

## 細胞壁マンナン中に $\beta$ -1,2-結合をもつ Saccharomycetaceae に属する酵母株の検出

大川 喜男\*, 山田 康代

### Detection of Yeast Strains Belonging to the Saccharomycetaceae Family Involving $\beta$ -1,2-Linkages in the Cell Wall Mannan

Yoshio OKAWA\* and Yasuyo YAMADA

(Received November 20, 2008)

We detected 6 yeast strains, *Issatchenkia terricola* IFO 1798, *Saccharomyces dairensis* IFO 0211, *S. exiguus* IFO 1128, *S. unisporus* IFO 0215, *S. yakushimaensis* IFO 1889, and *Torulaspora delbrueckii* IFO 0955, belonging to the Saccharomycetaceae family involving  $\beta$ -1,2-linkages in the cell wall mannan. The 5 cell wall mannans, It-1798-M, Sd-0211-M, Se-1128-M, Su-0215-M, and Td-0955-M, showed the reactivity against factor sera 5 and 6 from a commercially available serum factor kit (Candida Check) in an enzyme-linked immunosorbent assay. The <sup>1</sup>H-nuclear magnetic response patterns of the mannans showed the presence of the  $\beta$ -1,2-linked mannopyranose units, corresponding to the serum factors 5 and 6. By contrast, the Sy-1889-M showed the reactivity against factor serum 6 but not factor serum 5. The mannan did not show the presence of the  $\beta$ -1,2-linked mannopyranose units, corresponding to the serum factor 5.

**Key words** — Saccharomycetaceae; Cell-wall mannan;  $\beta$ -1,2 Linkage; Antigenicity; Structure

一般に世界中に広く分布している子囊菌酵母の *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵工業界でよく使用されており、哺乳動物に対して無害であると考えられている。事実、純培養した *S. cerevisiae* は、各種実験動物に対して病原性を示さないことが報告された。<sup>1,2)</sup> しかしながら、*S. cerevisiae* は *E. coli* K12 と同様に host-vector 系として組換え DNA 実験に使用されており、その安全性に注意が向けられるようになった。最近、Okawa ら<sup>3)</sup> は数種の Saccharomycetaceae に属する株が免疫抑制マウスに対して病原性を示すことを報告した。また Llanos ら<sup>4)</sup> も *S. cerevisiae* の危険性を警告した。このように病原性 *Candida* 属酵母に加えて、非病原性といわれている酵母にも注意を払っていく必要がある。

Tsuchiya ら<sup>5,6)</sup> は多数の酵母の抗原性を研究し、抗原構造を基礎として分類するシステムを提案した。さらに Gorin ら<sup>7)</sup> によって、酵母の細胞壁マンナンの化学構造を識別する分類学的手段として <sup>1</sup>H-NMR スペクトルが使用された。Tsukiji<sup>8)</sup> はスライド凝集反応や NMR 分析によって Saccharomycetaceae に属する酵母の抗原構造や生理化学的特性についての検討を行ったが  $\beta$ -1,2 結合の存在については論述していない。我々は、 $\beta$ -1,2 結合を有するマンナンが主として病原性 *Candida* 属酵母に存在すること

を報告してきたが、Saccharomycetaceae に属する酵母の中では *Pichia pastoris*,<sup>9)</sup> *Saccharomyces kluyveri*<sup>9,10)</sup> と *Torulaspora delbrueckii*<sup>11)</sup> に存在することを報告した。

今回、新たに  $\beta$ -1,2 結合をもつマンナン (抗原) を有する酵母株を見出す目的で、21 種 73 株の Saccharomycetaceae に属する酵母株をスクリーニングし、6 種の酵母株を得たので、各酵母株からマンナンを分離・精製し、その血清学的性質と <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを調べた。

#### 材料および方法

##### 1) 使用菌株

*Issatchenkia terricola* IFO 1798, *Saccharomyces dairensis* IFO 0211, *S. exiguus* IFO 1128, *S. unisporus* IFO 0215, *S. yakushimaensis* IFO 1889, *Torulaspora delbrueckii* IFO 0955 は大阪発酵研究所 (IFO) より購入した。

##### 2) 菌株の培養

各菌株はまず酵母エキス加サブロー斜面寒天培地 (ペプトン 1%, グルコース 2%, 酵母エキス 0.5%) に培養する。このスラントから同液体培地 (YSLM) 200 mL に移植し、27°C, 48 時間振とう培養を行った (seed 培養)。培養液 5 mL を YSLM 200

mL に移植し, 27°C, 48 時間振とう培養を行った (本培養). 各培養液は生理食塩水にて遠心 (3,000 rpm, 10 分) 洗浄を 2 回行い, 大量のアセトンにて脱脂菌体を得た.

### 3) マンナンの調製

粗抽出物並びにマンナンの調製は, Kobayashi らの方法<sup>12)</sup> により行った. すなわち, アセトン脱脂菌体 (20 g) を精製水 200 mL にけん濁し, 135°C, 3 時間オートクレーブ中で熱水抽出した. 冷後, 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し, 上清を流水透析し, 濃縮後凍結乾燥を行った. この抽出物 2 g を 20 mL の精製水に溶解し, これに Fehling 液 40 mL を加え生じた沈殿を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 70°C の温湯 100 mL で遠心洗浄した. 次いで得られた銅マンナン錯体の青色沈殿に Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) 樹脂を加え, この沈殿が完全に消失するまで攪拌した. グラスフィルターでろ過後ろ液を 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で中和後, 流水透析し, その透析内液を濃縮し凍結乾燥を行った. 各菌株から得られたマンナンはそれぞれ, It-1798-M, Sd-0211-M, Se-1128-M, Su-0215-M, Sy-1899-M, Td-0955-M と略す.

### 4) 酵素結合抗体法 (ELISA 法)

*Candida* 属酵母菌体の抗原因子に対するウサギポリクローナル抗体 (ウサギ抗因子血清) は, カンジダチェック (ヤトロン社) を使用した.

ELISA 法は Okawa と Goto の方法<sup>13)</sup> に従って行った. すなわち, 各マンナンを 100 µg/mL となるように 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) に溶解し, この溶液を 1 well 当たり 100 µL ずつ ELISA 用マイクロプレートに入れ, 4°C で一夜置き, 1% (v/v) Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBST, pH 7.4) で 3 回洗浄後, 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) の PBST 溶液 100 µL を加え, 室温で 2 時間放置後, PBST で 3 回洗浄する. 次に各

well に因子血清の希釈系列溶液 100 µL を加え, 室温で 2 時間放置後, PBST で 3 回洗浄する. 次に PBST で 1,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を 100 µL 加え, 室温で 2 時間放置後, PBST で 3 回洗浄する. さらに HRPO の基質として 0.01% *o*-フェニレンジアミンおよび 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 150 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 100 µL 加え, 室温で約 5 分間放置する. 各 well に 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µL ずつを加え 492 nm の吸光度を Micro Plate Reader A4 (Tosoh 社製) で測定した.

### 5) <sup>1</sup>H-NMR 分析

Okawa らの方法<sup>11)</sup> に準じて試料約 10 mg を重水 0.7 mL に溶解し, 日本電子 (JEOL) JNN-GSX 400 核磁気共鳴装置を用い, 400 MHz, 45°C で測定した. 内部標準物質としてアセトン (2.217 ppm) を用いた.

## 実験結果および考察

各酵母の血清学的性質は抗原決定基である細胞壁マンナンの構造によく反映されている. 酵母より新たなマンナン構造を見出し, その生理学的性質を明らかにすることを目的に, Saccharomycetaceae に属する酵母株をスクリーニングし, β-1,2 結合マンノピラノース残基を含むマンナンを有する 6 菌株 (*Issatchenkia terricola* IFO 1798, *Saccharomyces dairensis* IFO 0211, *S. exiguus* IFO 1128, *S. unisporus* IFO 0215, *S. yakushimaensis* IFO 1889, *Torulasporea delbrueckii* IFO 0955) を得た. それぞれ細胞壁マンナン (It-1798-M, Sd-0211-M, Se-1128-M, Su-0215-M, Sy-1899-M, Td-0955-M) を分離精製し, 血清学的性質と構造を検討した.

Table 1 は各菌株を YSLM で培養したときの培養液 1 L より得たアセトン脱脂菌体の重量と各菌体より得たマンナンの収率を示したものである. 全

Table 1. Cell Growth and Yields of the Mannans of Six Yeast Strains Belonging to the Saccharomycetaceae Family

Strain	Acetone-dried cells (g/L) <sup>a)</sup>	Yields of mannan (%) <sup>b)</sup>
<i>I. terricola</i> IFO 1798	3.35	6.2
<i>S. dairensis</i> IFO 0211	3.00	4.7
<i>S. exiguus</i> IFO 1128	2.49	4.6
<i>S. unisporus</i> IFO 0215	1.37	5.7
<i>S. yakushimaensis</i> IFO 1889	2.41	5.7
<i>T. delbrueckii</i> IFO 0955	2.75	9.3 <sup>11)</sup>

a) Acetone-dried weight of the cells in 1 L of the culture.

b) Weight basis of acetone-dried whole cells.

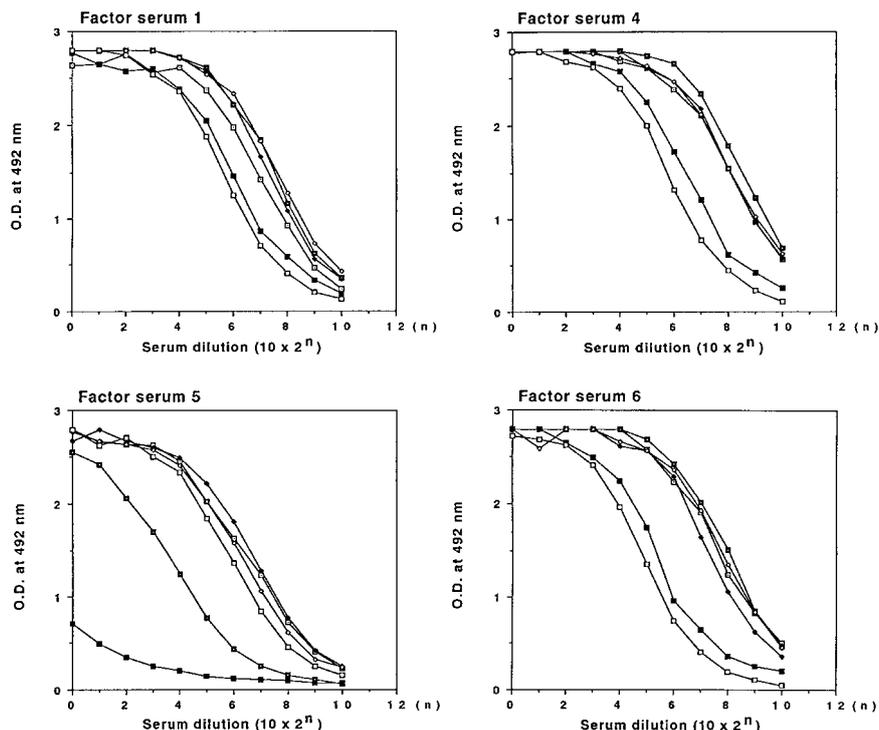


Fig. 1. ELISA of the Mannans of Six Yeast Strains Belonging to the Saccharomycetaceae Family with Factor Sera of *Candida* Check  
 ●, It-1798-M; ◆, Sd-0211-M; ◻, Se-1128-M; ◇, Su-0215-M; ■, Sy-1899-M; □, Td-0955-M<sup>11)</sup>

体をまとめると、アセトン脱脂菌体は2~3 g/L 得られ、マンナンの収率は5~10%であった。

6種のマンナンの因子血清を用いたELISAの結果はFig. 1に示した。5種のマンナン (It-1798-M, Sd-0211-M, Se-1128-M, Su-0215-M, Sy-1899-M, Td-0955-M) は因子血清1, 4, 5並びに6のいずれに対しても反応性を示したが、Sy-1899-Mは因子血清5との反応性を示さなかった。

Fig. 2は6種のマンナンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。6種のマンナン中に $\beta$ -1,2結合マンノピラノース部位の存在は、4.776, 4.842, 4.854 ppmのいずれかのシグナルの存在によって明らかである。<sup>14)</sup> 6種のマンナンのNMRスペクトルの比較はIt-1798-M, Sd-0211-M, Td-0955-Mが同じ化学シフトの $\beta$ -1,2結合マンノピラノース残基に相当する4.843と4.854 ppmのシグナル<sup>14)</sup>と1-O-リン酸結合マンノース部位に相当する5.535と5.552 ppmのシグナル<sup>14,15)</sup>が認められたことから $\beta$ -1,2結合オリゴマンノシル基とマンノシルリン酸基の存在が証明された。他のマンナン (Se-1128-M, Su-0215-M, Sy-1899-M) では $\beta$ -1,2結合マンノピラノシル基の存在は確認できるがリン酸ジエステルに相当するシグナルは認められなかった。6種のマ

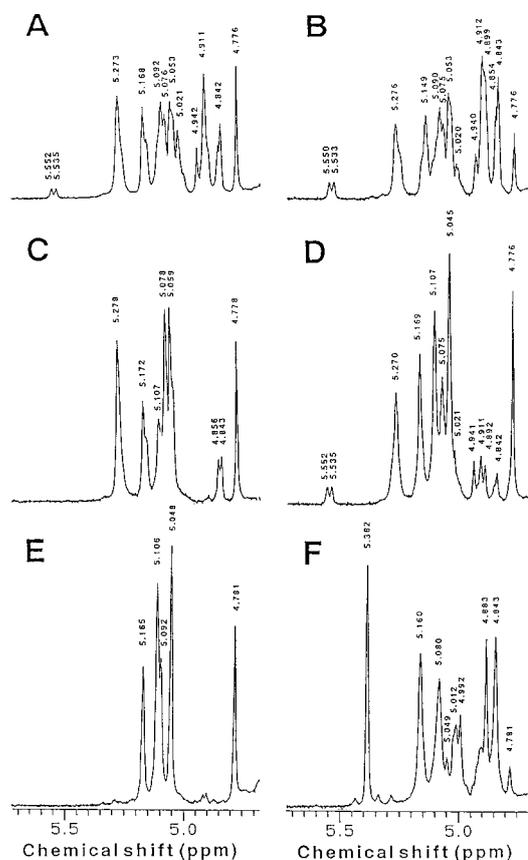


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR Spectra of the Mannans of Six Yeast Strains Belonging to the Saccharomycetaceae Family  
 A, It-1798-M; B, Sd-0211-M; C, Se-1128-M; D, Su-0215-M; E, Sy-1899-M; F, Td-0955-M<sup>11)</sup>

ンナンは *Candida albicans* のすべてのマンナンで認めることができる 5.375 ppm シグナル<sup>14,15)</sup> に相当する Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$  残基を含まないことが明らかである. Sy-1889-M は因子血清 5 との反応性を欠いているが, これは Sy-1889-M の <sup>1</sup>H-NMR の結果より 4.842 と 4.854 ppm の  $\beta$ -1,2 結合オリゴマンノシル基に相当するシグナルの欠如, さらに H-2 領域の相当するシグナルの欠如 (データは示さない) によっても明らかである.<sup>15,17)</sup> 本研究で使用した株のマンナンの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルのパターンが Gorin と Spencer<sup>7)</sup> や Tsukiji ら<sup>8)</sup> の報告と基本的に類似するが, 彼らの結果はいずれも 100 MHz で得たものでパターンのみが示されているのに対し, 本報告での結果 (400 MHz) はシグナルの分離が良好で, その構造について考察することができた.

病原性 *Candida* 属酵母の因子 1, 4, 5 と 6 のうち,  $\beta$ -1,2 結合を含むものは *C. albicans* serotype A の因子 6 の特異的エピトープに相当する  $\beta$ -1,2 結合と  $\alpha$ -1,2 結合を含むオリゴ糖 (Man $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man と Man $\beta$ 1-2Man $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2-Man $\alpha$ 1-2Man)<sup>16)</sup> と *C. albicans* serotype A と B 株共通の主要なエピトープ, 因子 5, のリン酸基に結合した  $\beta$ -1,2 結合オリゴマンノシル基である.<sup>17)</sup> 因子 1 のエピトープ構造は  $\alpha$ -1,2 結合オリゴマンノシル基であり,<sup>18)</sup> 因子 4 のエピトープの構造は  $\alpha$ -1,6 結合の分岐をもつ  $\alpha$ -1,3 と  $\alpha$ -1,2 結合オリゴマンノシル基である.<sup>19)</sup> 我々はさらに, *T. delbrueckii* のマンナンのオリゴマンノシル基 (Man $\alpha$ 1-2Man $\beta$ 1-2Man $\beta$ 1-2Man $\beta$ 1-2-Man $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man) が因子血清 1, 4, 5 並びに 6 とマンナンの反応を強く阻害し, 各因子と交叉反応性を示すことを報告した.<sup>11)</sup> 今回分離したマンナンにこのようなマンノオリゴ糖が存在する可能性もある. マンナン構造を詳細に解析するために各マンナンよりオリゴ糖を分離・精製し, その構造を解析する必要がある.

以上より, 本報告ではすでに指摘されているが,<sup>9-11,20)</sup>  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を含むマンナンが, 病原性 *Candida* 属の株だけでなく, Saccharomycetaceae に属する酵母株にも広く存在することを示した. 我々は様々なストレス (環境因子など) 条件下で生育した各種酵母マンナンの構造と性質の研究が, 酵母特有の生理や病原性酵母の診断・治療を考える上で意義のあることと考

えている.<sup>14,15)</sup> 最近, *S. cerevisiae* mnn 変異株を *Candida* 属の抗原因子に対する抗体によって認識されたエピトープの研究に応用しようとする試みがなされている.<sup>21)</sup> このように, 病原性 *Candida* 属以外の酵母菌株での研究から, 新しい有用な特異的抗原エピトープを見出すことも可能になるであろう.

## REFERENCES

- 1) Maejima K., Shinoda K., Morita C., Fujiwara T., Kitamura T., *J. Med. Sci. Biol.*, **33**, 271-276 (1980).
- 2) Barrett-Bee K., Hayes Y., Wilson R. G., Ryley J. F., *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1217-1221 (1985).
- 3) Okawa Y., Yamada Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 940-942 (2002).
- 4) de Llanos R., Fernández-Espinar M. T., Querol A., *Antonie van Leeuwenhoek.*, **90**, 221-231 (2006).
- 5) Tsuchiya T., Fukazawa Y., Kawakita S., *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **26**, 1-15 (1965).
- 6) Tsuchiya T., Fukazawa Y., Taguchi M., Nakase T., Shinoda T., *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **53**, 77-91 (1974).
- 7) Gorin P. A. J., Spencer J. F. T., (1970) in *Advances in Applied Microbiology* (Umbreit W. W., ed.) Vol. 13, pp. 25-89, Academic Press, New York.
- 8) Tsukiji M., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **24**, 263-273 (1983).
- 9) Kobayashi H., Shibata N., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 494-503 (1986).
- 10) Shibata N., Kojima C., Satoh Y., Satoh R., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 1-12 (1993).
- 11) Okawa Y., Monma K., Shibata N., Kobayashi H., Yamada Y., *Carbohydr. Res.*, **338**, 1175-1182 (2003).
- 12) Kobayashi H., Shibata N., Mitobe H., Ohkubo Y., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 364-375 (1989).
- 13) Okawa Y., Goto K., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46**, 438-443 (2006).
- 14) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167-171 (1994).
- 15) Okawa Y., Goto K., Nemoto S., Akashi M., Sugawara C., Hanzawa M., Kawamata M., Takahata T., Shibata N., Kobayashi H., Suzuki S., *Clin. Dian. Lab. Immunol.*, **3**, 331-336 (1996).

- 16) Kobayashi H., Shibata N., Suzuki S., *Infect. Immunol.*, **60**, 2106-2109 (1992).
- 17) Shibata N., Arai M., Haga E., Kikuchi T., Najima M., Satoh T., Kobayashi H., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **60**, 4100-4110 (1992).
- 18) Kobayashi H., Komido M., Watanabe M., Matsuda K., Suzuki M., Ikeda T., Oyamada H., Shibata N., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **62**, 4425-4431 (1994).
- 19) Shibata N., Ikuta K., Imai T., Satoh Y., Satoh R., Suzuki A., Kojima C., Kobayashi H., Hisamichi K., Suzuki S., *J. Biol. Chem.*, **270**, 1113-1122 (1995).
- 20) Zhang W., Ballou C. E., *J. Biol. Chem.*, **256**, 10073-10079 (1981).
- 21) Ataoglu H., Zueco J., Sentandreu R., *Infect. Immun.*, **61**, 3313-3317 (1993).