

総 説

真菌細胞壁多糖の構造

柴 田 信 之 大 川 喜 男

東北薬科大学感染生体防御学教室

要 旨

病原性真菌の細胞壁最外層は、マンナン、ガラクトマンナンなどの親水性の多糖で被われており、抗原性だけでなく宿主細胞との接着にも関与している。*Candida albicans* マンナンは、主鎖が α -1,6結合、側鎖は α -1,2結合および α -1,3結合マンノースで構成された基本骨格を持っているが、さらに側鎖に α -1,6結合マンノースによる分岐構造、 β -1,2結合マンノース、およびリン酸基の存在する複雑な構造であった。*Candida* 属マンナン中の β -1,2結合マンノースは、その結合の様式から1) リン酸基を介してマンナンに置換するもの、2) 側鎖の α -1,2結合マンノースに置換するもの、3) 側鎖の α -1,3結合マンノースに置換するもの、という3種類が存在していた。 β -1,2結合で連なった側鎖はコンパクトなヘリックス構造をとっていた。この特徴がNMR解析での特殊な化学シフト値や強い抗原性を示す原因と考えられる。これらの特徴を二次元NMRシグナルから読み取ることで、各種のマンナンの構造が非破壊的にかなり解析できるようになった。

Key words: カンジダ (*Candida*)、細胞壁マンナン (cell wall mannan)、 β -1,2結合 (β -1,2 linkage)、化学構造 (chemical structure)

はじめに

Candida albicans は Hasenclever および Mitchell¹⁾ によって血清型 A と B の2種類に分類されているが、この2種の血清型は細胞壁最外層の多糖であるマンナンの構造の違いによるものである。主な病原性 *Candida* 属菌種がそれぞれ異なった抗原因子を持つことから、これを利用した菌種同定用の因子血清キットも市販されている²⁾。因子1, 4, 5は *C. albicans* の共通抗原であり、その他に血清型 A では因子6を持っている。因子5は *C. albicans* の他に *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* にも存在している。この因子5および因子6の抗原を形成しているのが β -1,2結合マンノース残基であった。それ以後 *Candida* 属菌の病原性と細胞壁マンナンとの関係に関する解析が多く、多くの研究室で精力的に進められており、これまでに β -1,2結合マンノオリゴ糖に対するモノクローナル抗体の作製³⁾、 β -1,2結合マンノオリゴ糖の化学合成⁴⁾が行われている。さらに遺伝子工学的手法も取り入れられ、 β -1,2結合マンノオリゴ糖鎖と同様の抗原性を示すペプチドがランダムペプチドライブラリー法で合成され⁵⁾、またマンノース転移酵素欠損株が作製されるなど⁶⁾、研究の手法も広がってきている。

リン酸ジエステル結合するオリゴ糖鎖の抗原性および構造

C. albicans マンナンは10 mMの希塩酸で部分加水分解を行うと、多糖分子中のリン酸ジエステル結合が選択的に切断される。この希酸分解により血清型 A, B の両マンナンともに単糖から7糖までのオリゴ糖が数パーセント遊離してくる。この分解で残った多糖部分の、全菌体に対するウサギ抗血清との反応性を調べた結果、血清型 A では大きな低下は見られなかったのに対して血清型 B ではほとんど消失してしまった。この結果は、血清型 B の *C. albicans* 菌体の場合、リン酸基を介して結合しているオリゴ糖鎖部分が抗原性のほとんどを担っていたことを示している。

そこで、これらのオリゴ糖についてそれぞれメチル化分析、NMR分析等により構造解析を行った。Fig. 1に COSY (two-dimensional ^1H - ^1H -correlated spectroscopy) と NOESY (two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy) を組み合わせた二次元NMRによる3糖の解析例を示す。還元末端マンノースである Man-A の1位のプロトンは5.27 ppm 付近にシグナルが現れるので、これを手がかりに1位と2位のプロトン間でのカップリングに基づく COSY のクロスピークから2位のプロトンを、さらに隣のマンノースである Man-B の1位のプロトンとの間では空間的な距離の接近に基づく NOESY のクロスピークから、Man-B の1位のプロトンを帰属することができた。この手法で還元末端側から非

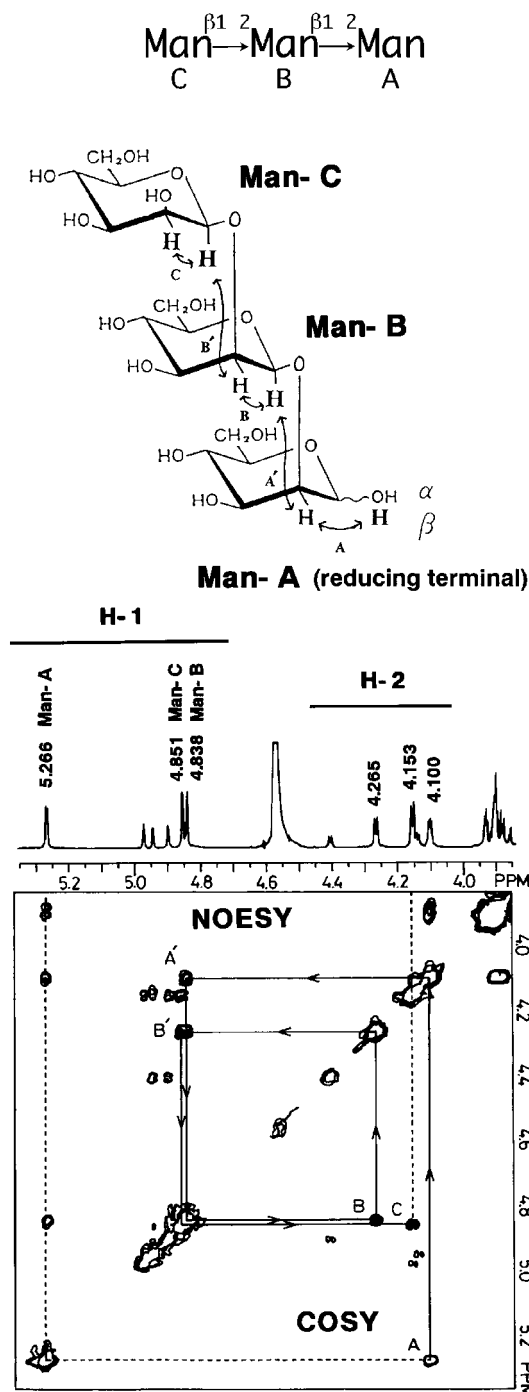


Fig. 1. Sequential assignment of the H-1 and H-2 signals of β-1,2-linked mannotriose. Adapted from Shibata *et al.*⁷⁾

還元末端側まで1位と2位のプロトンのシグナルを連鎖帰属することができ⁷⁾, 血清型 A, B 共に7糖までのオリゴ糖が全てβ-1,2結合からなっていることを確認することができた。この側鎖構造が因子5に対応していた⁸⁾。

β-1,2結合マンノオリゴ糖の3次元構造

Amber の力場を用いた高温ダイナミクスからのシミュレーテッドアニーリング法による立体構造解析の結果, β-1,2結合6糖はマンノース約3残基で1回転するコンパクトなヘリックスを形成していることが示唆され

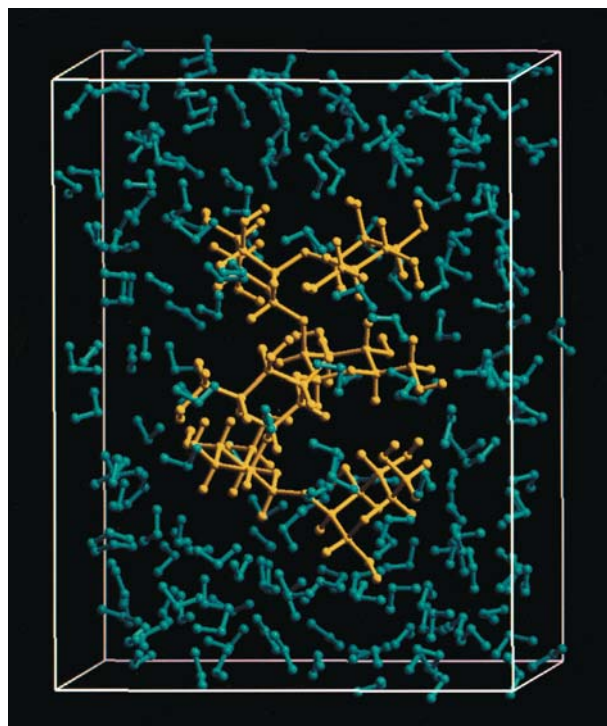


Fig. 2. Three-dimensional structure of the β-1,2-linked mannohexaose (yellow) in water (blue). The low energy conformation was obtained by a simulated annealing method using Amber force field.

た。この6糖について水分子を含めた分子動力学計算を行った結果も, ほぼこのコンホメーション付近で揺らいでいることを示していた (Fig. 2)。これはα-1,2結合マンノオリゴ糖が示す伸びたコンホメーションとは大きく異なっている。Nitzら⁹⁾は化学合成したβ-1,2結合5糖の誘導体についてNMRにより立体構造を解析し, 同様の結果を報告している。

アセトリシスで得られる側鎖オリゴ糖の分岐構造

マンナン希酸分解後の多糖部分について, 水酸基を全てアセチル化し硫酸で穏やかに加水分解すると主鎖のα-1,6結合が選択的に切断される。C. albicans 血清型 B と C. parapsilosis マンナンについて, このアセトリシスと呼ばれる分解反応を行い側鎖部分をオリゴ糖として遊離させ比較解析を行った (Fig. 3)。ゲルろ過で分離した各オリゴ糖についてNMR解析を行った結果, 6糖のシグナルは C. albicans 血清型 B 由来と C. parapsilosis 由来とでは大きく異なり, 前者ではα-1,6結合マンノースのシグナル (4.913 ppm) に加えてα-1,3結合マンノースのシグナル (5.128 ppm) および高磁場シフトしたα-1,2結合マンノースのシグナル (5.22-5.25 ppm) が存在していた。これは C. albicans 血清型 B のマンナンの側鎖にα-1,3結合とα-1,6結合で分岐した構造が存在することを示している。これらの解析の結果から, C. parapsilosis および C. albicans 血清型 B のマンナンの構造を Fig. 4 のように決定した¹⁰⁾。

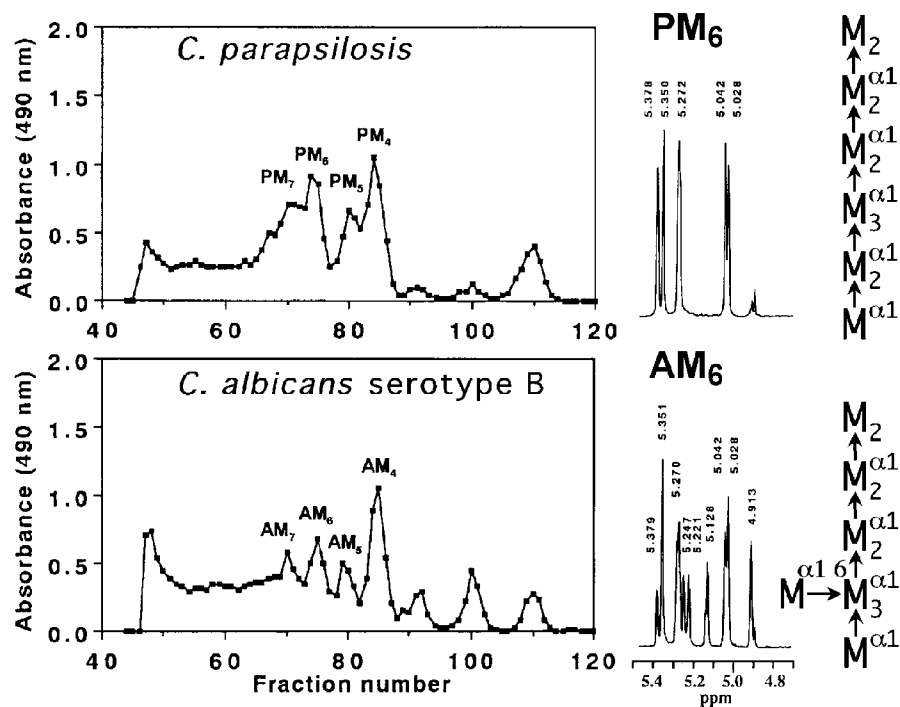


Fig. 3. Difference of the structure of mannohexaose obtained from the mannans of *C. parapsilosis* and *C. albicans* serotype B by acetolysis. Adapted from Shibata *et al.*¹⁰⁾

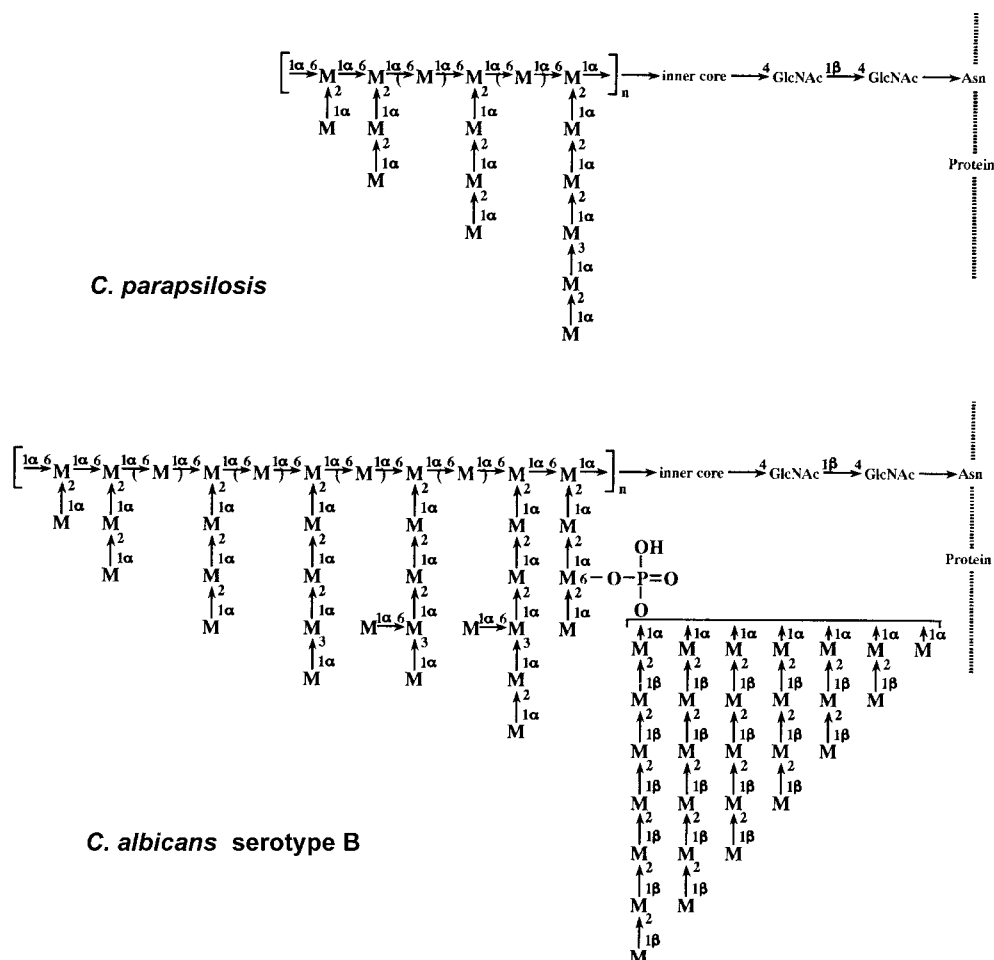


Fig. 4. Structures of the mannans of *C. parapsilosis* and *C. albicans* serotype B. Adapted from Shibata *et al.*¹⁰⁾

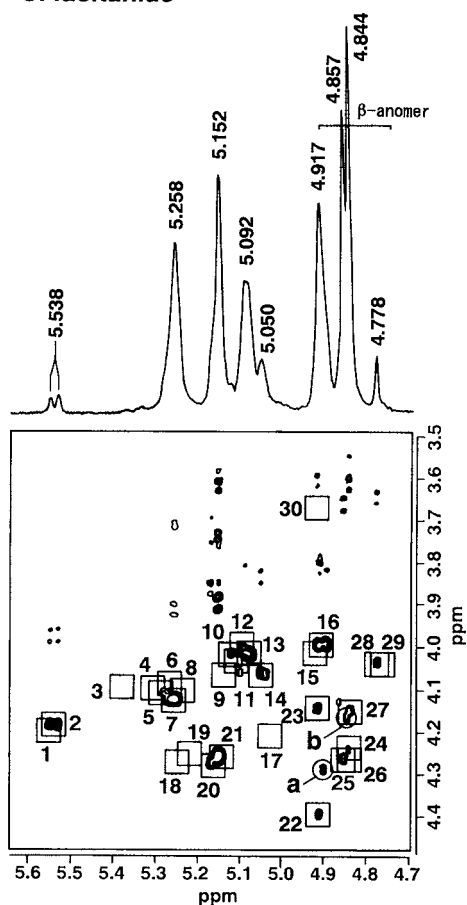
C. lusitaniae

Fig. 6. Two-dimensional HOHAHA spectrum of the mannan of *C. lusitaniae*. The boxed regions in the spectrum indicate the H-1-H-2-correlated cross-peaks. Adapted from Shibata *et al.*¹¹⁾

が α -1,3結合マンノースに置換した構造に対応する。従って、このマンナンは後者のタイプの β -1,2結合糖鎖構造を含んでいないことが分かる。クロスピーク8は、側鎖が α -1,3結合と α -1,6結合で分岐した構造に対応するが、*C. albicans*と異なりこのマンナンにはクロスピーク8は存在せず、側鎖に分岐構造は存在しないことが分かる。

マンナンの生合成

*C. guilliermondii*の β -1,2マンノース転移酵素は基質マンノオリゴ糖の非還元末端が α -1,3結合と α -1,6結合で分岐した構造である場合、その α -1,3結合マンノースに β -1,2結合でマンノースを導入することができるが、非還元末端が α -1,2結合もしくは分岐のない α -1,3結合である場合、本転移酵素は働かなかった¹⁵⁾。

生理活性

マンナン中の β -1,2結合マンノオリゴ糖鎖は、強い抗原性を示すだけでなくTNF- α の産生を誘導すること、上皮細胞やマクロファージへの*Candida*菌体の接着に関与すること、*Candida*菌体の腸管内定着に対して阻止活

性を示すこと、このオリゴ糖に対する抗体が*Candida*感染に対する防御活性を示すことなどが報告されているが^{3, 16-18)}、その活性発現機構については今後の課題となっている。

おわりに

最近マンナンの生合成関連酵素遺伝子であるMNN4の欠損菌株が作成された⁶⁾。この変異株はリン酸基の導入ができないため、リン酸基を介して結合する β -1,2結合マンノオリゴ糖鎖も欠損していると考えられる。現在まだ β -1,2マンノース転移酵素や分岐形成に関与する α -1,6マンノース転移酵素をコードする遺伝子はクローニングされていないが、これらの欠損菌株が作製できると菌体の宿主への接着、炎症の誘導、感染性と糖鎖構造との関係がより詳細に解析できるようになると考えられる。

参考文献

- 1) Hasenclever HF, Mitchell WO: Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J Bacteriol 82: 570-573, 1961.
- 2) Tsuchiya T, Fukazawa Y, Taguchi M, Nakase T, Shinoda T: Serologic aspects on yeast classification. Mycopathol Mycol Appl 53: 77-91, 1974.
- 3) Han Y, Kanbe T, Cherniak R, Cutler JE: Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. Infect Immun 65: 4100-4107, 1997.
- 4) Dromer F, Chevalier R, Sendid B, Improvisi L, Jouault T, Robert R, Mallet JM, Poulain D: Synthetic analogues of β -1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 46: 3869-3876, 2002.
- 5) Jouault T, Fradin C, Dzierszinski F, Borg-Von-Zepelin M, Tomavo S, Corman R, Trinel PA, Kerckaert JP, Poulain D: Peptides that mimic *Candida albicans*-derived β -1,2-linked mannosides. Glycobiology 11: 693-701, 2001.
- 6) Hobson RP, Munro CA, Bates S, MacCallum DM, Cutler JE, Heinsbroek SE, Brown GD, Odds FC, Gow NA: Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. J Biol Chem 279: 39628-39635, 2004.
- 7) Shibata N, Hisamichi K, Kikuchi T, Kobayashi H, Suzuki S: Sequential nuclear magnetic resonance assignment of β -1,2-linked manno oligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain. Biochemistry 31: 5680-5686, 1992.
- 8) Shibata N, Arai M, Haga E, Kikuchi T, Najima M, Satoh T, Kobayashi H, Suzuki S: Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as β -1,2-linked oligomannosyl residues. Infect Immun 60: 4100-4110, 1992.
- 9) Nitz M, Ling CC, Otter A, Cutler JE, Bundle DR: The unique solution structure and immunochemistry

- of the *Candida albicans* β -1,2-mannopyranan cell wall antigens. J Biol Chem **277**: 3440–3446, 2002.
- 10) Shibata N, Ikuta K, Imai T, Satoh Y, Satoh R, Suzuki A, Kojima C, Kobayashi H, Hisamichi K, Suzuki S: Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*. Structure-antigenicity relationship between the cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. J Biol Chem **270**: 1113–1122, 1995.
 - 11) Shibata N, Kobayashi H, Okawa Y, Suzuki S: Existence of novel β -1,2 linkage-containing side chain in the mannan of *Candida lusitanae*, antigenically related to *Candida albicans* serotype A. Eur J Biochem **270**: 2565–2575, 2003.
 - 12) Shibata N, Akagi R, Hosoya T, Kawahara K, Suzuki A, Ikuta K, Kobayashi H, Hisamichi K, Okawa Y, Suzuki S: Existence of novel branched side chains containing β -1,2 and α -1,6 linkages corresponding to antigenic factor 9 in the mannan of *Candida guilliermondii*. J Biol Chem **271**: 9259–9266, 1996.
 - 13) Shibata N, Onozawa M, Tadano N, Hinosawa Y, Suzuki A, Ikuta K, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y: Structure and antigenicity of the mannans of *Candida famata* and *Candida saitoana*. Comparative study of the mannan of *Candida guilliermondii*. Arch Biochem Biophys **336**: 49–58, 1996.
 - 14) Trinel PA, Maes E, Zanetta JP, Delplace F, Coddeville B, Jouault T, Strecker G, Poulain D: *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. J Biol Chem **277**: 37260–37271, 2002.
 - 15) Suzuki A, Shibata N, Suzuki M, Saitoh F, Oyamada H, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y: Characterization of β -1,2-mannosyltransferase in *Candida guilliermondii* and its utilization in the synthesis of novel oligosaccharides. J Biol Chem **272**: 16822–16828, 1997.
 - 16) Jouault T, Lepage G, Bernigaud A, Trinel P, Fradin C, Wieruszeski J, Strecker G, Poulain D: β -1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production. Infect Immun **63**: 2378–2381, 1995.
 - 17) Han Y, Cutler JE: Antibody response that protects against disseminated candidiasis. Infect Immun **63**: 2714–2719, 1995.
 - 18) Han Y, Riesselman MH, Cutler JE: Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. Infect Immun **68**: 1649–1654, 2000.

Structure of Fungal Cell Wall Polysaccharides

Nobuyuki Shibata, Yoshio Okawa

Department of Infection and Host Defense, Tohoku Pharmaceutical University,
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8558, Japan

Candida albicans mannan consists of the α -1,6-linked backbone moiety and the α -1,2- and α -1,3-linked side chains. It also contains α -1,6-branched mannose units, β -1,2-linked mannose units, and phosphate groups. The cell wall mannans of the genus *Candida* possess three types of β -1,2 linked mannose units. One is linked via the phosphodiester linkage, the second type is connected to an α -1,2-linked mannose unit, and the third type is attached to an α -1,3-linked mannose unit. These β -1,2-linked mannose units showed a strong antigenicity and produce the characteristic NMR chemical shifts. Using two-dimensional NMR techniques, we will practically determine the structure of these polysaccharides in a nondestructive manner.

この論文は、第49回日本医真菌学会総会の“シンポジウム4：真菌感染と自然免疫”において発表されたものです。