

Candida 属真菌の細胞壁マンナンの構造と病原性への関与

柴田 信之

Structure of the *Candida* Cell Wall Mannan and a Role in the Pathogenesis

Nobuyuki SHIBATA

(Received November 20, 2011)

はじめに

真菌症は表在性真菌症, 深部皮膚真菌症, 深在性真菌症の3つのカテゴリーに大別される. 表在性真菌症は *Trichophyton rubrum* などが原因菌である白癬, *Candida albicans* などによる表在性カンジダ症, *Malassezia furfur* などによる皮膚マラセチア症が主である. 深部皮膚真菌症としては *Sporothrix schenckii* によるスポロトリコーシス, *Fonsecaea pedrosoi* などが原因菌種である黒色真菌症がある. 重篤な感染症である深在性真菌症には *Candida albicans* などが原因菌種となるカンジダ症, *Aspergillus fumigatus* によるアスペルギルス症, *Cryptococcus neoformans* によるクリプトコッカス症, *Mucor* 属菌による接合菌症, *Pneumocystis jirovecii* が原因菌種であるニューモシスチス感染症などがある.

深在性カンジダ症は血液を介して脳, 腎臓, 心臓, 肺, 肝臓など多数の臓器に感染病巣を形成する. これは糖尿病, 好中球減少症, 血液透析患者, 中心静脈栄養投与を受けている患者, 広域スペクトル抗生物質やステロイド剤の長期間投与を受けている患者, 臓器移植のため免疫抑制剤の投与を受けている患者, がん患者で放射線療法や抗腫瘍剤の投与を受けている患者など, 免疫能の低下した患者で感染症を発症しやすい.¹⁾ 深在性カンジダ症は増加傾向にあるがこれは免疫不全患者の増加が第一の原因であり, さらに薬剤耐性菌の増加も関係している. 現在, アメリカにおける院内血液感染症の第4位が *Candida* 属菌による感染症であり, アメリカでは *Candida* 血症が年間1万から4万症例発生しているが, その致死率は45-75%と非常に高い. ヒトに対して深在性カンジダ症を引き起こす菌種は17種類以上報告されている. 主な原因菌種は *C. albicans* であり, 深在性カンジダ症の約65%を占めているが, 他の *Candida* 属菌種に

よる感染症が近年増加傾向にある. 原因菌種として *C. albicans* が占める割合はラテンアメリカでは約40%, ヨーロッパでは約70%と地域によって異なっている.²⁾ 日本, シンガポール, 台湾では *Candida* 血症において *C. albicans* は依然として最も検出頻度の高い菌であるが, タイでは *C. parapsilosis* と *C. albicans* が, マレーシアでは *C. parapsilosis* と *C. tropicalis* が主な原因菌となっているなど, 地域によってその原因菌種に違いのあることが明らかになってきた.³⁾ Tsuchiya ら^{4,5)} は *Candida* 属菌を含む真菌の細胞壁多糖抗原の解析を精力的に行い, 菌種に特異的な抗原の多数存在することを明らかにし, 菌種の分類・同定に利用可能であることを示した. *Candida* 属菌の中でも病原性菌として生体から検出されるのは主に *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. krusei* である.⁶⁾ 真菌の細胞壁は β -1,3 グルカン, β -1,6 グルカン, キチン, マンナンタンパク質, 糖脂質, タンパク質などにより形成されている. この細胞壁は細胞の透過性の障壁として, また各種の真菌に特徴的な形態を維持するのに必須である. さらに, 細胞壁は細胞の最外層に存在することから, 感染を引き起こす場合, 宿主との相互作用の最初の段階で関与する分子でもあり, 病原性解析および抗真菌薬開発の目的で多くの研究グループによる細胞壁の研究が進められている.

真菌細胞壁糖タンパク質の生合成

Candida 属菌の細胞壁最外層に存在するマンナンタンパク質の生合成には数十種類の糖転移酵素が関与しているが, N-結合型糖鎖形成の最初の段階は真核細胞において共通の過程である.⁷⁾ Fig. 1 に示すように, まず小胞体でドリコールジリン酸に結合して $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ が形成される. その後グル

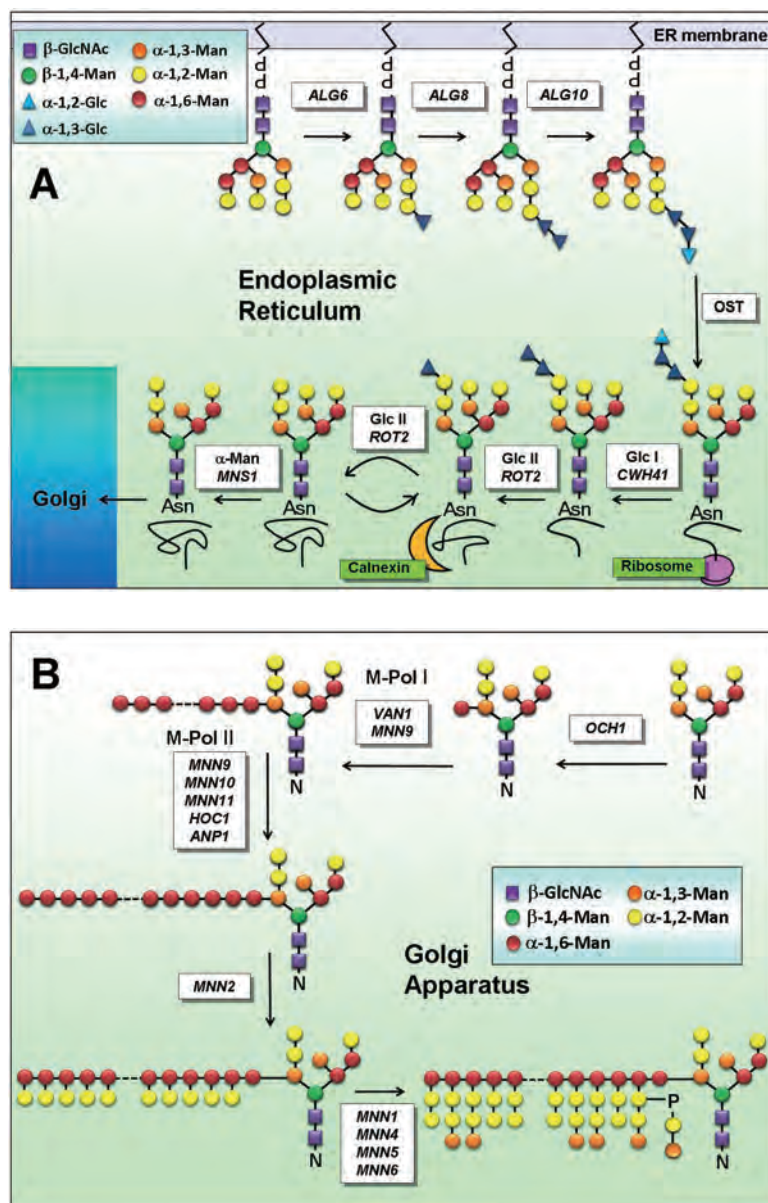


Fig. 1. Biosynthesis of the *N*-linked Mannan of *Candida* Cell Wall

(A) Biosynthesis of the *N*-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum. (B) Biosynthesis of the *N*-linked mannan in the Golgi apparatus.

コース転移酵素 (Alg6p, Alg8p, Alg10p) の作用でグルコース 3 残基が結合し $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ が形成される。オリゴ糖転移酵素 (Ostp) はこの構造を認識し、新たに合成されたタンパク質のアスパラギン残基にオリゴ糖鎖を *en bloc* 転移させ *N*-結合型糖鎖が形成される。次にグルコシダーゼ (Cwh41p, Rot2p) が作用することによりこの糖鎖のグルコース 2 残基が除去されて *N*-結合型の $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ が形成される。このオリゴ糖鎖を認識するレクチン様シャペロンタンパク質であるカルネキシン (calnexin) やカルレティキュリン (calreticulin) によってタンパク質部分が正しく折

り畳まれると、さらにグルコース、マンノースが 1 残基ずつ除去されゴルジ体へと送られて行く。

酵母様真菌では OCH1 遺伝子にコードされた α -1,6-マンノース転移酵素 (Och1p) によってこの *N*-結合型オリゴ糖鎖に多糖構造の主鎖となる最初の α -1,6 結合マンノースが導入される。この反応が多糖の生合成へと向かう最初のステップとなる。さらに数種類の α -1,6-マンノース転移酵素 (Van1p, Mnn9p, Mnn10p, Mnn11p, Hoc1p, Anp1p) が働いて α -1,6 結合マンノースからなる主鎖が伸長していく。この主鎖に α -1,2-マンノース転移酵素 (Mnn2p, Mnn5p) が作用することにより側鎖が伸

長し, α -1,3-マンノース転移酵素 (Mnn1p) も作用して側鎖が形成される. *Saccharomyces cerevisiae* の場合, マンナンの側鎖にはさらに α -1,3 結合マンノ二糖がリン酸基を介して結合している. この糖鎖の形成にはマンノースリン酸転移酵素 (Mnn4p, Mnn6p) が関与している.

真菌細胞壁多糖の構造の多様性

C. albicans の細胞壁抗原多糖であるマンナンは, α -1,6 結合マンノースからなる主鎖に α -1,2 結合マンノースや α -1,3 結合マンノースからなる側鎖を持つ櫛型構造であるという点では *S. cerevisiae* のマンナンと基本骨格は同じである (Fig. 2). この櫛型構造のマンナンは α -1,6 結合を比較的選択的に切断することのできる加酢分解 (アセトリシス)^{8,9)} によって側鎖構造をオリゴ糖へと断片化し, ゲルろ過により分離した各オリゴ糖のメチル化^{10,11)} ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS), NMR 分析などによる構造解析の結果を総合して全体構造が決定されてきた. しかし, 多糖の基本骨格が異なる場合, その分析手法は大きく異なってくる. *C. neoformans* の荚膜多糖であるグルクロノキシロマンナンは α -1,3 結合マンノースからなる主鎖に側鎖としてグルクロン酸やキシロースが結合しているが, この場合アセトリシスでは側鎖を断片化で

きない. そこで過ヨウ素酸酸化で側鎖のみが分解されることを利用して解析が行われている. *A. fumigatus* や *T. rubrum* のガラクトマンナンも側鎖のガラクトフラノース鎖は酸処理やアセトリシスに不安定であり加水分解されてしまう. そのためガラクトフラノースが連続して結合する側鎖オリゴ糖を分離する方法は確立されていない. しかし, メチル化 GC-MS 分析, 高分解能二次元 NMR などを組み合わせることによって, ある程度, 多糖のまま構造を決定していくことができるようになってきた.

Candida 属菌のマンナンにリン酸基を介して結合する β -1,2 結合マンノオリゴ糖

S. cerevisiae のマンナンは側鎖にリン酸基を介して α -1,3 結合マンノ二糖が結合している.¹²⁾ しかし, *C. albicans* のマンナンにリン酸基を介して結合しているのは β -1,2 結合マンノオリゴ糖であった.¹³⁾ そしてこの β -1,2 結合糖鎖が *C. albicans* のマンナンの強い抗原性を担っていた. この β -1,2 結合マンノオリゴ糖の ^1H NMR スペクトルは特殊なシグナルを示していた. 一般に同じ結合様式で連続するオリゴ糖鎖の各糖残基の H-1 シグナルは還元末端糖残基以外は同じ化学シフト値を示すため, オリゴ糖鎖が長くなるとそれとともに中間糖残基に対応する 1 カ所の H-1 シグナル強度のみが比例して強く現れてくる. α -1,2 結合マンノースの連続するオリゴ糖の場合 5.28 ppm, α -1,3 結合マンノースの連続するオリゴ糖の場合 5.13 ppm, α -1,6 結合マンノースの連続するオリゴ糖の場合 4.90 ppm のシグナルのみが高くなってくる. しかし, この β -1,2 結合マンノースの連続するオリゴ糖は二糖から七糖まで, 長くなるに従ってそれぞれマンノース残基の数だけ新たなシグナルが現れ, 各オリゴ糖で異なる化学シフト値を示していた.¹⁴⁾ これらの H-1 シグナルは糖残基内の H-1-H-2 相関を示す two-dimensional ^1H - ^1H -correlated spectroscopy (COSY) とグリコシド結合を介した糖残基間の H-1-H-2' の nuclear Overhauser effect (NOE) を利用した two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) を組み合わせた連鎖帰属により, 還元末端マンノースの H-1 シグナルから非還元末端マンノースの H-1 シグナルまで帰属することができた (Fig. 3, Fig. 4).¹⁵⁾ さらに total correlation spectroscopy (TOCSY) 解析で各環プロトンの帰属を行い ^1H NMR および ^{13}C NMR シグナルの完全

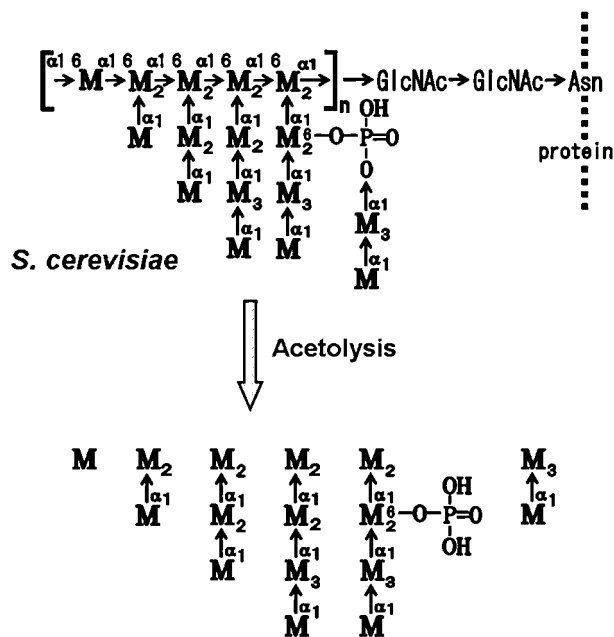


Fig. 2. Structure of the Cell-Wall Mannan of *S. cerevisiae*

M denotes an α -D-mannopyranose residue. The acetolysis cleaves the α -1,6-linkage of the mannan to produce side-chain oligosaccharides.

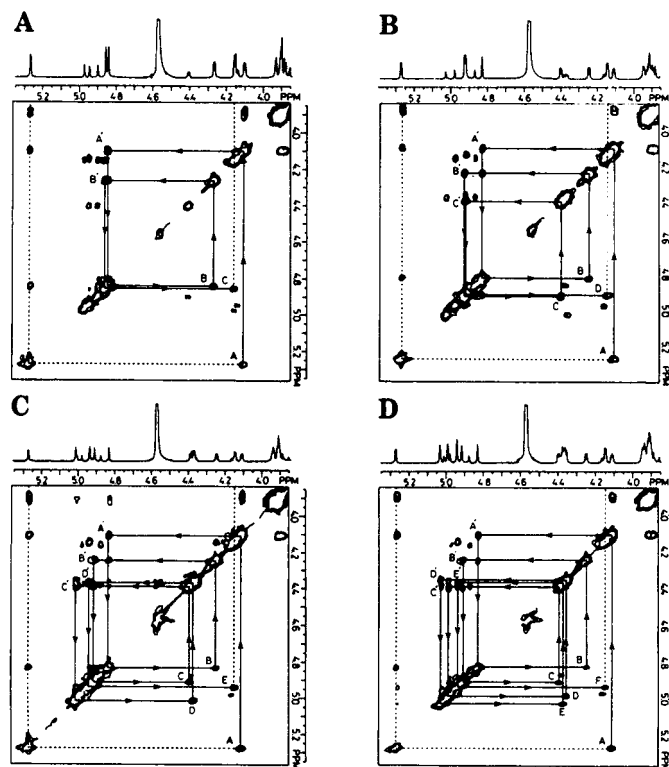


Fig. 3. Sequential H-1-H-2' Connectivities of Mannose Residues of the β -1,2-linked Manno oligosaccharide

(A) Mannotriose; (B) Mannotetraose; (C) Mannopentaose; (D) Mannohexaose. The right side of the diagonal shows COSY, and the left side of the diagonal shows NOESY. Primed letters indicate interresidue H-1-H-2' NOE cross-peaks and unprimed letters the H-1-H-2 correlated cross-peaks due to J-coupling. Arrows indicate the direction of the sequential connectivity from the reducing terminal residue to the nonreducing terminal residue.

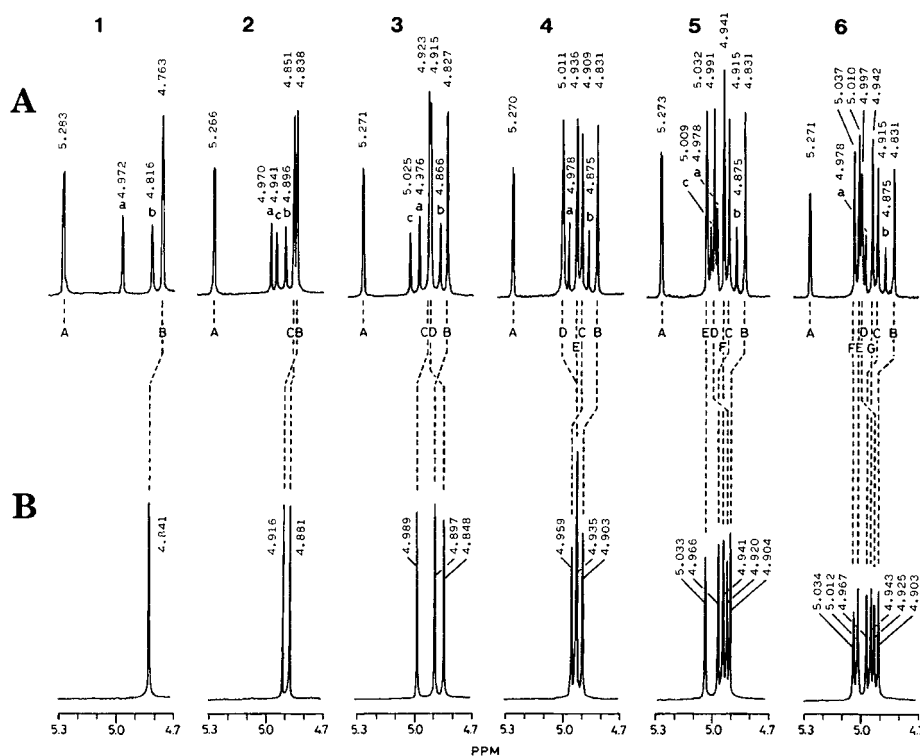


Fig. 4. ^1H NMR Spectra of the β -1,2-linked Manno oligosaccharides (A) and their Corresponding Alcohols (B)

(1) Mannobiose; (2) Mannotriose; (3) Mannotetraose; (4) Mannopentaose; (5) Mannohexaose; (6) Mannohexaose. The capital letters from A to G refer to the mannose residues from the reducing terminal.

帰属を行うことができた。¹⁶⁾ 同時期に Poulain らのグループ^{17,18)} もこのオリゴ糖シリーズの NMR シグナルの完全帰属を行っている。これらの結果から得られるマンノース残基間の NOE, β -1,2 結合二糖のグリッドサーチによる低エネルギーコンホメーション解析, Discover プログラムの Amber の力場を用いた 900 K の高温分子動力学シミュレーションから段階的に絶対 0°C 付近まで温度を下げていくシミュレーテッドアニーリング法による低エネルギーコンホメーション解析の結果, このオリゴ糖シリーズがマンノース 3 残基で 1 回転するコンパクトに折り畳まれたヘリックス様立体構造を形成しているという結果が得られた (Fig. 5).¹⁹⁾ Nitz ら²⁰⁾ は化学合成した β -1,2 結合五糖のプロピル誘導体についてマンノース残基 n と $n+3$ の間に NOE を検出し, 同様のヘリックス様立体構造を報告している。これは α -1,2 結合マンノオリゴ糖が比較的長く伸展したコンホメーションをとるのとは大きく異なるものであり, この特徴的なコンホメーションが β -1,2 結合マンノオリゴ糖の強い抗原性に関与していると考えられる。

Candida 属真菌のマンナンの側鎖末端に存在する β -1,2 結合マンノース

C. albicans マンナンが *S. cerevisiae* マンナンと大きく異なる点の一つが側鎖に存在する β -1,2 結合マンノースの存在であるが, リン酸基を介して結合する β -1,2 結合マンノースの他にリン酸基を介さず直接側鎖に結合する構造も存在していた。*C. albicans* は 2 種類の血清型 (血清型 A および B) の存在することが知られているが,²¹⁾ この血清型の違いはリン酸基を介さず直接側鎖に結合する β -1,2 結合マンノースの存在によるものであった。^{22,23)} *C. albicans* 菌体をウサギに免疫して作成した抗 *C. albicans* 血清は両血清型とも主に β -1,2 結合マンノースに対する抗体を含んでいた。血清型 B のマンナンでは, 希酸加水分解でリン酸ジエステル結合のみを切断し β -1,2 結合マンノオリゴ糖を除去すると, この抗体との反応性が著しく低下したが, 血清型 A のマンナンでは大きな反応性の低下が見られなかった。¹³⁾ この違いは血清型 A のマンナンの側鎖非還元末端に β -1,2 結合マンノースが 1~3 残基結合する構造, $\text{Man}\beta 1\text{-}[2\text{Man}\beta 1]_n\text{-2Man}\alpha 1\text{-}$

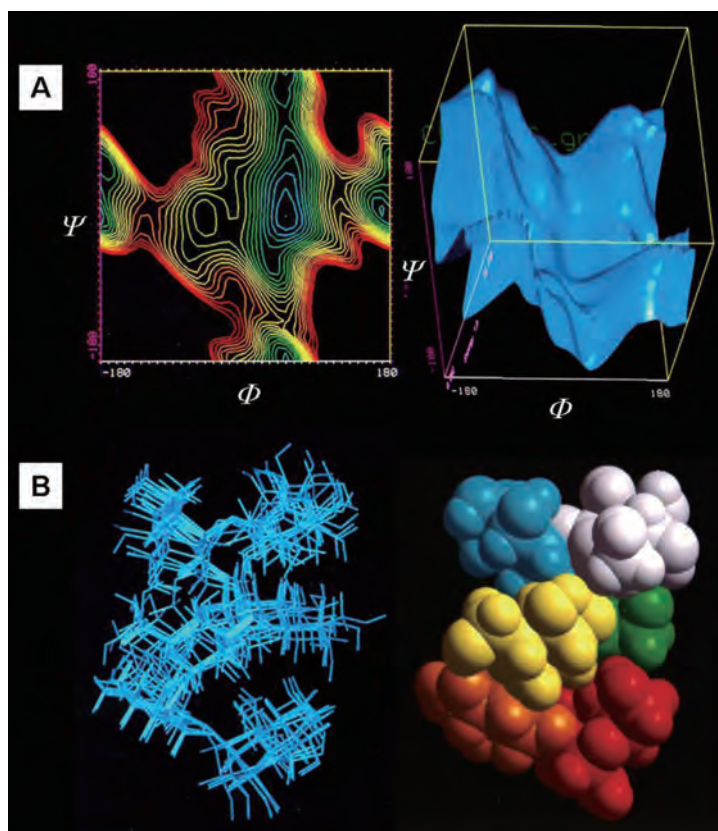


Fig. 5. Conformation Analysis of the β -1,2-linked Mannoooligosaccharides

(A) Relaxed-residue steric energy map of the β -1,2-linked mannoobiose as a function of the Φ (H-1-C-1-O-1-C-2') and Ψ (C-1-O-1-C-2'-H-2') torsion angles. (B) Lowest energy conformers of the β -1,2-linked mannohexaose obtained by simulated annealing from 900 K molecular dynamics.

2Man α 1-2Man α 1-2Man (n=0-2), が存在しこの β -1,2結合マンノースが抗体と反応したことによるものであった. この側鎖構造の存在は血清型Aのマンナンが α -マンノシダーゼ処理に抵抗性を示し, 多くの側鎖が分解されずに残ること, さらに α -1,6結合を選択的に切断するアセトリシスを温和な条件で行いフラグメント化して得られたオリゴ糖の ^1H NMR解析で明らかとなった.^{24,25)} マンナンの側鎖にリン酸基を介さず直接結合する β -1,2結合マンノースを含む構造は *C. albicans* 血清型A^{24,27)} の他には *C. tropicalis*,²⁸⁾ *C. guilliermondii*,²⁹⁾ *C. saitoana*,³⁰⁾

C. lusitaniae,³¹⁾ *C. glabrata*³²⁾ などでは明らかにしてきたが, その全体構造はそれぞれの菌種に特徴的なものであった (Fig. 6).

糖鎖構造と ^1H NMRシグナルの加成則

これまで得られたマンノオリゴ糖の構造と ^1H NMRのH-1およびH-2シグナルの帰属結果をまとめると, 多糖のdouble quantum filtered (DQF)-COSYもしくはTOCSYで得られるH-1-H-2相関クロスピークの位置を Fig. 7, その帰属結果を Table 1のように表すことができる.²⁷⁾ 非還元末端の α -

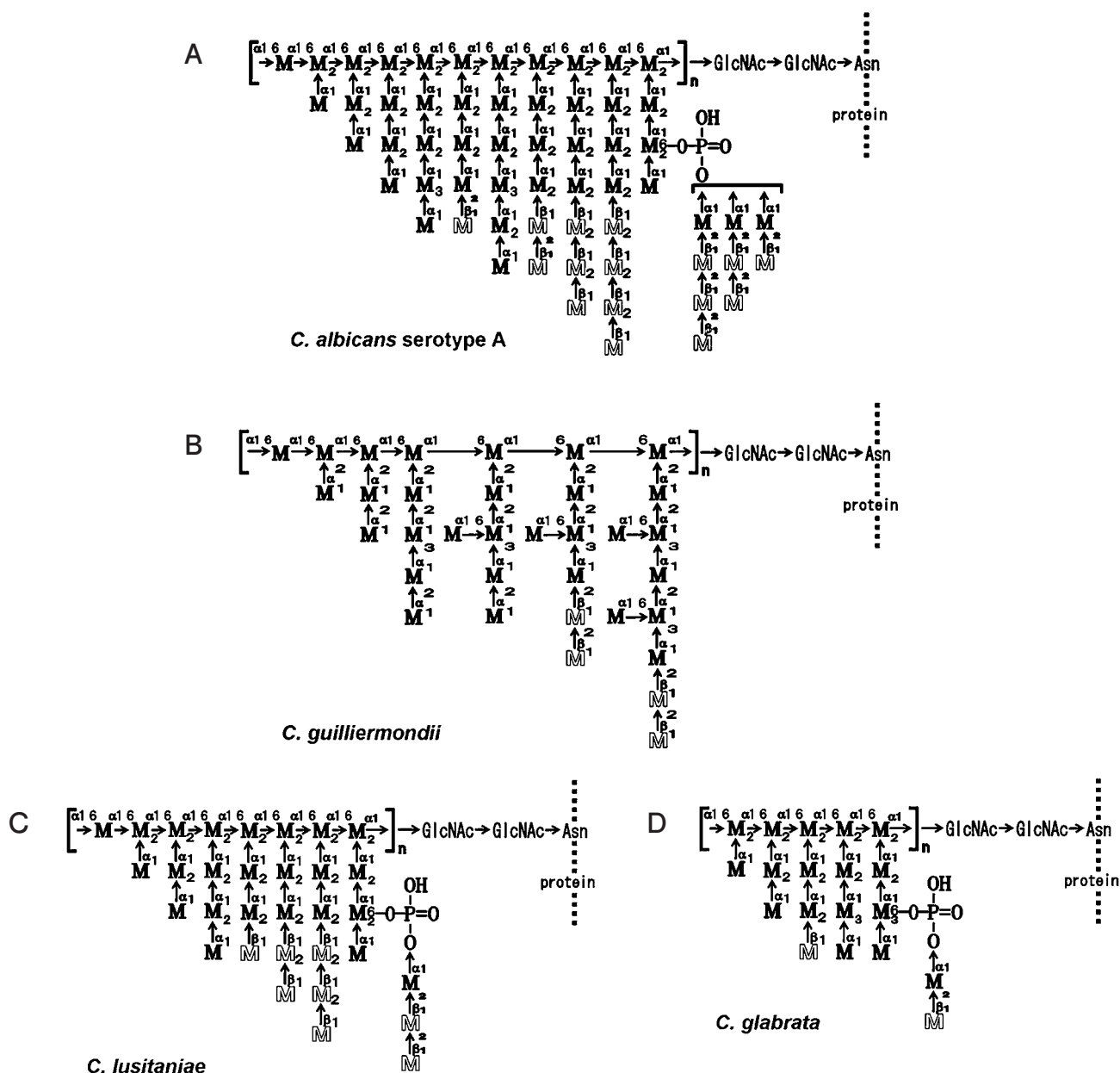


Fig. 6. Structure of the Cell Wall Mannans of *Candida* Species

(A) *C. albicans* serotype A, (B) *C. guilliermondii*, (C) *C. lusitaniae*, (D) *C. glabrata*. M set in outlined type indicates β -D-mannopyranose residue. These mannans contain the β -1,2-linked mannose residues at the nonreducing terminal side of the side-chains as well as at the phosphodiesterified oligosaccharide moiety.

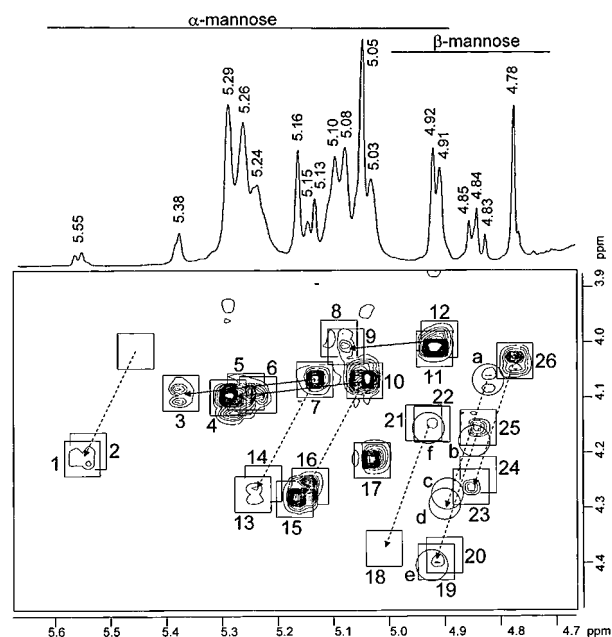


Fig. 7. TOCSY Spectrum of the Mannan of *C. albicans* Serotype A

The boxed regions in the spectrum indicate the H-1-H-2-correlated cross-peaks of the α - and β -mannose residues in the acid-stable polysaccharide moiety. The circled cross-peaks correspond to the β -1,2-linked mannose residues of the phosphodiesterified acid-labile oligosaccharide side chains. The broken- and continuous-line arrows indicate the shifts in the cross-peaks caused by the addition of the β -1,2-linked mannose residues and the α -1,2-linked mannose residues, respectively.

Table 1. Assignments and Additivity Rule of the NMR Signals of *C. albicans* J-1012 Mannan

Cross peak	δ (p.p.m.)		Residue ^a	Cross-peak shifted by the addition of ($\Delta\delta$ of H-1/H-2)	
	H-1	H-2		Man β 1 \rightarrow 2	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n
1	5.55	4.21	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate	2 (-0.01/-0.02)	
2	5.54	4.19	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow phosphate		
3	5.38	4.10	α 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 3 Man 1 \rightarrow 2		
4	5.29	4.10	Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2		
5	5.26	4.10	Man 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow 2		
6	5.24	4.10	α 1 \rightarrow 3 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2		
			↑ 6		
			Man 1		
7	5.14	4.07	α 1 \rightarrow 6 Man 1 \rightarrow 3	13 (+0.11/+0.20)	14 (+0.08/+0.18)
8	5.10	4.00	α 1 \rightarrow 6 Man 1 \rightarrow 6 Man 1 \rightarrow 6 Man 1 \rightarrow 6		
			↑ 2		
			Man 1(\rightarrow 2 Man 1) _n		
9	5.08	4.01	(\rightarrow 6 Man 1 \rightarrow) _n		
			↑ 2		
			Man 1(\rightarrow 2 Man 1) _n		
10	5.05	4.07	Man 1 \rightarrow 2	15 (+0.11/+0.21)	16 (+0.10/+0.19)
11	4.92	4.01	Man 1 \rightarrow 6		
12	4.91	4.00	Man 1 \rightarrow 6(Man β 1 \rightarrow 6) _n Man 1 \rightarrow 6		
13	5.25	4.27	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 3	14 (-0.03/-0.02)	
14	5.22	4.25	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow 3		
15	5.16	4.28	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2	16 (-0.01/-0.02)	
16	5.15	4.26	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow 2		
17	5.03	4.21	α 1 \rightarrow 3 Man 1 \rightarrow 2		
18	5.01	4.37	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2		
19	4.91	4.40	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2	20 (-0.01/-0.02)	
20	4.90	4.38	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2		
21	4.93	4.14	Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2		
22	4.91	4.14	Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2	18 (+0.10/+0.23)	
23	4.85	4.26	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2	24 (-0.01/-0.02)	
24	4.84	4.24	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2		
25	4.84	4.15	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2	19 (+0.07/+0.25)	20 (+0.06/+0.23)
26	4.78	4.04	Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2	23 (+0.07/+0.22)	24 (+0.06/+0.20)
a	4.83	4.07	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate	d (+0.08/+0.23)	c (+0.06/+0.21)
b	4.85	4.17	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate	e (+0.08/+0.24)	
c	4.89	4.28	Man β 1 \rightarrow 2(Man β 1 \rightarrow 2) _n Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate		
d	4.91	4.30	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate		
e	4.93	4.41	Man β 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate	e (-0.02/-0.01)	
f	4.93	4.16	Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow 2 Man 1 \rightarrow phosphate		

a) Chemical shifts are for mannose residues in bold. n>0

1,2 結合マンノースにさらにマンノースが α -1,2 結合で結合した場合、実線の矢印で示すようにそのクロスピークはクロスピーク 10 からクロスピーク 4 へとシフトすることを示している。このシフトはベクトルの長さで角度で表すことができるが、非還元末端の α -1,3 結合マンノースにさらにマンノースが α -1,2 結合で結合した場合は、クロスピーク 7 からクロスピーク 3 へとシフトするが、ベクトルの始点が変わり平衡移動しただけで長さや角度は同じである。一方、非還元末端の α -1,2 結合マンノースにさらにマンノースが β -1,2 結合で結合した場合、そのクロスピークは破線の矢印で示すようにクロスピーク 10 からクロスピーク 15 へとシフトすること、非還元末端 α -1,3 結合マンノースにさらにマンノースが β -1,2 結合で結合した場合は、クロスピーク 7 からクロスピーク 13 へとシフトすることが明らかとなった。この加成則は、一見不規則に現れる β -1,2 結合マンノオリゴ糖のクロスピークにも適用できるものであった。²⁷⁾ これらのクロスピークの解析により多糖をフラグメント化することなく構造に関する情報を得ることができるようになった。

分岐側鎖の解析

これまで *C. albicans* マンナンは α -1,2 結合、 α -1,3 結合、および β -1,2 結合マンノースからなる直鎖構造と考えられていた。真菌多糖に分岐するマンノオリゴ糖鎖の存在することは、最初に Zhang および Ballou³³⁾ によって *Saccharomyces kluyveri* のマンナンタンパク質の *O*-結合糖鎖中に

見いだされた。そこで我々はこの真菌の多糖部分について温和な条件でアセトリシスを行い、得られたオリゴ糖のメチル化 GC-MS 分析および ¹H NMR 解析を行いマンナンの側鎖にも *O*-結合型糖鎖に存在するものと同様の 3,6 分岐を持つマンノオリゴ糖側鎖の存在することを明らかにした。³⁴⁾ ¹H NMR シグナルの帰属の結果、予想外にこの 3,6 分岐マンノースに隣接する α -1,2 結合マンノースのシグナルが 5.27 ppm から 5.22 ppm へと約 0.05 ppm 高磁場シフトしていた。この特徴的なシグナルを利用してマンナン抗原の側鎖の分岐を検出することができる。各種の *Candida* マンナンについて ¹H NMR シグナルを解析した結果、*C. albicans* 血清型 B のマンナンは 5.22 ppm 付近にシグナルが現れていた。そこでこの多糖構造の再解析を行った結果、Fig. 8 に示すように 3,6-分岐を持つオリゴ糖側鎖の多く存在する構造であることが明らかとなった。³⁵⁾ *C. stellatoidea* についても側鎖に同様の分岐の存在することが明らかとなった。³⁶⁾ *C. albicans* の *N*-結合するマンナン部分に分岐側鎖の存在する可能性は、多糖のメチル化分析の結果から示唆されていた。³⁷⁾ しかし、一般に用いられるアセトリシス条件でフラグメント化すると、側鎖に分岐で存在する α -1,6 結合マンノースが切断されてしまい、分岐構造を保った側鎖オリゴ糖を得ることができず、その存在は実証されていなかった。

マンノース転移酵素の基質特異性

我々は *Candida* 菌体をガラスビーズを用いて破

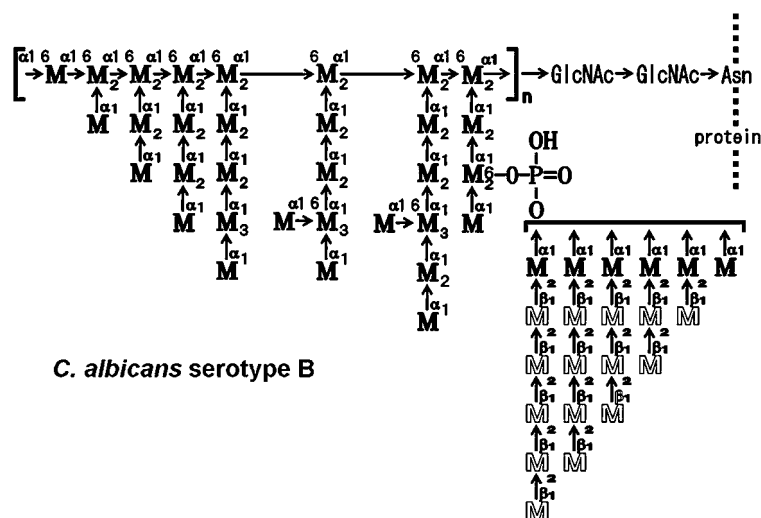


Fig. 8. Structure of the Cell Wall Mannan of *C. albicans* Serotype B

This mannan contains the 3,6-branched mannose residues at the side-chains. The β -1,2-linked mannose residues are present only at the phosphodiesterified oligosaccharide moiety.

Table 2. Substrate Specificity of the Mannosyltransferase Activity in the Enzyme Fraction from *Candida* spp.

Substrate (5 mM)	Mannose incorporated (nmol/mg protein/h) β -1,2-Mannosyltransferase		
	<i>C. albicans</i> serotype A	<i>C. albicans</i> serotype B	<i>C. stellatoidea</i>
Man β 1-2Man-PA	0	- ^{a)}	-
Man β 1-2Man β 1-2Man-PA	0	-	-
Man β 1-2Man α 1-2Man-PA	20	-	-
Man β 1-2Man β 1-2Man β 1-2Man-PA	0	-	-
Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	0	-	-
Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	29	56	35
Man β 1-2Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	29	-	-
Man β 1-2Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	0	-	-
	<i>C. guilliermondii</i>		
	β -1,2-Mannosyltransferase ^{b)}	α -1,6-Mannosyltransferase ^{b)}	
Man α 1-3Man α 1-2Man-PA	13	149	
Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	0	0	
Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	1	41	
Man α 1-3Man α 1-2Man-PA 6 Man α 1	52	-	
Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	1	49	
Man α 1-3Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA	6	97	
Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA 6 Man α 1	52	-	
Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA 6 Man α 1	60	-	
Man α 1-3Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man-PA 6 Man α 1	48	-	

a) Not determined.

b) The β -1,2-mannosyltransferase and α -1,6-mannosyltransferase activities were calculated from the amount of an α -mannosidase resistant and susceptible enzyme reaction products, respectively.

碎することによりミクロソーム画分を調製し、ゴルジ体に存在する *Candida* マンナンの生合成に関与するマンノース転移酵素の基質特異性解析を行った。 β -1,2-マンノース転移酵素検出のための基質は各種のマンナンのフラグメント化により得たマンノオリゴ糖を用いてピリジルアミノ (PA) 化体を調製し、酵素反応の検出は蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーにより行った。最初に二糖から四糖までの α -1,2 結合マンノオリゴ糖の PA 誘導体を用いて、このオリゴ糖に 1 残基目の β -1,2 結合マンノースを導入する β -1,2-マンノース転移酵素 I の活性の検出を試みたが、血清型 A, B 共に活性は検出できなかった。しかし、 β -1,2 結合マンノースを非還元末端に 1 残基含むマンノオリゴ糖の PA 誘導体を基質とすることで、2 残基目の β -1,2 結合マンノースを導入する β -1,2-マンノース転移酵

素 II の活性を検出することができた (Table 2)。³⁸⁾ 非還元末端に β -1,2 結合マンノースを持つ構造は血清型 A の特異構造であるが、この構造を持たない *C. albicans* 血清型 B および *C. stellatoidea* でも活性が検出された。血清型 A と B を分ける key enzyme である β -1,2 マンノース転移酵素 I は血清型 A にもみ存在すると考えられるが、この結果は、 β -1,2 マンノース転移酵素 II は両血清型菌株に存在していることを示唆している。

C. albicans では β -1,2 マンノース転移酵素 I の活性を検出できなかった。これはこの酵素の基質の認識の仕方が関係していると考えられる。 β -1,2 結合マンノースをマンナンの側鎖に含む真菌は何種類も存在するが、これらの化学構造解析の結果からその結合位置は菌種によって異なることが明らかとなっている。 Fig. 9 に示すように、 *C. albicans*

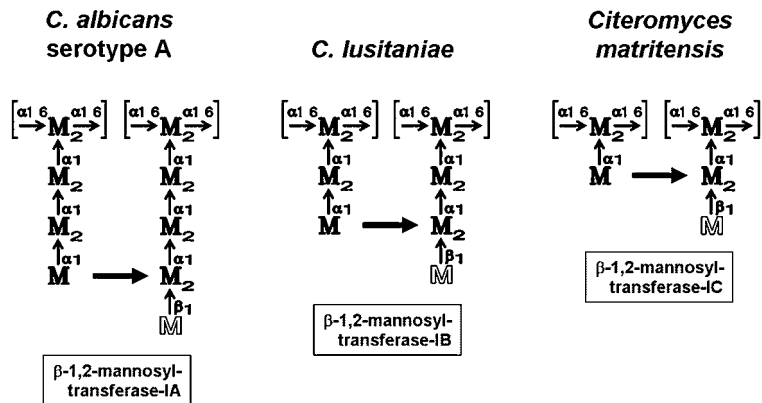


Fig. 9. Hypothetical Substrates of the β -1,2-Mannosyltransferase-I of three *Candida* Species.

では α -1,6 結合からなる主鎖を含めて 4 残基まで α -1,2 結合マンノースが伸長した側鎖にのみ β -1,2 結合マンノースが結合しており、それより短い側鎖には全く β -1,2 結合マンノースは結合していない. *C. lusitaniae* の場合、主鎖を含めて 3 残基まで α -1,2 結合マンノースが伸長した側鎖にのみ β -1,2 結合マンノースが結合している.³¹⁾ さらに、*Citeromyces matritensis* では主鎖に 1 残基 α -1,2 結合マンノースが伸長した側鎖にのみ β -1,2 結合マンノースが結合している.³⁹⁾ これらの結果から α -1,2 結合マンノース側鎖に 1 残基目の β -1,2 結合マンノースを導入する β -1,2-マンノース転移酵素 I は、基質である α -1,2 結合マンノオリゴ糖側鎖の長さを主鎖の α -1,6 結合マンノースも含めて認識していることを示唆している. 一方、*C. guilliermondii* マンナンの場合、側鎖の α -1,3 結合マンノースに β -1,2 結合マンノースが結合している.²⁹⁾ この菌の β -1,2-マンノース転移酵素の基質特異性を調べた結果、Table 2 に示すように非還元末端に α -1,3 結合マンノースを持っていても直鎖のオリゴ糖とは反応せず、3,6-分岐の存在するマンノオリゴ糖のみを基質とすることが明らかとなった.⁴⁰⁾ さらに側鎖の分岐形成に関与する α -1,6-マンノース転移酵素は末端に α -1,3 結合マンノースの存在を必要とすることが分かった.⁴¹⁾ 従って、これらの酵素の場合は糖鎖の長さではなく非還元末端構造を基質として認識することが明らかになった. これらの酵素の基質特異性を利用することにより、これまで自然界からは見いだされていない構造のマンノオリゴ糖や多糖を酵素合成することができた. 酵素合成で得られるオリゴ糖は異性体を含まないため、新たな酵素反応の基質として、さらに構造解析用標準品として利用することができる.^{27,40)}

C. albicans のゲノムプロジェクトは 2003 年に完了し、そのデータベースが公開されているが、この β -1,2 マンノース転移酵素の遺伝子はしばらく不明のままであった. しかし、最近 Mille ら⁴²⁾ は *Pichia pastoris* マンナン中に β -1,2 結合マンノースが存在していることを利用し、この遺伝子の中に *S. cerevisiae* のマンノース転移酵素 Mnn4p の C 末端に存在するリシン-グルタミン酸を多く含む特徴的な繰り返し配列 (KKKKKEEEE) を基にプローブを作成し新規遺伝子を検出し、その中に 4 種類の β -1,2-マンノース転移酵素遺伝子の存在を確認した. さらにこの遺伝子を基に BLAST 解析を行い、*C. albicans* に 9 種類のホモログ遺伝子の存在することを明らかにした. 彼らはその中の 4 種類 (CaBmt1p-CaBmt4p) の欠損株を作成し、その表現型の違いから *C. albicans* マンナン生合成におけるこれらの酵素の作用部位を明らかにしている.⁴³⁾

ホスホリポマンナン

Poulain のグループ⁴⁴⁻⁴⁶⁾ は、 β -1,2 結合マンノースの連続するオリゴ糖鎖が *C. albicans* 菌体表層の糖脂質であるホスホリポマンナンと呼ばれる分子にも存在することを明らかにした. Iyata-Ombetta ら⁴⁷⁾ は *C. albicans* がマクロファージに取り込まれたときホスホリポマンナンが ERK1/2 を抑制し、Bad のリン酸化を抑制することによりマクロファージのアポトーシスを引き起こし、*C. albicans* の殺菌に抵抗性を示す働きのあることを報告している. また、Jouault ら⁴⁸⁾ はこのホスホリポマンナンが J774 細胞の Toll-like receptor 2 を介して NF- κ B を活性化することにより TNF- α の産生を誘導することを示している.

糖タンパク質型酵素

真菌は細胞壁最外層に存在するマンナンタンパク質以外にも糖タンパク質型酵素の存在することが知られている。インベルターゼ、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、酸性ホスファターゼ、キチナーゼ、カルボキシペプチダーゼ Y、トレハラーゼなどがマンナンタンパク質もしくは糖タンパク質型酵素である。さらにゴルジ体に存在する β -1,6-グルカン合成酵素も糖タンパク質型酵素であると報告されている。⁴⁹⁾ その他にも真菌の多数の酵素が糖タンパク質型と考えられる。従って、小胞体やゴルジ体で糖鎖生成に関与する酵素の変異・欠損は細胞壁だけでなく細胞の機能そのものにも大きな影響を与える場合がある。実際、新たな GDP-マンノースの生成に必要なゴルジ GDPase をコードする遺伝子 (GDA1) を欠損させると糖タンパク質の *O*-結合型糖鎖の減少だけでなく、細胞壁キチン含量の増加や β -1,3-グルカナーゼ感受性の増加、菌糸形成誘導の部分的な低下などの影響が現れる。⁵⁰⁾ β -1,6-グルカン合成に間接的に関与すると考えられる遺伝子 (*KRE5*) の欠損株では代償的にキチンや β -1,3-グルカンが増加し、細胞壁の構築が変化するのに伴って菌糸形成能および病原性が低下することも明らかになっている。⁵¹⁾ 我々は、小胞体のグルコース転移酵素である Alg6p をコードする遺伝子の欠損株 (Δ alg6) について性質の解析を行った結果、細胞壁にストレスを与える各種の薬剤に対する感受性が上昇することを明らかにしている。 β -1,6-グルカンはその他の細胞壁成分である β -1,3-グルカン、キチン、マンナンタンパク質と結合してこれらをつなぎ留め、緻密な細胞壁を形成するのに関与していると考えられているため、⁵²⁾ 糖鎖修飾不全はこれらの糖タンパク質型酵素の活性低下を引き起こし、細胞壁の構築が脆くなることから病原性の低下、抗真菌薬感受性の増大へとつながる可能性が考えられる。

Candida 感染における α -および β -マンノース鎖の関与

多くの病原菌にとって動物細胞への接着は病原性発現の最初のステップである。Miyakawa ら⁵³⁾ および Kanbe ら⁵⁴⁻⁵⁶⁾ は *Candida* 属菌の α -結合マンノース側鎖が細胞接着に関与していることを報告している。一方、Fradin ら^{57,58)} は β -1,2 結合マンノースが Galectin-3 を介してマクロファージへの接着に関与していると報告している。Dalle ら⁵⁹⁾ も

α -1,2 結合マンノース残基と β -1,2 結合マンノース残基の両者が *Candida* 菌のヒト小腸細胞への接着に関与していることを、合成オリゴ糖を用いた接着阻止試験で明らかにしている。さらに Dromer ら⁶⁰⁾ は化学合成 β -1,2 結合マンノオリゴ糖をマウスにあらかじめ投与することで *C. albicans* の径口投与による小腸での感染病巣形成を阻止できることを示している。Han ら^{61,62)} は β -1,2 結合マンノオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体を、カンジダ症のマウスモデルに投与することにより *Candida* 感染抵抗性を誘導する効果のあること、Lee ら⁶³⁾ は fluconazole とこのモノクローナル抗体を併用することにより、マウスモデルでその治療効果を著しく増強させることができることを報告している。

プロテイン *O*-マンノース転移酵素 (Pmp) は、マンナンタンパク質のセリンもしくはスレオニンの水酸基にマンノースを転移して *O*-結合型糖鎖を合成する際に関与する酵素であるが、Ernst らのグループ⁶⁴⁻⁶⁶⁾ はこの遺伝子欠損株の性質から、この *O*-結合型糖鎖が形態変化、接着性、抗真菌薬に対する耐性、バイオフィーム形成などに関与していることを示している。Buurman ら⁶⁷⁾ は *O*-結合型糖鎖の伸長に関与する α -1,2-マンノース転移酵素をコードする遺伝子 (MNT1) 欠損株の性質から、この糖鎖が *Candida* 菌体の接着や病原性発現に重要であることを示している。Mille ら⁶⁸⁾ はホスホリポマンナンの合成に関与する GDP-mannose: inositol-phospho-ceramide mannose transferase をコードする遺伝子 (MIT1) を欠損させることによりホスホリポマンナンの β -マンノシル化を阻害すると、マウスに対する病原性が低下することを報告している。これらの結果は細胞壁マンナンの α -結合マンノース鎖、 β -結合マンノース鎖、さらにホスホリポマンナンの β -結合マンノース鎖が細胞への接着および病原性に関与していることを示している。

糖鎖構造の変化

C. albicans の病原性因子として、加水分解酵素の産生、酵母型増殖と菌糸型増殖を切り替えることのできる二形成と呼ばれる性質、環境に合わせた表現形の変化能力、細胞や生体成分への接着性、生体防御系の調節作用などがあり、これらが総合的に働いて生体内で増殖が進行すると考えられている。菌種の同定を目的として形態観察および抗原解析を行う場合の標準培養条件から、培地成分、

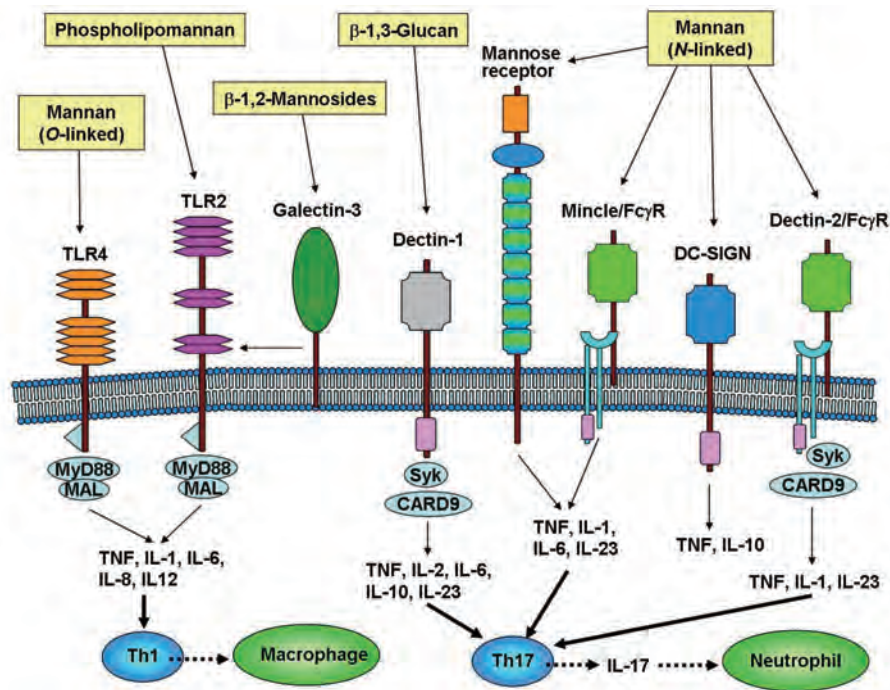


Fig. 10. Pattern Recognition Receptors Sensing *C. albicans*

The *C. albicans* mannan induces interleukin- β (IL- β) and IL-23 secretion in a Dectin-2-dependent manner and induces Th17 cell differentiation. IL-17A from Th17 cells recruits neutrophils to the inflammatory sites.

温度、pH などを変化させると、増殖速度だけでなくその形態や抗原性も大きく変化する場合があります。それが明らかになった。*Candida* 属菌は標準培養条件では酵母の形態で増殖するが、培地に *N*-アセチルグルコサミンや血清を加えると菌糸形増殖に変化し、それに伴って β -1,2 結合マンノースが減少するなどマンナン側鎖の構造が変化する。^{24,27)} また、培地の pH を酸性⁶⁹⁾ にしたり増殖温度を 28°C から 37°C⁷⁰⁾ に上昇させると、マンナン中の β -1,2 結合マンノースが消失ないしは大きく減少することが明らかとなった。これは生体内という環境での *Candida* 菌の性質を知る上で重要な知見である。

自然免疫系による認識

Fig. 10 は自然免疫に関与する受容体の模式図である。樹状細胞、マクロファージなどに発現している Dectin-1 は β -1,3-グルカン結合性レクチンであるが、多くの真菌が共通して持っているこの多糖と結合することにより、異物認識のシグナルが細胞内に伝達され、細胞の活性化による活性酸素、アラキドン酸代謝産物、サイトカイン類の産生誘導の起きることが報告されている。⁷¹⁾ Dectin-1 は *C. albicans* の酵母型菌体のある程度認識するが菌糸型菌体は認識しない。⁷²⁾ しかし、 β -1,3-グルカン

層の外側を厚いマンナンタンパク質層が覆っているため Dectin-1 は *Candida* 属菌の認識に重要ではないようである。一方、かつては原虫として扱われていたが現在は真菌に分類されているカリニ肺炎の原因菌である *Pneumocystis jirovecii* は β -1,3-グルカンが菌体表層に露出しており、Dectin-1 と結合することで自然免疫系が活性化される。⁷³⁾ 一方、Dectin-2 は α -マンノース結合性レクチン活性を示すことが明らかにされ、^{74,75)} 樹状細胞の *Candida* 菌との相互作用が解析されている。*C. albicans* の α -結合マンナンを樹状細胞に作用させるとサイトカイン産生が誘導され、Th17 細胞の分化誘導が起きるが、Dectin-2 欠損マウスの樹状細胞に対してはこの作用を示さないこと、さらに β -1,2 結合マンノース鎖は Dectin-2 による *Candida* 菌の認識に関与しないことが明らかにされている。⁷⁶⁾ 樹状細胞で見いだされた dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin (DC-SIGN) もマンノース結合性レクチン活性を持つことが報告されており、*Candida* 菌と宿主との相互作用に関与していることが明らかになってきた。⁷⁷⁾ DC-SIGN は *S. cerevisiae* マンナンには存在せず *C. albicans* マンナンに存在する 3,6-分岐マンノオリゴ糖と結合するドッキングモデルが

解析されている。⁷⁸⁾ 自然免疫における重要な分子である Toll-like receptor (TLR) も真菌の認識に関与しており, TLR2 および TLR4 はそれぞれ, ホスホリボマンナンおよびマンナンを認識して結合することにより各種サイトカインの産生を誘導し, 感染防御のための炎症反応を引き起こすことが知られている。⁷⁹⁾ 最近, macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) が⁸⁰⁾ *Candida* 菌体と結合することも明らかになっている。^{80,81)} ガラクトフラノース結合性を示すレクチンとしては Intelectin⁸²⁾ の存在が報告されているが, 真菌の中には *A. fumigatus*,⁸³⁾ *T. rubrum*,⁸⁴⁾ *Malassezia furfur*,⁸⁵⁾ *Fonsecaea pedrosoi*⁸⁶⁾ などガラクトフラノースを含む細胞壁多糖を持つものも多く存在しており, Intelectin とこれら菌体との相互作用や自然免疫系への関与などの解明もこれからの課題である。

おわりに

医療技術の高度化は免疫力の低下した患者を増加させ, それとともに深在性真菌症患者も増加する傾向にある。抗真菌薬の標的分子としては動物細胞に存在しない細胞膜成分であるエルゴステロールの合成酵素, 細胞壁成分である β -1,3-グルカンの合成酵素などに対するものが実用化されている。しかし, 自然耐性を示す菌の存在や耐性菌の出現等により, 作用機序の異なる新たな抗真菌薬の開発が待たれている。今後, 自然免疫系活性化の詳細な機構の解明, *Candida* 菌の遺伝子欠損株を利用した病原性に関与する分子の解明等から, 新規抗真菌薬開発のターゲット分子の発見もしくは新たな治療法の開発につながることを期待される。

REFERENCES

- 1) Pfaller M. A., *Clin. Infect. Dis.*, **22**, S89–S94 (1996).
- 2) Pfaller M. A., Diekema D. J., *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 133–163 (2007).
- 3) Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. M., Seifert H., Wenzel R. P., Edmond M. B., *Clin. Infect. Dis.*, **39**, 309–317 (2004).
- 4) Tsuchiya T., Fukazawa Y., Kawakita S., *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **26**, 1–15 (1965).
- 5) Tsuchiya T., Fukazawa Y., Taguchi M., Nakase T., Shinoda T., *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **53**, 77–91 (1974).
- 6) Falagas M. E., Roussos N., Vardakas K. Z., *Int. J. Infect. Dis.*, **14**, 954–966 (2010).
- 7) Herscovics A., Orlean P., *FASEB J.*, **7**, 540–550 (1993).
- 8) Kocourek J., Ballou C. E., *J. Bacteriol.*, **100**, 1175–1181 (1969).
- 9) Kobayashi H., Shibata N., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 494–503 (1986).
- 10) Hakomori S., *J. Biochem.*, **55**, 205–208 (1964).
- 11) Ciucanu I., Kerek F. A., *Carbohydr. Res.*, **131**, 209–217 (1984).
- 12) Rosenfeld L., Ballou C. E., *J. Biol. Chem.*, **249**, 2319–2321 (1974).
- 13) Shibata N., Ichikawa T., Tojo M., Takahashi M., Ito N., Okubo Y., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 338–348 (1985).
- 14) Kobayashi H., Shibata N., Nakada M., Chaki S., Mizugami K., Ohkubo Y., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 195–204 (1990).
- 15) Shibata N., Hisamichi K., Kikuchi T., Kobayashi H., Okawa Y., Suzuki S., *Biochemistry*, **31**, 5680–5686 (1992).
- 16) Shibata N., Hisamichi K., Kobayashi H. & Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 113–117 (1993).
- 17) Faille C., Wieruszkeski J. M., Lepage G., Michalski J. C., Poulain D., Strecker G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1251–1258 (1991).
- 18) Faille C., Wieruszkeski J. M., Michalski J. C., Poulain D., Strecker G., *Carbohydr. Res.*, **236**, 17–27 (1992).
- 19) Shibata N., Okawa Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1386–1390 (2010).
- 20) Nitz M., Ling C.-C., Otter A., Cutler J. E., Bundle D. R., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3440–3446 (2002).
- 21) Hasenclever H. F., Mitchell W. O., *J. Bacteriol.*, **82**, 570–573 (1961).
- 22) Kobayashi H., Shibata N., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **60**, 2106–2109 (1992).
- 23) Shibata N., Arai M., Haga E., Kikuchi T., Najima M., Satoh T., Kobayashi H., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **60**, 4100–4110 (1992).
- 24) Shibata N., Fukasawa S., Kobayashi H., Tojo M., Yonezu T., Ambo A., Ohkubo Y., Suzuki S., *Carbohydr. Res.*, **187**, 239–253 (1989).
- 25) Kobayashi H., Shibata N., Mitobe H., Ohkubo Y., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 364–375

- (1989).
- 26) Kobayashi H., Shibata N., Osaka T., Miyagawa Y., Ohkubo Y., Suzuki S., *Phytochemistry*, **31**, 1147–1153 (1992).
- 27) Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Okawa Y., *Biochem. J.*, **404**, 365–372 (2007).
- 28) Kobayashi H., Matsuda K., Ikeda T., Suzuki M., Takahashi S., Suzuki A., Shibata N., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **62**, 615–622 (1994).
- 29) Shibata N., Akagi R., Hosoya T., Kawahara K., Suzuki A., Ikuta K., Kobayashi H., Hisamichi K., Okawa Y., Suzuki S., *J. Biol. Chem.*, **271**, 9259–9266 (1996).
- 30) Shibata N., Onozawa M., Tadano N., Hinosawa Y., Suzuki A., Ikuta K., Kobayashi H., Suzuki S., Okawa Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **336**, 49–58 (1996).
- 31) Shibata N., Kobayashi H., Okawa Y., Suzuki S., *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2565–2575 (2003).
- 32) Kobayashi H., Mitobe H., Takahashi K., Yamamoto T., Shibata N., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 662–669 (1992).
- 33) Zhang W. J., Ballou C. E., *J. Biol. Chem.*, **256**, 10073–10079 (1981).
- 34) Shibata N., Kojima C., Satoh Y., Satoh R., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 1–12 (1993).
- 35) 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).
- 36) Shibata N., Senbongi N., Hosoya T., Kawahara K., Akagi R., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., Okawa Y., *Eur. J. Biochem.*, **246**, 477–485 (1997).
- 37) Suzuki M., Fukazawa Y., *Microbiol. Immunol.*, **26**, 387–402 (1982).
- 38) Suzuki A., Takata Y., Oshie A., Tezuka A., Shibata N., Kobayashi H., Okawa Y., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **373**, 275–279 (1995).
- 39) Kobayashi H., Shibata N., Yonezu T., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**, 381–396 (1987).
- 40) Suzuki A., Shibata N., Suzuki M., Saitoh F., Oyamada H., Kobayashi H., Suzuki S., Okawa Y., *J. Biol. Chem.*, **272**, 16822–16828 (1997).
- 41) Suzuki A., Shibata N., Suzuki M., Saitoh F., Takata Y., Oshie A., Oyamada H., Kobayashi H., Suzuki S., Okawa Y., *Eur. J. Biochem.*, **240**, 37–44 (1996).
- 42) Mille C., Bobrowicz P., Trinel P. A., Li H., Maes E., Guerardel Y., Fradin C., Martínez-Esparza M., Davidson R. C., Janbon G., Poulain D., Wildt S., *J. Biol. Chem.*, **283**, 9724–9736 (2008).
- 43) Maes E., Mille C., Trivelli X., Janbon G., Poulain D., Guérardel Y., *J. Biochem.*, **145**, 413–419 (2009).
- 44) Trinel P. A., Borg-von-Zepelin M., Lepage G., Jouault T., Mackenzie D., Poulain D., *Infect. Immun.*, **61**, 4398–4405 (1993).
- 45) Trinel P. A., Plancke Y., Gerold P., Jouault T., Delplace F., Schwarz R. T., Strecker G., Poulain D., *J. Biol. Chem.*, **274**, 30520–30526 (1999).
- 46) Trinel P. A., Maes E., Zanetta J. P., Delplace F., Coddeville B., Jouault T., Strecker G., Poulain D., *J. Biol. Chem.*, **277**, 37260–37271 (2002).
- 47) Ibata-Ombetta S., Idziorek T., Trinel P. A., Poulain D., Jouault T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 13086–13093 (2003).
- 48) Jouault T., Ibata-Ombetta S., Takeuchi O., Trinel P. A., Sacchetti P., Lefebvre P., Akira S., Poulain D., *J. Infect. Dis.*, **188**, 165–172 (2003).
- 49) Chavan M., Suzuki T., Rekowicz M., Lennarz W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 15381–15386 (2003).
- 50) Herrero A. B., Uccelletti D., Hirschberg C. B., Dominguez A., Abeijon C., *Eukaryot. Cell.*, **1**, 420–431 (2002).
- 51) Herrero A. B., Magnelli P., Mansour M. K., Levitz S. M., Bussey H., Abeijon C., *Eukaryot. Cell.*, **3**, 1423–1432 (2004).
- 52) Kollár R., Reinhold B. B., Petráková E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonová J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17762–17775 (1997).
- 53) Miyakawa Y., Kuribayashi T., Kagaya K., Suzuki M., Nakase T., Fukazawa Y., *Infect. Immun.*, **60**, 2493–2499 (1992).
- 54) Kanbe T., Han Y., Redgrave B., Riesselman M. H., Cutler J. E., *Infect. Immun.*, **61**, 2578–2584 (1993).
- 55) Kanbe T., Cutler J. E., *Infect. Immun.*, **62**, 1662–1668 (1994).
- 56) Kanbe T., Cutler J. E., *Infect. Immun.*, **66**, 5812–5818 (1998).
- 57) Fradin C., Jouault T., Mallet A., Mallet J. M., Camus D., Sinaÿ P., Poulain D., *J. Leukoc. Biol.*, **60**, 81–87 (1996).
- 58) Fradin C., Poulain D., Jouault T., *Infect. Immun.*, **68**, 4391–4398 (2000).
- 59) Dalle F., Jouault T., Trinel P. A., Esnault J., Mallet J.

- M., d'Athis P., Poulain D., Bonnin A., *Infect. Immun.*, **71**, 7061–7068 (2003).
- 60) Dromer F., Chevalier R., Sendid B., Improvisi L., Jouault T., Robert R., Mallet J. M., Poulain D., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 3869–3876 (2002).
- 61) Han Y., Morrison R. P., Cutler J. E., *Infect. Immun.*, **66**, 5771–5776 (1998).
- 62) Han Y., Riesselman M. H., Cutler J. E., *Infect. Immun.*, **68**, 1649–1654 (2000).
- 63) Lee J. H., Jang E. C., Han Y., *Arch. Pharm. Res.*, **34**, 399–405 (2011).
- 64) Timpel C., Zink S., Strahl-Bolsinger S., Schröppel K., Ernst J., *J. Bacteriol.*, **182**, 3063–3071 (2000).
- 65) Prill S. K., Klinkert B., Timpel C., Gale C. A., Schröppel K., Ernst J. F., *Mol. Microbiol.*, **55**, 546–560 (2005).
- 66) Peltroche-Llacsahuanga H., Goyard S., d'Enfert C., Prill S. K., Ernst J. F., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **50**, 3488–3491 (2006).
- 67) Buurman E. T., Westwater C., Hube B., Brown A. J., Odds F. C., Gow N. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7670–7675 (1998).
- 68) Mille C., Janbon G., Delplace F., Ibata-Ombetta S., Gaillardin C., Strecker G., Jouault T., Trinel P. A., Poulain D., *J. Biol. Chem.*, **279**, 47952–47960 (2004).
- 69) Kobayashi H., Giummelly P., Takahashi S., Ishida M., Sato J., Takaku M., Nishidate Y., Shibata N., Okawa Y., Suzuki S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 1003–1009 (1991).
- 70) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167–171 (1994).
- 71) Drummond R. A., Brown G. D., *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 392–399 (2011).
- 72) Gantner B. N., Simmons R. M., Underhill D. M., *EMBO J.*, **24**, 1277–1286 (2005).
- 73) Saijo S., Fujikado N., Furuta T., Chung S. H., Kotaki H., Seki K., Sudo K., Akira S., Adachi Y., Ohno N., Kinjo T., Nakamura K., Kawakami K., Iwakura Y., *Nat. Immunol.*, **8**, 39–46 (2007).
- 74) Sato K., Yang X. L., Yudate T., Chung J. S., Wu J., Luby-Phelps K., Kimberly R. P., Underhill D., Cruz P. D. Jr., Ariizumi K., *J. Biol. Chem.*, **281**, 38854–38866 (2006).
- 75) McGreal E. P., Rosas M., Brown G. D., Zamze S., Wong S. Y., Gordon S., Martinez-Pomares L., Taylor P. R., *Glycobiology*, **16**, 422–430 (2006).
- 76) Saijo S., Ikeda S., Yamabe K., Kakuta S., Ishigame H., Akitsu A., Fujikado N., Kusaka T., Kubo S., Chung S. H., Komatsu R., Miura N., Adachi Y., Ohno N., Shibuya K., Yamamoto N., Kawakami K., Yamasaki S., Saito T., Akira S., Iwakura Y., *Immunity*, **32**, 681–691 (2010).
- 77) Cambi A., Netea M. G., Mora-Montes H. M., Gow N. A., Hato S. V., Lowman D. W., Kullberg B. J., Torensma R., Williams D. L., Figdor C. G., *J. Biol. Chem.*, **283**, 20590–20599 (2008).
- 78) Reina J. J., Diaz I., Nieto P. M., Campillo N. E., Páez J. A., Tabarani G., Fieschi F., Rojo J., *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 2743–2754 (2008).
- 79) Netea M. G., Gow N. A., Munro C. A., Bates S., Collins C., Ferwerda G., Hobson R. P., Bertram G., Hughes H. B., Jansen T., Jacobs L., Buurman E. T., Gijzen K., Williams D. L., Torensma R., McKinnon A., MacCallum D. M., Odds F. C., Van der Meer J. W., Brown A. J., Kullberg B. J., *J. Clin. Invest.*, **116**, 1642–1650 (2006).
- 80) Wells C. A., Salvage-Jones J. A., Li X., Hitchens K., Butcher S., Murray R. Z., Beckhouse A. G., Lo Y. L., Manzanero S., Cobbold C., Schroder K., Ma B., Orr S., Stewart L., Lebus D., Sobieszczuk P., Hume D. A., Stow J., Blanchard H., Ashman R. B., *J. Immunol.*, **180**, 7404–7413 (2008).
- 81) Bugarcic A., Hitchens K., Beckhouse A. G., Wells C. A., Ashman R. B., Blanchard H., *Glycobiology*, **18**, 679–685 (2008).
- 82) Tsuji S., Uehori J., Matsumoto M., Suzuki Y., Matsuhisa A., Toyoshima K., Seya T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 23456–23463 (2001).
- 83) Latgé J. P., Kobayashi H., Debeaupuis J. P., Diaquin M., Sarfati J., Wieruszkeski J. M., Parra E., Bouchara J. P., Fournet B., *Infect. Immun.*, **62**, 5424–5433 (1994).
- 84) Ikuta K., Shibata N., Blake J. S., Dahl M. V., Nelson R. D., Kobayashi H., Hisamichi K., Suzuki S., Okawa Y., *Biochem. J.*, **323**, 297–305 (1997).
- 85) Shibata N., Saitoh T., Tadokoro Y., Okawa Y., *Microbiology*, **155**, 3420–3429 (2009).
- 86) Shibata N., Okawa Y., *Glycobiology*, **21**, 69–81 (2011).