

(1) ロタウイルス感染防御でSI画分とSII画分で活性の差があるのか？

(2) SI画分とSII画分の量比は個体差や種の差によって変化するのか？

【答】

(1) ロタウイルスの実験を行った際には、アッセイに十分な量のサンプルを有しておりませんでした。

(2) われわれの調べた範囲では、大差ないものと考えています。

【質問】

東京農工大 坂野

変な質問ですがシアル酸が除去されると調べた生理活性（作用）がなくなるのでしょうか。

【答】

ロタウイルスの感染阻害効果においてシアリダーゼ処理によって阻害効果が完全に喪失しました。したがって、シアリルオリゴ糖のシアル酸が除かれることにより活性がなくなります。

(平成8年1月11日受付)