

## 鶏卵由来シアリルオリゴ糖の学習能力向上効果

額 守\*, 中田勝康\*, L. R. ジュネジャ\*,  
金 武祐\*, 山本武彦\*\*

\* 太陽化学(株)総合研究所  
(510 四日市市宝町 1-3)

\*\* 福山大学工学部生物工学科  
(729-02 福山市東村町字三蔵 985-1)

## Learning Performance of Egg Yolk Sialyloligosaccharide Fraction

Mamoru KOKETSU,\* Katsuyasu NAKATA,\* Lekh Raj JUNEJA,\* Mujo KIM\* and Takehiko YAMAMOTO\*\*

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

\*\* *Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Fukuyama University*  
(985-1, Sanzo, Higashimura-cho, Fukuyama 729-02, Japan)

The learning performance ability of the egg yolk sialyloligosaccharide fraction was investigated. The egg yolk sialyloligosaccharide fraction was administered to rats aged 14 to 21 days. Goal-reaching time and success ratio of goal reaching were measured using maze test on 42-49 days old rats. The results showed that the group which were administered egg yolk sialyloligosaccharides fraction had higher success ratio of goal reaching than control group, and goal reaching time was also reduced significantly as compared to control. The results of this study suggest that the sialyloligosaccharide derivatives might play an important role to improve the learning performance of infants.

シアル酸は、細胞表面の糖タンパク質やガングリオシドなどの非還元末端に存在し、しかもカルボキシル基を有していることから細胞表面のマイナス電荷を付与し<sup>1)</sup>、細胞間の情報伝達<sup>2,3)</sup>やウイルスのレセプター作用<sup>4,5)</sup>などを示す特有な糖鎖である。近年、シアル酸誘導体が抗慢性炎症<sup>6)</sup>、インフルエンザウイルス阻害作用<sup>7)</sup>など医薬品開発に向けての開発も盛んに行われている。

シアル酸を含有したスフィンゴ糖脂質の一つであるガングリオシドは、神経系<sup>8)</sup>や脳の部位<sup>9)</sup>で広く分布し、種類も多くのものが報告されている<sup>10,11)</sup>。ガングリオシドは、脳内での含有量が多いことから脳の発達や学習能力の向上効果と深い関わりがあると推察されている<sup>12)</sup>。

われわれは、これまで鶏卵卵黄中の主要なシアリルオリゴ糖の糖鎖構造<sup>13)</sup>について報告してきた。今回、鶏卵卵黄から調製した糖タンパク質由来のシアリルオ

リゴ糖が、新生児期のラットの学習能力に及ぼす影響を迷路実験により試験した。

## 実験材料と方法

## 1. シアリルオリゴ糖画分の調製

脱脂卵黄は、前回報告したものと同ロット品<sup>14)</sup>を用いた。40 kgの脱脂卵黄は、90 kUのプロテアーゼ(オリエンターゼ, *Aspergillus oryzae* 由来, 阪急バイオインダストリー社製)を添加し、0.05 Mリン酸緩衝液中で50℃、20時間反応させた。酵素反応液は、濾過後、分画分子量10,000のUF膜(日東電工社製)によって高分子成分を除去した。UF膜透過液の濃縮と脱塩を、RO膜によって行い、エバポレーターで乾固させ、オリゴ糖濃縮画分を得た。このオリゴ糖濃縮画分を陰イオン交換樹脂であるDowex MSA-1 (Cl<sup>-</sup>型, ダウ・ケミカル社製)にアプライし、ステップワイズ溶出を行った。各フラクションは、糖の場合フェ

ノール-硫酸法<sup>15)</sup>, シアル酸の場合過ヨウ素酸-レゾルシノール法<sup>16)</sup>でモニターし, 中性糖画分およびシアリルオリゴ糖画分の確認を行った. イオン交換水で中性糖画分が溶出された後, 0.5 M NaClにて樹脂に吸着したシアリルオリゴ糖画分が溶出された. シアリルオリゴ糖画分は, Bio gel P-4 (200~400 メッシュ, バイオラッド社)にて脱塩した. シアリルオリゴ糖画分は, 過塩素酸-チオバルビツール酸 (TBA) 法<sup>17)</sup>にてシアル酸の定量を行った. アミノ酸分析は, MOOREらの方法<sup>18)</sup>に従って行った. すなわちシアリルオリゴ糖画分を6 M HClで110°C, 80時間加水分解し, アミノ酸自動分析装置 (Hitachi 835-50, 日立製作所製)で測定した.

## 2. 投与スケジュール

SD ラットは, 1日齢のものを親とともに SLC 社より購入した. ラットの飼育, サンプルの投与時期, 迷路学習の実験スケジュールを Fig. 1 に示した. すなわち, 21日齢までは, 親とともに飼育し親には固形飼料 (C-2, 日本クレア社製) を与えた. 22日齢で, 離乳し, 1匹ずつケージに入れ固形飼料で飼育した. シアリルオリゴ糖画分は, 100  $\mu$ l の生理的食塩水に溶解し, 14~21日齢のラットに体重 50 g 当り 10.5 mg になるようにシリンジに付けたゾンデを用いて強制的に経口投与した. コントロール群には 100  $\mu$ l の生理的食塩水を同様に投与した. 投与は, 1日1回午前中に行い, いずれのラットも毎日同じ時間に投与した. 試験は, 1群5匹とした. 迷路実験終了までの期間に

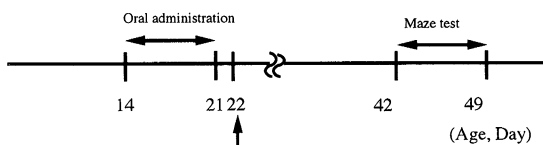


Fig. 1. Experimental schedule.

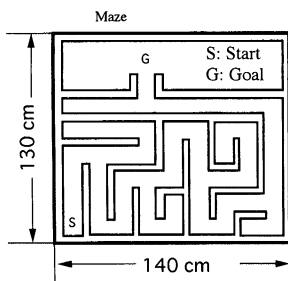


Fig. 2. Design of maze used in the study.

において両群の体重増加を毎日測定し, サンプル投与による両群間の成長に対する個体差は認められなかった.

## 3. 迷路実験

シアリルオリゴ糖画分投与群およびコントロール群は, 42日齢から49日齢に Fig. 2 に示した迷路を用いて学習能力の評価をした. 迷路のルートは, S をスタートとしそれぞれの選択関門を通過させ, G をゴールとした. ゴールには, 固形飼料を一つ設置した. 通路は幅 10 cm, 高さ 7.5 cm の黒色のアクリルを用いた<sup>19)</sup>. 迷路学習初日は, 予備試行として1度だけラットを軽く手で持ちながら正しい道順をたどり, ゴールまで導いた. 本試行では, 透明のアクリル板で装置にふたをし, ラットの行動を観察できるようにした. 照明は, スタンドの間接光を用いた. また, 前室を有した比較的静かな環境で試験を行った. 1匹の試行が終了した後, アルコールによって装置の通路をふき取りドライヤーで乾燥させることにより, 前のラットの臭いを除去した.

試行時間は, 5分間とし, ゴールに到達するまでの時間を計測した. 時間を超過してもゴールに到達しなかった場合は, 1律5分としてデータ処理し, ゴールまでの到達率は, ゴールに到達したラットの数から求めた. 統計学的処理は, *t*-検定法に従った.

## 実験結果

### 1. シアリルオリゴ糖画分の成分

プロテアーゼ処理したオリゴ糖濃縮画分をイオン交換樹脂の Dowex MSA-1 で分画した (Fig. 3). 素通りのイオン交換水溶出画分は, シアル酸の発色をほと

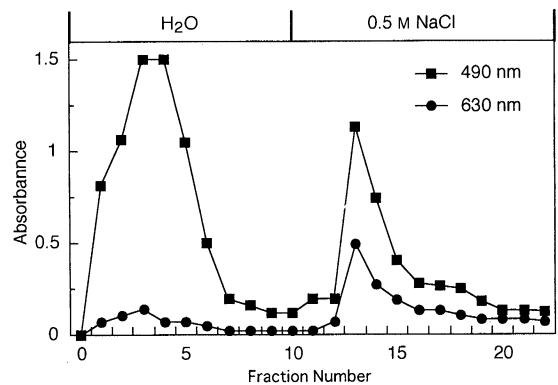


Fig. 3. Elution profile of oligosaccharide-enriched fraction on anion exchange column (Dowex MSA-1).

■, Hexose; ●, Sialic acid.

Table 1. Amino acid composition of the sialylglycopeptide fraction.

Amino acid	mol %
Asx	17.0
Thr	7.3
Ser	5.6
Glx	24.5
Gly	8.0
Ala	9.3
Cys	4.9
Val	9.6
Met	0.8
Ile	2.5
Leu	2.9
Tyr	0.3
Phe	0.7
Lys	4.9
Arg	1.7

んど認めず、フェノール-硫酸の呈色反応が強いことから中性糖を主体とする画分であった。0.5 M NaCl 溶出画分は、シアリル糖の発色を認め同時に糖の発色も認めた。前報ですでに報告<sup>13)</sup>しているように鶏卵卵黄から調製したシアリルオリゴ糖画分に含まれる主要なシアリルオリゴ糖鎖は、*N*-結合型の複合型2本鎖糖鎖であり、アミノ酸は、平均で Asp 残基を含めて1~3.5個含んでいることがわかっている<sup>20)</sup>。

シアリルオリゴ糖画分のシアリル糖とアミノ酸の組成分析を行った。シアリル糖は、シアリルオリゴ糖画分全体の6.9%であった。アミノ酸分析の結果は Table 1 に示した。卵黄中のシアリルオリゴ糖は、*N*-結合型の糖タンパク糖鎖であるため<sup>13)</sup> Asn 残基が含まれ、全アミノ酸のうち17.0%であった。同じように2個のカルボン酸を有する Glx 残基の含量が多く、24.5%であった。その他に、Val が9.6%、Ala が9.3%、Gly が8.0%含まれていた。

## 2. ゴールまでの到達率

シアリルオリゴ糖画分が学習能力に及ぼす作用を調べるためにゴールまでの到達率と到達時間を測定した。ゴールまでの到達率は、シアリルオリゴ糖画分投与群は、3日目で100%のラットがゴールに到達したのに対し、コントロール群は、5日目で100%のラットがゴールに到達した (Fig. 4)。

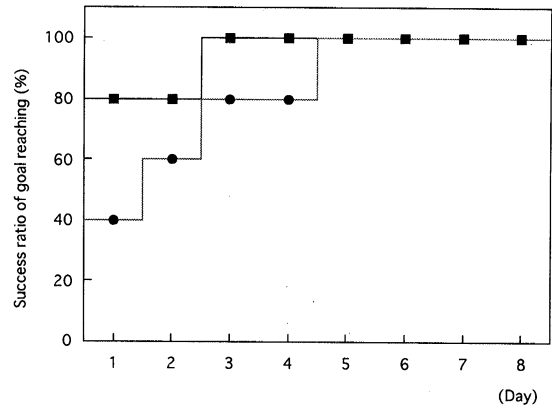


Fig. 4. Effect of oral administration of sialyloligosaccharides fraction on success ratio of goal reaching using maze test on rats.

■, Sialyloligosaccharide fraction; ●, Saline.

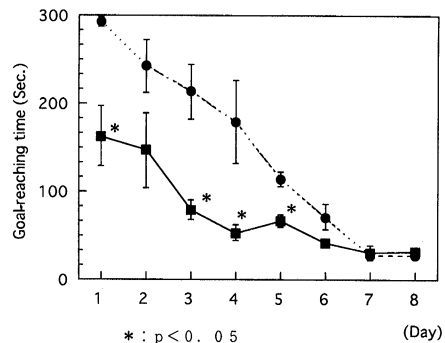


Fig. 5. Effect of oral administration of sialyloligosaccharide fraction on goal-reaching time using maze test on rats.

■, Sialyloligosaccharide fraction; ●, Saline.

## 3. ゴールまでの到達時間

ゴールまでの到達時間は、1日目、3日目、4日目および5日目でシアリルオリゴ糖画分投与群が、コントロール群と比べ有意に短時間であった。シアリルオリゴ糖画分投与群が1日目で163.4秒に対してコントロール群は、293秒であった。4日目で53.8秒に対して、179.8秒であった (Fig. 5)。

## 考 察

迷路実験によって鶏卵由来のシアリルオリゴ糖画分投与群は、コントロール群と比べ、より短時間に迷路学習の効果を示した。シアリルオリゴ糖画分投与群は1日目からこの学習を獲得した。

14日齢のラットに *N*-アセチルノイラミン酸を投与することにより脳内でのガングリオシドとシアル酸含有糖タンパク質の量が増大すること<sup>21)</sup>さらに生後間もない段階で刺激を与えたラットは、学習能力の点で刺激を与えない群と比べ優れており、脳内のシアル酸の含量を定量したところ有意に増大することが報告されている<sup>22)</sup>。また、脳から調製した粗ガングリオシドやGM1, GD1bの投与によって学習能力の向上が、報告されているが<sup>12)</sup>、これらのことから今回投与したシアリルオリゴ糖画分が、脳内でのガングリオシドとシアル酸含有糖タンパク質の生合成原料として使われ、その結果学習能力の向上がもたらされたと推察される。これらを確認するために今後放射ラベル体を調製し、RI実験によって投与されたシアリルオリゴ糖画分が脳内に取り込まれるのかを検討する必要がある。

人乳の初乳期におけるシアリルオリゴ糖の含量は非常に高く最初の1週間の含量は、1,400 mg/lであり、10週目以降の母乳と比べ約7倍もの量含有している<sup>23)</sup>。これは、新生児期にシアリルオリゴ糖を大量に、与えることにより、脳の発達を促しているものと考えられている。これらの事実から新生児期においてシアリルオリゴ糖が乳児の学習能力の発達に欠かせない重要な成分であると考えられる。

## 要 約

鶏卵卵黄由来のシアリルオリゴ糖画分の学習能力に与える影響を調べた。鶏卵卵黄から調製したシアリルオリゴ糖画分を乳飲み子のラットに14日齢から21日齢の期間、経口投与した。42日齢から49日齢の8日間迷路を用いてゴールまでの到達率と到達時間を測定した。その結果、シアリルオリゴ糖画分投与群は、コントロール群と比べゴールまでの到達率が高く、到達時間もコントロール群と比べ有意に短時間であった。

今回の実験から新生児期のシアリルオリゴ糖の摂取は、新生児の学習能力の発達にとって重要な成分であると考えられた。

迷路の作成ならびにラットの扱いなど多くの技術的指導をしていただきました三重大学教育学部三ツ矢隆重博士に心より感謝いたします。有益な議論をしていただきました太陽化学株式会社総合研究所高橋秀久氏に感謝いたします。

## 文 献

1) R. SCHAUER : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **40**,

131-234 (1982).

- 2) 小島直也 : 油化学, **40**, 344-351 (1991).
- 3) N. KOJIMA and S. HAKOMORI : *J. Biol. Chem.*, **264**, 20159 (1989).
- 4) 内貴正治 : 現代化学, **248**, 38-42 (1991).
- 5) H. SMIT, W. GAASTRA, J. P. KAMERLING, J. F. G. Vliegenthart and F. K. GRAAF : *Infect. Immun.*, **46**, 578-584 (1984).
- 6) M. L. PHILLIPS, E. NUDELMAN, F. C. A. GAETA, M. PEREZ, A. K. SINGHAL, S. HAKOMORI and J. C. PAULSON : *Science*, **250**, 1130-1132 (1990).
- 7) M. ITZSTEIN, W. Y. WU, G. B. KOK, M. S. PEGG, J. C. DYASON, B. JIN, T. V. PHAN, M. L. SMYTHE, H. F. WHITE, S. W. OLIVER, P. M. COLMAN, J. N. VARGHESE, D. M. RYAN, J. M. WOODS, R. C. BETHELL, V. J. HOTHAM, J. M. CAMERON and C. R. PENN : *Nature*, **363**, 418-423 (1993).
- 8) N. F. AVROVA : *J. Neurochem.*, **18**, 667-674 (1971).
- 9) D. M. DERRY and L. S. WOLFE : *Science*, **158**, 1450-1452 (1967).
- 10) M. T. VANIER, M. HOLM, R. ÖHMAN and L. SVENNERHOLM : *J. Neurochem.*, **18**, 581-592 (1971).
- 11) S. ANDO and R. K. YU : *J. Biol. Chem.*, **252**, 6247-6250 (1977).
- 12) S. E. KARPIAK, F. VILIM and MAHADIK : *Dev. Neurosci.*, **6**, 127-135 (1984).
- 13) M. KOKETSU, L. R. JUNEJA, M. OHTA, F. MATSUURA, M. KIM and T. YAMAMOTO : *J. Food Sci.*, **58**, 743-747 (1993).
- 14) M. KOKETSU, L. R. JUNEJA, H. KAWANAMI, M. KIM and T. YAMAMOTO : *Glycoconjugate J.*, **9**, 70-74 (1992).
- 15) J. E. HODGE and B. T. HOFREITER : in *Methods in Carbohydr. Chem.*, Vol. 1, R. L. WHISTLER and M. L. WOLFROM, eds., Academic Press, New York, p. 380-394 (1962).
- 16) G. W. JOURDIAN, L. DEAN and S. ROSEMAN : *J. Biol. Chem.*, **246**, 430-435 (1971).
- 17) L. WARREN : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971-1975 (1959).
- 18) M. MOORE and W. H. STEIN : *Methods Enzymol.*, **6**, 819-831 (1963).
- 19) 三ツ矢隆重 : 日衛誌, **28**, 324-399 (1973).
- 20) M. KOKETSU, A. SEKO, L. R. JUNEJA, M. KIM, N. KASHIMURA and T. YAMAMOTO : *J. Carbohydr. Chem.*, (1995) in press.
- 21) S. E. CARLSON and S. G. HOUSE : *J. Nutr.*, **116**, 881-886 (1986).
- 22) B. L. G. MORGAN and M. WINICK : *J. Nutr.*, **110**, 425-432 (1980).
- 23) S. E. CARLSON : *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 720-726 (1985).

(平成6年10月28日受付, 平成6年12月5日受理)