

原 著

病原性酵母 *Candida dubliniensis* の酵母型から菌糸型への形態変化に伴い  
細胞壁多糖は  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基の増加した構造へと変化する

伊藤 文恵, 石山 智絵, 一條麻里奈, 永倉 真人, 目黒 雄大,  
田中 大, 佐々木雅人, 柴田 信之\*

The Cell Wall Mannan Changes to an Increased Structure of  $\beta$ -1,2 Linked  
Mannose Residues with Morphological Change from Yeast to Hyphal  
Form of the Pathogenic Yeast *Candida dubliniensis*

Fumie ITOH, Chie ISHIYAMA, Marina ICHIJO, Masato NAGAKURA, Yuta MEGURO,  
Yutaka TANAKA, Masato SASAKI, and Nobuyuki SHIBATA\*

Division of Infection and Host Defense, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Tohoku medical and Pharmaceutical University.

(Received November 20, 2019)

*Candida dubliniensis* is closely related phylogenetically to *Candida albicans* species and is often isolated from oral Candidiasis in immunocompromised patients. In this study, we induced yeast form and hyphal form growth by using phenylethyl alcohol and RPMI 1640 medium and determined the fine chemical structure of the cell wall mannans of both form cells. Acetolysis followed by HPLC and <sup>1</sup>H-NMR analysis of the mannan of hyphal form cells indicated that it possesses large amount of  $\beta$ -1,2-linkage-containing long oligosaccharides, mannohexaose, mannoheptaose and mannooctaose. We found that these side chains are responsible for the strong antigenicity and are the possible determinants of the anti-*Candida* polyclonal antibody of a clinical diagnostic reagent.

**Key words** — dimorphic fungus, non-*albicans* *Candida*, diagnosis,  $\beta$ -1,2-linked mannose, antigenic determinant

緒 論

これまで *Candida albicans* として同定されていた臨床分離株の中に、遺伝子解析の結果から異なる菌種の *Candida* 属菌が含まれていることが明らかになった。*C. dubliniensis* はこれにより分類上独立することとなった新しい菌種である。これは 1995 年に HIV 感染患者の口腔カンジダ症原因菌として報告されたのがきっかけであった。<sup>1)</sup> *Candida* 属菌は皮膚、口腔、その他の粘膜で増殖する表在性真菌症だけでなく臓器に病巣を形成する深在性真菌症の原因菌でもあり、抗生物質の長期使用による菌交代現象、ステロイド剤、免疫抑制剤等の薬剤や放射線による治療、抗がん剤投与などで発症することが知られている。<sup>2)</sup> カンジダ症原因菌としてかつては *C. albicans* が圧倒的に多く検出されていたが、近年その割合は大きく変化し non-*albicans*

*Candida* と呼ばれる菌種の割合が増加している。<sup>3)</sup> *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. auris* など<sup>4)</sup> non-*albicans* *Candida* であるが、中でも *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* は抗真菌薬に対して自然耐性を持つことが知られている。<sup>4)</sup> 遺伝子解析の結果、*C. dubliniensis* は *C. albicans* が持っている病原性に関する遺伝子のいくつかを持たないため *C. albicans* と比較すると病原性の低いことが知られているが、身体の特定の部位ではカンジダ症の原因菌として問題となっている。<sup>5)</sup> 口腔には常在菌として *C. albicans* に次いで *C. parapsilosis* および *C. dubliniensis* が検出され、AIDS 患者では口腔カンジダ症の原因菌となっている。<sup>1,6)</sup> 一方、糖尿病患者、化学療法による好中球減少症や骨髄移植患者では全身感染を発症する場合があり、深在性の感染が成立する。<sup>7,8)</sup>

深在性カンジダ症の診断は、血中に微量に存在する細胞壁多糖であるマンナンに対する抗体を用いた検出法が数種類市販され利用されている。し

かし, *Candida* 属菌は菌種ごとにマンナンの抗原構造が異なるため, これらの検出法で検出できないもしくは検出感度の低い菌種も存在する.<sup>9)</sup> また, 菌種までは同定できないことから抗真菌薬自然耐性菌が原因菌か否かを判断できないため, 治療を開始しても効果が現れない場合もある.<sup>10,11)</sup> カンジダ菌種の同定には分離培養後の栄養利用試験や顕微鏡を用いた形態観察が必要になる. 研究設備が整った施設では rRNA の ITS (internal transcribed spacer) 領域の比較や 26S rDNA D1/D2 ドメインの塩基配列解析で菌種を正確に同定する手法も確立されているが,<sup>12)</sup> 一般的ではない.

*Candida* 属菌は二形性 (dimorphism) を示し, 環境に応じてその増殖形態を変えることが知られている. *C. albicans* の場合, 常在菌として皮膚に付着している状態では酵母型で存在しているが, 侵襲することにより皮膚真菌症や内臓真菌症などの病原性を現す状態では菌糸型増殖を示す.<sup>13)</sup> この形態変化の環境要因として血清の存在, 窒素源, 炭素源, 温度, 酸素分圧などが報告されている. 深在性真菌症における菌糸型増殖では, 組織の深部へと菌糸が伸びることにより薬剤が到達し難くなるのが治療を難しくしている要因の一つとなっている. この病原性に関わる二形性形態変化に伴う細胞壁構造の変化については *C. albicans* マンナンでの報告はあるが,<sup>14)</sup> その他の菌種での報告はほとんど存在しない.

*Candida* 属菌の細胞壁最外層はマンノースから成る多糖であるマンナンが覆っており, 菌体の抗原性を担っている. 最外層に存在するマンナンは真菌感染が成立する最初の段階で宿主と相互作用し, 免疫反応を引き起こす重要な成分である.<sup>15)</sup> マンナンは抗原提示細胞の C-type lectin 受容体や Toll 様受容体と反応することで炎症反応や生体防御反応を誘導すること, マンナンの構造に変異のある菌株では病原性および抗原提示細胞の活性化の低下が見られることも報告されている.<sup>16-20)</sup> 従って, 抗原性を担う多糖の構造の詳細を明らかにすることは, 免疫系との分子レベルでの相互作用を解明する上で欠かせないものとなっている.

この多糖の構造は菌種により異なるため菌種特異的抗原を形成しているが, 特に *C. albicans* では 2 種の血清型 (血清型 A および B) の存在が報告されている.<sup>21)</sup> *C. dubliniensis* 酵母型菌体のマンナンの構造は Lizicarova ら<sup>22)</sup> による研究があり, 基本的

に血清型 A の *C. albicans* マンナンと同様であり, 櫛形構造のマンナン側鎖の非還元末端部に  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基が存在していると報告しているが, 詳細な解析は成されていない. 加えて, 菌糸型菌体のマンナン構造については一切不明である.

本研究の目的は, 病原性に関わる侵襲性を示す形態である菌糸型菌体の細胞壁マンナンの抗原構造の詳細を明らかにし, その検出法への応用や病原性発現の理解につなげることである. *Candida* 属菌の多くに存在する  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基の存在様式としてこれまで明らかになっている構造は, 側鎖の  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基に結合するもの (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*)<sup>14,23,24)</sup> および  $\alpha$ -1,3 結合マンノース残基に結合するもの (*C. guilliermondii*, *Candida saitoana*)<sup>25)</sup> の二種類であるが, 本研究で菌糸型菌体から新たな存在様式の  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を含む側鎖構造を見いだしたので, マンナンの全体構造と共に報告する.

## 実験材料および実験方法

### 1. 実験材料

*Candida dubliniensis* ATCC MYA-646 (CBS 7987) は American Type Culture Collection (USA) より入手した. グルコースオリゴマー混合物はデキストラン (MW 50,000-70,000) を 100 mM HCl で 100°C, 280 分間, 部分加水分解することにより調製した. ユニメディ 「カンジダ」モノテストは極東製薬工業株式会社から購入した.

### 2. 酵母型および菌糸型菌体増殖の誘導

形態変化の条件検討用培地としては yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), yeast nitrogen base-glucose (YNB) 培地 (5% glucose, 0.67% yeast nitrogen base), potato-dextrose (PTD) 培地 (2% glucose, 0.4% potato starch), RPMI 1640 with L-Gln and HEPES (RPMI 1640) 培地を用いた. 二形性変化の誘導は 10% BSA, 10% ヤギ血清, 10% FBS, 0.04~0.22% D-biotin, 1~15 mM phenylethyl alcohol (東京化成工業) を用いて検討した. これらの培地に菌を接種し, 28°C で振盪培養後, 目視および顕微鏡で形態の観察を行った. Phenylethyl alcohol は *C. albicans* のクオラムセンシング (quorum sensing) に関与する分子であり,<sup>26)</sup> 菌が

自ら産生し自身の代謝を調節する。その存在により菌糸型から酵母型へと形態を変化させることが報告されている。<sup>27)</sup>

### 3. 細胞壁多糖の抽出と分離精製

28°Cで3日間振盪培養して得た菌体をホルムアルデヒド溶液で一晩処理し、精製水で遠心洗浄後アセトン脱脂により乾燥菌体とした。菌糸型菌体の洗浄は菌体を回収後ミラクロス (Merck Millipore) を用いて精製水でろ過洗浄した後、同様にアセトン処理により乾燥菌体とした。この菌体を精製水に懸濁し、121°Cで2時間熱水抽出することにより細胞壁多糖を可溶化したのち48時間の流水透析、減圧濃縮、凍結乾燥により回収した。多糖画分の分離はFehling液沈殿法により行った。抽出物の水溶液10 mLに対しFehling液20 mLを攪拌しながら加えて、銅と多糖から成る不溶性複合体を形成させたのち3,000 rpm、10分間の遠心分離により沈殿を回収した。これに陽イオン交換樹脂であるAmberlite IR-120 (H<sup>+</sup>)を加えて沈殿が消えるまで穏やかに混ぜることで銅を除去し、多糖を可溶化し回収した。樹脂の洗浄液も合わせて0.1 M NaOHで中和し、48時間透析後、濃縮乾固、凍結乾燥により回収した。

### 4. リン酸ジエステル結合を形成する糖鎖の分離

多糖画分100 mgを10 mM塩酸に溶解し、100°Cで1時間反応させた。これにより多糖構造中のリン酸ジエステル結合を開裂させ、リン酸基を介して結合していた糖鎖を遊離させ、0.1 M NaOHで中和したのち濃縮乾固により回収し、蛍光ラベル化後の電気泳動による解析用試料とした。

### 5. ANTSラベル化オリゴ糖の蛍光標識電気泳動による解析

マイクロチューブ中のオリゴ糖混合物5  $\mu$ gに、5  $\mu$ Lの0.2 M ANTS溶液 (disodium 8-amino-1,3,6-naphthalenetrisulfonate hydrate (ANTS) を15%酢酸溶液に溶解したもの) および5  $\mu$ Lの0.1 M NaCNBH<sub>3</sub>/DMSO溶液を加え、37°Cで15時間反応させ還元末端をANTSラベルした。<sup>28)</sup> 減圧乾燥したラベル化オリゴ糖混合物は5  $\mu$ Lのloading buffer (20% glycerol および少量のphenol redを含む62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) に溶解し、ポリアクリルアミドゲル (濃縮ゲル8%, 分離ゲル35%, 厚さ0.75 mm) で100 V, 120分間、次に200V, 180分間、さらに300V, 90分間の電気泳動を行い分離した。ゲルの撮影はトランスイルミネーター DigiDoc-

It System を用いて行った。

### 6. アセトリシスによるフラグメント化と分離

アセトリシスは多糖の水酸基を全てアセチル化し、無水酢酸、酢酸混液中で硫酸により加水分解するものであるが、加水分解反応の感受性が非アセチル化糖の場合と逆転し、 $\alpha$ -1,2 結合および $\alpha$ -1,3 結合と比較して $\alpha$ -1,6 結合の分解速度が速くなることを利用したフラグメント化法である。

細胞壁より抽出精製した多糖100 mgをホルムアミド1 mLに溶解したのち、さらに無水酢酸、ピリジン混液 (1:1, v/v) 10 mLを加えて溶解し、40°Cで12時間反応させることによりアセチル化を行った。溶媒を減圧濃縮乾固し得られたアセチル化糖を無水酢酸、酢酸、硫酸混液 (100:100:1, v/v/v) 10 mLに溶解し、40°C, 36時間の反応によりアセトリシスを行い多糖をフラグメント化した。氷冷しながらピリジン1 mLを加えることにより反応を停止させ、溶媒を減圧濃縮乾固したのちアセチル化オリゴ糖をクロロホルム抽出した。クロロホルム層は3回水洗したのち無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過し減圧濃縮乾固した。次にメタノール5 mLに溶解し、28%ナトリウムメチラートのメタノール溶液10~20滴を加えて室温で15分間反応させ脱アセチル化を行った。50%酢酸で中和し濃縮乾固して得られたオリゴ糖混合物は、少量の水に溶解してBio-Gel P-2カラム (2.5 cm $\times$ 100 cm) でゲルろ過することによりオリゴ糖を分画した。溶出液中の糖量の測定はフェノール・硫酸法により行った。<sup>29)</sup>

### 7. HPLCによるオリゴ糖の分離

オリゴ糖混合物を精製水に溶解し、TSKgel Amide-80カラム (4.6 mm $\times$ 250 mm) を装着した高速液体クロマトグラフ装置 NANOSPACE SI-1 (資生堂) を用い、アセトニトリル-水混液 (55:45, v/v) を移動相に使用し分離した。ピークの検出は示差屈折率検出器 ERC-7520 (エルマ光学) を用いた。

### 8. NMR分析

NMRスペクトルの測定は、日本電子JNM-ECZ600R/S1 (600 MHz) 核磁気共鳴装置を用いて行った。<sup>1</sup>H-NMRは試料を重水 (99.95% D<sub>2</sub>O) 0.7 mLに溶解しアセトンを内部標準物質 (2.225 ppm) として用い45°Cで測定した。DQF-COSY (double-quantum filtered correlation spectroscopy) は標準パルスシーケンスで測定した。

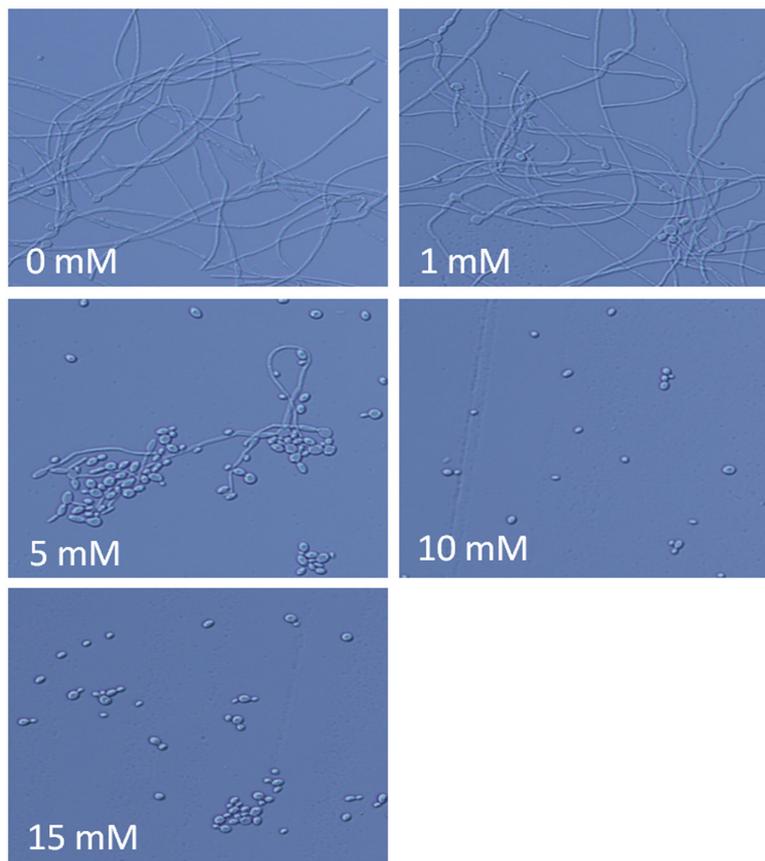
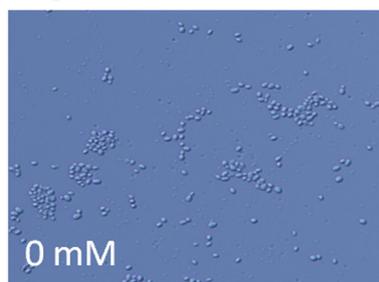
*C. dubliniensis**C. glabrata*

Fig. 1. Morphological change of *C. dubliniensis* cells. The cells were cultivated in RPMI 1640 medium in the presence of phenylethyl alcohol at 28°C for 72 h. Concentration of the phenylethyl alcohol was shown in each panel. *C. glabrata* cells were also cultured as the control.

## 9. 抗原性の解析

血清を用いたカンジダ症の臨床診断用試薬であるユニメディ「カンジダ」モノテストを用い、製品のプロトコルに従い反応性を解析した。1 ng/mL に調製したマンナン溶液 200  $\mu$ L と、アルカリホスファターゼ標識ウサギ由来抗マンナンポリクローナル抗体 100  $\mu$ L を室温で 30 分間反応させた。この反応液 250  $\mu$ L をデバイスに移し、基質を含む反応液を 4 滴加えて 10 分間反応させたのち停止液を加え呈色を検出した。

## 結 果

### 酵母型菌体と菌糸型菌体の増殖条件の検討

各種の培養条件を検討した結果、形態変化を最も効率的に誘導することができたのは RPMI 1640 培地で phenylethyl alcohol を添加した場合であった。RPMI 1640 培地を用いて 28°C で振盪培養すると菌糸型で増殖するが、phenylethyl alcohol を 1 mM から 15 mM まで濃度を変えて培養すると、*C. dubliniensis* は濃度の上昇に従って酵母型増殖の割合が増加した (Fig. 1)。5 mM では両形態の菌体が

存在していたが、10 mM では完全に酵母型での増殖に変化していた。一方、二形性を示さないと報告されている *C. glabrata* をコントロールとして同じ条件で培養した結果、phenylethyl alcohol を添加しない RPMI 1640 培地においても完全な酵母型増殖を示した。そこで、*C. dubliniensis* の培養には RPMI 1640 培地を用いて 10 mM phenylethyl alcohol を添加することで酵母型菌体、無添加で菌糸型菌体を増殖させ細胞壁抗原構造に与える影響を解析した。

### 酵母型菌体及び菌糸型菌体から分離精製し得られた細胞壁マンナン構造の $^1\text{H-NMR}$ による比較解析

酵母型菌体のマンナンは、*C. albicans* 血清型 A のマンナンの NMR シグナルと基本的には同じであった (Fig. 2A)。すなわち、櫛形構造のマンナンには長さの異なる  $\alpha$ -1,2 結合マンノオリゴ糖側鎖も多く存在するが、 $\beta$ -anomer 領域のシグナルの存在から血清型 A の特徴である  $\beta$ -1,2 結合マンノースを含む側鎖も多く存在していることが分かる。<sup>21)</sup> さらに、5.23 ppm 付近のシグナルの存在から、側鎖の一部は  $\alpha$ -1,6 結合で分岐する構造を持つことを示している。<sup>30)</sup> さらに、5.551 ppm のシグナルから側鎖にリン酸ジエステル結合を介して、 $\beta$ -1,2 結合マンノオリゴ糖鎖が多く存在していることを示している。<sup>14)</sup> しかし、菌糸型菌体のマンナンの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは酵母型菌体のものと比べて著し

く異なっていた (Fig. 2B)。全体にシグナルが少ないことから構造がシンプルになっていることを示している。 $\beta$ -1,2 結合マンノースを含むオリゴ糖側鎖の割合が増加しているが、 $\alpha$ -1,6 結合で分岐する側鎖構造の存在を示すシグナルは消失している。さらに、側鎖末端の  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基に対応する 5.056 ppm のシグナルおよびリン酸ジエステル結合するオリゴ糖の存在に対応する 5.551 ppm のシグナルが消失していた。一方、酵母型菌体のマンナンには見られない  $\alpha$ -1,2 結合で置換を受けた  $\alpha$ -1,3 結合マンノースの存在に対応すると考えられる 5.365 ppm および 5.386 ppm のシグナルが現れていた (Fig. 2B)。

### 側鎖のリン酸基を介して結合する糖鎖の解析

多糖を 10 mM 塩酸で穏やかに加水分解すると、リン酸ジエステル結合を選択的に加水分解することができる。この処理で遊離した糖鎖の還元末端に ANTS 試薬を結合させることにより、本来電荷を持たない糖鎖をマイナスの電荷を持った蛍光物質に変え、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離できるようになる。理論上 1 モルのオリゴ糖に 1 モルの試薬が結合することから、電気泳動後の蛍光バンドの強度比はモル比と相関する。マーカーとして同時にデキストラン由来のグルコースオリゴマー混合物を泳動させ解析を行った。酵母型菌体のマンナンから遊離した糖鎖は二糖、三糖のバ

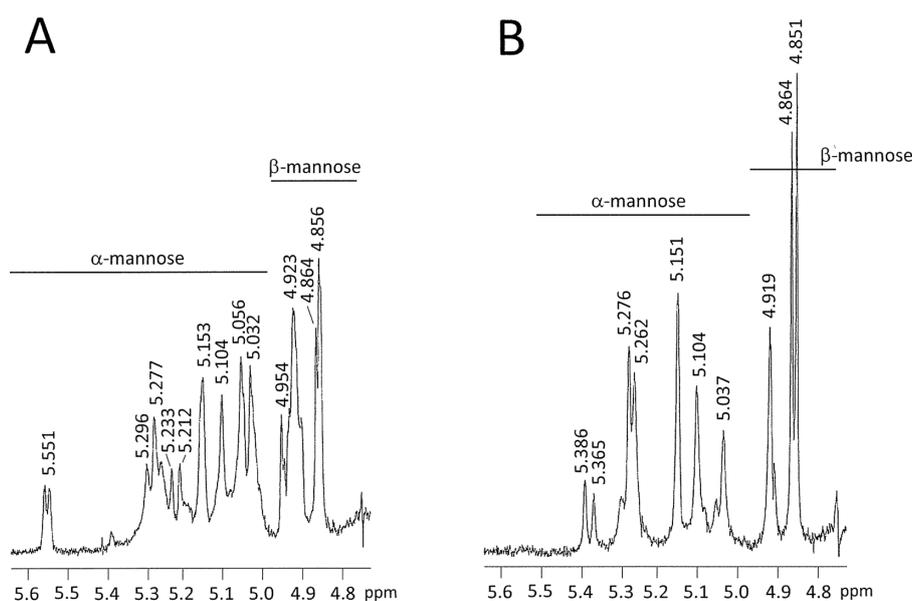


Fig. 2. Anomeric region of  $^1\text{H-NMR}$  spectra of the mannans from yeast (A) and hyphal (B) forms of *C. dubliniensis* cells. Cell wall mannan was extracted from the cells at 121°C for 2 h and purified by Fehling's solution precipitation method.  $^1\text{H-NMR}$  signals were recorded at 45°C using JEOL JNM-ECZ600R/S1 spectrometer. The proton chemical shift was referenced relative to the internal acetone at 2.225 ppm.

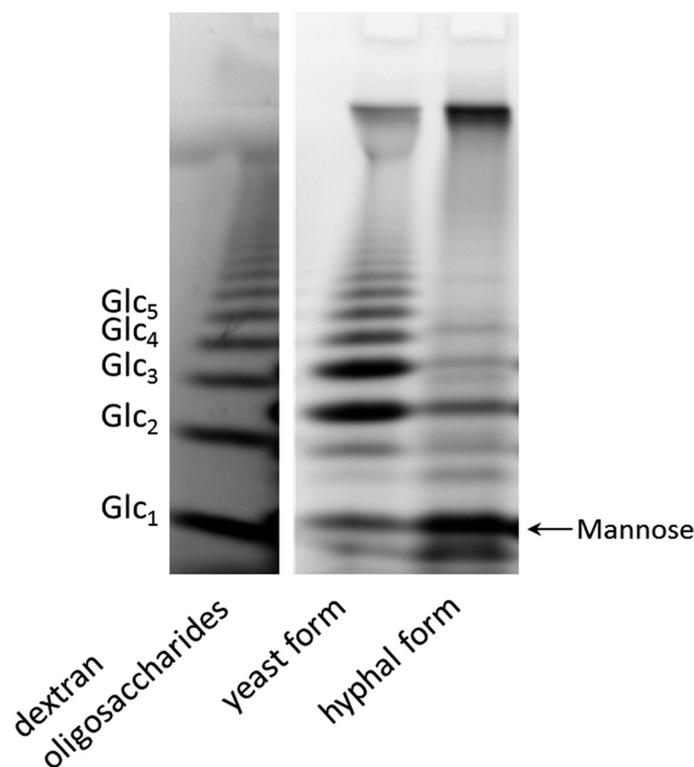


Fig. 3. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) profile of oligosaccharides released by acid hydrolysis of mannans, which were obtained from yeast and hyphal forms of *C. dubliniensis* cells. 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS) labelled oligosaccharides were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The left lane is a dextran oligosaccharides. Numbers from 1 to 5 indicate glucose monomer to glucose pentamer, respectively as molecular marker.

ンドが強く検出されているが、さらに八糖近くまでバンドが確認できた。一方、菌糸型菌体のマンナンでは二糖のバンドは薄く検出されたが、それ以上のオリゴ糖のラダーはほとんど検出されなかった (Fig. 3)。この結果から、菌糸型増殖ではリン酸基を介して側鎖に結合するマンノオリゴ糖鎖の合成がほとんど進まないことが明らかとなった。**アセトリシスにより得られたフラグメントのゲルろ過および HPLC による分離**

楕形構造のマンナンの主鎖である  $\alpha$ -1,6 結合をアセトリシスにより選択的に加水分解し、得られたフラグメントであるオリゴ糖は Bio-Gel P-2 カラムでゲルろ過することにより分離した。酵母型菌体のマンナンから得られたフラグメントで最も多く得られたのは四糖であったが、菌糸型菌体のマンナンでは二糖から四糖までのフラグメントピークが極めて小さくなっていった (Fig. 4)。単糖は主鎖および一部の  $\beta$ -マンノース残基由来であるため、菌糸型菌体のマンナンの側鎖は六糖以上の長い側鎖の存在割合が著しく高くなっていることが明らかである。五糖以上の長鎖オリゴ糖はゲルろ過での分離が難しいため HPLC による分離を行った。

その結果、十糖までの存在が確認できた (Fig. 5)。菌糸型菌体のマンナンから得られたオリゴ糖は、酵母型菌体のマンナンと比較して六糖、七糖、八糖の存在割合が高くなっており、これらを回収して  $^1\text{H-NMR}$  による解析を行った。これらのオリゴ糖を以後はそれぞれ  $\text{Man}_6$ 、 $\text{Man}_7$ 、 $\text{Man}_8$  と表記する。

#### オリゴ糖の $^1\text{H-NMR}$ による解析

菌糸型菌体のマンナンから分離したオリゴ糖について  $^1\text{H-NMR}$  解析を行った結果を Fig. 6 に示す。 $\text{Man}_6$  は還元末端側に  $\alpha$ -1,2 結合マンノースから成る四糖が存在し、さらに、4.847 ppm および 4.860 ppm のシグナルから非還元末端側には  $\beta$ -1,2 結合マンノースを 2 残基含む構造であることが明らかである。一方、 $\text{Man}_7$  では 4.848 ppm および 4.918 ppm のシグナルの存在から、 $\beta$ -1,2 結合マンノースを 3 残基含む構造が含まれていることを示しているが、4.861 ppm のシグナルも含めたこれら 3 つのシグナル比から、 $\alpha$ -1,2 結合マンノースから成る五糖に  $\beta$ -1,2 結合マンノースを 2 残基含む七糖と、 $\alpha$ -1,2 結合マンノースから成る四糖に  $\beta$ -1,2 結合マンノースを 3 残基含む七糖という 2 種類の異性体の

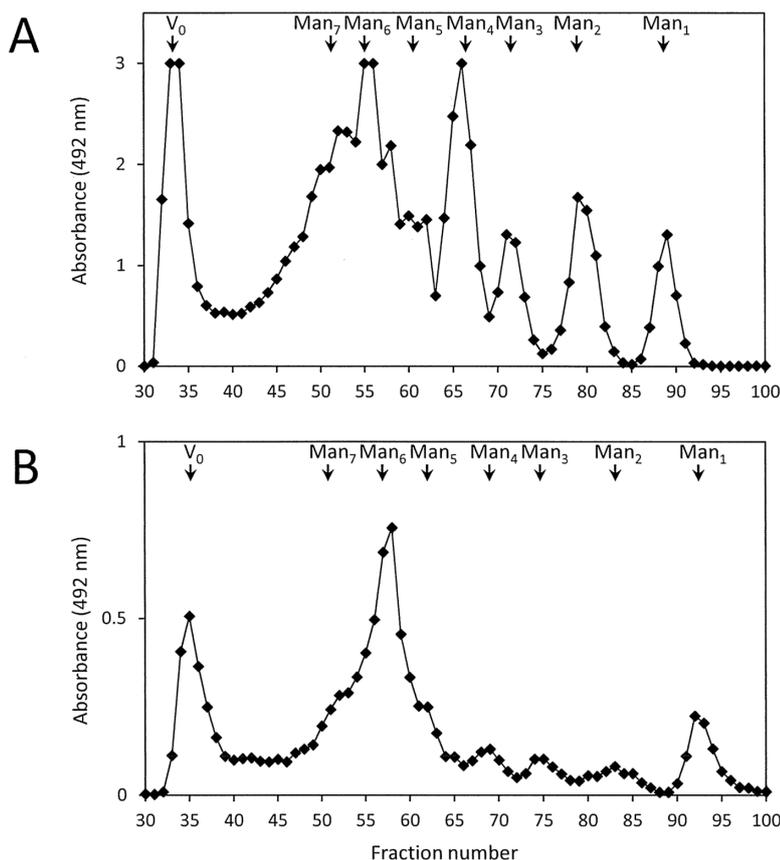


Fig. 4. Gel filtration chromatography of the acetolysis products of the mannans obtained from yeast (A) and hyphal (B) forms of *C. dubliniensis* cells. The oligosaccharide mixture was applied on a column (2.5 cm  $\times$  100 cm) of Bio-Gel P-2 and eluted with deionized water. The carbohydrate contents in each fraction were determined by the phenol/sulfuric acid method. Man<sub>1</sub> to Man<sub>7</sub> indicate the elution positions of mannose monomer to mannose heptamer, respectively. V<sub>0</sub>, void volume.

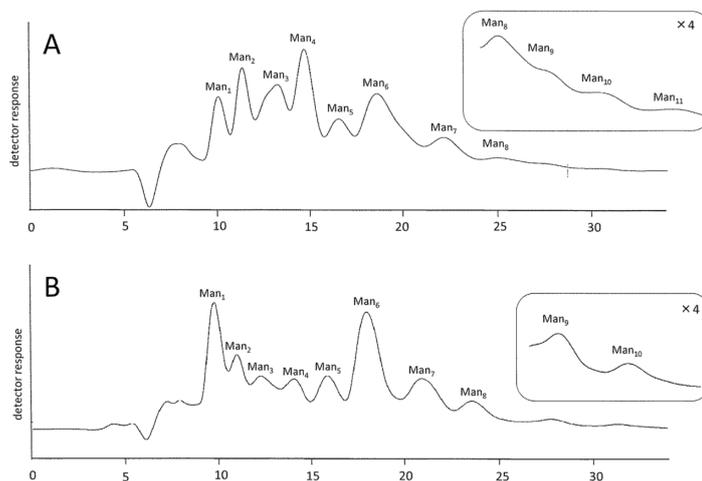


Fig. 5. HPLC of the acetolysis products of mannans obtained from yeast (A) and hyphal (B) forms of *C. dubliniensis* cells. HPLC was performed using TSKgel Amide-80 column (4.6 mm  $\times$  250 mm). Elution was done with a 55 : 45 (v/v) mixture of acetonitrile and water, and the eluates were monitored with a differential refractometer.

混合物であること、また、その比は約 2 : 1 であることを示している。<sup>14)</sup>

Man<sub>8</sub> では Man<sub>7</sub> に見られた 4.848 ppm, 4.861 ppm, および 4.917 ppm のシグナルに加えて、シグナル強度は低いが 4.905 ppm, 4.942 ppm, およ

び 5.004 ppm のシグナルが検出されている。これらのシグナルは  $\beta$ -1,2 結合マンノースを 4 残基含む構造が異性体として含まれていることを示している。<sup>14,31)</sup> これら 3 種類の異性体の中で最も多く存在するのは、シグナル比から  $\beta$ -1,2 結合マンノースを

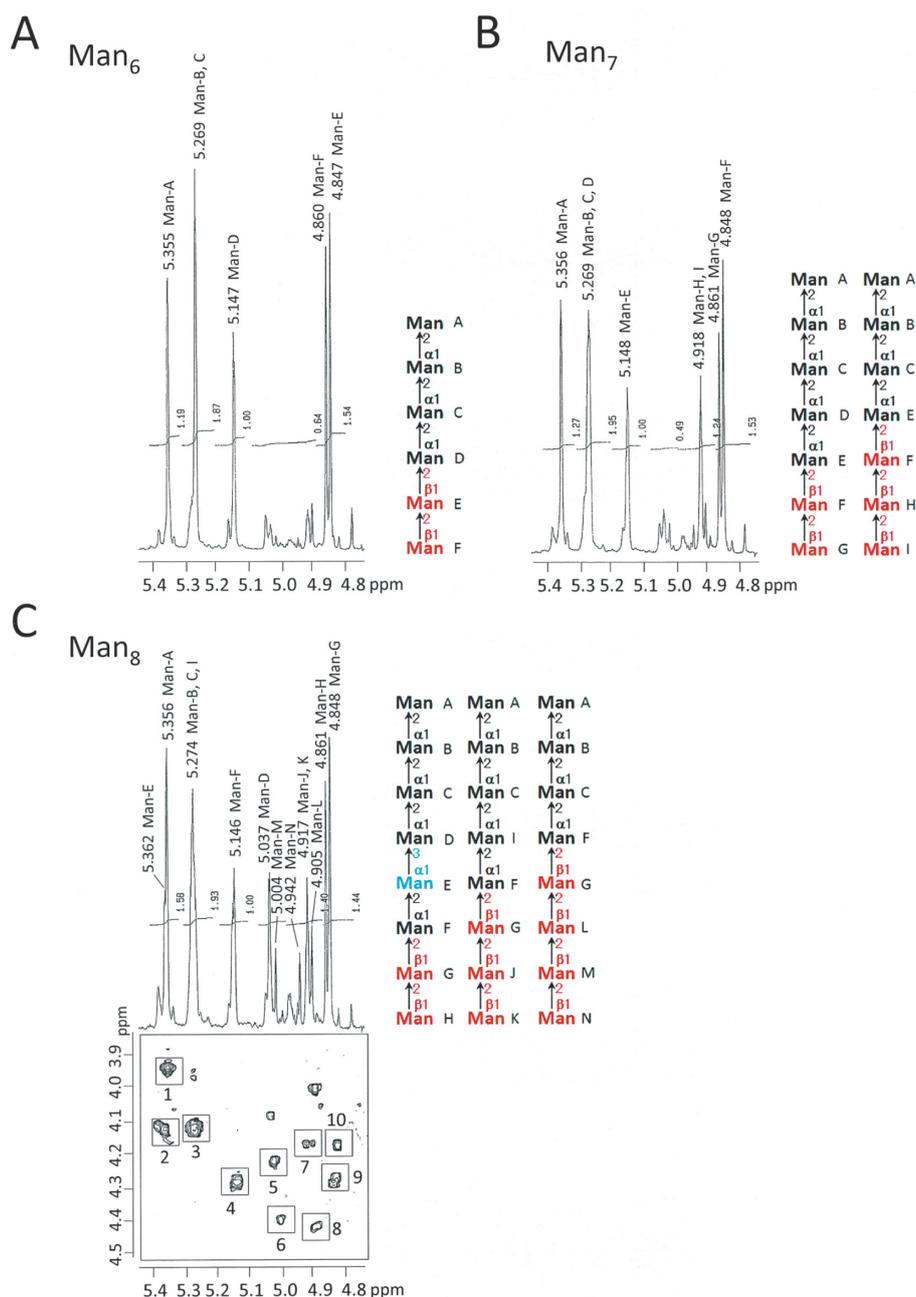


Fig. 6. Anomeric region of  $^1\text{H-NMR}$  spectra of oligosaccharides,  $\text{Man}_6$  (A),  $\text{Man}_7$  (B), and  $\text{Man}_8$  (C, upper panel), obtained from the mannan of hyphal form *C. dubliniensis* cells by acetolysis.  $\text{Man}_8$  was also analyzed by DQF-COSY (C, lower panel). The boxed regions in the 2D-NMR spectrum indicate the H-1-H-2-correlated cross-peaks of the mannose residues of the oligosaccharide. The alphabet that attached to H-1 signal corresponds to the mannose residue of the oligosaccharides shown on the right of each panel. The signal intensities of  $\text{Man}_7$  (B) and  $\text{Man}_8$  (C) indicated that these oligosaccharides were isomer mixture. The black, red and blue printing types indicate  $\alpha$ -1,2-,  $\beta$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked mannose residues, respectively. Assignment results of these cross-peaks are shown in Table 1.

2 残基含む構造であることが分かる。  $\text{Man}_8$  の構造は DQF-COSY の H-1-H-2 相関クロスピークで解析した。 Fig. 6C および Table 1 に示すように、  $\text{Man}_8$  は  $\text{Man}_7$  および  $\text{Man}_6$  には見られない 5.037 ppm および 5.362 ppm のシグナルが存在していた。 H-1-H-2 相関クロスピークの領域から Table 1 に帰属結果を示すように、 クロスピーク 2 (5.362 ppm/4.103

ppm) は  $\alpha$ -1,2 結合で置換を受けた  $\alpha$ -1,3 結合するマンノース残基、 (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 3)、 クロスピーク 5 (5.037 ppm/4.207 ppm) は  $\alpha$ -1,3 結合で置換を受けた  $\alpha$ -1,2 結合するマンノース残基、 (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)、 の存在に対応することが確認できた。 <sup>14)</sup>  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基が非還元末端に存在する側鎖にこの構造が含まれていることになる

Table 1. Assignment of the  $^1\text{H-NMR}$  signals of  $\text{Man}_8$  obtained from the mannan of hyphal form of *C. dubliniensis* cells.

Cross-peak	$\delta$ (ppm)		Residue
	H-1	H-2	
1	5.35	3.93	$\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}$
2	5.36	4.10	$\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
3	5.27	4.10	$\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
4	5.14	4.26	$\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 (\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2)_n \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
5	5.03	4.20	$\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
6	5.00	4.39	$\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
7	4.91	4.15	<b><math>\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2</math></b>
8	4.91	4.40	<b><math>\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2</math></b>
			$\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
9	4.86	4.26	$\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
			$\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
10	4.84	4.15	$\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2$
			<b><math>\text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2</math></b>

Chemical shifts are for the mannose residues shown in bold typeface.

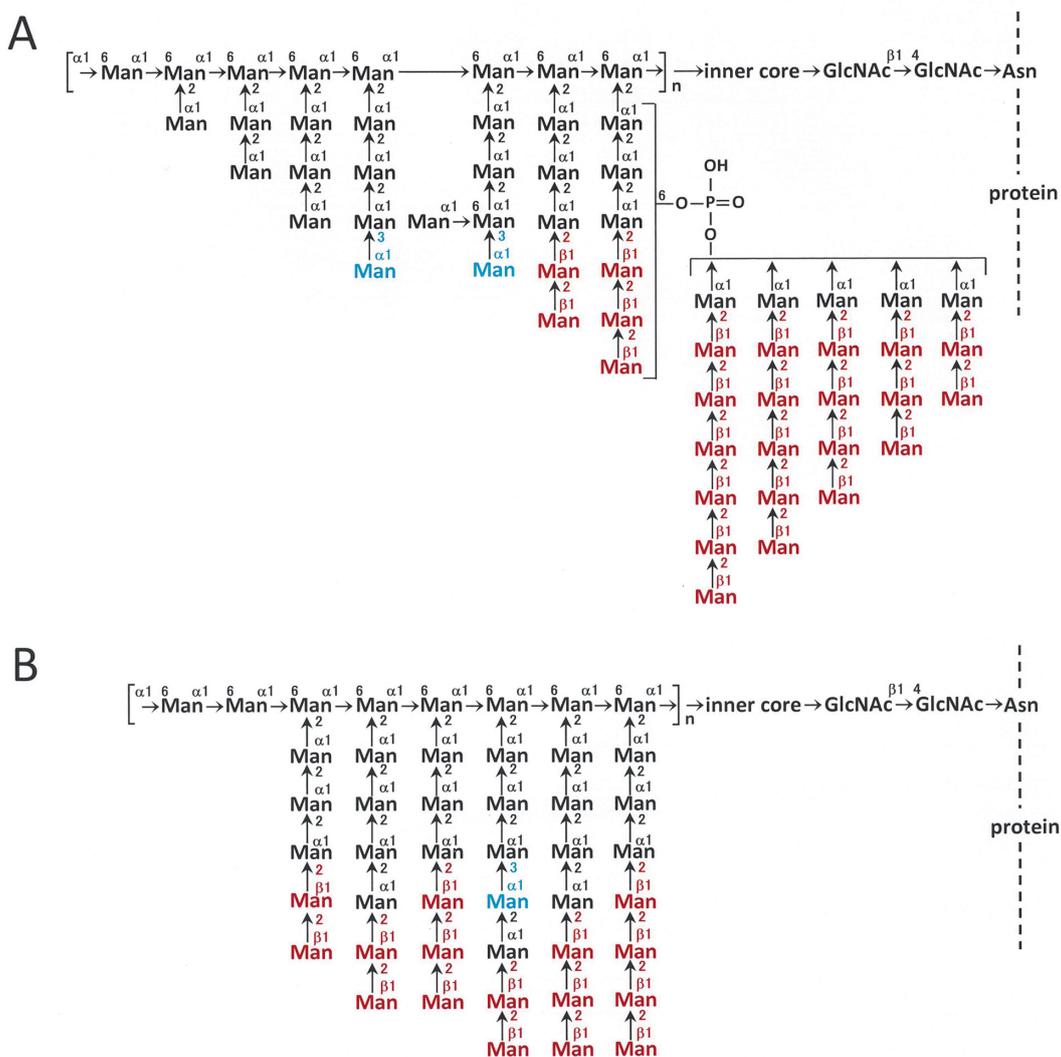


Fig. 7. Possible structure of the mannans of yeast (A) and hyphal (B) forms of *C. dubliniensis* cells. The red printing type indicates  $\beta$ -1,2-linked mannose residue and the blue printing type indicates  $\alpha$ -1,3-linked mannose residue. Non-reducing terminal of the side chain of the mannan from hyphal form cells predominantly consists of  $\beta$ -1,2-linked mannose residue. The side chain sequence is not specified.

が,  $\alpha$ -1,3 結合マンノース残基は五糖以上の長い側鎖にしか導入されないこと, および 5.037 ppm のシグナル面積を総合すると,  $\beta$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man が 3 種類の異性体中で最も多く含まれる構造といえる. これは *Candida* 属マンナンで初めて存在の確認された構造となる. Fig. 7 に今回の解析により得られた酵母型菌体および菌糸型菌体に存在する細胞壁マンナンの全体構造を示す. 菌糸型菌体では  $\alpha$ -マンノース残基を非還元末端に持つ側鎖がほぼ消失し, 末端は  $\beta$ -マンノース残基だけに变化していた. リン酸ジエステル結合を介したマンノオリゴ糖鎖もほとんど失われていた.

#### 臨床診断用抗体との反応性

Fig. 8 に抗マンナン抗体と各菌種より分離したマンナンとの反応性を比較した結果を示す. 現在 4 種類のカンジダ症診断用抗原検出キットが承認されているが, 中でもユニメディ「カンジダ」モノテストはサンドイッチ ELISA と酵素サイクリング増幅法を組み合わせた検出法であり, 感度の点から最も優れている.<sup>32)</sup> コントロールとして *Saccharomyces cerevisiae* マンナンおよび血清型 A の *C. albicans* マンナンを同時に反応させたが, *S. cerevisiae* マンナンは全く反応しなかった. 抗体との反応性は, *C. albicans* (血清型 A) の酵母型菌体のマンナン < *C. dubliniensis* の酵母型菌体のマンナン < *C. dubliniensis* の菌糸型菌体のマンナンの順に強くなることが明らかとなった. この結果から, 菌糸型菌体では抗体との反応性の高い側鎖がマンナン構造中に増加していることを示している.

#### 考 察

本研究において *C. albicans* と極めて近い新種であると報告されている *C. dubliniensis* について, phenylethyl alcohol を用いた二形性変化の誘導法を活用した.<sup>27)</sup> これまでも誘導物質として血清, アルブミン, *N*-アセチルグルコサミン, ビオチンなどの栄養成分を添加する方法が報告されているが, 二形性変化の誘導因子に対して *C. albicans* と *C. dubliniensis* では異なる応答性を示す. Phenylethyl alcohol は *C. albicans* のクオラムセンシング (quorum sensing) に関与する分子として研究されてきた化合物である.<sup>26)</sup> クオラムセンシングは細菌でよく研究されており, 菌の増殖に伴いその環境における菌の密度の高まりを感知して菌が特定の物質の産生を調節する機構のことである. その物質の濃度変化により, 集団としての菌の代謝系がその環境での生存や増殖に有利になるように調節されると考えられている. 栄養成分を変えずに低濃度のクオラムセンシング分子の添加で形態変化を誘導できることは, より自然に近い状態での形態変化を引き起こしていると考えられる. この条件で得られた酵母型菌体および菌糸型菌体の細胞壁マンナン抗原の構造解析を行った結果, 著しい違いが認められた. 二形性真菌の形態変化と細胞壁抗原構造との関係については *C. albicans* で解析されており, 菌糸型ではマンナン側鎖の分岐構造が減少すること, また,  $\alpha$ -結合マンノース残基が減少し,  $\beta$ -結合マンノース残基の割合が増加することは報告されていた.<sup>14)</sup> しかし, *C. albicans* での解析はフラグメント化することなく多糖のまま比較解析を行ったものである. 酵母型菌

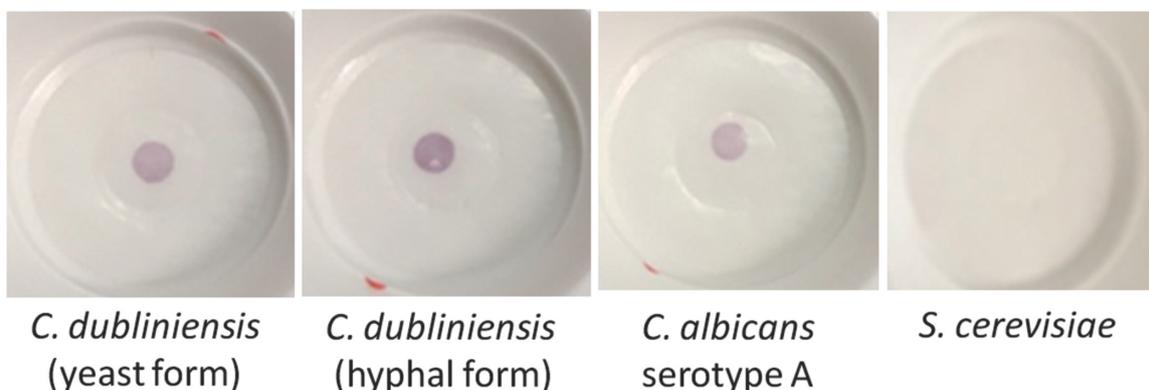


Fig. 8. Evaluation of the reactivity of mannans obtained from yeast and hyphal form *C. dubliniensis* cells using polyclonal antibody of Unimedi *Candida* monotest. Two hundred  $\mu$ L of each mannan solution, 1 ng/mL, and 100  $\mu$ L of alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-*C. albicans* antibody were used for the assay. *S. cerevisiae* mannan was used as the control.

体のマンナン抗原構造は詳細に解析されているが、菌糸型菌体のマンナン抗原構造の詳細は不明であった。アセトリシスにより得られた側鎖フラグメントのゲルろ過による分離の結果、酵母型菌体のマンナンから最も多く得られた四糖が菌糸型菌体由来のマンナンからはほとんど得られず、二糖および三糖もほとんど存在していなかった。*C. albicans* マンナンの場合、四糖以下の側鎖は  $\alpha$ -1,2 結合マンノース残基のみで構成されていることが明らかになっている。<sup>14)</sup> *C. dubliniensis* マンナンもこの部分の構造は同じであるが、菌糸型菌体では側鎖がほとんど六糖以上の長いものだけになっていることを確認することができた。HPLC による分取で得られた  $\text{Man}_6$  および  $\text{Man}_7$  の構造は、*C. albicans* マンナンの側鎖に存在するものと同じであるが、この割合が菌糸型菌体のマンナンで著しく増加していることは新たな発見であり、菌糸型菌体の主な抗原性を担う構造となっていると考えられる。 $\text{Man}_8$  にはこれまで報告のなかった  $\alpha$ -1,3 結合マンノースを中間に含む構造が見いだされた。この構造が *C. dubliniensis* の特異抗原として機能するのか、この糖鎖構造を合成する新たなマンノース転移酵素が存在するのかなどについてはさらなる解析が必要である。

*Candida* 属菌の抗原性を強く担っているのは、 $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を含む六糖以上の長い側鎖構造である。<sup>33)</sup> 従って、ほとんど  $\text{Man}_6$ 、 $\text{Man}_7$ 、 $\text{Man}_8$  といった長鎖のみで構成される菌糸型菌体の細胞壁マンナンは、酵母型菌体より強い抗原性を持つと考えられる。ユニメディ「カンジダ」モノテストに利用されている抗体はポリクローナル抗体であるが、その認識部位は  $\alpha$ -マンノースのみから成る *S. cerevisiae* マンナンと反応しないこと、さらに側鎖末端が  $\beta$ -マンノース残基のみに変化している *C. dubliniensis* の菌糸型菌体のマンナンと最も強く反応することから、この抗体には  $\beta$ -1,2 結合マンノース残基を認識するものが含まれていると考えられる。この試薬は *C. krusei* に対する検出感度の低いことが報告されているが、<sup>32)</sup> このマンナンは  $\beta$ -マンノース残基を持たない構造であることが明らかになっており、この抗体の反応性と矛盾のない結果といえる。この検出システムは極めて高感度であるが、ポリクローナル抗体を用いるにもかかわらず特定の構造に対する反応性が強くなっている。しかし、non-*albicans Candida* の細

胞壁抗原構造は多様性があるため、この試薬のように 1 菌種に対する抗体を用いるシステムではなく、典型的な複数の菌種に対する抗体を組み合わせたシステムとすることで、より多くの原因菌種を検出できる、すなわち偽陰性をなくすることができるようになると考えられる。菌糸型菌体では細胞壁最外層に存在するマンナン構造の側鎖末端から  $\alpha$ -マンノース残基がほぼ消失していることから、 $\alpha$ -マンノースを認識する Dectin-2、DC-SIGN 等の C-type lectin との相互作用も低下し、自然免疫系から認識され難い構造に変化することで侵襲が伸展する要因になっている可能性も考えられる。

### 利益相反

開示すべき利益相反はありません。

### REFERENCES

- 1) Sullivan D. J., Westerneng T. J., Haynes K. A., Bennett D. E., Coleman D. C., *Microbiology*, **141**, 1507–1521 (1995).
- 2) Pfaller M. A., *Clin. Infect. Dis.*, **22**, S89–S94 (1996).
- 3) Pfaller M. A., Diekema D. J., Turnidge J. D., Castanheira M., Jones R. N., *Open Forum Infect. Dis.*, **6**, S79–S94 (2019).
- 4) 山口英世, モダンメディア, **59**, 261–277 (2012).
- 5) Moran G., Stokes C., Thewes S., Hube B., Coleman D. C., Sullivan D., *Microbiology*, **150**, 3363–3382 (2004).
- 6) Jabra-Rizk M. A., Falkler W. A., Merz W. G., *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2423–2426 (2000).
- 7) Willis A. M., Coulter W. A., Sullivan D. J., Coleman D. C., Hayes J. R., Bell P. M., Lamey P. J., *J. Oral Pathol. Med.*, **29**, 86–90 (2000).
- 8) Lai C. C., Tsai H. Y., Chang T. C., Hsueh P. R., *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **46**, 306–308 (2013).
- 9) Jacquinet P. M., Plancke Y., Sendid B., Strecker G., Poulain D., *FEMS Microbiol. Lett.*, **169**, 131–138 (1998).
- 10) Pfaller M. A., Woosley L. N., Messer S. A., Jones R. N., Castanheira M., *Mycopathologia*, **174**, 259–271 (2012).
- 11) Friedman D. Z. P., Schwartz I. S., *J. Fungi (Basel)*, **5**, 67 (2019).
- 12) Mirhendi H., Makimura K., Khoramizadeh M., Yamaguchi H., *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, **47**,

- 225–229 (2006).
- 13) Desai J. V., *J. Fungi* (Basel), **4**, 10 (2018).
- 14) Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Okawa Y., *Biochem. J.*, **404**, 365–372 (2007).
- 15) Netea M. G., Brown G. D., Kullberg B. J., Gow N. A., *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 67–78 (2008).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) Rizzetto L., Kuka M., De Filippo C., Cambi A., Netea M. G., Beltrame L., Napolitani G., Torcia M. G., D'Oro U., Cavalieri D., *J. Immunol.*, **184**, 4258–4268 (2010).
- 19) 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).
- 20) Takahara K., Arita T., Tokieda S., Shibata N., Okawa Y., Tateno H., Hirabayashi J., Inaba K., *Infect. Immun.*, **80**, 1699–1706 (2012).
- 21) Shibata N., Arai M., Haga E., Kikuchi T., Najima M., Satoh T., Kobayashi H., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **60**, 4100–4110 (1992).
- 22) Lizicarova, I., Matulova, M., Capek, P., Machova, E., *Carbohydr. Polym.*, **70**, 89–100 (2007).
- 23) Shibata N., Kobayashi H., Okawa Y., Suzuki S., *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2565–2575 (2003).
- 24) Takahashi S., Kudoh A., Okawa Y., Shibata N., *FEBS J.*, **279**, 1844–1856 (2012).
- 25) 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).
- 26) Lingappa B. T., Prasad M., Lingappa Y., Hunt D. F., Biemann K., *Science*, **163**, 192–194 (1969).
- 27) Han T. L., Tumanov S., Cannon R. D., Villas-Boas S. G., *PLoS One.*, **8**, e71364 (2013).
- 28) Jackson P., *Biochem. J.*, **270**, 705–713 (1990).
- 29) DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. G., *Anal. Chem.*, **28**, 350–356 (1956).
- 30) 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).
- 31) Shibata N., Hisamichi K., Kikuchi T., Kobayashi H., Okawa Y., Suzuki S., *Biochemistry*, **31**, 5680–5686 (1992).
- 32) 吉田耕一郎, 二木芳人, 宮下修行, 松島敏春, *感染症学雑誌*, **76**, 536–541 (2002).
- 33) Medovarska I., Bystricky S., Kossaczka Z., Machova E., *Glycoconj. J.*, **27**, 697–702 (2010).