

**「Benanomicin A を用いた酵母細胞壁マンナンの  
新規調製法の有用性」**

**2018**

**長崎国際大学大学院薬学研究科**

**医療薬学専攻**

**倉岡 卓也**

**Usefulness of new method for the preparation of  
yeast cell wall mannan using Benanomicin A**

**Takuya Kuraoka**



## 目次

緒言	1
第1章 Benanomicin A で調製した <i>Candida krusei</i> 細胞壁マンナン-タンパク質複合体の O-グリコシド結合について	13
1. 実験材料及び実験方法	14
1-1. 試薬	14
1-2. 菌株及び培養	14
1-3. 粗抽出物の調製	14
1-4. Benanomicin A を用いた <i>C. krusei</i> マンナンの調製	14
1-5. Fehling 液によるマンナンの調製	15
1-6. マンナンの希アルカリ処理 ( $\beta$ 脱離)	16
1-7. マンナン及びオリゴ糖の $^1\text{H-NMR}$ 分析	16
1-8. マンナンの化学分析	16
2. 実験結果	18
2-1. Benanomicin 法の確立	18
2-2. マンナン (Fr. K-B 及び K-F) の化学分析	18
2-3. マンナン (Fr. K-B 及び K-F) の $^1\text{H-NMR}$ 分析	19
2-4. マンナン (Fr. K-B 及び K-F) の希アルカリ処理 ( $\beta$ 脱離)	21
3. 考察	23
4. 小括	25
第2章 Benanomicin A を用いて調製した <i>Pichia pastoris</i> 細胞壁マンナンの 2次元 NMR による構造解析	26
1. 実験材料及び実験方法	27
1-1. 菌株及び培養	27
1-2. 粗抽出物の調製	27
1-3. マンナンの調製	27

1-4. マンナンの NMR 分析	27
1-5. マンナン側鎖の平均鎖長の算出	28
2. 実験結果	29
2-1. マンナン (Fr. P-B 及び P-F) の $^1\text{H}$ -NMR 分析	29
2-2. マンナン (Fr. P-B) の 2 次元 NMR 分析	31
2-3. マンナン (Fr. P-B) の全体構造	36
3. 考察	37
4. 小括	39
総括	40
謝辞	43
参考文献	44

## 緒言

真菌は微生物の中でも細菌とは異なり、核や細胞内小器官をもつ真核生物に属する。キノコ、カビ及び酵母を含む生物群であり、現在認識されている種数だけでも 10 万種程度、未知の菌種を含めると 150 万種にも及ぶと推定されている[1, 2]。真菌のほとんどは、球状の酵母型または糸状をした菌糸型のどちらか一方の形態で存在するが、両方の形態をとる二形性菌も存在する。菌糸は管状の細胞であり、真菌によって隔壁で細胞が仕切られているものと、隔壁がないものがある[3]。細胞内には、膜で覆われた核、ミトコンドリア及びリボソーム等の細胞内小器官を有する。ヒトの細胞膜はコレステロールがリン脂質二重層に挿入されているが、真菌ではエルゴステロールがその成分に代わって存在している。また、最外層に位置する細胞壁の構成成分は  $\beta$ -1,3-グルカン、 $\beta$ -1,6-グルカン、キチン、マンナン-タンパク質複合体（タンパク含量は極めて少ないので、以降では、マンナンと省略する。）及び糖脂質等を含んでおり、細菌の細胞壁とは大きく異なる（図 1）[4, 5]。

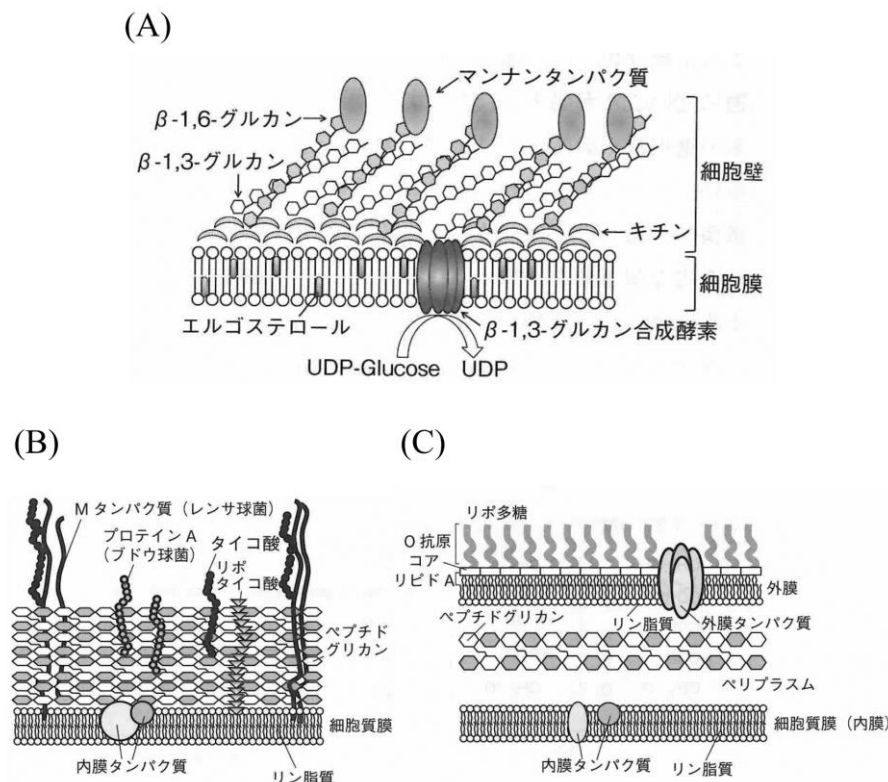


図 1 真菌及び細菌の細胞壁構造[5]

(A) 真菌 (B) グラム陽性細菌 (C) グラム陰性細菌

真菌には 2 つの生殖方法がある。有性孢子による有性生殖を行う場合と二分裂や無性孢子等による無性生殖を行う場合である。大部分の真菌は、生活環に有性生殖と無性生殖を持つが、無性生殖のみしか知られていない菌種も存在する。無性生殖では、酵母の出芽や二分裂、または糸状菌の無性孢子（分生子）によって、基本的には同一クローンが増殖を続ける。このような菌を無性世代（アナモルフ）または不完全世代という。分生子は菌糸から伸びた分生子柄の先端が分化して形成されるが、孢子嚢や菌糸の中に形成される内生分生子と外側に形成される外生分生子の 2 種類がある。一方、有性生殖では、同種間の異なる細胞が細胞質融合を起こした後に、二核が融合して減数分裂することにより有性孢子（配偶子）を形成する。このような菌を、有性世代（テレオモルフ）または完全世代という。

真菌の分類は、有性器官の形質により分類されており、子嚢菌門には *Candida* 属、*Aspergillus* 属、担子菌門には *Cryptococcus* 属、*Rhodotorula* 属、ケカビ門には *Mucor* 属等の主要な病原性真菌が分類されている（表 1）[5]。このように、ヒトに対して病原性を示す真菌は多岐にわたって存在しており、530 種程度とされている。

**表 1** ヒト病原性真菌の分類[5]

界	門	旧分類の門 (有性孢子)	病原性真菌の属
真菌界	子嚢菌門	子嚢菌門 (子嚢孢子)	<i>Pneumocystis</i> <i>Candida</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trichophyton</i> <i>Exophiala</i>
	担子菌門	担子菌門 (担子孢子)	<i>Rhodotorula</i> <i>Malassezia</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Trichosporon</i> <i>Schizophyllum</i>
	ケカビ門	接合菌門 (接合孢子)	<i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>

真菌が原因となるヒトの疾患は、真菌症、カビ毒中毒症及び真菌アレルギー症の 3 つに分類される。真菌症は病原性をもつ真菌が感染して引き起こされる感染症、カビ毒中毒症は食品を汚染した真菌が産生するカビ毒によって引き起こされる食中毒、真菌アレルギー症は真菌の菌体や孢子成分が抗原となって引き起こされるアレルギー反応を主体とする疾患である。さらに真菌症は感染部位の違いにより 3 つに分類されている。患部が皮膚の表皮や粘膜等に限定し真皮に及ばない表在性真菌症、患部が表皮に止まらず、真皮や皮下組織にまで及ぶ深部表在性真菌症、患部が肺、肝臓、心臓、脳等の内部臓器にまで及ぶ深在性真菌症である。深在性真菌症は、骨髄等の臓器移植を受けた後や、ステロイド剤または免疫抑制薬が投与されている患者、小児、高齢者、糖尿病患者、免疫不全患者、抗がん剤治療患者等、極度に免疫力が低下している患者に対して日和見的に発症する。このような易感染者に誤った診断や不適切な抗生物質の投与が施された場合は、根治が極めて困難な状態に陥る。深在性真菌症の代表的なものは、*Aspergillus* 症、*Cryptococcus* 症及び *Candida* 症であり、これらは“三大真菌症”と呼ばれている[5]。深在性真菌症の中でも *Candida* 症は感染患者の死亡率が比較的高いため、特に関心が高い[6]。

近年、18S rRNA 遺伝子配列による系統分類では、真菌は植物よりも動物に近いことが明らかとなっている。そのため、治療薬の選択性や診断薬におけるマーカーの選定に困難を伴うことが多い。現在、わが国では *Candida* 症の治療薬として、RNA 合成及びタンパク質合成を阻害するフルオロピリミジン系、ラノステロール 14  $\alpha$ -脱メチル酵素を阻害して細胞膜成分のエルゴステロール合成を阻害するアゾール系、エルゴステロールに結合して膜機能を障害するポリエン系及び細胞壁に存在する 1,3- $\beta$ -D-グルカン合成酵素を阻害して 1,3- $\beta$ -D-グルカン合成を阻害するキャンディン系が臨床使用されている。深在性 *Candida* 症の約 60%を *C. albicans* が占めているが、近年アゾール系に対して耐性を持つ *C. glabrata* や *C. krusei*、キャンディン系に耐性を持つ *C. parapsilosis* 等が増加していると報告されている[6-9]。

このように、抗生物質に対する感受性が菌種によって異なるため、これらの感染症を適切な抗生物質で治療するためには正確な診断が必要である。深在性真菌症の診断法としては、直接病変部の起因菌を検出する確定診断法と、間接

的に起因菌の関与を検出する補助診断法に分けられる。確定診断法としては、顕微鏡検査及び培養検査が用いられている。顕微鏡検査は、真菌の形態が菌種により著しく異なることから、検体を顕微鏡観察することで起因菌を特定する方法である。培養検査法は、まず臨床検体から真菌を分離培養して、市販の分離同定用平板寒天培地上で生育した真菌を肉眼もしくは顕微鏡によって観察する方法である。近年、*Candida* 属の主要な 5 菌種 (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* 及び *C. krusei*) については、種特異的な色調のコロニーを形成させる発色培地が開発され、臨床材料からの検出頻度も向上している[10]。しかし、これらの診断は同定までに長時間を要することから、実際には確定診断の前に医師の臨床所見と、遺伝子診断法及び抗原検出診断法等の補助診断とを組み合わせる暫定的な診断が行われる（表 2）[5]。遺伝子診断法は、真菌の 18S rRNA をターゲットとし、菌種固有の塩基配列を検出・同定する方法であり、補助診断法の中では唯一菌種の同定が可能である。培養を必要とせず、高感度であるので、従来の診断法で起因菌の検出が不能または培養に長時間を要する場合でも迅速に検出が可能である。一方、保険適用がなく、検体からの核酸抽出が煩雑であること、常在菌も検出してしまうため反応特異性に限界があること等解決すべき問題点も多いため、新しい手法が種々検討されている。抗原検出診断法は、真菌がもつ特異的な細胞成分または代謝物を、血清学的な手法により検出する方法である。起因菌を確定することはできないが、主要な病原性真菌に共通する細胞壁構成成分の一つである  $\beta$ -D-グルカンの検査法は、深在性真菌症の一次スクリーニングを目的とする場合に有用なため、広く受け入れられている。*Aspergillus* 症、*Cryptococcus* 症及び *Candida* 症のような代表的な病原性真菌の血清学的診断は、各真菌の細胞壁に特徴的な多糖類であるガラクトマンナン[11]、グルクロノキシロマンナン[12, 13]及びマンナン[14]をそれぞれ特異抗原として検出するキットが臨床で頻用されている（図 2）[5]。

これらの細胞壁多糖類は細胞壁最外層に位置することから、酵母とその宿主との相互作用の初期段階において最も重要な役割を担っていると思われる。したがって、免疫学的性状の解明のみならず、感染メカニズムの解明及び抗真菌薬開発の目的で病原性 *Candida* 属を含めた真菌細胞壁マンナンの生合成や構造解析の研究が積極的に行われてきた[15, 16, 17]。



**表 2** 真菌感染症の補助診断法[5]

分類	対象菌種	標的検出物	検出法	特徴
血清診断	真菌共通	1,3-β-D-グルカン (細胞壁の主要構成成分)	比色法、比濁法	深在性真菌症において感度・特異度が高く、感染初期から検出される。診断スクリーニングに適している。
	カンジダ	カンジテック抗原 (易熱性糖タンパク抗原)	ラテックス凝集法	迅速・簡便性に優れるが、感度・特異度にやや劣る。
		マンナン抗原 (特異抗原)	ラテックス凝集法、 ELISA法	特異度は両法ともに優れるが、感度はELISA法のほうが優れる。
		D-アラビニトール (カンジダの代謝産物)	比色法	特異度は優れるが、感度はやや低い。
	アスペルギルス	ガラクトマンナン (アスペルギルス属の細胞壁構成成分)	ラテックス凝集法、 ELISA法	ラテックス法は特異度・利便性・迅速性に優れるが感度が低い。ELISA法は特異度はラテックス法と変わらないが感度が優れる。早期のアスペルギルス症、アスペルギローマの診断に有用。
	クリプトコックス	グルクロノキシロマンナン (莢膜多糖体成分)	ラテックス凝集法	感度・特異度に優れ、信頼性が高い。
遺伝子診断	カンジダ	18S rRNAのなかの特異領域	リアルタイムPCR法	長所：感度・特異度が高い。菌種・属レベルの同定が可能。血液以外の検体も適応可能。リアルタイムPCR法は、PCR法の欠点であった定量性・再現性が改良された。短所：コストが高い。特殊な検査機器が必要。
	アスペルギルス	18S rRNAのなかの特異領域	リアルタイムPCR法	
	ニューモシスチス	18S rRNAのなかの特異領域	リアルタイムPCR法	

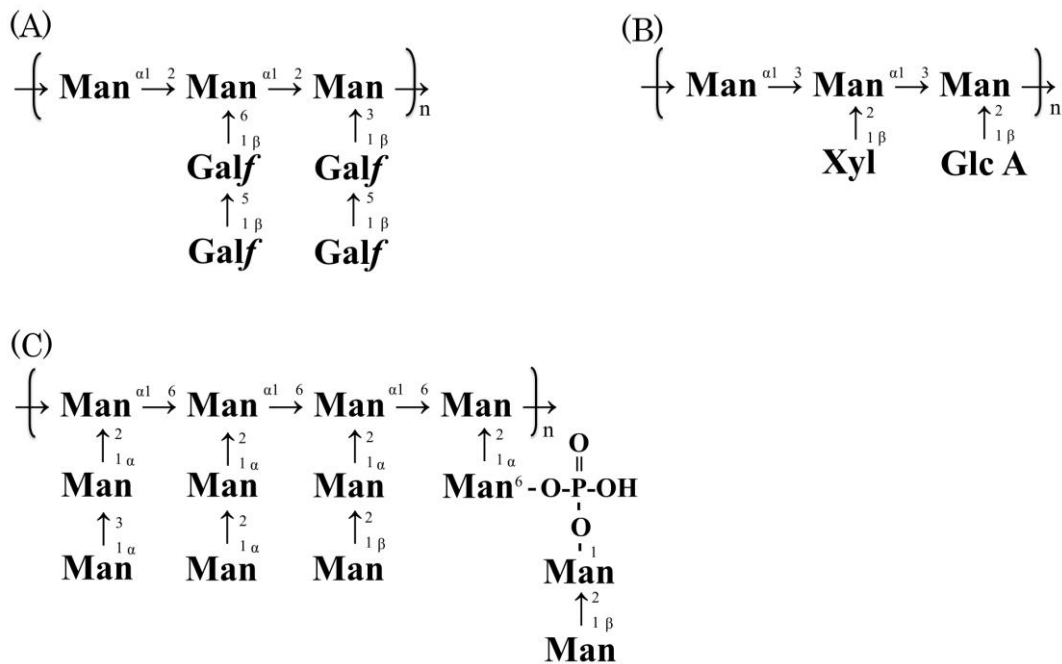


図 2 主な真菌の細胞壁多糖類の化学構造

(A) *Aspergillus fumigatus* : ガラクトマンナン

(B) *Cryptococcus neoformans* : グルクロノキシロマンナン

(C) *Candida albicans* : マンナン

Man: マンノース、Gal $f$ : ガラクトフラノース、Xyl: キシロース

GlcA: グルクロン酸

*Candida* 属酵母由来のマンナンは、多数のマンノース残基が重合した分子量約 10~2000 kDa の糖タンパク質群であり、その大部分は親水性の高い不均一な多糖から構成されている[18]。マンナンの基本構造は、糖タンパク質としての一般的な構造的分類に従えば、高マンノース型に分類され[15]、その生合成は *N*-結合型糖鎖と *O*-結合型糖鎖で異なる過程を経て行われている。*N*-結合型糖鎖の生合成は、まず小胞体内でドリコールジリン酸にコアとなる GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> より成るオリゴ糖が結合し、タンパク質のアスパラギン残基へ糖鎖付加されるまではその他の真核細胞生物と共通である。次に、グルコシダーゼが作用することによりこのオリゴ糖鎖のグルコース 2 残基が除去され、レクチン様シャペロンタンパク質によりタンパク質部分が正しく折りたたまれると、さらにグルコース及びマンノースが 1 残基ずつ除去されてゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体内では数十種類のマンノース転移酵素が関与して糖鎖の伸長が行われる[19, 20]。

合成された *N*-結合型糖鎖のうち、高度に重合したものは、細胞表層へと輸送される[19, 20]。一方、*O*-結合型糖鎖については、小胞体内でドリコールリン酸にマンノース残基が結合した後、タンパク質のセリンまたはトレオニン残基へマンノース残基が直接付加される[20]。また、*N*-結合型糖鎖とは異なり、ゴルジ体に輸送されずに小胞体内で糖鎖の伸長が行われ、一般的に重合度は 10 以下であることが知られている[20]。このように生合成されたマンナンは、細胞壁内層に存在する  $\beta$ -グルカンとマンナンのタンパク質部分を介して 2 種類の結合様式で局在していることが報告されている[21-23]。一つは **Proteins with Internal Repeats-Cell Wall Protein (PIR-CWP)** と呼ばれる反復するアミノ酸配列中のグルタミン残基と  $\beta$ -1,3-グルカンが直接連結するもの[21]、二つ目は **Glycosylphosphatidylinositol-Cell Wall Protein (GPI-CWP)** と呼ばれる GPI アンカー型タンパク質の C 末端側 GPI のマンノース残基またはリン酸基を介して  $\beta$ -1,3-グルカン及び  $\beta$ -1,6-グルカンと連結するものが報告されている[22, 23]。これらのマンナン-タンパク質複合体のマンナン部分は、宿主細胞への接着[24]、正常な細胞形態の維持[25, 26]、実験動物に対する致死活性[25, 26]及び菌体外でのバイオフィルム形成[27]等への関与が報告されている。一方、マンナン-タンパク質複合体のタンパク質部分については、機能、アミノ酸配列及び糖鎖付加を受ける割合等は未解明であるものが多い。*C. albicans* ではマンナンとは異なるが比較的大きな分子の糖部分を有し、292 アミノ酸残基でコードされる MP58 と呼ばれる分子量 58 kDa のマンノプロテイン (*N*-結合型糖鎖：約 19%、*O*-結合型糖鎖：約 4%) が、接着や抗原性に寄与していること等が報告されている[28, 29]。

*Candida* 属酵母のマンナンの化学構造決定の最初の報告は 1960 年の Bishop ら[30]による *C. albicans* マンナンに関するものである。彼らはこのマンナンが  $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3 及び  $\alpha$ -1,6 結合で構成される高度に分岐した構造であることを報告した。さらに、真菌マンナンにおける  $\beta$  結合の存在に関して、1969 年、Gorin ら[31]は、メタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) の細胞壁マンナンから  $\alpha$  及び  $\beta$  結合を含むマンノオリゴ糖を得ることで証明した。また、病原性 *Candida* 属酵母を迅速かつ正確に同定する目的で、1968 年に Fukazawa ら[32]のグループは *Candida* 酵母の表層抗原 (マンナン) に対する幾つかの因子抗体を作製した。すなわち医学的に重要な *Candida* 酵母 (*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. stellatoidea*、*C.*

*guilliermondii*、*C. krusei*、*C. parapsilosis*、*C. kefyr* 及び *C. glabrata*) の加熱死菌でウサギを免疫して得られた抗血清を他種の加熱死菌で相互に吸収した 10 種の因子抗体 (1、4、5、6、8、9、11、13、13b 及び 34) によって菌種の同定が可能であることを報告している (表 3) [33]。各因子抗体に対応する抗原決定基の解析は、Fukazawa ら[34, 35]や Suzuki ら[36-43]によって精力的に行われてきた。

**表 3** 医学的に重要な *Candida* 種を識別するための凝集パターン[33]

\*抗原因子の番号は、各因子抗体の番号に対応している。

菌種又は血清型	抗原因子*			
<i>C. albicans</i> A型	1	4	5	6
<i>C. tropicalis</i>	1	4	5	6
<i>C. albicans</i> B型	1	4	5	13b
<i>C. stellatoidea</i>	1	4	5	
<i>C. guilliermondii</i>	1	4		9
<i>C. krusei</i>	1			11
<i>C. parapsilosis</i>	1			13 13b
<i>C. kefyr</i>	1		8	
<i>C. glabrata</i>	1	4	6	34

Shibata ら[44]並びに Kobayashi ら[45]は、*C. albicans* のマンナンはリン酸基を含み、それに連結する希酸に不安定な  $\beta$ -1,2 結合オリゴ糖鎖が、抗原活性に強く関与することを報告した。また、*C. albicans* serotype A 株のマンナンに、 $\beta$ -1,2 及び  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基を含むオリゴ糖鎖 (Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man 及び Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man) の存在を示し[46, 47]、これらが serotype A 株マンナンの特異抗原 (因子 6) であることを証明した[48]。後に、この因子 6 は *C. tropicalis* や *C. stellatoidea* type II のマンナンからも検出されている[49, 50]。一方、ホスホジエステル結合する  $\beta$ -1,2 結合オリゴマンノシル基は、*C. albicans* serotype A 及び B の両菌株の共通抗原として存在し、これらは因子 5 に相当することが明らかにされている[51]。次いで、Shibata ら[52]及び Kobayashi ら[53]は *C. parapsilosis* 及び *C. kefyr* 由来のマンナンを構造解析することにより、因子 1、4 及び 13b が  $\alpha$ -1,2 結合や  $\alpha$ -1,3 結合から構成されるオリゴ糖側鎖に対応することを明らかにし、そのうち因子 4 は  $\alpha$ -1,2、

$\alpha$ -1,3 及び  $\alpha$ -1,6 結合を含む分岐するオリゴマンノシル側鎖であることを証明した。*C. parapsilosis* の特異的抗原とされる因子 13 は、因子 13b と同じ糖鎖を抗原決定基とするが、その糖鎖の周辺構造が *C. albicans* serotype B との反応性に影響するものと考えられている [54]。さらに、Shibata ら[55]は、*C. guilliermondii* の細胞壁マンナンの構造解析を行うと共に、このマンナン中の  $\beta$ -1,2 結合及び  $\alpha$ -1,3 結合マンノース残基から構成される側鎖が因子 9 に相当することを明らかにした。一方、Kobayashi ら[56]は、*Saccharomyces cerevisiae* の野生株及び変異株から得られるマンナンを用いて免疫化学的性状を検討した結果、マンナンの  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基から成る主鎖に 2 つの短い側鎖が置換する部位が因子 8、側鎖未置換の主鎖部分が因子 9、 $\alpha$ -1,2 結合と非還元末端  $\alpha$ -1,3-結合マンノース残基から成る側鎖が因子 34 にそれぞれ対応することを明らかにした。このように各因子抗体の抗原決定基と共に、*C. grabrata* を含む主要な病原性 *Candida* 酵母の細胞壁マンナンの全体構造も明らかにされた[17, 57]。しかし、先にも述べたように近年耐性菌が頻発している *C. krusei* の簡易診断法開発という観点から、本菌に特異的な因子 11 に相当する抗原決定基及びその細胞壁マンナンの全体構造を早急に明らかにする必要がある[17]。

酵母マンナンの化学構造解析において最も重要なポイントの一つは、マンナン分子をできる限り無傷の状態に分離精製することである。*Candida* 酵母の細胞壁マンナンの基本構造は、 $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基から構成される主鎖に二糖から八糖程度のオリゴ糖が側鎖として連結するクシ状構造を呈している (図 2 C)。これまで、Suzuki らのグループ [45, 47, 48, 51, 56, 57]による *Candida* 酵母細胞壁に由来するマンナンの化学構造及び抗原決定基の解析は、Fehling 試薬によって銅-マンナン錯体を沈殿させる Fehling 液法によりマンナンを調製し、 $\alpha$ -1,6 結合を比較的選択的に切断することのできる希酸処理や加酢分解 (アセトリシス)、及び  $\alpha$ -マンノシダーゼ等の酵素によって側鎖をオリゴ糖へと断片化したのち、各種クロマトグラフィーで分画した各オリゴ糖のメチル化分析、質量分析 (GC-MS)、旋光度測定及び核磁気共鳴 (NMR) 分析等の結果を総合的に解釈することで行われてきた。しかし、この一連の手法では分子中の目的以外のグリコシド結合が少なからず加水分解されてしまう可能性がある。例えば、マンナン調製法として Fehling 試薬を用いた場合、操作過程でマンナン分

子からアルカリに不安定な *O*-結合型糖鎖が失われることが懸念される(図3)。

*O*-グリコシド結合に関与するセリンまたはトレオニンのカルボニル基の $\alpha$ 水素は、アルカリ条件下で引き抜かれ、酸素原子が脱離基として働くことにより糖部分が脱離する。一方、*N*-グリコシド結合においては、そのような脱離基が存在しないため、アルカリ処理では *N*-結合型糖鎖は遊離しない。(図3)。実際、*O*-結合型糖鎖の分析は、対象となるタンパク質をアルカリ処理し、遊離した糖鎖を分析するという方法が一般的に行われている。

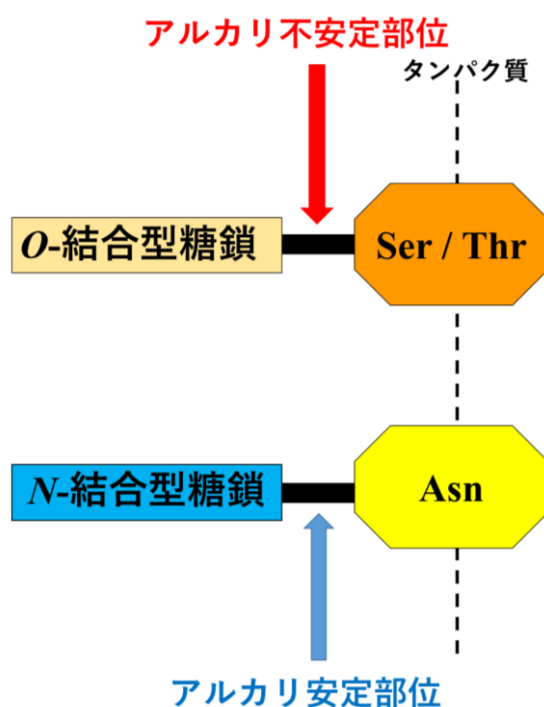


図3 酵母のマンナン-タンパク質複合体

Ser：セリン Thr：トレオニン Asn：アスパラギン

1988年、新しい抗真菌剤を開発する目的で、真菌類の細胞壁表層に特異的に存在する $\beta$ -グルカン、キチン及びマンナン等の多糖類に焦点を当てた斬新なスクリーニング系の構築により、放線菌 *Actinomadura sporax* の培養濾液から新規抗生物質 Benanomycin A が単離された[58]。Benanomycin A は、ベンゾ[a]ナフタセキノン骨格に D-アラニンと二糖が結合した構造を持ち、分子量 864 の暗赤色の化合物である(図4) [58]。この低分子化合物が抗真菌活性、抗グラム陽性細菌活性及び抗 HIV 活性を持つことが報告されたことから、新しい感染症治療薬

のリード化合物として期待された[59, 60]。しかし、哺乳動物腎臓細胞に対する顕著な急性毒性が見出されたことにより、治療薬として臨床化することを断念した経緯を持つ。一方、Benanomicin A の研究過程において、本化合物が  $\text{Ca}^{2+}$  の存在下、感受性真菌の細胞壁表層に存在するマンナンに対して選択的に結合することで、殺菌作用が開始されることが明らかにされた[61]。Benanomicin A と真菌由来の多糖及び糖タンパク質酵素との結合性について、 $\alpha$ -D-マンノース残基及び  $\alpha$ -D-グルコース残基を認識して特異的に結合する代表的なレクチンである Concanavalin A と比較して表 4 に示した[62]。細胞壁由来の高分子マンナンと高度に糖鎖化された分泌型酵素のインベルターゼやカルボキシペプチダーゼに対して良好な親和性を示したが、 $\beta$ -グルカン及びキチンについては全く反応しない。Benanomicin A は D-マンノース残基の 2, 3, 4, 6 位の遊離水酸基のいずれか及び立体構造を認識して結合することが示唆されているが[62]、2 位及び 3 位が分岐する多糖だけでなく、直鎖型の  $\alpha$ -1,6 結合マンナンでも共沈することが明らかになっている [61, 62] (表 5)。以上のように、Benanomicin A は結合機序について未解明であるが、マンノース残基との特異的な結合性の観点から Concanavalin A とほぼ等価とみなすことができ、高分子タンパク質でない点を除けば、レクチンの定義に適うものである (表 5) [62, 63, 64]。

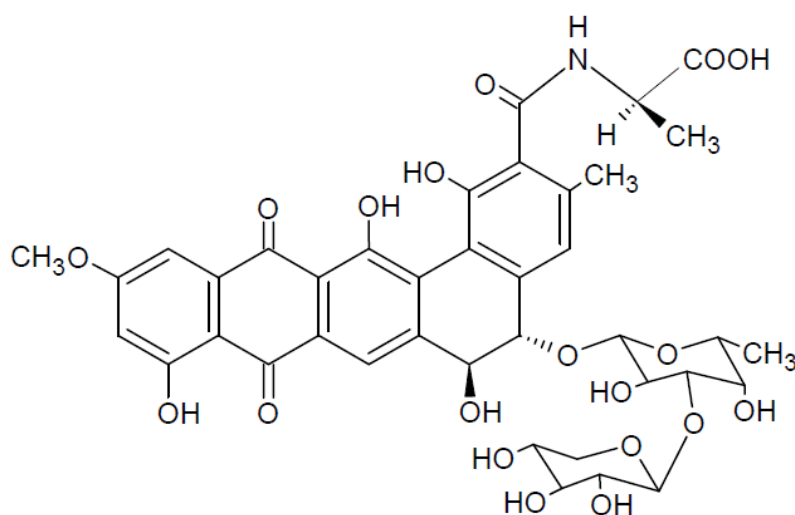


図 4 Benanomicin A の化学構造[58]

**表 4** 真菌細胞壁構成成分等への Benanomicin A 及び Concanavalin A の吸着[62, 63, 64]

成分	Benanomicin A	Concanavalin A
キチン	－	－
キトビオース	－	－
キトサン	－	－
グルカン	－	－
マンナン	○	○
カルボキシペプチダーゼ	○	○
インベルターゼ	○	○
トリプシン	－	－
キモトリプシン	－	－
アルカリホスファターゼ	－	－

○:吸着する   －:吸着しない

**表 5** Benanomicin A と Concanavalin A の性状の比較[62]

	Benanomicin A	Concanavalin A
構造（特徴）	ベンゾ[a]ナフタセンキノン骨格	蛋白質
分子量	864	106.000 (サブユニット 26.500)
糖特異性	$\alpha$ -及び $\beta$ -D-マンノピラノシド	$\alpha$ -D-マンノピラノシド $\alpha$ -D-グルコース
糖鎖認識部位	D-マンノース残基の 2, 3, 4, 6位遊離水酸基	D-マンノース残基の 3, 4, 6位遊離水酸基
糖結合分子数	2分子/Benanomicin A1分子	1分子/サブユニット
活性に関与する 金属イオン	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$
生理活性作用	抗真菌活性、抗HIV活性	血球凝集反応、抗HIV活性、癌細胞 凝集活性、リンパ球分裂促進等

本研究では、酵母細胞壁マンナンの化学構造解析における従来までのマンナン調製法の問題点を指摘すると共に、それを解消するための新たな調製方法を構築することを目的とした。

第1章では、レクチン様活性を持つ抗生物質 Benanomicin A を利用することで、酵母細胞壁マンナンの新規調製法を確立し、細胞壁マンナンの化学構造が未知な *C. krusei* について適用することを試みた。

第2章では、第1章で構築した新規法を、非病原性酵母の *Pichia pastoris* に適用し、より複雑な化学構造を有するマンナンの調製を行うと共に、マンナン分子を全く分解することなく2次元 NMR 分析のみで構造解析することを試みた。



## 第1章 Benanomicin A で調製した *Candida krusei* 細胞壁マンナン-タンパク質複合体の O-グリコシド結合について

*Candida krusei* は、*Candida* 属酵母の DNA 核型分析及び rRNA 分析による系統解析の結果、その相同性において他の *Candida* 属酵母とは異なる部分が多くみられ、むしろ糸状菌である *Aspergillus* 属に類似することが見出されている[65, 66, 67]。また、細胞壁表層のマンナンに関しても、他の *Candida* 種には存在しない *C. krusei* に特異的な抗原構造が存在することが免疫化学的研究により示されている[17]。さらに、近年においてはアゾール系抗真菌薬に耐性を有する菌株の臨床分離が増加の一途を辿る等[9]、臨床的に極めて重要な病原性酵母のひとつとして認識されるようになった。しかしながら、*C. krusei* 細胞壁マンナンの全体構造及び部分的な糖鎖構造は報告されていないことから[17]、本菌の宿主細胞への接着をはじめとするマンナンの生物学的機能についてもほとんど明らかにされていない。

本章の目的は、レクチン様機能を持つ抗生物質 Benanomicin A を用いて、強アルカリに曝される過程を持たない新しいマンナン調製法の確立を試みた。この方法で調製した *C. krusei* マンナンの O-結合型糖鎖を、既存の Fehling 液法で調製したマンナンの場合と比較検討し、より緩和な条件下で調製できることを実証すると共に、*C. krusei* マンナンの O-結合型糖鎖の存在とその構造解析を試みた。

## 1. 実験材料及び実験方法

### 1-1. 試薬

*Actinomadura sporax* の培養濾液より抽出された抗生物質 Benanomicin A (純度: 83.9%) は、明治製菓株式会社製薬研究センターの五味修一博士より供与された。

### 1-2. 菌株及び培養

*Candida krusei* NBRC 0584 株 (以前の *C. krusei* IFO 0584 株) は、製品評価技術基盤機構 (千葉) より購入した。酵母エキス加サブロー液体培地 (Yeast Extract 0.5% [w/v]、Peptone 1.0% [w/v]、Glucose 2.0% [w/v]) を用い、菌の増殖が定常期になるまで 26°C、100 rpm で 48 時間振とう培養した[68]。なお、Yeast Extract 及び Peptone は BD Biosciences 社を、Glucose は富士フィルム和光純薬社のものを用いた。

### 1-3. 粗抽出物の調製

培養液に少量のホルムアルデヒドを加えて殺菌し、上清を除いて生理食塩水で洗浄後、遠心分離 (3000 rpm、10 分、4°C) により集菌しアセトンで脱脂乾燥した。この乾燥菌体に精製水を加えて 130°C で 3 時間オートクレーブを行い、遠心分離 (3000 rpm、10 分、4°C) した上清をセルロースチューブ 24/32 (三光純薬) を用いて 48 時間流水透析し、エバポレーターにより減圧濃縮後、凍結乾燥させて粗抽出物とした[68]。この方法により、主に水溶性の高分子成分 (マンナン-タンパク質複合体、タンパク質またはマンノプロテイン及び核酸等) が混合物として抽出される[69]。粗抽出物の収量は、乾燥菌体の 18.5% (w/w) であった。

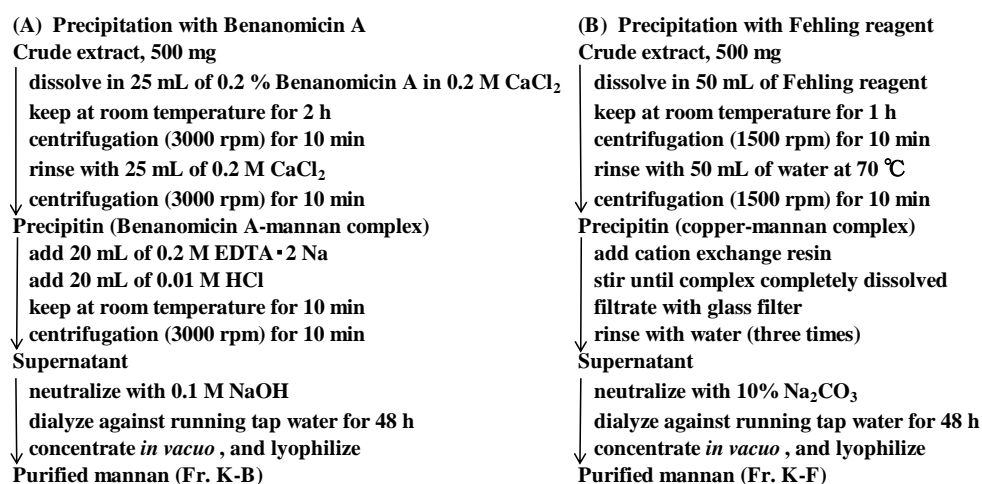
### 1-4. Benanomicin A を用いた *C. krusei* マンナンの調製

500 mg の粗抽出物を 1.5 mL の精製水に溶かし、25 mL の 0.2% Benanomicin A / 0.2M CaCl<sub>2</sub> 水溶液を激しく攪拌しながら加えた。室温で 2 時間放置後、得られた赤紫色の沈殿物を遠心分離 (3000 rpm、10 分、4°C) によって回収し、20 mL の 0.2M CaCl<sub>2</sub> 水溶液で攪拌しながら洗浄した。沈降物 (Benanomicin A-マンナン錯体) を 100 mL ビーカーに移し、20 mL の 0.2M EDTA・2Na 水溶液及び 20 mL

の 0.01M HCl 水溶液を沈殿物に添加した。室温で 10 分放置後、沈降物 (Benanomicin A 及び  $\text{Ca}^{2+}$ -EDTA $\cdot$ 2Na キレート) を遠心分離 (3000 rpm、10 分、4°C) によって除去した。次いで、上清を 0.1M NaOH で中和した。得られたマンナン溶液を 48 時間流水透析し、エバポレーターにより減圧濃縮後、凍結乾燥を行った (**Scheme 1-A**)。上記の方法を Benanomicin 法と呼び、この方法で得られた *C. krusei* マンナンを Fr. K-B と省略する。

#### 1-5. Fehling 液によるマンナンの調製

500 mg の粗抽出物を 1.5 mL の精製水に溶かした。4%  $\text{CuSO}_4$  (A 液) 及び 15% NaOH / 20% 酒石酸ナトリウムカリウム水溶液 (B 液) 1:1 (v/v) を用時調製し、この混液 50 mL を粗抽出物溶液に添加して激しく攪拌した。室温で 1 時間放置後、得られた青色沈殿物を遠心分離 (1500 rpm、10 分間、4°C) によって回収し、70°C の温湯 5 mL で攪拌しながら洗浄した。マンナンと  $\text{Cu}^+$  のキレート物を 100 mL ビーカーに移し、アンバーライト IR-120 ( $\text{H}^+$ ) 樹脂 (ORGANO) を添加した。 $\text{Cu}^+$  に基づく青色の沈殿が完全に消失するまで攪拌した。次いで、この溶液をろ過し、ろ液を 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  で中和した。得られたマンナン溶液を 48 時間流水透析し、エバポレーターにより減圧濃縮後、凍結乾燥を行った[70] (**Scheme 1-B**)。この方法で得られた *C. krusei* マンナンを Fr. K-F と省略する。



**Scheme 1** Benanomicin method (A) and Fehling method (B).

#### 1-6. マンナンの希アルカリ処理 ( $\beta$ 脱離)

精製法の異なる 2 種のマンナン (Fr. K-B または K-F) 200 mg を 30 mL の 0.1M NaOH に溶解し、保温器内で 25°C において 18 時間放置後、1M HCl を加えて中和した。エバポレーターにより減圧濃縮後、少量の精製水に溶解し、Bio-Gel P-2 (400 mesh、BioRad) カラム (2.5×100 cm) を用いて、精製水でゲルろ過 (0.25 mL/min)、溶出液を 2.5 mL ずつ分取した[44]。溶出液中の糖の含量は、フェノール・硫酸法[71]で発色後、吸光度 (490 nm) 測定して求めた。

#### 1-7. マンナン及びオリゴ糖の $^1\text{H}$ -NMR 分析

各マンナン (Fr. K-B または K-F) 15 mg または、各オリゴ糖 1~3 mg を  $\text{D}_2\text{O}$  650  $\mu\text{L}$  に溶解し、JNM-AL400 (400 MHz) 核磁気共鳴装置 (日本電子) を用いて測定した。測定温度を 70°C とし、内部標準物質はアセトン (2.217 ppm) を用いた。

#### 1-8. マンナンの化学分析

総糖量は、フェノール・硫酸法[71]により次のように測定した。1 mg/mL になるように試料を精製水に溶解し、試験管に 0.5 mL 取り、5% フェノール 0.5 mL 及び  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.5 mL を加え、37°C で 20 分間インキュベートした。その後、Model 680 マイクロプレートリーダー (BioRad) で 490 nm の吸光度を測定した。標準物質として D-マンノースを用いた。

総タンパク質含量は、Lowry らの Folin 改良法[72]により次のように測定した。2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /0.1M NaOH (A 液)、0.5%  $\text{CuSO}_4$  (B 液)、1% 酒石酸カリウムナトリウム (C 液) 50:1:1 (v/v) を用時調製し、この混液 3 mL を試料 1 mg に加えて攪拌後、室温で 30 分間インキュベートし、Model 680 マイクロプレートリーダー (BioRad) で 750 nm の吸光度を測定した。標準物質としてウシ血清アルブミンを用いた。

総リン酸量は、Ames-Dubin 法[73]を一部改良して次のように測定した。1 mg/mL になるように試料を精製水に溶解後、試験管に 0.2 mL 取り、1%  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  /エタノール溶液を 0.2 mL 加え、強熱灰化し冷後 1M HCl 1 mL を加え、沸騰水浴上で 15 分間加水分解を行った。冷後、10% L-アスコルビン酸、0.42% モリブデン酸アンモニウム/0.5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1:6 (v/v) を用時調製し、この混液 2.5 mL を添加

した。45°C で 20 分間インキュベートし、V-730 BIO Spectrophotometer (jasco) で 820 nm の吸光度を測定した。標準物質として  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を用いた。

各化学分析は、2 種のマンナン調製法により 3 回調製したものについて、それぞれ行った。

## 2. 実験結果

### 2-1. Benanomicin 法の確立

抗生物質 Benanomicin A のレクチン様活性を利用した酵母細胞壁マンナンの調製法を確立するために、Benanomicin A およびマンナンの濃度（比率）、キレート剤の種類、反応温度及び時間等、100 以上の条件を検討した結果、Benanomicin A が  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でマンノース残基がオリゴ糖以上に重合した糖鎖と複合体を形成し、多糖程度に重合度したものは沈降することが明らかとなり（データは示さない）、**Scheme 1-A** に示すような新しい方法を構築することが出来た。この方法は、従来の Fehling 液法（**Scheme 1-B**）のような強アルカリ性下にマンナンが曝露される過程が一切存在しない。Fr. K-F の収率が粗抽出物の 30.1% (w/w) であったのに対して、Fr. K-B の収率は 54.7% (w/w) となり、大幅な収量の増加が認められた。また、その操作時間も大幅に短縮できることがわかった。

### 2-2. マンナン (Fr. K-B 及び K-F) の化学分析

Fr. K-B 及び K-F の化学分析の結果を **Table 1** に示す。先行研究では、*C. albicans* における粗抽出物の組成は、糖: 72.8% (w/w)、タンパク質: 20.5% (w/w)、リン酸: 5.1% (w/w) だったことが報告されている[74]。Fr. K-B 及び K-F の組成は、いずれも少量のタンパク質が含まれていたが、リン酸は検出されなかった。したがって、今回得られた Fr. K-B 及び K-F においては、核酸やタンパク質等の夾雑物がほとんど除去されているものと考えられた。また、Fr. K-B においてタンパク質含量が比較的多いことは、緩和な条件下でマンナンを調製できた結果、マンナンと共沈するポリペプチド鎖が切断されず、透析膜内に保持されたものと推定される。

**Table 1** Chemical compositions of *C. krusei* mannans, Frs. K-B and K-F.

Mannan	Total Carbohydrate <sup>a</sup> (%)	Total Protein <sup>b</sup> (%)	Total Phosphate <sup>c</sup> (%)	Yield <sup>d</sup> (%)
Fr. K-B	88.8	9.1	0	54.7
Fr. K-F	94.9	3.4	0	30.1

<sup>a</sup> Determined by phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method using D-mannose as a standard.

<sup>b</sup> Determined by Folin method using bovine serum albumine as a standard.

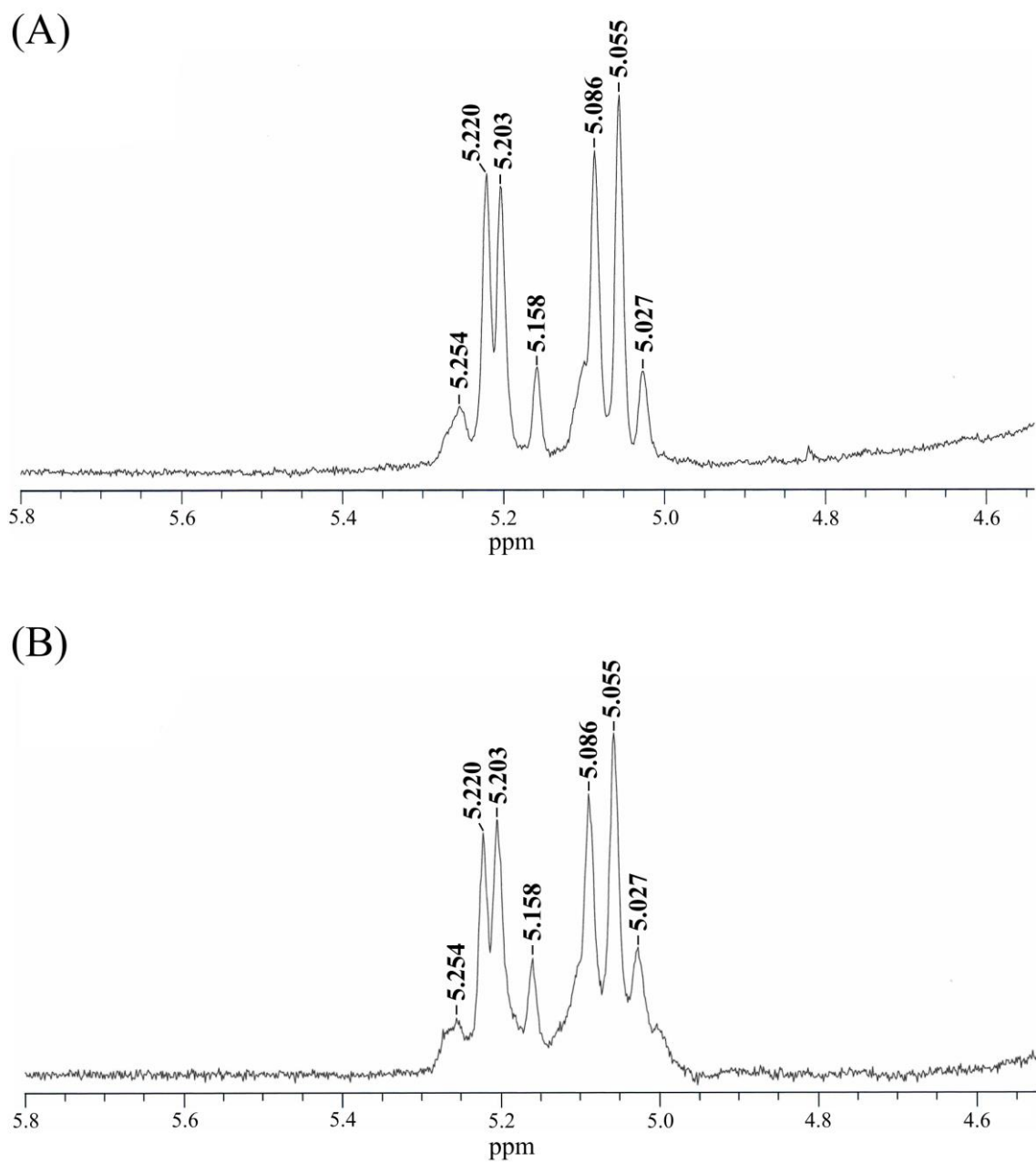
<sup>c</sup> Determined by Ames-Dubin method using KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as a standard.

Data of a~c are representative of at least three independent experiments of new preparation method or conventional method that yielded similar results.

<sup>d</sup> Weight based of crude extract (The average of three preparation experiments).

### 2-3. マンナン (Fr. K-B 及び K-F) の <sup>1</sup>H-NMR 分析

Fr. K-B 及び K-F の主要構成成分である *N*-結合型糖鎖の化学構造に関する情報を得るために、<sup>1</sup>H-NMR 分析を行った (**Fig. 1**)。その結果、アノマープロトン領域 (4.7~5.7 ppm の磁場範囲) において、いずれも類似したスペクトルパターンを示した。したがって、異なる 2 つの方法で調製した *C. krusei* マンナンの *N*-結合型糖鎖は、結合様式及びその存在割合がほぼ同一であることが示された。この結果から、Benanomycin 法が Fehling 液法と同様に、細胞壁マンナンの調製法として有効であることを示している。また、Kobayashi ら[45]の NMR 解析手法に基づき分析した結果、4.7~5.0 及び 5.4~5.7 ppm の範囲のシグナルが存在しないことは、Fr. K-B 及び K-F が β 結合マンノース残基及びホスホジエステル結合を介したマンノース残基を含まないことを示した。α-1,2 及び α-1,6 結合マンノース残基に由来する 4 つの強いシグナル (5.220, 5.203, 5.086 及び 5.055 ppm) 及び α-1,3 結合マンノース残基に由来する 3 つの弱いシグナル (5.254, 5.158 及び 5.027 ppm) がいずれのマンナンでも観察されたことから、*C. krusei* の細胞壁マンナンは α 結合マンノース残基のみから成るものと考えられた。

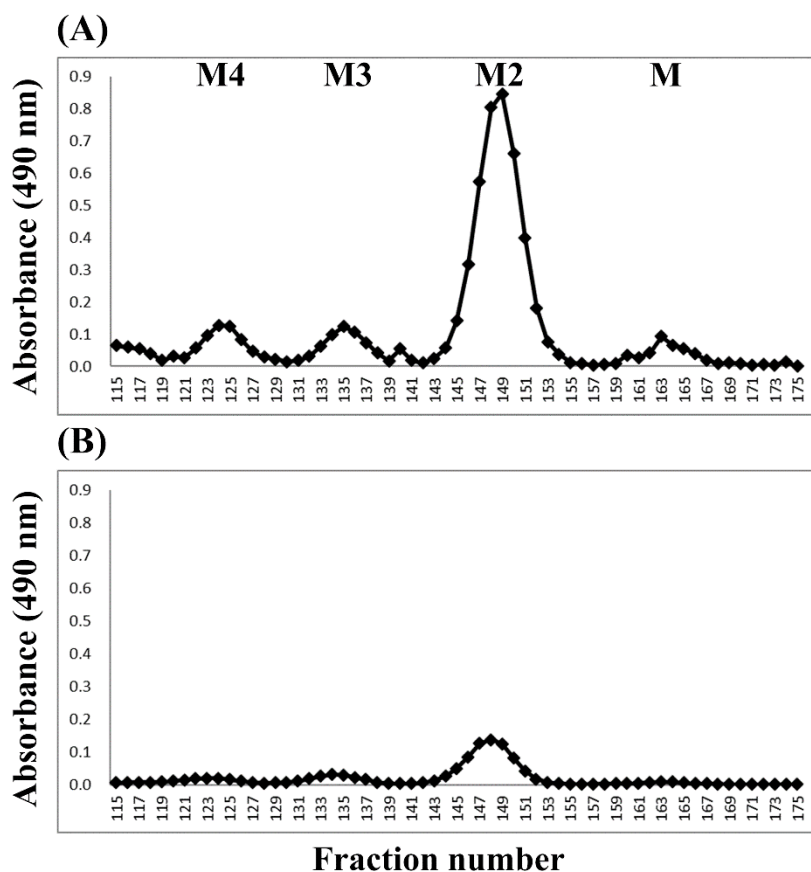


**Fig. 1**  $^1\text{H}$ -NMR spectra (anomeric region) of *C. krusei* mannans, Frs. K-B (A) and K-F (B).



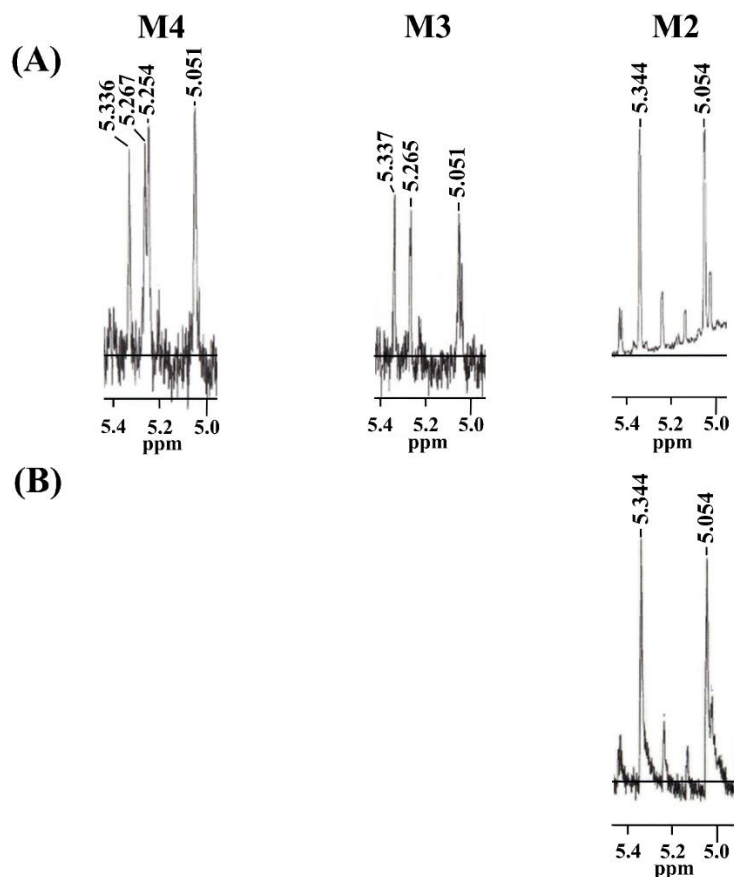
#### 2-4. マンナン (Fr. K-B 及び K-F) の希アルカリ処理 ( $\beta$ 脱離)

**Fig. 2** に示すように、*C. krusei* マンナンのアルカリ不安定糖鎖の情報を得るために、Fr. K-B 及び K-F について希アルカリ処理を行い、ゲルクロマトグラフィーにより分画した。Fr. K-B から遊離するオリゴ糖は、二糖 (M2)、三糖 (M3) 及び四糖 (M4) であり、マンノースの生成はごく少量であった。一方、Fr. K-F からは、NMR における分析可能な量を得ることができたのは M2 のみであった。得られたオリゴ糖をそれぞれ凍結乾燥し、その重量から Fr. K-B 及び K-F から放出されたオリゴ糖の収率を算出した結果、それぞれ 20.0 及び 1.4% (w/w) であった。この結果は、Fr. K-F の *O*-結合型糖鎖の大部分が Fehling 液法による調製段階で失われたことを示している。すなわち、Benanomicin 法では、従来法でほとんど失われていた *O*-結合型糖鎖を、収率良く残存させることに成功した。



**Fig. 2** Elution profiles in Bio-Gel P-2 gel filtration column chromatography of oligosaccharides obtained from Frs. K-B (A) and K-F (B) by the alkali treatment ( $\beta$ -elimination). M4, M3, M2, and M indicate the eluted positions of standard mannooligosaccharides, tetraose, triose, biose, and mannose, respectively.

アルカリ処理で得られたオリゴ糖の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを **Fig. 3** に示す。Kobayashi ら[50]の知見に基づいて分析した結果、これらのオリゴ糖のすべてが  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基のみから成ることを確認した。すなわち、M2、M3 及び M4 の化学構造は、 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ 、 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ 、及び  $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$  とそれぞれ同定された (**Table 2**)。



**Fig. 3**  $^1\text{H}$ -NMR spectra of oligosaccharides obtained from Frs. K-B (A) and K-F (B) by the alkali treatment ( $\beta$ -elimination). M4, M3, and M2 indicate tetraose, triose and biose, respectively.

**Table 2**  $^1\text{H}$  chemical shifts (anomeric region) of oligosaccharides[50]

Oligosaccharide	Sugar residue				Chemical shift (ppm)			
	D	C	B	A	D	C	B	A
M2			$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$				5.054	5.344
M3			$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$			5.051	5.265	5.337
M4		$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2$	$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2$	$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$	5.051	5.267	5.254	5.336

Man indicate mannose residue.

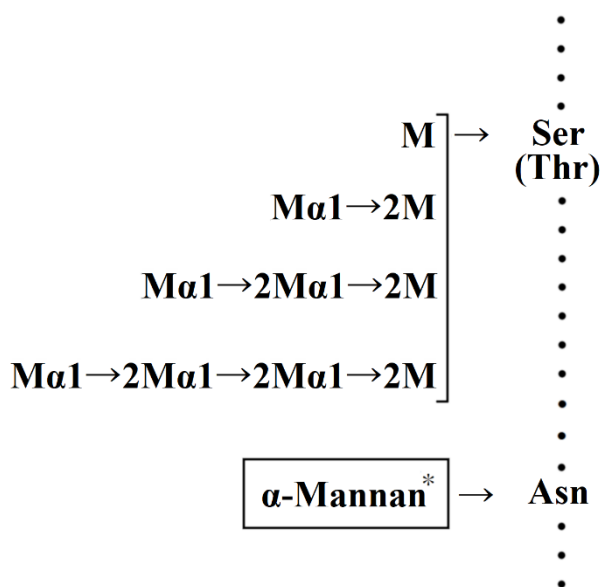
### 3. 考察

本章では、レクチン様活性を持つ Benanomicin A を利用した新規マンナン調製法を構築し、構造が未解明の *C. krusei* NBRC 0584 マンナンへの適応を試みた。その結果、既存の酵母マンナン調製法として確立されている Fehling 液法で得られるマンナンと同様の化学組成及び NMR スペクトルパターンを持つマンナンを収率よく調製できることが示された。また、NMR スペクトルには  $\beta$ -グルカン等に相当するシグナルがほとんど認められなかったことから、不純物の混在も極めて少ないものと考えられる(データはしめさない)。この結果は、Benanomicin A が、*C. krusei* マンナンとより効果的に沈降したものと解釈できる。しかし、今回はマンナン以外の多糖類の存在の有無を構成糖分析等で確認していないため、今後行う必要がある。さらに、このマンナンを  $\beta$  脱離することで、*O*-結合型糖鎖を収率良く得ることに成功すると共に、*O*-結合型糖鎖が  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基のみから成る低分子量のオリゴ糖であることが明らかとなった (Fig. 4)。また、このマンナンの *N*-結合型糖鎖は、主に  $\alpha$  結合マンノース残基から構成され、 $\beta$  結合マンノース残基はほとんど含まれないことが示された。 $\beta$  脱離による遊離糖量から、このマンナン分子は約 20%の *O*-結合型オリゴ糖と約 80%の *N*-結合型多糖から構成されているものと思われる。この *N*-結合型糖鎖の詳細な化学構造は未だ報告されていないことから、今後の研究課題となるが、*C. krusei* マンナンの NMR スペクトルにおけるシグナルパターン (Fig. 1) より、他の主要な *Candida* 種のマンナン構造として提示されているような”クシ状構造”とは大きく異なることが示唆されている (データ未公表)。

これまでの病原性 *Candida* 酵母の免疫化学的研究は、その大部分が細胞壁マンナンの *N*-結合型糖鎖を標的としてきた。これらの報告[16,17]では、細胞壁マンナンの調製法として Fehling 液法が採用されている。しかし、この従来法ではマンナンが強アルカリ性の Fehling 溶液に曝されているため、マンナンの *O*-結合型糖鎖の含量は約 5%以下と調製段階でほとんど失われている。したがって、*Candida* 酵母マンナン中の *O*-結合型糖鎖の含量は、これまでに認識されているよりも著しく多い可能性が示唆される。今後は *C. krusei* のみならず、他種の *Candida* 酵母マンナンについても、Benanomicin 法を適用して細胞壁マンナンの

化学構造を再確認し、*O*-結合型糖鎖が免疫化学的性状や感染機構にどの程度関わっているか調べる必要がある。

*Candida* 酵母の宿主への感染機構に関する最近の研究では、*O*-結合型糖鎖の合成に関与する *O*-マンノシルトランスフェラーゼまたは  $\alpha$ -1,2-マンノシルトランスフェラーゼのタンパク質をコードする *PMT* または *MNT* 遺伝子ファミリーを欠く突然変異株が瀕用されている。これらの報告では、宿主細胞への接着[75, 76]、実験動物の致死活性[76]、宿主免疫応答[77, 78]、抗生物質耐性[79]、バイオフィルム形成[80]等、マンナン中の *O*-結合型糖鎖の重要な役割が議論されている。しかし、マンナンの *O*-結合型糖鎖が *Candida* 感染メカニズムやマンナンの生物学的活性に直接関与するか否かは、野生菌株からマンナンを無傷の状態で分離調製し、 $\beta$  脱離により得られた糖鎖を各生体反応系の阻害剤として利用する等して証明する必要がある。したがって、Benanomycin 法は病原性酵母の免疫化学的性状のみならず、宿主との感染メカニズムを解明する生物学的な研究においても有用となるであろう。さらに、Benanomycin A のレクチン様活性を利用することにより、酵母マンナン類の調製だけでなく、様々な分子が混在するあらゆる生体成分から、マンノースを優位に含む配糖体や糖タンパク質等の新規生理活性物質成分の分離調製において大きく貢献できるものと考えられる。



**Fig. 4** Structure of *O*-linked sugar chains in the cell wall mannan of *C. krusei*. Ser, Thr, Asn, and M indicate serine, threonine, asparagine, and mannose, respectively. \*The chemical structure of *N*-linked sugar chains in this mannan is not clear yet.

#### 4. 小括

本章では、マンノース残基に特異的なレクチン様機能を持つ抗生物質 Benanomicin A を用いて、*C. krusei* 酵母細胞壁マンナンを調製することにより以下の知見を得た。

##### 1) Benanomicin 法の有用性

Benanomicin A を酵母マンナンの調製法に利用した結果、マンナンを強アルカリに曝すことなく緩和な条件下でマンナンを調製することができた。すなわち、アルカリ不安定部位（タンパク質部分のセリンまたはスレオニン残基に *O*-グリコシド結合するオリゴ糖鎖）を収率良く調製することに成功した。したがって、Benanomicin 法は病原性酵母の免疫化学的性状の解明のみならず、宿主との感染メカニズムに対する *O*-結合型糖鎖の関与を証明する生物学的研究においても有用であると考えられる。

##### 2) *C. krusei* マンナンの化学構造

Benanomicin A を利用した方法で調製した *C. krusei* マンナンの NMR 分析の結果より、このマンナンは  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,及び  $\alpha$ -1,6 結合から成る *N*-結合型糖鎖（詳細な構造は未同定）と、マンノース、二糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ )、三糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) 及び四糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) の *O*-結合型糖鎖で構成されていることが明らかとなった。

## 第2章 Benanomicin A を用いて調製した *Pichia pastoris* 細胞壁マンナンの2次元 NMR による構造解析

アセトリシスは、多糖の  $\alpha$ -1,6 グリコシド結合を選択的に切断する限定加水分解法とされ、生物由来の多糖成分の免疫化学及び生合成研究におけるエピトープや酵素基質の調製等を目的に広く利用されてきた。Gorin と Perlin[80]は、酵母マンナンの抗原構造解析に初めてアセトリシスを適用し、マンノ二糖 (Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man) を単離することに成功した。その後、様々な酵母マンナンについてアセトリシスを用いた数多くの論文が発表された[39, 57, 81-85]。一方で、Gorin と Spencer [86]による幾つかの酵母マンナンの NMR 分析の結果から、数種の酵母マンナンには  $\beta$  結合マンノース残基が含まれることが示された。しかし、アセトリシスでは  $\alpha$ -1,6 グリコシド結合と同様に  $\beta$ -1,2 グリコシド結合も速やかに分解されることから、 $\beta$ -1,2 結合を含むオリゴ糖を得ることはできなかった。後に、Kobayashi ら[87]は、*P. pastoris* マンナンを用いて  $\beta$ -1,2 結合を保持したまま  $\alpha$ -1,6 結合を選択的に調製できる緩和アセトリシスを確立した。その後、この改良法は様々な病原性 *Candida* 属の細胞壁マンナンの研究に適用されるに至った。さらに NMR 分析における解析手法の発展に伴い、化学的分解を不要とするマンナンの構造解析法も報告されるようになってきた[86, 88]。

第1章において、抗生物質 Benanomicin A を用いて、従来のマンナン調製法 (Fehling 液法) より緩和な条件下で、 $\alpha$  結合のみから成る *C. krusei* マンナンを調製することに成功した。

本章では、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を多量に含むクシ状構造を持つことで知られる *P. pastoris* マンナンの化学構造[87,89]について、新規法 (Benanomicin A によるマンナン調製及び2次元 NMR 分析法) を適用し、その有用性の実証を試みた。

## 1. 実験材料及び実験方法

### 1-1. 菌株及び培養

*Pichia pastoris* NBRC 0948 株 (IFO 0984 株を継代) は、製品評価技術基盤機構 (千葉) より購入した。培養は、Kobayashi ら[87]の条件にしたがって培養した。

### 1-2. 粗抽出物の調製

粗抽出物は第 1 章と同様の方法で調製した。アセトン脱脂菌体の収量は乾燥菌体の 13.2% (w/w) であった。

### 1-3. マンナンの調製

マンナンの調製は、第 1 章と同様に Benanomicin 法及び Fehling 液法により行った。以後 Benanomicin 法により得られた *P. pastoris* マンナンを Fr. P-B、Fehling 液法により得られた *P. pastoris* マンナンを Fr. P-F とする。

### 1-4. マンナンの NMR 分析

$^1\text{H}$ -NMR 分析は、サンプル (3~10 mg) を  $\text{D}_2\text{O}$  650  $\mu\text{L}$  に溶解し、JNM-AL400 (400 MHz) 核磁気共鳴装置 (日本電子) を用いて測定した。測定温度を  $70^\circ\text{C}$  とし、内部標準物質はアセトン (2.217 ppm) を用いた。 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルについては、サンプル (15~25 mg) を  $\text{D}_2\text{O}$  650  $\mu\text{L}$  に溶解し、測定温度を  $55^\circ\text{C}$  とし、内部標準物質は  $\text{CD}_3\text{OD}$  (49.00 ppm) を用いて同じ核磁気共鳴装置により測定した。C-H COSY (Two-dimensional  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  correlated spectroscopy) は、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR 分析と同じ条件下で記録した。2D-HOHAHA (Two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn) は、サンプル (10~20 mg) を  $\text{D}_2\text{O}$  650  $\mu\text{L}$  に溶解し、測定温度を  $45^\circ\text{C}$  として測定した。*P. pastoris* マンナン中のオリゴマンノシル側鎖の分布は、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの各側鎖に特徴的な H1 シグナル (Table 1) のピーク面積に基づいて算出した[88]。これらの NMR 分析は、マンナン調製法により 3 回調製されたそれぞれの生成物について行った。それらが同じ結果を示したため、もっとも典型的なデータを示した。

#### 1-5. マンナン側鎖の平均鎖長の算出

前報[89]に従って次の式を用いて側鎖の平均鎖長 ( $X$ ) を算出した。

$$X = [(A \times 1) + (B \times 2) + (C \times 3) + (D \times 4) + (E \times 5)] / (A + B + C + D + E)$$

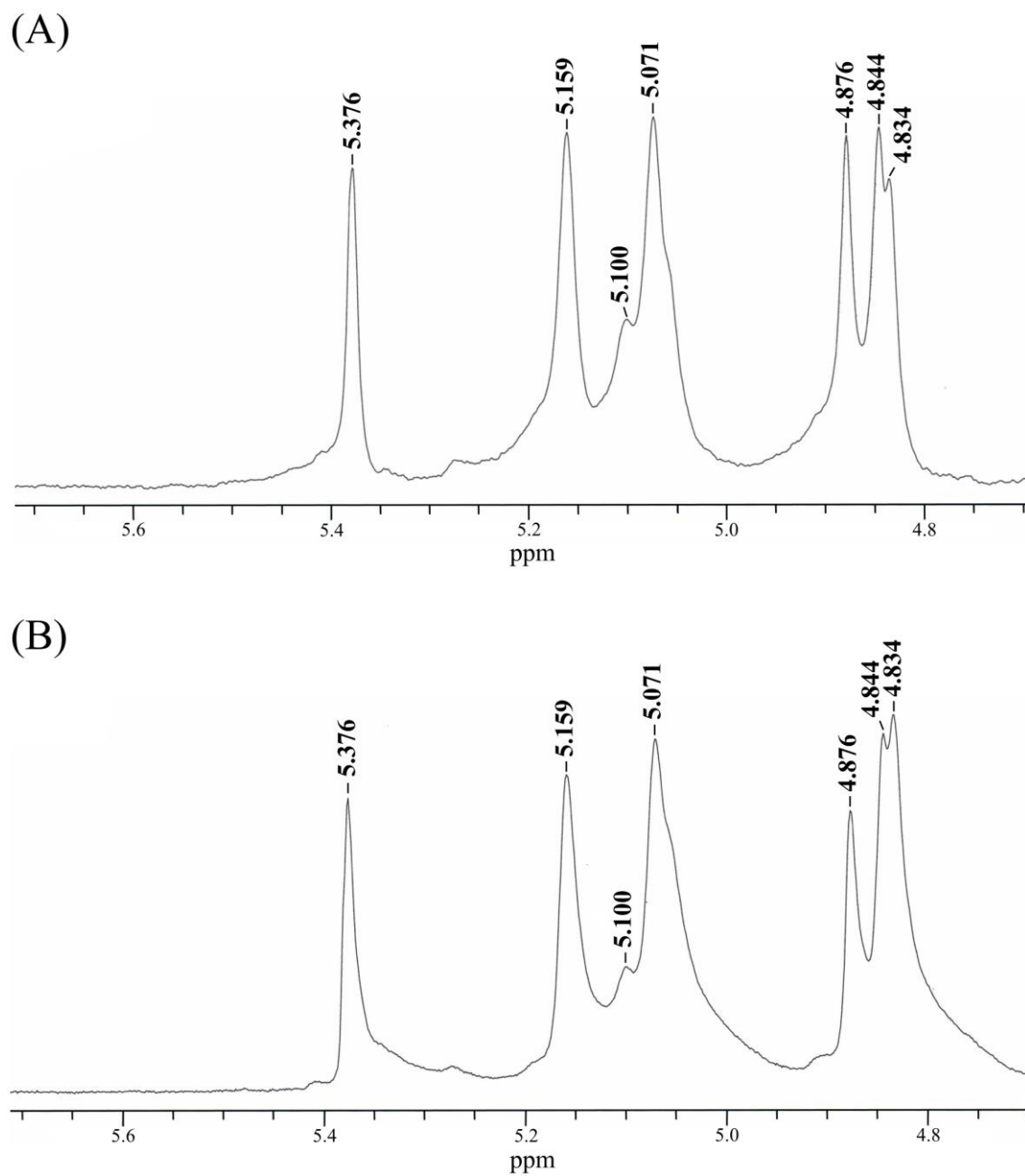
ここで、A～E は、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルの H1 シグナルのピーク面積におけるマンノース (M)、二糖 (M2)、三糖 (M3)、四糖 (M4) 及び五糖 (M5) のモル比を表し、数字 1～5 は、マンノオリゴ糖の重合度を表す。



## 2. 実験結果

### 2-1. マンナン (Fr. P-B 及び P-F) の $^1\text{H}$ -NMR 分析

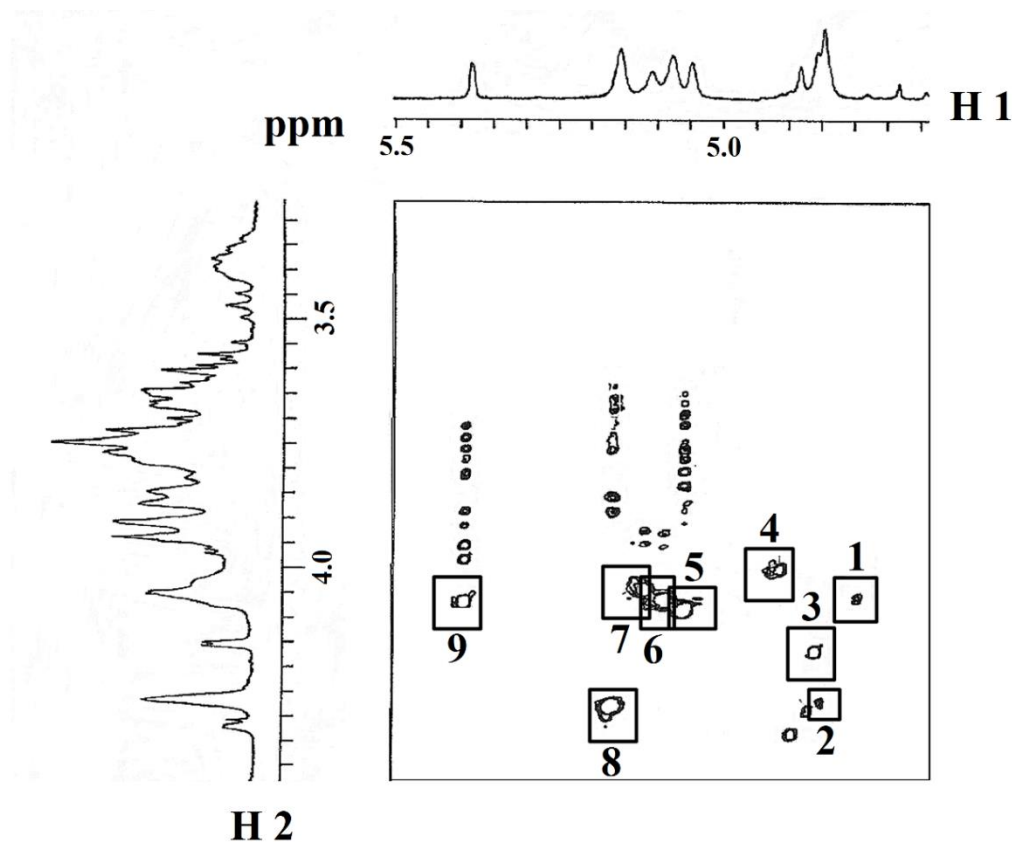
Benanomicin 法が  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を多量に含むマンナンであっても適用可能か検討するために、Fr. P-B 及び P-F の化学構造を  $^1\text{H}$ -NMR 分析により比較した (Fig. 1)。いずれのスペクトルにも、アノマープロトン領域 (4.7~5.7 ppm) において極めて類似するシグナルパターンを示した。以前の報告において、Fehling 液法により得られた調製物の糖成分は、約 97%がマンノースで構成されていることが分かっている[87]。また、前章と同様に  $\beta$ -グルカン等に相当するシグナルもほとんど認められなかった (データは示さない)。さらに、5.4~5.7 ppm の範囲のシグナルが存在しないことは、いずれのマンナンにもホスホジエステル結合を介したマンノース残基が含まれないことを示す。 $\alpha$ -1,2 及び  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基に由来する 3 つの強いシグナル (5.100, 5.071 及び 4.876 ppm)、 $\alpha$ -1,2 及び  $\beta$ -1,2 結合マンノースに由来する 4 つの強いシグナル (5.376, 5.159, 4.844 及び 4.834 ppm) がいずれの画分のパターンで観察された。各シグナルを帰属した結果、細胞壁マンナンは  $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,6 及び  $\beta$ -1,2 結合を含有することが明らかとなった。これらの結果は、Kobayashi ら[87]の報告と一致した。したがって、 $\alpha$  結合のみから構成されるマンナンのみならず、 $\beta$  結合を含むマンナンであっても Benanomicin A を用いて調製できることが明らかとなった。



**Fig. 1**  $^1\text{H}$ -NMR spectra (anomeric region) of *P. pastoris* mannan, Frs. P-B (A) and P-F (B)

## 2-2. マンナン (Fr. P-B) の 2 次元 NMR 分析

Fr. P-B の全体構造の決定は、2 種の 2 次元 NMR マップ上のクロスピークの化学シフト値によって試みた。**Fig. 2** は、Fr. P-B の 2D-HOHAHA スペクトルの 2 次元マップを示す。Kobayashi 及び Shibata ら[55, 87, 89, 90, 91]の報告に基づいて同定可能な 9 つのクロスピークが観察された。すなわち、クロスピーク 1 (H1:4.82, H2:4.06) , 2 (H1:4.84, H2:4.25) 及び 3 (H1:4.87, H2:4.17) の出現は、マンナンが非還元末端と中間  $\beta$ -1,2 結合オリゴマンノシル側鎖を含有することを示す。クロスピーク 4 (H1:4.91, H2:4.00) または 6 (H1:5.06, H2:4.07) 及び 7 (H1:5.09, H2:4.03) は、 $\alpha$ -1,6 結合マンノースから成る主鎖の非置換及び 2-O-置換型にそれぞれ対応する。非還元末端と中間  $\alpha$ -1,2 結合オリゴマンノシル側鎖の存在は、クロスピーク 5 (H1:5.05, H2:4.08) 及び 8 (H1:5.15, H2:4.26) の出現によって証明できる。クロスピーク 9 (H1:5.37, H2:4.07) は、マンナン側鎖のうち最も長い側鎖の非還元末端に位置する  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基の存在を示す (**Table 1**)。



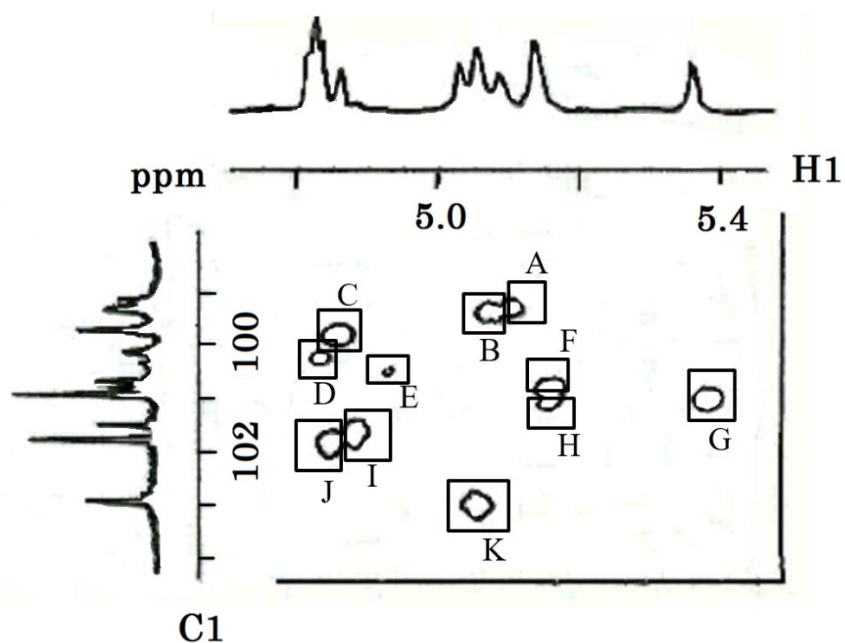
**Fig. 2** 2D-HOHAHA spectrum of Fr. P-B. Boxed cross-peaks are H-1 and H-2 correlated by J-coupling.

**Table 1** Identification of chemical shifts of H1-H2 cross peak in two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn (2D-HOHAHA) spectra of Fr. P-B.  
Man indicate mannose residue.

Cross peak	Mannose residues
1	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
2	Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
3	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
4	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man
5	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\uparrow$ 2 Man $\alpha$ 1
6	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\uparrow$ 2 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
7	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\uparrow$ 2 Man $\alpha$ 1
8	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\uparrow$ 2 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
9	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1

**Fig. 3** は、Fr. P-B の C-H COSY スペクトルの 2 次元マップを示す。以前の報告[87, 89, 92]に基づいて同定された 11 のクロスピークが観察された。クロスピーク G (H1:5.37, C1:100.97) 及び I (H1:4.87, C1:101.57) と D (H1:4.82, C1:100.19) は最も長い側鎖の非還元末端に位置する  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基及びその内側の連続する  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基の存在を示す。クロスピーク C (H1:4.84, C1:99.79) 及び J (H1:4.84, C1:101.82) の存在は、非還元末端及びその内側の  $\beta$ -1,2 結合オリゴマンノシル側鎖を含有することを示す。クロスピーク E (H1:4.91, C1:100.33)、B (H1:5.06, C1:99.57) は、 $\alpha$ -1,6 結合マンノースから成る主鎖の非置換または 2-O-置換型にそれぞれ対応する。短い側鎖の非還元末端  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基及びこれが置換する主鎖の  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基の存在は、クロスピーク K (H1:5.05, C1:102.99) 及び A (H1:5.09, C1:99.24) の出現により示

された。最後に、クロスピーク F (H1:5.15, C1:100.78) 及び H (H1:5.15, C1:101.21) は、長い側鎖の中間マンナン側鎖の  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基の存在を示す (Table 2)。



**Fig. 3** C-H COSY spectrum of Fr. P-B. Boxed cross-peaks are H1 and C1 correlated by J-coupling.

**Table 2** Identification of chemical shifts of H1-C1 cross peak in C-H correlation spectroscopy (C-H COSY) spectra of Fr. P-B. Man indicate mannose residue.

Cross peak	Mannose residues
A	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man ↑ 2 Man $\alpha$ 1
B	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man ↑ 2 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
C	Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
D	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
E	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man
F	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man ↑ 2 Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
G	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
H	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man ↑ 2 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
I	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
J	Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1
K	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man ↑ 2 Man $\alpha$ 1

2次元 NMR (2D-HOHAHA 及び C-H COSY) における H1、H2 及び C1 化学シフト値の帰属結果を **Table 3** に示した。すなわち、このマンナンは二糖 (Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man)、四糖 (Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man) 及び五糖 (Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man) に相当する側鎖を持つことが明らかとなった。一方、4.75~4.77ppm の H1 シグナル[(Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2(Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2))に対応]が観測されない事実は、三糖 (Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man) に相当する側鎖がほとんど存在しないことを示す。

**Table 3** Assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of Fr. P-B.

Man indicate mannose residue. Side chain sequence is not specified.

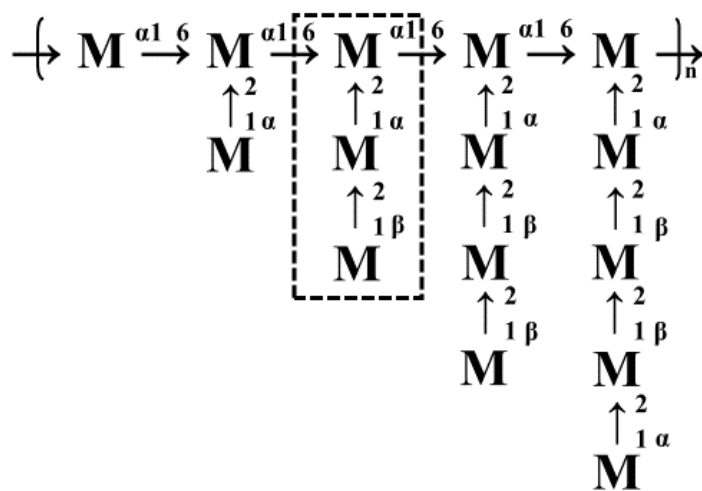
Asterisks indicate characteristic H1 signal of each side chain.

The values or alphabets given in parentheses indicate the cross peak of 2D-HOHAHA or C-H COSY.

Mannose residue				
$\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow$	$\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow$	$\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow$	$\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow$	$\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow$
	$\uparrow^2$	$\uparrow^2$	$\uparrow^2$	
	Man $\alpha$ 1	Man $\alpha$ 1	Man $\alpha$ 1	
		$\uparrow^2$	$\uparrow^2$	
		Man $\beta$ 1	Man $\beta$ 1	
		$\uparrow^2$	$\uparrow^2$	
		Man $\beta$ 1	Man $\beta$ 1	
			$\uparrow^2$	
			Man $\alpha$ 1	
Chemical shift (ppm)				
H1	4.91 *	5.09 *	5.06	5.06
H2	4.00 (4)	4.03 (7)	4.07 (6)	4.07 (6)
C1	100.33 (E)	99.24 (A)	99.57 (B)	99.57 (B)
H1		5.05	5.15	5.15
H2		4.08 (5)	4.26 (8)	4.26 (8)
C1		102.99 (K)	100.78 (F)	101.21 (H)
H1			4.84	4.82
H2			4.25 (2)	4.06 (1)
C1			99.79 (C)	100.19 (D)
H1			4.84 *	4.87
H2			4.25 (2)	4.17 (3)
C1			101.82 (J)	101.57 (I)
H1				5.37 *
H2				4.07 (9)
C1				100.97 (G)

### 2-3. マンナン (Fr. P-B) の全体構造

**Fig. 4** は、 $^1\text{H-NMR}$  分析におけるアノメリックプロトンシグナルの面積により算出した *P. pastoris* マンナン側鎖の分布状態を示している。1986 年の Kobayashi ら[87]による Fehling 液法で調製された *P. pastoris* マンナンの緩和アセトリシスによる分析で導かれたマンナンでは、三糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) に相当する側鎖の存在が述べられているが、今回の分析ではこの側鎖がほとんど検出されなかった。さらに、四糖及び五糖に相当する側鎖の総モル比は、Kobayashi ら[87]の報告と比較して明らかに大きくなり、反対に側鎖未置換の  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基及び二糖に相当する側鎖の総モル比は著しく小さくなった。また、 $^1\text{H-NMR}$  分析のピーク面積を基に Fr. P-B の側鎖の鎖長を算出した結果、平均鎖長は 3.5 となり、Kobayashi ら[87]の報告で示された結果より有意に長いことが明らかになった。



Side chain distribution

9.60 : 26.36 : - : 36.85 : 27.19

**Fig. 4** Structure of *P. pastoris* mannan. Side chain distribution was calculated based on the dimensions of characteristic H1 signals of each side chain in the  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy map [88]. Side chain sequence is not specified. M denotes a mannose residue.



### 3. 考察

前章で確立した Benanomicin A を用いる新しいマンナン調製法が *C. krusei* マンナンのような  $\alpha$  結合マンノース残基のみから構成されるマンナンだけでなく、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を多量に含む”クシ状構造”を呈する *P. pastoris* マンナンの調製においても適用可能なことを証明した。しかし、今回は NMR 分析のみによる解析であったため、化学分析及び構成糖分析等を行い、夾雑物の有無を詳細に確認する必要がある。ある種の *Candida* 属の細胞壁マンナンには、 $\alpha$  及び  $\beta$  結合マンノース残基から成る分岐側鎖に、ホスホジエステル結合が含まれる複雑な構造を呈するものが知られている[17]。また、その他の酵母やカビ由来の細胞壁多糖の多くはヘテロ多糖であるが、共通成分として必ずマンノース残基を含んでいる。例えば、*Trichophyton* 属や *Aspergillus* 属由来の細胞壁多糖は、マンノース残基に加え、ガラクトピラノースやガラクトフラノース残基が含まれるガラクトマンナンとして知られる[11, 93]。また、*Cryptococcus* 属の細胞壁多糖は、マンノース、キシロース及びグルクロン酸から成るグルクロノキシロマンナンとして知られる[12, 13]。したがって、Benanomicin A がマンノース残基を含むヘテロ多糖、リン酸基等を含む酸性多糖の分離調製にも広く適用可能であるか興味を持たれる。

一方、本章で得られた *P. pastoris* マンナンから  $\beta$  脱離で生成する *O*-結合型糖鎖の含量は 1%未満となり、*C. krusei* マンナンとは大きく異なる結果が得られた（データは示さない）。*P. pastoris* については、5 つの *O*-結合型糖鎖に関連する生合成酵素（PMT 遺伝子）を有することが報告されているが[94]、今回得られたマンナン-タンパク質複合体には極めて少量の *O*-結合型糖鎖しか存在しなかった。この知見は、何らかの理由でこれらの生合成酵素が本分子には発現されていないか、この分子とは異なる *O*-結合型糖鎖を持つタンパク質が存在する可能性を示唆する。

2次元 NMR により構造解析された *P. pastoris* マンナンの側鎖分布は、Kobayashi ら[87]が以前に緩和アセトリシスを利用して報告した解析結果とは明らかに異なっていた。すなわち、Benanomicin 法により調製したマンナンを 2 次元 NMR (2D-HOHAHA 及び C-H COSY) により分析した結果 (Table 3)、マンナン分子

に三糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) に相当する側鎖がほとんど存在しないことを証明した (Fig. 4)。この結果は、Kobayashi ら[86]が採用した緩和アセトリシスの分解過程で、マンナンの  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基のみならず、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基も部分的に加水分解されたことを示唆する。したがって、四糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) や 五糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) から、緩和アセトリシスによって 2 次的に二糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) や三糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) が生じたものと解釈できる。

*P. pastoris* マンナンにおいて三糖に相当する側鎖がほとんど検出されない事実は、マンナンの比較的長い四糖に相当する側鎖や五糖に相当する側鎖の生合成過程において、2 種類の  $\beta$ -1,2-マンノシルトランスフェラーゼは、マンノース残基を供与体 (GDP-マンノース) から基質 (二糖  $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$  に相当する側鎖) へ極めて速く転移させるものと思われる。また、四糖に相当する側鎖が多量に検出されることより、生合成の最終段階で働く  $\alpha$ -1,2-マンノシルトランスフェラーゼによる GDP-マンノースの転移速度が、 $\beta$ -1,2-マンノシルトランスフェラーゼの速度よりも有意に遅いことが伺える。

以上により、アセトリシスなどの多糖限定加水分解法は、様々な免疫化学的または生物学的機能の重要なエピトープやリガンド等の断片に相当するオリゴ糖を調製するための手段としては極めて重要であることは疑いようがないが、多糖類の本来の化学構造に関する正確な情報を得るための手法として相応しいとは言えない。すなわち、非分解の高分子多糖類の構造決定においては、出来るだけ高分解能の NMR 分析装置を用いて、様々な 2 次元マッピング等のより新しい解析方法を駆使することが望ましい。

#### 4. 小括

本章では、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を比較的多量に含むことで知られる *P. pastoris* マンナンを用いて、第 1 章で確立した Benanomicin 法の有用性について検討すると共に、調製したマンナンの化学構造について 2 次元 NMR 分析で検証したところ、次のような知見を得た。

##### 1) Benanomicin 法の有用性

Benanomicin 法が、 $\alpha$  結合マンノース残基のみから構成されるマンナンだけでなく、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を多量に含むクシ状構造を呈するマンナンの調製にも十分に適用可能なことを証明した。

##### 2) *P. pastoris* マンナンの化学構造

Benanomicin 法で調製した *P. pastoris* マンナンの 2 次元 NMR 分析における化学シフト値の帰属により、この分子は  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基が連結する主鎖に二糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ )、四糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) 及び五糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) に相当する側鎖が置換していることが明らかとなったが、三糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) に相当する側鎖はほとんど存在しないことが示された。

##### 3) 2 次元 NMR 分析法の有用性

アセトリシス等の多糖限定加水分解法は、部分構造に相当する側鎖オリゴ糖を調製する手段としては極めて重要である。一方、マンナン等の高分子多糖類の構造決定においては、分子を分解することなく種々の 2 次元 NMR 法を導入して解析する方が正確な糖鎖構造に関する情報を導くものと考えられる。

## 総括

深在性真菌症の代表的なものとして、*Aspergillus* 症、*Cryptococcus* 症及び *Candida* 症が挙げられ、わが国では“三大真菌症”と呼ばれている。深在性真菌症の中でも *Candida* 症は感染患者の死亡率が比較的高いため、臨床現場における関心が大きく、病原真菌学の研究対象としても注目されることが多い。

現在、わが国では深在性 *Candida* 症の治療薬としてフルオロピリミジン系、アゾール系及びキャンディン系抗真菌薬等が臨床使用されている。しかし、これらの抗生物質に対する感受性が菌種によって異なるので、適切な抗生物質で治療するためには、菌種を区別できる正確な診断法が必要不可欠になる。

深在性真菌症の確定診断は原因真菌の臨床分離・同定でのみ可能である。したがって、血液や組織から直接起因菌を検出する顕微鏡検査及び培養検査が確定診断として用いられている。しかし、このような方法は同定までに長時間を要することから、確定診断の前に医師の臨床所見に加え、補助診断を総合して暫定的な診断が行われている。補助診断のひとつとして抗原検出診断法がある。この方法は、真菌が持つ特異的成分または代謝物を、血清学的手法により検出するものである。*Candida* 症の血清学的診断は、細胞壁表層に存在するマンナンを標的抗原として検出するのが主流である。抗原活性を持つマンナンは、酵母とその宿主との相互作用の初期段階において最も重要な役割を担うと考えられる。したがって、免疫化学的性状や感染メカニズムの解明及び抗真菌薬開発の目的で、病原性 *Candida* 属を含めた真菌細胞壁マンナン類の構造化学的研究が精力的に行われてきた。

酵母マンナンの化学構造解析において最も重要なポイントの一つは、マンナン分子を傷つけることなく分離調製することである。これまでの *Candida* 酵母細胞壁に由来するマンナンの構造化学的または免疫化学的研究においては、Fehling 試薬によりマンナン分子を調製して以降の実験に供されてきた。すなわち、 $\alpha$ -1,6 結合を選択的に切断するとされる緩和アセトリシス、さらには希酸処理等によってオリゴ糖へ断片化したのち、ゲルクロマトグラフィーにより分離した各オリゴ糖について、メチル化分析、質量分析 (GC-MS)、核磁気共鳴 (NMR) 分析等の機器分析法を総合的に適用することにより、元のマンナンの全体構造

が決定されてきた。

第 1 章では、マンナン調製方法として最も一般的であった Fehling 液法の持つ問題点を改善するために、レクチン様活性を有する抗生物質 Benanomicin A を利用することで新規調製法を確立、その有用性を実証すると共に、*Candida krusei* 細胞壁マンナン中の *O*-結合型糖鎖の存在を証明した。すなわち、Benanomicin A を用いるマンナン調製法では、マンナン分子を強アルカリに曝すことなく緩和な条件下で調製することができ、アルカリ不安定なことで知られる分子中のセリンまたはスレオニン残基に結合するマンノース及び 3 種のオリゴ糖鎖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ 、 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$  及び  $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) を収率良く回収でき、その存在を立証することに成功した。したがって、*C. krusei* 以外の *Candida* 酵母マンナン類の *O*-結合型糖鎖の含有量も、これまで知られているよりも著しく多い可能性が示唆される。

第 2 章では、前章において開発した Benanomicin A を用いるマンナン調製法の適用範囲に言及すると共に、調製したマンナンの全体構造について、NMR 分析法のみで分析を行った。すなわち、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を多量に含むことで知られる *Pichia pastoris* マンナンを新規法により調製し、限定加水分解法を用いることなく 2 次元 NMR 法 (2D-HOHAHA 及び C-H COSY) を用いて構造解析を行った。NMR の化学シフト値の帰属により、この分子は  $\alpha$ -1,6 結合マンノース残基から成る主鎖に、 $\alpha$ -1,2 結合及び  $\beta$ -1,2 結合から成る二糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ )、四糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) 及び五糖 ( $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) に相当する側鎖が連結する”クシ状構造”であることが明らかとなった。しかし、三糖 ( $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) に相当する側鎖がほとんど存在しないことが示されたことより、アセトリシス法では  $\alpha$ -1,6 結合のみならず、一部の  $\beta$ -1,2 結合も加水分解されることが示唆された。したがって、多糖類の限定加水分解法は、様々な生理機能における重要なエピトープやリガンドに相当するオリゴ糖の調製には極めて有効であるが、多糖類の詳細な化学構造に関する情報を得るためには、分子を分解することなく種々の 2 次元 NMR 法を導入して分析する方が正確な結果を与えられられる。

本論文は、学術誌に掲載または掲載予定の次の論文を基礎とするものである。

- [1] T. Kuraoka, A. Ishiyama, H. Oyamada, Y. Ogawa, H. Kobayashi, Presence of *O*-glycosidically linked-oligosaccharides in the cell wall mannoprotein of *Candida krusei* purified with Benanomicin A, *FEBS Open Bio*, **9** (2019) 129-136. doi: 10.1002/2211-5463.12558.
  
- [2] T. Kuraoka, M. Shukuri, S. Iwanaga, T. Yamada, Y. Ogawa, H. Kobayashi, Distribution of oligomannosyl side chains in the cell wall mannan of *Pichia pastoris* purified by Benanomicin A, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **8** (2019) 2926-2935. doi: 10.20546/ijcmas.2019.801.311.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました主指導教員である長崎国際大学大学院薬学研究科 小林秀光教授ならびに副指導教員の同研究科 小川由起子教授に深甚なる謝意を表します。

本論文を作成するにあたり、同研究科 岸原健二教授ならびに黒川健児教授に深謝いたします。

大学院博士課程を修めるに当たり、多大なるご助力をいただきました長崎国際大学大学院薬学研究科研究科長 榊原隆三教授ならびに同研究科専攻長 藤田英明教授に深謝致します。

Benanomicin A を供与していただいた明治製菓株式会社製薬研究センターの五味修一博士に謝意を表します。

本研究実施期間中、協力して頂いた長崎国際大学薬学部微生物学研究室及び感染制御学研究室の配属学生の皆様に心から感謝致します。また、日々の研究活動に、終始、温かい言葉をかけて下さり、励まして下さった本学教職員の方々に深謝致します。

最後に、私を支えて下さった多くの方々に心から感謝致します。

## 参考文献

- [1] P. Kirk, P. Cannon, D. Minter, J. Stalpers, Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 10<sup>th</sup> ed, CABI Europe (2008).
- [2] R.T. Watson, V.H. Heywood, I. Baste, B. Dias, R. Gámez, W. Reid, G. Ruark, Global Biodiversity Assessment: Summary for Policy-Makers, Cambridge University Press (1995).
- [3] 山口恵三、松本哲哉監訳「イラストレイテッド微生物学 第2版」丸善(2008)。
- [4] S.M. Bowman, S.J. Free, The structure and synthesis of the fungal cell wall, *Bioessays*, **28** (2006) 799-808.
- [5] 増澤俊幸、河村好章編「薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学 第4版」廣川書店(2018)。
- [6] M. Hegazi, A. Abdelkader, M. Zaki, B. El-Deek, Characteristics and risk factors of candidemia in pediatric intensive care unit of a tertiary care children's hospital in Egypt, *J. Infect. Dev. Ctries.*, **8** (2014) 624-634.
- [7] M.H. Nguyen, J.E. Peacock, A.J. Morris, D.C. Tanner, M.L. Nguyen, D.R. Snyderman, M.M. Waqener, M.G. Rinaldi, V.L. Yu, The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance, *Am. J. Med.*, **100** (1996) 617-623.
- [8] D.G. Gokcebay, N. Yarali, P. Isik, C. Bayram, A. Ozkaya-Parlakay, A. Kara, B. Tunc, *Candida* associated bloodstream infections in pediatric hematology patients: a single center experience, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, **8** (2016) e2016018.
- [9] H. Kakeya, K. Yamada, Y. Kaneko, K. Yanagihara, K. Tateda, S. Maesaki, Y. Takesue, K. Tomono, J.I. Kadota, M. Kaku, Y. Miyazaki, K. Kamei, K. Shibuya, Y. Niki, M. Yoshida, Y. Sei, National Trends in the Distribution of *Candida* Species



- Causing Candidemia in Japan from 2003 to 2014, *Med. Mycol. J.*, **59** (2018) E19-E22.
- [10] 五十君静信、江崎孝行、高鳥浩介、土戸哲明監修「微生物の簡易迅速検査法」テクノシステム (2013) .
- [11] J.P. Latgé, H. Kobayashi, J.P. Debeaupuis, M. Diaquin, J. Sarfati, J.M. Wieruszeski, E. Parra, J.P. Bouchara, B. Fournet, Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*, *Infect. Immun.*, **62** (1994) 5424–5433.
- [12] A.K. Bhattacharjee, J.E. Bennett, C.P. Glaudemans, Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*, *Rev. Infect. Dis.*, **6** (1984) 619-624.
- [13] S.H. Turner, R. Cherniak, Multiplicity in the Structure of the Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*, NATO ASI series, Springer-Verlag, Berlin, **H53** (1991) 123–142.
- [14] H.F. Hasenclever W.O. Mitchell, Immunochemical Studies on Polysaccharides of Yeasts, *J. Immunol.*, **93** (1964) 763-71.
- [15] 中島佑、酵母の糖タンパク質・糖鎖の生合成と機能、日本醸造協会誌、**88** (1993) 871-877.
- [16] S. Suzuki, N. Shibata, and H. Kobayashi, Immunochemistry of *Candida* mannan, NATO ASI series, Springer-Verlag, Berlin, **H53** (1991) 111-121.
- [17] N. Shibata., H. Kobayashi and S. Suzuki, Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on Mannan, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **88** (2012) 250-265.

- [18] 小林秀光、小島原健之、高橋かおり、柴田信之、大久保恭仁、鈴木茂生、3種の *Candida albicans* 細胞壁ホスホマンナンの *Arthrobacter* GJM-1 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化、東北薬科大学研究年報、**36** (1989) 183-189.
- [19] R. Kornfeld, S. Kornfeld, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **54** (1985) 631-664.
- [20] W. Tanner, L. Lehl, Protein glycosylation in yeast, *Biochim. Biophys. Acta.*, **906** (1987) 81-99.
- [21] M. Ecker, R. Deutzmann, L. Lehle, V. Mersa, W. Tanner, Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to  $\beta$ -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage, *J. Biol. Chem.*, **281** (2006) 11523-11529.
- [22] R. Kollár, B.B. Reinhold, E. Petráková, H.J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonová, J.C. Kapteyn, F.M. Klis, E. Cabib, Architecture of the yeast cell wall.  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-glucan, and chitin, *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 17762-17775.
- [23] J.C. Kapteyn, R.C. Montijn, G.J. Dijkgraaf, F.M. Klis, Identification of  $\beta$ -1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*, *Eur. J. Cell. Biol.*, **65** (1994) 402-407.
- [24] M. Miyauchi, P. Giummelly, S. Yazawa, Y. Okawa, Adhesion of *Candida albicans* to HeLa cells: studies using polystyrene beads, *Biol. Pharm. Bull.*, **30** (2007) 588-590.
- [25] S. Bates, D.M. MacCallum, G. Bertram, C.A. Munro, H.B. Hughes, E.T. Buurman, A.J. Brown, F.C. Odds, N.A. Gow, *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence, *J. Biol. Chem.*,

**280** (2005) 23408-23415.

- [26] S. Bates, H.B. Hughes, C.A. Munro, W.P. Thomas, D.M. MacCallum, G. Bertram, A. Atrih, M.A. Ferguson, A.J. Brown, F.C. Odds, N.A. Gow, Outer chain *N*-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*, *J. Biol. Chem.*, **281** (2006) 90-98.
- [27] E. Dominguez, R. Zarnowski, H. Sanchez, A.S. Covelli, W.M. Westler, P. Azadi, J. Nett, A.P. Mitchell, D.R. Andes, Conservation and Divergence in the *Candida* Species Biofilm Matrix Mannan-Glucan Complex Structure, Function, and Genetic Control, *MBio*, **9** (2018) e00451-18.
- [28] M. Casanova, J.L. Lopez-Ribot, C. Monteagudo, A. Llombart-Bosch, R. Sentandreu, J.P. Martinez, Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*, *Infect. Immun.*, **60** (1992) 4221–4229.
- [29] J.L. Lopez-Ribot, P. Sepulveda, A.M. Cervera, P. Roig, D. Gozalbo, J.P. Martinez, Cloning of a cDNA fragment encoding part of the protein moiety of the 58-kDa fibrinogen-binding mannoprotein of *Candida albicans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **157** (1997) 273–278.
- [30] C.T. Bishop, F. Blank, P.E. Gardner, The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: glucan, mannan, and chitin, *Can. J. Chem.*, **38** (1960) 869-881.
- [31] P.A.J. Gorin, J.F.T. Spencer, S.S. Bhattacharjee, Structures of yeast mannans containing both  $\alpha$ - and  $\beta$ -linked D-mannopyranose units, *Can. J. Chem.*, **47** (1969) 1499-1505.
- [32] Y. Fukazawa, T. Shinoda, T. Tsuchiya, Response and Specificity of Antibodies for

*Candida albicans*, *J. Bacteriol.*, **95** (1968) 754-763.

- [33] T. Shinoda, L. Kaufman, A.A. Padhye, Comparative evaluation of the Iatron serological Candida Check kit and the API 20C kit for identification of medically important *Candida* species, *J. Clin. Microbiol.*, **13** (1981) 513-518.
- [34] T. Tsuchiya, Y. Fukazawa, S. Kawakita, A method for the rapid identification of the genus *Candida*, *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **10** (1959) 191-206.
- [35] Y. Fukazawa, Antigenic structure of *Candida albicans*. Immunochemical basis of the serologic specificity of the mannan in yeast, *Immunol. Ser.*, **47** (1989) 37-62.
- [36] O. Sakaguchi, S. Suzuki, M. Suzuki, H. Sunayama, Biochemical and immunocemical studies of fungi. VIII. Immunochemical studies of mannans of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Jpn. J. Microbil.*, **11** (1967) 119-128.
- [37] S. Suzuki, M. Suzuki, K. Yokota, H. Sunayama, O. Sakaguchi, On the immunochemical and biochemical studies of fungi. XI. Cross reaction of the polysaccharides of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* against antisera of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Jpn. J. Microbil.*, **11** (1967) 269-273.
- [38] S. Suzuki, H. Sunayama, T. Saito, Studies on the antigenic activity of yeasts I. Analysis of the determinant groups of the mannan of *Saccharomyces cerevisiae*, *Jpn. J. Microbiol.*, **12** (1968) 19-24.
- [39] S. Suzuki, H. Sunayama, Studies on the antigenic activity of yeast III. Isolation and inhibition assay of the oligosaccharides from acetolysate of mannan of *Candida albicans*, *Jpn. J. Microbiol.*, **12** (1968) 413-422.

- [40] S. Suzuki, H. Sunayama, Studies on the antigenic activity of yeast II. Isolation and inhibition assay of the oligosaccharides from acid-hydrolysate of mannan of *Candida albicans*, *Jpn. J. Microbiol.*, **13** (1969) 95-101.
- [41] H. Sunayama, S. Suzuki, Studies on the antigenic activity of yeasts V. Effect of  $\alpha$ -mannosidase digestion on the immunochemical properties of the mannan of *Saccharomyces cerevisiae*, *Jpn. J. Microbiol.*, **14** (1970) 197-207.
- [42] H. Sunayama, S. Suzuki, Studies on the antigenic activities of yeasts VI. Analysis of the antigenic determinants of the mannan of *Candida albicans* serotypes B-792, *Jpn. J. Microbiol.*, **14** (1970) 371-379.
- [43] S. Suzuki, H. Hatsukaiwa, H. Sunayama, N. Honda, Studies on the antigenic activities of yeasts VII. The reaction between concanavalin A and the mannans isolated from five species of yeasts including two serotypes of *Candida* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Jpn. J. Microbiol.*, **15** (1971) 437-442.
- [44] N. Shibata, T. Ichikawa, M. Tojo, M. Takahashi, N. Ito, Y. Ohkubo, S. Suzuki, Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **243** (1985) 338-348.
- [45] H. Kobayashi, N. Shibata, M. Nakada, S. Chaki, K. Mizugami, Y. Ohkubo, S. Suzuki, Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues, *Arch. Biochem. Biophys.*, **278** (1990) 195-204.
- [46] H. Kobayashi, N. Shibata, T. Osaka, Y. Miyagawa, Y. Ohkubo, S. Suzuki, Structural study of cell wall mannan of *Candida albicans* (serotype A) strain, *Phytochemistry.*,

**31** (1992) 1147-1153.

- [47] N. Shibata, S. Fukazawa, H. Kobayashi, M. Tojo, T. Yonezu, A. Ambo, Y. Ohkubo, S. Suzuki, Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form cells of *Candida albicans* NIH A-207 serotype A strain, *Carbohydr. Res.*, **187** (1989) 239-253.
- [48] H. Kobayashi, N. Shibata, S. Suzuki, Evidences for oligomannosyl residues containing both  $\beta$ -1,2 and  $\alpha$ -1,2 linkages as serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans* species, *Infect. Immun.*, **60** (1992) 2106-2109.
- [49] H. Kobayashi, M. Takaku, Y. Nishidate, S. Takahashi, M. Takikawa, N. Shibata, S. Suzuki, Structural of D-mannan of pathogenic yeast, *Candida stellatoidea* ATCC 20408 (type II) strain, in comparison with that of type I strains: *C. stellatoidea* ATCC 36232 (type I) strain, *Carbohydr. Res.*, **231** (1992) 105-116.
- [50] H. Kobayashi, K. Matsuda, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Takahashi, N. Shibata, S. Suzuki, Structures study of cell wall mannans isolated from pathogenic yeast *Candida tropicalis* IFO 0199 and 1647 strains, *Infect. Immun.*, **62** (1994) 615-622.
- [51] N. shibata, M. Arai, E. Haga, T. Kikuchi, M. Najima, T. Satoh, H. Kobayashi, S. Suzuki, Structural identification of epitope of antigenic factor 5 in manans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and *C. albicans* J-1012 (serotype A) strains as  $\beta$ -1,2-linked oligomannosyl residues, *Infect. Immun.*, **60** (1992) 4100-4110.
- [52] N. Shibata, T. Imai, K. Ikuta, Y. Satoh, R. Satoh, A. Suzuki, C. Kojima, H. Kobayashi, K. Hisamichi, S. Suzuki, Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*; Structure-antigenicity relationship between cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, *J. Biol. Chem.*, **270** (1995) 1113-1122.

- [53] H. Kobayashi, M. Komido, M. Watanabe, K. Matsuda, M. Suzuki, T. Ikeda, H. Oyamada, N. Shibata, S. Suzuki, Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586, *Infect. Immun.*, **62** (1994) 4425-4431.
- [54] M. Funayama, A. Nishikawa, T. Shinoda, M. Suzuki, Y. Fukazawa, Antigenic relationship between *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* serotype B, *Microbiol. Immunol.*, **28** (1984) 1359-1371.
- [55] N. Shibata, R. Akagi, T. Hosoya, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Ikuta, H. Kobayashi, K. Hisamichi, Y. Okawa, S. Suzuki, Existence of novel branched side chains containing  $\beta$ -1,2 and  $\alpha$ -1,6 linkages corresponding to antigenic factor 9 in the mannan of *Candida guilliermondii*, *J. Biol. Chem.*, **271** (1996) 9259-9266.
- [56] H. Kobayashi, H. Oyamada, A. Suzuki, N. Shibata, S. Suzuki, Y. Okawa, Identification of the antigenic determinants of factors 8, 9, and 34 of genus *Candida*, *FEBS. Lett.*, **395** (1996) 109-112.
- [57] H. Kobayashi, H. Mitobe, K. Takahashi, T. Yamamoto, N. Shibata, S. Suzuki, Structure study of a cell wall mannan-protein complex of the pathogenic yeast *Candida glabrata* IFO 0622 strain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **294** (1992) 662-669.
- [58] T. Takeuchi, T. Hara, H. Naganawa, M. Okada, M. Hamada, H. Umezawa, S. Gomi, M. Sezaki, S. Kondo, New antifungal antibiotics, Benanomicins A and B from an Actinomycete, *J. Antibiotics.*, **41** (1988) 807-811.
- [59] H. Hoshino, J. Seki, T. Takeuchi, New antifungal antibiotics, Benanomicins A and B inhibit infection of T-cell with human immunodeficiency virus (HIV) and syncytium formation by HIV, *J. Antibiotics.*, **42** (1989) 344- 346.

- [60] S. Kondo, S. Gomi, D. Ikeda, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Iwai, J. Seki, H. Hoshino, Antifungal and antiviral activities of Benanomicins and their analogues, *J. Antibiotics*, **44** (1991) 1228-1236.
- [61] M. Watanabe, S. Gomi, H. Tohyama, K. Ohtsuka, S. Shibahara, S. Inouye, H. Kobayashi, S. Suzuki, S. Kondo, T. Takeuchi, H. Yamaguchi, Binding of Benanomicin A to fungal cells in reference to its fungicidal action, *J. Antibiotics*, **49** (1996) 366-373.
- [62] 沖 俊一、レクチン様機能を持つ低分子物質プラディマイシン、蛋白質 核酸 酵素、**39** (1994) 973-978.
- [63] T. Ueki, K. Numata, Y. Sawada, M. Nishio, H. Ohkuma, S. Toda, H. Kamachi, Y. Fukagawa, T. Oki, Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. II. D-mannopyranoside-binding site and calcium-binding site, *J. Antibiot (Tokyo)*, **46** (1993) 455-464.
- [64] T. Ueki, M. Oka, Y. Fukagawa, T. Oki, Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. III. Spectrophotometric sequence analysis of the ternary complex formation of BMY-28864 with D-mannopyranoside and calcium.:III. Spectrophotometric sequence analysis of the ternary complex formation of BMY-28864 with D-mannopyranoside and calcium, *J. Antibiot (Tokyo)*, **46** (1993) 465-477.
- [65] B.L. Wickes, J.B. Hicks, W.G. Merz, K.J. Kwon-Chung, The molecular analysis of synonymy among medically important yeasts within the genus *Candida*, *J. Gen. Microbiol.*, **138** (1992) 901-907.
- [66] M. Doi, M. Homma, A. Chindamporn, K. Tanaka, Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important



*Candida* species, *J. Gen. Microbiol.*, **138** (1992) 2243-2251.

- [67] S.M. Barns, D.J. Lane, M.L. Sogin, C. Bibeau, W.G. Weisburg, Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives, *J. Bacteriol.*, **173** (1991) 2250-2255.
- [68] H. Kobayashi, N. Shibata, H. Mitobe, Y. Ohkubo, S. Suzuki, Structural study of phosphomannan of yeast-form cells of *Candida albicans* J-1012 strain with special reference to application of mild acetolysis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **272** (1989) 364-375.
- [69] 柴田信之、茶木精一、小林秀光、伊藤美智子、高野今日子、大久保恭仁、鈴木茂生、パン酵母から異なった温度で熱水抽出されたマンナン-タンパク質複合体の免疫化学的性質の比較、東北薬科大学研究年報、31 巻 (1984) 213-218.
- [70] Y. Okubo, T. Ichikawa, S. Suzuki, Relationship between phosphate content and immunochemical properties of subfractions of bakers' yeast mannan, *J. Bacteriol.*, **136** (1978) 63-68.
- [71] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28** (1956) 350-356.
- [72] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193** (1951) 265-275.
- [73] B.N. Ames, D.T. Dubin, The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, **235** (1960) 769-775.

- [74] 川上晋、江嶋彩香、仲彩香、小川由起子、小林秀光、病原性 *Candida* 酵母から調製した粗抽出物の  $^1\text{H}$ -NMR 分析によって得られる細胞壁マンサンの構造情報について、長崎国際大学論叢、14 巻 (2014) 297-302.
- [75] E.T. Buurman, C. Westwater, B. Hube, A.J. Brown, F.C. Odds N.A. Gow, Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*, *Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.*, **95** (1998) 7670-7675.
- [76] C. Timpel, S. Strahl-Bolsinger, K. Ziegelbauer, J.F. Ernst, Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998) 20837-20846.
- [77] J.M. Bain, J. Louw, L. E. Lewis, B. Okai, C. A. Walls, E R. Ballou, L. A. Walker, D. Reid, C. A. Munro, A. J. Brown, G. D. Brown, N. A. Gow, L. P. Erwig, *Candida albicans* hypha formation and mannan masking of  $\beta$ -glucan inhibit macrophage phagosome maturation, *MBio*, **5** (2014) e01874.
- [78] L.A. Pérez-García, K. Csonka, A. Flores-Carreón, E. Estrada-Mata, E. Mellado-Mojica, T. Németh, L.A. López-Ramírez, R. Toth, M.G. López, C. Vizler, A. Marton, A. Tóth, J.D. Nosanchuk, A. Gácsér, H.M. Mora-Montes, Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction, *Front. Microbiol.*, **7** (2016) 306.
- [79] C. Timpel, S. Zink, S. Strahl-bolsinger, K. Schröppel J. Ernst, Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*, *J. bacteriol.*, **182** (2000) 3063-3071.
- [80] L. C. Dutton, A. H. Nobbs, K. Jepson, M. A. Jepson, M. M. Vickerman, S. Aqeel Alawfi, C. A. Munro, R. J. Lamont, H. F. Jenkinson, O-mannosylation in *Candida*

- albicans* enables development of interkingdom biofilm communities, *MBio*, **5** (2014) e00911.
- [81] P. A. J. Gorin, A. S. Perlin, A mannan produced by *Saccharomyces rouxii*, *Canad. J. Chem.*, **34** (1956) 1796-1803.
- [82] J. Kocourek, C.E. Ballou, Method for fingerprinting yeast cell wall mannans, *J. Bacteriol.*, **100** (1969) 1175-1181.
- [83] S. Suzuki, H. Sunayaa, Studies on the antigenic activities of yeasts. II. Isolation and inhibition assay of the oligosaccharides from acetolysate of the mannan of *Candida albicans*, *Jpn. J. Microbiol.*, **12** (1968) 413-422.
- [84] T. Hamada, T. Nakajima, K. Izaki, K. Matsuda, Comparison of the mannan structure from the cell-wall mutant *Candida* sp. M-7002 and its wild type, *Eur. J. Biochem.*, **119** (1981) 365-371.
- [85] M. Funayama, A. Nishikawa, T. Shinoda, M. Suzuki, Y. Fukazawa, Antigenic relationship between *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* serotype B, *Microbiol. Immunol.*, **28** (1984) 1359-1371.
- [86] P.A.J. Gorin, J.F.T. Spencer, Proton magnetic resonance spectroscopy-an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts, *Adv. Appl. Microbiol.*, **13** (1970) 25-89.
- [87] H. Kobayashi, N. Shibata, S. Suzuki, Acetolysis of *Pichia pastoris* IFO 0948 strain mannan containing  $\alpha$ -1,2 and  $\beta$ -1,2 linkages using acetolysis medium of low sulfuric acid concentration, *Arch. Biochem. Biophys.*, **245** (1986) 494-503.
- [88] H. Kobayashi, J. Suzuki, S. Tanaka, Y. Kiuchi, H. Oyamada, N. Iwadate, H. Suzuki, N. Shibata, S. Suzuki, Y. Okawa, Structure of a cell wall mannan from the pathogenic yeast, *Candida catenulata*: Assignment of  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance

- chemical shifts of the inner  $\alpha$ -1,6-linked mannose residues substituted by a side chain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **341** (1997) 70-74.
- [89] H. Kobayashi, N. Shibata, T. Yonezu, S. Suzuki, Application of Mild Acetolysis to Confirm the Comb-like Structure of Cell Wall Mannan from *Pichia pastoris* IFO 0948 Strain, *Chem. Pharm. Bull.*, **36** (1988) 3168-3172.
- [90] H. Kobayashi, H. Oyamada, K. Matsuda, N. Shibata, S. Suzuki, Distribution of antigenic oligomannosyl side chains in the cell wall mannans of several strains of *Candida tropicalis*, *Arch. Microbiol.*, **180** (2003) 76-80.
- [91] N. Shibata, A. Suzuki, H. Kobayashi, Y. Okawa, Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms, *Biochem. J.*, **404** (2007) 365-372.
- [92] N. Shibata, K. Hisamichi, H. Kobayashi, S. Suzuki, Complete assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance chemical shifts of  $\beta$ -1,2-linked mannoooligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **302** (1993) 113-117.
- [93] K. Ikuta, N. Shibata, J.S. Blake, M.V. Dahl, R.D. Nelson, K. Hisamichi, H. Kobayashi, S. Suzuki, Y. Okawa, NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*, *Biochem. J.*, **323** (1997) 297-305.
- [94] Juergen H. Nett, W. James Cook, Ming-Tang Chen, Robert C. Davidson, Piotr Bobrowicz, Warren Kett, Elena Brevnova, Thomas I. Potgieter, Mark T. Mellon, Bianka Prinz, Byung-Kwon Choi, Dongxing Zha, Irina Burnina, John T. Bukowski, Min Du, Stefan Wildt, Stephen R. Hamilton, Characterization of the *Pichia pastoris* Protein-O-mannosyltransferase Gene Family, *PLoS One*, **8** (2013) e68325. doi: 10.1371/journal.pone.0068325.