

(様式 6)

学籍番号 : 1531D01

氏 名 : 倉岡卓也

論文題名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

深在性 *Candida* 症は、その原因菌種の約 60% を *C. albicans* が占めているが、近年 *C. glabrata* や *C. krusei* 等による感染症が増加傾向にある。*Candida* 酵母は菌種によって抗生物質に対する感受性が大きく異なることが知られており、*Candida* 症を適切な抗生物質で治療するためには、菌種を区別することができる迅速かつ正確な診断法が必要となる。現在、抗原抗体反応を利用した診断法が、安価で迅速に診断できることから臨床現場で繁用されているが、菌種レベルを分別可能なものは未だ開発されていない。*Candida* 属の血清学的診断法においては、細胞壁成分である β グルカンやマンナン-タンパク質複合体が標的抗原とされている。特にマンナン-タンパク質複合体のマンナン部分は、細胞壁の最外層に存在することから *Candida* 酵母と宿主との相互作用の初期段階においても重要な役割を演じている。したがって、免疫化学的性状の解明のみならず、感染機序解明を目的としても、病原性 *Candida* 酵母のマンナン構造を明らかにすることは大きな意義を持つ。臨床分離されることが多い主要な *Candida* 酵母のマンナンについては、その抗原決定基及び全体構造が既に明らかにされている。しかし、*C. krusei* の細胞壁マンナンについては、その全体構造はおろか特異的な抗原決定基も未解明のままである。

酵母細胞壁の糖鎖構造解析において最も重要なポイントの一つは、糖鎖抗原をできる限り無傷の状態 で分離調製することである。これまで *Candida* 酵母細胞壁に由来するマンナンの抗原決定基及び化学構造の解析は、強アルカリ性の Fehling 試薬によって銅-マンナン錯体を沈殿させる Fehling 液法が最もよく採用されてきた。しかし、この調製法では、調製過程で分子中の *O*-グリコシド結合型糖鎖が部分的に失われてしまう可能性が指摘されている (Fig. 1)。

放線菌 *Actinomadura sporax* の培養濾液から見出された抗生物質の Benanomicin A (分子量 864) は、 Ca^{2+} の存在下で酵母細胞壁マンナンのマンノース残基に選択的に結合することによって抗真菌作用を開始する。したがって、Benanomicin A は、タンパク質ではない点を除けば、その機能面においてレクチンと同等であると見なされる (Fig. 2)。

第 1 章では、抗生物質 Benanomicin A のマンノースに特異的なレクチン様機能を利用して、従来のマ

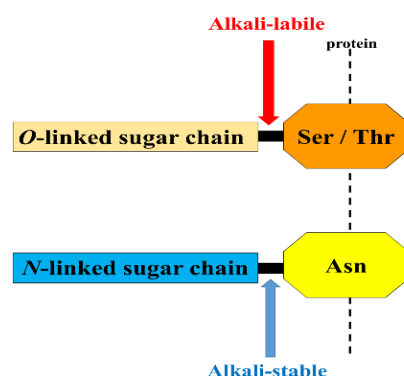


Fig. 1 Mannan-protein complex of yeast cell wall

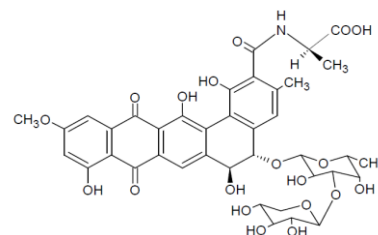


Fig. 2 Chemical structure of Benanomicin A

(様式6)

ンナン調製法が持つ問題点を克服する新規マンナン調製法を構築すると共に、本法を *C. krusei* に適用し、調製した分子の糖鎖構造を既存の Fehling 液法による場合と比較検討した。

第2章では前章で構築した新規法を、 β -1,2 結合マンノース残基を含むマンナンを有することで知られる *Pichia pastoris* (メタノール資化酵母) に適用し、マンナンの調製を試みると共に、得られたマンナン分子を2次元 NMR 分析のみで構造解析することを試みた。

1. 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

レクチン様機能を持つ抗生物質 Benanomicin A を用いた酵母マンナンの新規調製法 (Benanomicin 法) を確立し、抗原決定基及びマンナンの化学構造が未解明の *C. krusei* に適用した結果、マンナンを強アルカリに曝すことなく緩やかな条件下でマンナン-タンパク質複合体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、スレオニン残基に O-グリコシド結合するオリゴ糖鎖) をほぼ失うことなく、より効率的に調製することに成功した。さらに、この分子を希アルカリ処理することで生成したオリゴ糖を NMR 分析した結果、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 ($\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$) であることが明らかとなり、これらは O-結合型糖鎖であると考えられる (Fig. 3)。

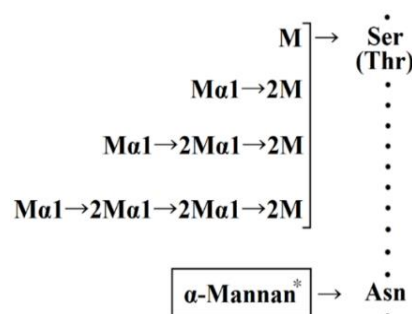
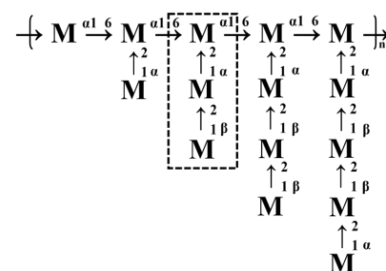


Fig. 3 Structure of O-linked sugar chains in the cell wall mannan of *C. krusei*. M indicate mannose residue. *The chemical structure of N-linked sugar chains in this mannan is not clear yet.

2. 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

前章において開発した新規マンナン調製法を、 β -1,2 結合マンノース残基を多量に含む *P. pastoris* マンナンの調製に適用し、得られた分子について NMR 分析法のみで構造解析を行った。その結果、Benanomicin 法が、 β -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 N-結合型マンナンの調製にも十分に適用可能なことを証明した。このマンナンの2次元 NMR (2D-HOHAHA 及び C-H COSY) 分析における化学シフト値の帰属により、この分子は α -1,6 結合マンノース残基が連結するものを“主鎖”とし、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 ($\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$) に相当するオリゴ糖を“側鎖”としていることが明らかとなった。以前、アセトリシス (糖鎖限定加水分解法) を用いて行われた構造解析では三糖 ($\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$) の存在が示されていたが、今回の2次元 NMR による構造解析では三糖に相当する側鎖は全く存在しないことが示された (Fig. 4)。この知見は、アセトリシスにより四糖または五糖の β -1,2 結合が加水分解されたことで、二次的に三糖が生じたものと解釈できる。



Side chain distribution					
(A)	9.60	26.36	-	36.85	27.19
(B)*	14.64	34.47	4.06	32.32	14.51

Fig. 4 Structure of *P. pastoris* NRBC 0948 mannan. (A) Side chain distribution was calculated based on the dimensions of characteristic H-1 signals of each side chain in the ¹H-NMR spectroscopy map. (B) Side chain distribution was calculated based on the peak-dimensions in the gel-filtration profile of the mild acetolysis products. M indicate mannose residue. *These values were referred from previous report (Kobayashi et al., 1988).