

〈総説〉

糖類が秘める生体内機能. II. 新しいオリゴ糖への期待

細見 修*, 池田 啓一**, 佐々木 啓**, 奈良岡佑南**, 伊藤 匠*

Oligosaccharides and their physiological functions —II. Expectation for novel oligosaccharides—

Osamu HOSOMI*, Keiichi IKEDA**, Hiraku SASAKI**,
Yuuna NARAOKA** and Takumi ITO*

Abstract

We examined some simple disaccharides (Gal-GlcNH₂) which had glucosamine residue at the reducing terminal and galactose residue at the non-reducing terminal, respectively. It was surprising that one of them, Gal α 1-6GlcNH₂ (MeNH₂), had suppressive activity against proliferation of human and other animal cancer cells, although other similar disaccharides showed no or moderate suppressive activity against cancer cell proliferation. In our examinations, it was indicated that galectin-1 and ribonucleoprotein molecules associated with the role(s) of this saccharide, Gal α 1-6GlcNH₂. Also, it should be emphasized that these proteins and saccharide commonly have important roles in vitro studies using human, dog and mouse cancer cells. In this review, we present an overview of the center of our research.

Key words: oligosaccharide, cancer cell, galectin, hnRNP A1

1. はじめに

今回は、前稿(順天堂 スポーツ健康科学研究 第2巻第4号, 2011年)⁹⁾の続きとして研究者等が生体内で特異的に生理活性(機能)を現すであろうと期待して合成した数種のオリゴ糖を中心にして、それらの今後期待できる作用についてこれまで国内外で報告されている類似の研究と著者らが進めてきた研究の成果などについて述べてみたい。

前号で触れたように、オリゴ糖など糖質の生体内機能性について、一般的には細胞膜表面や細胞間に

存在するものは細胞・組織間の情報交換としての役目や、胃の粘膜等に見られるムチン(mucin, 粘性糖蛋白質)、関節等の潤滑液としての多糖類など組織の保護的役割が挙げられる¹⁾。これら糖質は大きな分子になると糖鎖(sugar chain)等と呼ばれ、糖鎖単独で存在することはなくタンパク質や脂質と複合体を形成して複合糖質と呼ばれている。その糖鎖構造は非常に複雑かつ不揃いで、容易にはその構造を解明できるものではなかった。近年になって、切り出したオリゴ糖や糖鎖を化学標識して高速液体クロマトグラフィーやマススペクトル等による構造解析が可能となり、大いにこの分野の研究に拍車がかかったと言える^{22,29,30)}。

しかし、これら糖鎖、オリゴ糖は受動的機能という印象が強く、能動的な機能性という点についての

* 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科
Graduate School of Health and Sports Science,
Juntendo University

** 順天堂大学スポーツ健康科学部
Department of Health Science, Juntendo University

研究は少ない。グルコサミン単体から構成されるキトサンオリゴ糖等はマクロフェージの活性化を促して、生体の免疫機能を高めることが明らかにされているが²⁶⁾、このような例はまだ少ない。

2. グルコサミン (Glucosamine, GlcNH₂) を持つオリゴ糖

ヒトを含めた動物から分離されたオリゴ糖類の中で、グルコサミンを持つオリゴ糖類は未だ報告がない。発見されているのはいずれも天然型の N-アセチルグルコサミン (N-Acetylglucosamine, GlcNAc) を持つ仲間である。グルコサミンを持つ二糖であるラクトサミン (lactosamine, Galβ1-4GlcNH₂) の合成は、ウシに多量のグルコサミンを摂取(静脈注射)させたところ、乳汁中にラクトサミンが検出されたというものであるが、生体内でどのような反応によって合成されたかは不明である⁷⁾。考えられる合理的な合成経路は糖分解酵素 (β-galactosidase) の逆反応経路ではなく、生体組織や血流中に豊富に存在するガラクトース転移酵素 (β1-4galactosyltransferase が働いて UDP-Gal + Glc or GlcNAc → Galβ1-4Glc or Galβ1-4GlcNAc の二糖類を作る)¹⁴⁾ によるラクトース又は N-アセチルラクトサミン合成と同様の経路と予想される。この合成反応は筆者等が糖供与体として UDP-Gal, 糖受容体として GlcNH₂ を用い、ヒト血清 (β1-4galactosyltransferase が豊富に存在する) を酵素源に in vitro (試験管やシャーレ内) で行った実験でもラクトサミンが生成される結果を得ている (未公表) ので、生体組織・細胞膜にある糖鎖構造の N-アセチルラクトサミン (Galβ1-4GlcNAc) の合成経路と同じと考えられる。ラクトサミンと同じ構成糖からなる二糖類であるアロラクトサミン (Allo-lactosamine, Galβ1-6GlcNH₂) も、自然界に存在する N-アセチルアロラクトサミン (Allo-N-acetylactosamine, Galβ1-6GlcNAc) と構造が酷似し、研究者らが糖分解酵素の逆反応を利用して初めて合成した。更に、このアロラクトサミンのガラクトース C1 側鎖である -OH 基が α に配位し、グルコサミンの代わりにグルコースであるのが

メリビオース (melibiose, Galα1-6Glc) という二糖類で蜂蜜、大豆、甜菜等に僅かに含まれる。その高い保水力を利用して化粧品に配合されたり、アトピー性皮膚炎にも効果がある等の研究もなされている^{15,27)}。このようにガラクトースとグルコサミンからなる二糖類で、Galα1-6GlcNH₂ 構造を持つのが MelNH₂ (仮称: メリビオサミン) という新規の機能性オリゴ糖である。

3. 新しい機能性オリゴ糖

メリビオサミンという二糖類の合成と研究が本格的に始まったのは2002年で、その機能が発表されたのは2003年(キチンキトサンシンポジウム・秋田)であった。この新規の二糖類ががん細胞の増殖抑制作用を有することが明らかになってきた過程や背景について述べて行きたい。

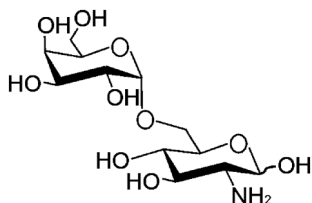
最初に、グルコサミンという単糖のがん抑制効果について初めて報告したのが Quastel と Cantero²⁴⁾ である。彼らは Sarcoma 37 という腫瘍細胞を移植したマウスにグルコサミンを投与すると、がん組織の成長が阻害されることを観察した。これは急激に成長するがん組織とグルコサミンの代謝系の間でエネルギー源である ATP の争奪戦が起こり、がん組織へのエネルギー供給が不足するためがん組織の成長が阻害されると考えられた。更に、Molnar と Bekesi は in vitro 実験で、Ehrlich 腹水がんや Sarcoma 180 腹水がん細胞にグルコサミン等のアミノ糖を添加すると細胞質の空胞化と核の崩壊という著しい変化をもたらすことを報告している¹⁹⁾。更に、彼らはグルコサミンを継続的に静注することで、ラットに移植した Walker 256 がん肉腫が高い率で後退することを観察している²⁰⁾。Ichikawa 等も、mastocytoma P-815 (肥満細胞腫) 細胞を 5 mM のグルコサミンと共に培養すると、がん細胞の増殖が著しく阻害され、グルコースの細胞内取り込みが減少したり、細胞内 ATP レベルの低下が見られ、同時に uridine nucleotide (ウリジンヌクレオチド: 糖鎖合成系における糖供与体の骨格を成す) の減少や UDP-GlcNAc (ウリジン-2-リン酸 N-アセチルグ

ルコサミン：糖鎖合成課程における N-アセチルグルコサミンを供与する) の蓄積を招くことを観察した¹²⁾。

そこで、著者等はヒトや動物に対するグルコサミンの抗炎症作用やがん細胞(組織)に対する減少(委縮)作用等に注目して、グルコサミンに生体内機能特異性を持たせる方法を模索した。そして、ヒトや動物がほぼ普遍的に持っている糖結合性タンパク質(レクチン:lectin)の働きを利用することで可能になると考えて、Gal-GlcNH₂構造の二糖類合成を微生物由来の α -ガラクトシダーゼ(α -galactosidase)や β -ガラクトシダーゼ(β -galactosidase)の糖分解酵素活性の逆反応を利用することを試みた。前回の稿で紹介したように、数種類の新規オリゴ糖が合成され、in vitro でそれらオリゴ糖類のがん細胞に対する作用を探索することとした。

がん細胞は比較的扱いやすいヒト慢性白血病由来細胞の K562(浮遊細胞)を用い(図1)、各オリゴ糖ががん細胞の増殖を阻害するか否かについて観察した⁸⁾。その方法について簡単に説明しておこう。

合成したオリゴ糖類は LacNH₂(Gal β 1-4GlcNH₂)、AlloLacNH₂(Gal β 1-6GlcNH₂)、MelNH₂(Gal α 1-6GlcNH₂, 下図参照)、GalLacNH₂(Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNH₂)、MelNAc(Gal α 1-6GlcNAc)、GalLacNAc(Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc)等で、LacNAc(Gal β 1-4GlcNAc)とAlloLacNAc(Gal β 1-6GlcNAc)は既に市販されているものを利用した。



その結果、LacNH₂、AlloLacNH₂、GalLacNH₂等を細胞培養系に添加しても対照(Control)と比較してがん細胞数は有意に減少することはなく、天然動植物由来の他の糖類(lactose, melibiose, glucose, galactose等)でも同様にごん細胞の増殖を抑制することは観察されなかった(図2)。一方、GlcNH₂

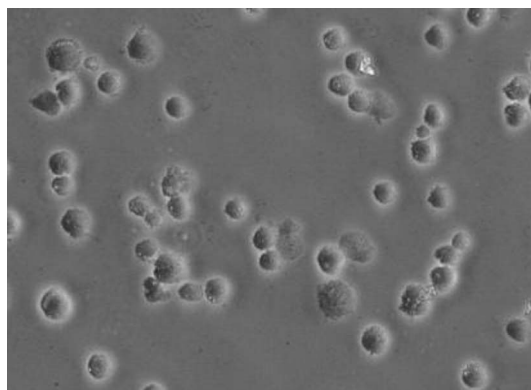


図1 ヒト由来の慢性骨髄性白血病細胞(K562 cell)の顕微鏡像(200倍)

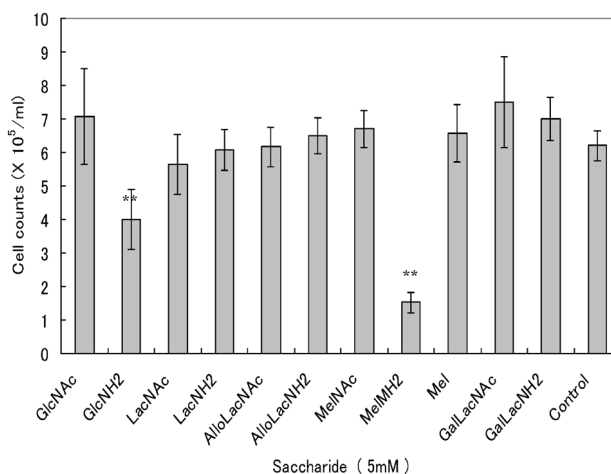


図2 慢性骨髄性白血病細胞(K562)に対する糖類の影響

GlcNAc: N-acetylglucosamine, GlcNH₂: glucosamine, LacNAc: N-acetyllactosamine, LacNH₂: lactosamine, AlloLacNAc: allo-N-acetyllactosamine, AlloLacNH₂: allolactosamine, MelNAc: N-acetylmelibiosamine, MelNH₂: melibiosamine, Mel: melibiose, GalLacNAc: galactosyl-N-acetyllactosamine, GalLacNH₂: galactosyllactosamine
**コントロールに対して有意(p<0.01)に差があることを示す。

やMelNH₂は有意にごん細胞の増殖を抑制するという結果が示され、中でもMelNH₂のがん細胞増殖抑制作用はGlcNH₂よりも強いことが観察された。図2でも解るように、LacNH₂、AlloLacNH₂、GalLacNH₂やLacNAc、AlloLacNAc、MelNAc、GalLacNAc等は期待したがん細胞の増殖を抑制する活性は認められなかった。

単糖である GlcNH₂ が中等度にがん細胞の増殖抑制活性を示すが, Gal が α 結合することで生物学的活性を大きく変化させてしまうことが明らかになった. 何故 α 結合でなければならないのかはこれから解明しなければならない課題でもある. 更に, GlcNH₂ が二個から五个連なったキトサンオリゴ糖類のキトビオース, キトトリオース, キトテトラオース, キトペンタオース類についてもがん細胞増殖抑制作用を調べたが, 対照と比較して効果が認められるものは確認されなかった(図3). GlcNH₂ が連なったキトオリゴ糖が全くがん細胞に対する作用(増殖抑制)を示さなかったことは, がん細胞がこれらのオリゴ糖類の受容体を持たないということを示唆し, 逆に Galα1-6GlcNH₂ に対する特異的な受容体が存在することを示唆していると考えられた. 更に, Galα1-6GlcNH₂ と全く同じ構成糖からなる Galβ1-4GlcNH₂ や Galβ1-6GlcNH₂ 等は何故がん細胞に対する影響を示さないのか, 今後明らかにしなければならない課題でもある. 一方, この MelNH₂ のヒト正常細胞への影響を明らかにしておくことは重要なポイントになる. K562細胞と同様に, HUC-F2細胞(正常ヒト臍帯由来細胞)に対するオリゴ糖類の影響を調べた結果が図4である. 図からも解るように, GlcNH₂ 以外のオリゴ糖類には正常細胞の増殖を阻害するようなものは認められなかった. 著者等はその後他のがん細胞を使った実験を繰り返し, ヒト白血病性B細胞(BALL-1)やヒト大腸がん由来細胞等に対して MelNH₂ がそれらの増殖を抑制することを明らかにしている(図5, 6).

また, MelNH₂ と類似のオリゴ糖類を用いた競争的拮抗試験(competition test)をメリビオース(Mel, Galα1-6Glc)と MelNH₂ の間で実施した. がん細胞浮遊液とメリビオースを予め混合して一定時間(細胞培養器内で2時間程度)経過した後, MelNH₂ を5mM濃度になるよう添加して更に72時間の培養を行った. この結果を図7に示した. 予めがん細胞をメリビオースと混合しておくこと MelNH₂ によるがん細胞増殖抑制作用が30%程度低

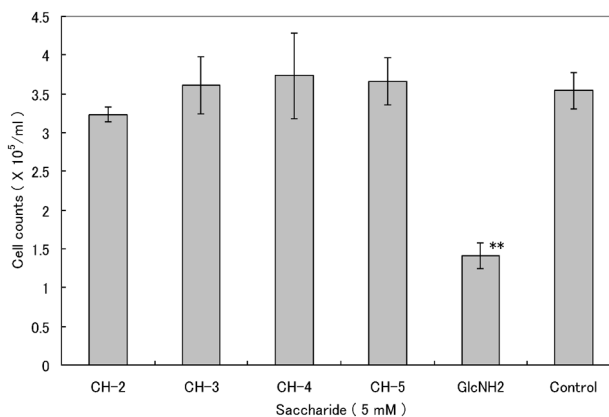


図3 K562細胞に対するキトサンオリゴ糖類の影響
CH-2: chitobiose, CH-3: chitotriose, CH-4: chitotetraose, CH-5: chitopentaose
**コントロールに対して有意(p<0.01)に差があることを示す.

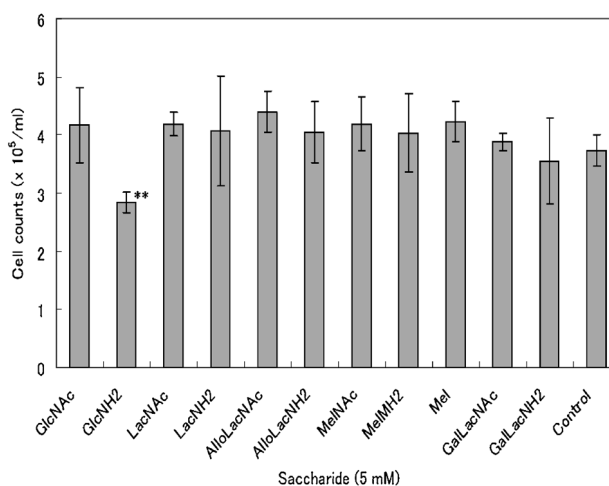


図4 ヒト正常細胞 HUC に対する糖類の影響
糖類は図1で用いたものと同様
**コントロールに対して有意(p<0.01)に差があることを示す.

下することが見られた. これらのことから, MelNH₂ とメリビオースが同一の受容体分子に結合するものと推定された. しかし, MelNH₂ のみのがん細胞の増殖抑制作用を示し, グルコサミンの代わりにグルコースやN-アセチルグルコサミンになっているオリゴ糖は, 何故, 同様の作用を持たないかは不明のままである.

次に, がん細胞のどのような分子がこのオリゴ糖に結合するのかについて, affinity chromatography

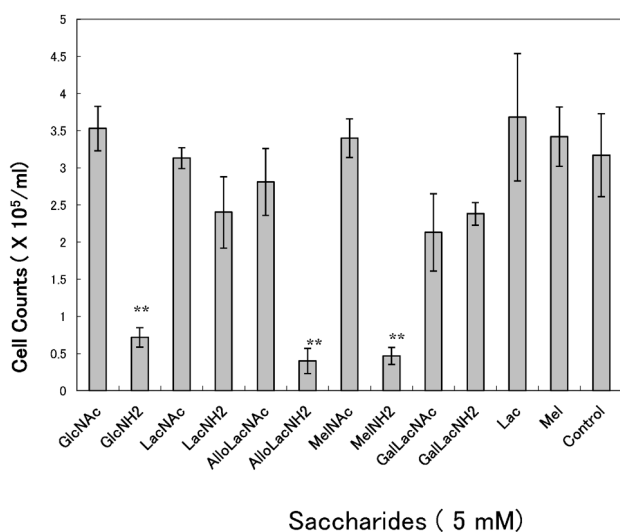


図5 急性リンパ芽球様白血病細胞 (BALL) に対するオリゴ糖類の影響糖類は図1で用いたものと同様。
**コントロールに対して有意 ($p < 0.01$) に差があることを示す。

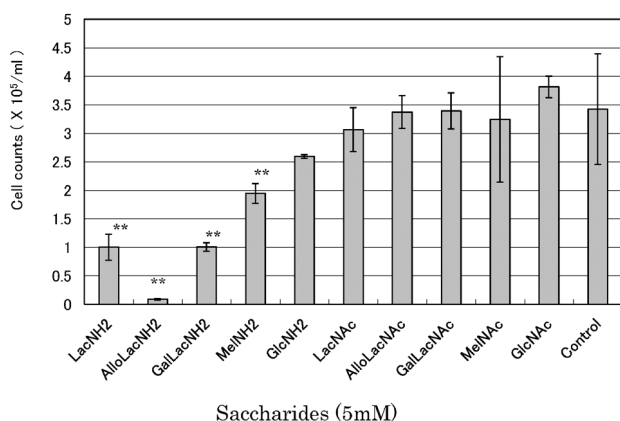


図6 ヒト由来大腸がん細胞 (CW-2) に対する糖類の影響用いた糖類は図1と同様。
**コントロールに対して有意 ($p < 0.01$) に差があることを示す。

という手法と LC/MS/MS (液体クロマトグラフィ質量分析機) 分析機械を使って探索した。こうして得られた細胞由来の生体分子は複数種含まれている可能性が高く、電気的手法 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法, 二次元電気泳動法, 等電点電気泳動法) 等による分離を行ってゲルを染色した後, 分離されたタンパク質を回収し, それぞれタンパク質分解酵素による断片化 (ペプチド化) したも

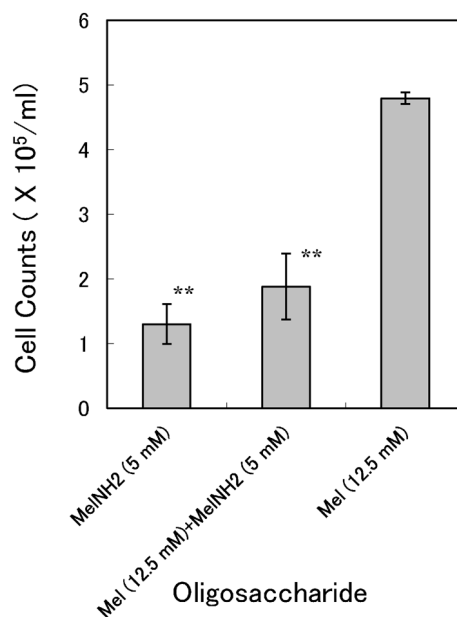


図7 メリビオース (Mel) によるがん細胞増殖抑制試験に対する阻害試験
Mel による MelNH₂ のがん細胞増殖抑制作用に対する拮抗的阻害試験の結果を表し, Mel は予め K562 細胞と混合した後 MelNH₂ を添加して培養した。
**コントロールに対して有意 ($p < 0.01$) に差があることを示す。
MelNH₂

の性状を分析機器 (LC/MS/MS 等) で明らかにして行くのが通常的手段である。

今回, 結果的に分析可能なタンパク質が一つ, 明瞭に分離出来たが分析するには量的に困難な物質が二つ得られた。断片化された数種類のペプチドから得られたアミノ酸配列情報をもとに, 確認されたタンパク質がリボヌクレオリボ核タンパク質の一種の A1 (hnRNP-A1) であった。

hnRNP-A1 は分子量が約 30 kDa で通常, 核内に局在して pre-mRNA の成熟 (splicing) に関与する重要な役割を担う物質の一つとされている^{4,21)}。しかし, がん細胞で急速に増殖をしているフェーズでは hnRNP-A1 は核と細胞質を行き来するシャトルのような動きをされると言われているが²³⁾, がん細胞内でこのような動きをすることの理由は不明である。更に, このタンパク質はラクトース (二糖類) を抱え込む構造を持っていることも報告され²¹⁾, が

ん細胞に於いても細胞質中において何か重要な働きを担っていると考えられるが、全くその働きは不明である。又、この hnRNP-A1 分子は同じがん細胞にあっても、分裂が緩慢になったフェーズ(おそらくがん細胞が休眠状態)では Gal α 1-6GlcNH₂ を添加しても予想したほどの影響を受けない現象が観察された。この現象は「がん細胞の分裂状態(緩慢)によっては細胞質に hnRNP-A1 分子が少なくなる。」といった報告^{3,16)}の内容とも一致すると考えられる。

著者等の研究で、melibiose 固定カラムに結合し、特異抗体を使った免疫学的手法によっても hnRNP-A1 分子が検出されたことは⁸⁾、明らかに hnRNP-A1 が melibiose という Gal α 1-6Glc や Gal α 1-6GlcNH₂ を認識する部位を有していると考えられる。また、その後の実験でも Gal α 1-6GlcNH₂ を固定化したカラムを使って特異的抗体を用いた免疫染色でも hnRNP-A1 が証明され(未発表)、hnRNP-A1 の糖結合性の一部が明らかになってきたと考えている。

更に、未解決の大きな課題として、がん細胞は如何にして MelNH₂ を細胞内に取り込むのか、その糖受容体分子はどのような物質なのか、既知の物質か未知の物質かなどの問題が残っている。動植物の細胞内外に存在して糖に親和性(結合性)を有する物質として登場するのがレクチン(lectin)という比較的小さなタンパク質分子群であることは前号でも触れた⁷⁾。中でも小さな虫から高等動物まで持っているのがガレクチン(galectin)と言われるレクチンで14~15種類が発見されている²⁵⁾。その中で、著者等が注目しているのが galectin-1 という分子量が約14 kDa の小分子である。その糖結合性は β ガラクトース(β -galactose) 特異的であると発見以来定義づけられ、著者等も最近まではそのように捉えていた。しかし、最近になって、Miller 等が galectin-1 には β -galactose 結合部位以外に α -galactose-1-6mannan 認識部位があることを報告している¹⁸⁾。Galectin-1 という分子は今回調べたがん細胞(K562)の galectin 遺伝子の中では最も強く発現し

ていることが網羅的遺伝子発現検査の DNA micro array でも確認されている(未発表)。そこで、著者等は K562 細胞を 10¹² 個程に増やして Gal α 1-6GlcNH₂ 固定化カラムでタンパク質を分離した。これを膜に転写してヒト抗 galectin-1 マウスモノクローナル抗体を用いた検出を実施したところ、分子量が約14 kDa の galectin-1 分子を検出した¹⁰⁾。

これらから、ヒト由来のがん細胞の増殖を抑制する二糖類 MelNH₂ は、galectin-1 や hnRNP A1 に親和性(結合性)を持つことが明らかになったと考えている。更に、重要な点として galectin-1 分子の存在である。Galectin-1 は小さな虫から高等動物に至るまで広く存在することを前述したが、このことはヒト以外の哺乳動物のがん細胞にも MelNH₂ が同様のメカニズムでそれらの増殖を抑制するのではないかと推測させるきっかけになった。そこで、はじめに、ペットであるイヌのがん細胞(リンパ腫細胞)3頭分を他大学獣医学科から譲り受け、ヒトがん細胞実験と同様の条件で GlcNH₂ と MelNH₂ の比較実験を重点的に実施した。その結果、ヒトがん細胞に対して MelNH₂ の抑制効果は48~72時間で顕著に現れてきたが、イヌのリンパ腫細胞では24~48時間以内で強く認められた¹³⁾。また、イヌリンパ腫細胞には明らかな委縮が有意差をもって認められ、アポトーシスの誘導が起こることが示唆された。

最近ではこの galectin-1 と細胞表面に局在する LacNAc (N-acetyllactosamine, Gal β 1-4GlcNAc) の発現量が腫瘍の免疫回避に関連しているとの報告²⁾もされている。Cedeno-Laurent 等は、galectin-1 と LacNAc 結合は、免疫細胞の中で特に強い能力を持つ細胞であるエフェクター白血球のアポトーシスを誘導したり、腫瘍の攻撃性や病態の進行に関与していると予想している。Galectin-1 の過剰発現と沈黙している黒色腫(メラノーマ)をそれぞれマウスに移植すると、galectin-1 を過剰発現している腫瘍は沈黙している腫瘍に比べて有意に大きい事を示している。更に、彼らは LacNAc 合成を阻害するグルコサミン誘導体である 4-F-GlcNAc (peracetyl-4-fluoro-glucosamine) を腫瘍に罹患しているマウス

に投与したところ、T細胞やNK細胞がアポトーシスを回避することが見られ、これを応用すると抗腫瘍免疫レベルを上昇させることで、腫瘍の増殖を弱め、有望ながん治療法となるのではないかと考えている。

4. 今後の展望

最近、四国の香川大学、香川医科大学や香川県が連携して、希少糖に関する研究と実用化に向けての取り組みを加速させていることが注目されている。D-プシコース⁶⁾と言われる単糖は抗生物質プシコフラニンから単離された希少糖で、砂糖(スクロース)の0.3%程度のカロリー、甘味をもつとされている⁵⁾。このD-プシコースは大量生産が出来ず、米国企業が有機化学合成をおこなっていたが、その生体内機能を検証するには量的・予算的なハードルが高かったとされる。今回、我が国の大学等が連携して大量生産への道を切り開いたことは、我々にとっても大いに追い風となると期待している。そして、その注目される機能としてはインシュリン分泌の促進や動脈硬化の防止作用等を持ち、飲食品への利用や医学分野での貢献が期待されている^{11,17,28)}。

我々が進めているグルコサミンを持つ二糖類(MelNH₂, Galα1-6GlcNH₂)も希少糖の仲間と言えるが、研究は我々が進めているのみである。今後の展開としてはマウス等実験小動物を使った移植がんに対する作用を確認することや、糖の投与方法の検討、更により効率のいい合成方法の開発等、課題が多く残されている。更に、医療への利用は今後も多くの時間とエネルギーを必要とするが、挑戦する価値のある課題であると捉えており、ヌードマウスにヒトのがん細胞(組織)を移植して、オリゴ糖投与による影響を調べる計画も立てている。

一方では、イヌやネコなどのペットは現代社会ではその存在は大きく、特に高齢化が一層進み独居世帯が増える我が国の状況では、「家族の一員」として、また「癒し」という存在として、更に核家族の中にあっては子供達への影響力も計り知れないものがあると言える。しかし、彼等ペット達もヒトと同

様になんによる死亡例が増えているのも現実で、国内だけでも10数%のイヌやネコ達(年間150万頭以上)ががんで命を落としている。

過去に少糖類(オリゴ糖類)で直接がん細胞(組織)の増殖が抑制されたという例は、グルコサミン単糖がある種のがん(マウス等)に抑制的に作用するという報告があるが、他に例を見ない。我々が取り組んでいる非常にシンプルな二糖類が、ヒトを始めとして哺乳動物(イヌ、ネコ等)のがん細胞(組織)の増殖を抑制することが様々な例で確認されて行くなら、今後期待以上の社会貢献が出来るものと考えている。

謝 辞

糖類の開発と提供に多大の支援を頂いている焼津水産化学工業㈱の又平芳春博士、三澤義知博士に深く感謝申し上げますと共に、今回、新たにイヌのリンパ腫細胞株をご提供下さった山口大学農学部獣医学科の水野拓也教授と平野博子博士に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Abato, M., Pulcini, D., Dilorio, A., and Schiarione, C., Viscosupplementation with the intra-articular hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis in the elderly. *Curr. Pharm. Des.*, 16, 631-640, 2010.
- 2) Cedeno-Laurent, F., Opperman, M. J., Barthel, S. R., et al., Metabolic inhibition of galectin-1-binding carbohydrates accentuates antitumor immunity. *J. Invest. Dermatology*, 132, 410-420, 2012.
- 3) Celis, J. E., Bravo, R., Arenstorff, H. P. and Lestourgeon, W. M. Identification of proliferation-sensitive human proteins amongst components of the 40 S hnRNP particles. Identity of hnRNP core proteins in the HeLa protein catalogue. *FEBS Lett.*, 194, 101-109, 1986.
- 4) Ding, J., Hayashi, K. M., Zhang, Y., Manche, L., Krainer, A. R. and Rui-Ming, X., Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1(UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev.*, 13, 1102-1115, 1999.

- 5) Granstrom, T.B., Takata, G., Tokuda, M., and Izumori, K., Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 89–94, 2004.
- 6) Green, G. M. and Perlin, A. S., O-isopropylidene derivatives of D-allulose (D-psicose) and D-erythrohexopyranos-2,3-diulose. *Can. J. Biochem.*, 46, 765–70, 1968.
- 7) Hara, Y. and Suyama, K. Biosynthesis of lactosamine in bovine mammary gland. *Carbohydr. Res.*, 330, 65–71, 2001.
- 8) Hosomi, O., Misawa, Y., Takeya, A., Matahira, H., Sugahara, K., Kubohara, Y. and Kudo, S., Novel oligosaccharide has suppressive activity against human leukemia cell proliferation. *Glycoconj. J.*, 26, 189–198, 2009.
- 9) 細見 修, 池田啓一, 奈良岡佑南, 糖鎖が秘める生体内機能. I. オリゴ糖とは何か? 順天堂スポーツ健康科学研究, 2, 129–138, 2011.
- 10) 細見 修, 奈良岡佑南, 池田啓一, 伊藤 匠, ヒト由来 K562白血病細胞の Gal α 1-6GlcNH₂ (MeNH₂) 受容体と取り込み経路について. キチン・キトサンシン研究, 18, 75, 2012
- 11) 早川 茂, 希少糖 D-ブシコースの食品への利用, 生物工学, 86, 434–436, 2008.
- 12) Ichikawa, A., Takagi, M. and Tomita, K., Effect of D-glucosamine on growth and several functions of cultured mastocytoma P-815 cells. *J. Pharmacobiodyn.*, 3, 577–588, 1980.
- 13) 伊藤 匠, 水野拓也, 平岡博子, 奈良岡佑南, 三澤義知, 又平芳春, 池田啓一, 細見 修, イヌの悪性がんに対する GlcNH₂ と Gal α 1-6GlcNH₂ (MeNH₂) の増殖抑制効果について. キチン・キトサンシン研究, 18, 215, 2012.
- 14) Jones, E. A. Studies on the particulate lactose synthetase of mouse mammary gland and the role of α -lactalbumin in the initiation of lactose synthesis. *Biochem. J.*, 126, 67–78, 1972.
- 15) Kaneko, I., Hayamizu, K., Tomita, K., Kikuchi, H., Nagura, T., Shigematsu, N. and Chiba, T. Pilot study of melibiose in patients with adolescent or adult-type atopic dermatitis. *J. Appl. Glicosci.*, (in Japanese) 51, 123–128, 2004.
- 16) Lestourgeon, W. M. B. A., Christensen, M. E., Walker, B. W., Poupore, S. M. and Daniels, L. P., The packaging proteins of core hnRNP particles and the maintenance of proliferative cell stages. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 42, 885–898, 1978.
- 17) Matsuo, T. and Izumori, K. d-Psicose Inhibits Intestinal α -Glucosidase and Suppresses the Glycemic Response after Ingestion of Carbohydrates in Rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 45, 202–206, 2009.
- 18) Miller, M. C., Klyosov, A. and Mayo, K. H., The α -galactomannan Davanat binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. *Glycobiology*, 19, 1034–1045, 2009.
- 19) Molnar, Z. and Bekesi, J. G., Effects of D-glucosamine, D-mannosamine, and 2-deoxy-D-glucose on the ultrastructure of ascites tumor cells in vitro. *Cancer Res.*, 32, 380–389, 1972a.
- 20) Molnar, Z. and Bekesi, J. G., Cytotoxic effects of D-glucosamine on the ultrastructures of normal and neoplastic tissues in vivo. *Cancer Res.*, 32, 756–765, 1072b.
- 21) Murzin, A. G., OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.*, 12, 861–867, 1993.
- 22) Oyama, T., Yodohsi, M., Yamane, A., Kakehi, K. and Suzuki, S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 879, 2928–2934, 2011.
- 23) Pinol-Rome, S. and Dreyfuss, G., Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature*, 355, 730–732, 1992.
- 24) Quastel, J. H. and Cantero, A., Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. *Nature*, 171, 252–254, 1953.
- 25) Rapoport, E. M., Kurmyshkina, O. V. and Bovin, N. V., Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry (Mosc)*, 73, 393–405, 2008.
- 26) Suzuki, Y. S., Momose, Y., Higashi, N., Sigematsu, A., Park, K. B., Kim, J. R. and Ryu, J. M. Biodistribution and kinetics of holmium-166-chitosan complex (DW-166HC) in rats and mice. *J. Nucl. Med.*, 39, 2161–2166, 1998.
- 27) Tomita, K., Nagura, T., Okuhara, Y., Nakajima-Adachi, H., Shigematsu, N., Aritsuka, T., Kaminogawa, S. and Hachimura, S., Dietary melibiose regulates Th cell response and enhances the induction of oral tolerance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2774–2780, 2007.

- 28) 豊田行康, 森茂 彰, 梅村展子, 二村由里子, 井上博貴, 秦毅 司, 三輪一智, 村尾孝児, 西山 成, 徳田雅明, 糖尿病ラットへのグルコース負荷試験におけるD-ブシコースの血糖低下作用. 薬理と治療 38, 261-269, 2010.
- 29) Urashima, T., Saito, T., Ohmisya, K. and Shimazaki, K. Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrums, including the novel trisaccharide; GalNAc alpha 1-3Gal beta 1-4Glc. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1073, 225-229, 1991.
- 30) Warner, T. G., Robertson, A. D. and O'Brien, J. S. Diagnosis of GM1 gangliosidosis based on detection of urinary oligosaccharides with high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.*, 127, 313-326, 1983.

(平成25年2月27日 受付)
(平成25年3月30日 受理)