

東北薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	外 ^レ ウ アツ 工藤 敦（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博薬科第1号
学位授与の日付	平成27年3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
学位論文題名	Aspergillus 属菌の細胞壁ガラクトマンナンの構造及び増殖条件によるその変化の解析
論文審査委員	主査 教授 大久保 恭 仁
	副査 教授 山 下 幸 和
	副査 教授 柴 田 信 之

Aspergillus 属菌の細胞壁ガラクトマンナンの構造
及び増殖条件によるその変化の解析

東北薬科大学大学院薬学研究科

感染生体防御学教室

工 藤 敦

目 次

序 章	1
第一章 異なる培地で培養した <i>Aspergillus fumigatus</i> の O-結合型オリゴ糖の構造解析	
第一節 緒論	5
第二節 実験材料及び実験方法	7
第三節 結果	12
第四節 考察	20
第二章 異なる培地で培養した <i>Aspergillus fumigatus</i> の N-結合型ガラクトマンナンの構造解析	
第一節 緒論	22
第二節 実験材料及び実験方法	24
第三節 結果	29
第四節 考察	44
第三章 <i>Aspergillus niger</i> 及び <i>Aspergillus terreus</i> の N-結合型ガラクトマンナンの構造解析	
第一節 緒論	48
第二節 実験材料及び実験方法	50
第三節 結果	52
第四節 考察	60
総 括	62
論文目録	65
謝 辞	66
引用文献	67

序 章

我々人類は細菌や真菌と密接に関わって生活している。人間の体には 100 兆個以上の常在菌が生息しており，特に腸内細菌は人間の免疫の調節に関与していると言われている¹⁾。また，人間は嗜好品の製造や環境保全のために，さらにバイオテクノロジーの分野でも細菌や真菌を利用してきた。一方で，人類は細菌類による感染症に苦しめられ，死亡原因の大半が感染症となっていた時代もあった。

この感染症の治療に大きく貢献したのが抗菌薬である。ペニシリンは世界初の抗菌薬として 1929 年に発見され，特に第二次世界大戦の際には負傷後の破傷風による感染症に広く使われた。その後セフェム系抗菌薬の発見や全合成によって作られたニューキノロン系抗菌薬など多くの抗菌薬が作られ，感染症の治療は急速に進歩した。例えば，放線菌から発見された抗菌薬であるストレプトマイシンや結核に効果があるイソニアジド，ピラジナミドなどの抗結核薬の発見は，かつて 1 位であった結核の死亡率を現在では 26 位まで低下させた。

しかし抗菌薬の開発の一方で，細菌類の抗菌薬に対する耐性化が問題となっている。例えばペニシリンに対する耐性菌は実用化から間もない 1940 年台に発見されている。ペニシリンの作用機序は細菌類が有するペニシリン結合タンパク質に結合することによる細胞壁合成阻害だが，耐性化はそのタンパク質に変異が起こればペニシリンの結合能が低下したために生じた。人類はこの耐性菌に対抗するための抗菌薬としてメチシリンを開発したが，更にメチシリンに耐性を獲得した *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* が発生した。この MRSA は医療施設内での院内感染だけではなく *community-acquired MRSA (CA-MRSA)* と言われる市中感染型の MRSA の増加，治療薬であるバンコマイシンの最少発育阻止濃度 (MIC) が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株の出現により治療難渋例が増えている²⁾という問題があり，より注意が必要な菌種である。

一方真菌症に着目すると，近年増加傾向にあるのは *Aspergillus* 属菌

が原因で生じるアスペルギルス症であり，剖検例中の内臓真菌症（深在性真菌症）として検出される頻度が最も多い菌種である³⁾ (Fig. 1). 以前は *Candida* 属菌の検出が最も多かったが，新規抗真菌薬の登場によりカンジダ症の治療効果が上昇したこと及び易感染性の病態で患者が長期生存可能になり，*Aspergillus* 属菌の感染を受ける機会が増加したため *Aspergillus* 属菌の検出頻度が上昇したと考察されている⁴⁾. アスペルギルス症の代表的なものとしては，*Aspergillus* 属菌がアレルギー源となり発症するアレルギー性気管支肺アスペルギルス症，肺あるいは気管支に器質的な病変が存在する場合に発症する肺アスペルギローマ，好中球減少，強力な免疫抑制薬及び抗がん剤投与時に発症頻度が高い侵襲性アスペルギルス症がある．この中でも侵襲性アスペルギルス症は致死率が 58% と高い予後不良な疾患である⁵⁾.

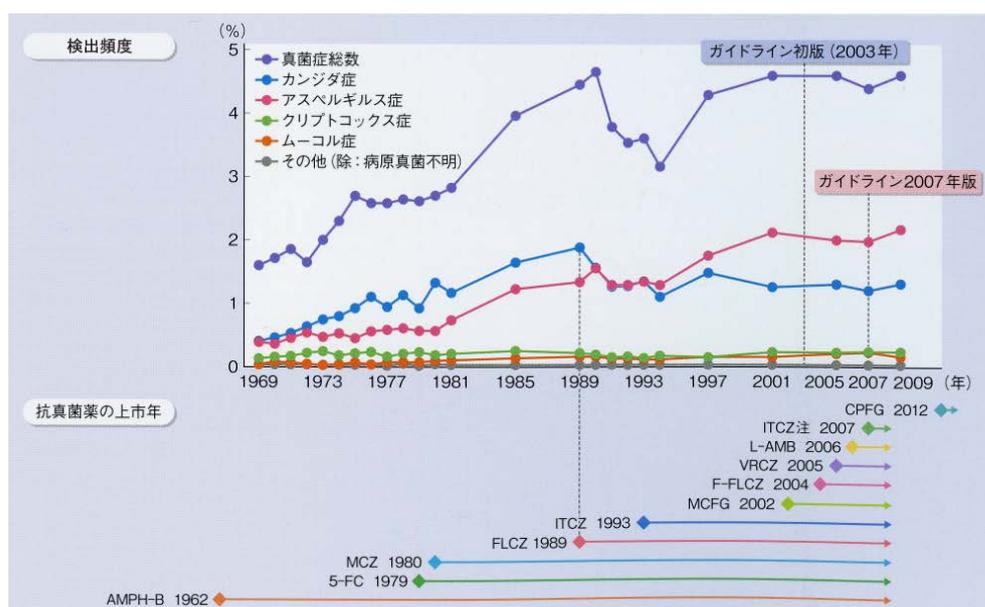


Fig. 1. わが国の病理剖検例における内臓真菌症の年次別発生頻度と抗真菌薬の上市年⁶⁾.

この *Aspergillus* 属菌の感染には孢子が重要とされているが，空気中にも多く存在し無意識に一日数百個を吸いこんでいると言われている⁷⁾. 特に建物の建築や改築が近くで行われていた場合にアスペルギルス症の発症率が上がるため^{8, 9)}，病院内の空調設備の清掃や HEPA フィルターによる管理が重要とされている^{10, 11)}. この孢子は健常人であれば肺胞マクロファージや好中球などの生体の防御機構により排除するこ

とができるが^{12,13)}、免疫能の低下した患者では排除できずに感染してしまい¹⁴⁾、特に骨髄移植患者などの好中球減少患者は発症のリスクが高いと言われている¹⁵⁻¹⁸⁾。

これらの真菌症に対する治療薬である抗真菌薬としては、cytochrome P450 を阻害し、細胞膜成分のエルゴステロール合成を阻害するアゾール系、エルゴステロールに結合し細胞膜を破壊するポリエン系があるが、近年新しくカンディン系抗真菌薬が発売されている。これは新規作用部位として細胞壁に存在する β -1,3-グルカン合成酵素阻害作用を有するが、真菌特異的な作用部位のため副作用が少ないという利点がある。一方で細菌と同様に真菌の耐性化の問題が危惧されており、イトラコナゾールやボリコナゾール耐性の *A. fumigatus*¹⁹⁻²²⁾、アムホテリシン B 耐性の *Aspergillus terreus*²³⁾などが出現しており、今後の耐性化の進行に注意が必要である。また *Aspergillus* 属菌では未だ認められていないが、*Candida* 属菌ではカンディン系抗真菌薬低感受性菌の存在が報告されていることから²⁴⁻²⁶⁾、更なる耐性化の防止、新規抗真菌薬の開発が求められている。

これらのアスペルギルス症の治療には早期診断が重要であり、診断法としては微生物学的検査、病理組織学的検査、画像検査、真菌抗原検査、分子生物学的検査の有用性が明らかとなっている。このうち確定診断は培養検査、鏡検、病理組織学的検査で行えるが、状態不良の患者に侵襲的検査は行えず明確な結果が得られない場合があり、補助診断法としてこれら以外の診断法も用いられている。その中でも真菌抗原検査として、菌体が産生するガラクトマンナン抗原を ELISA 法で検出するキット(Plateria *Aspergillus* EIA)は発症早期に短時間で感染の有無の確認ができるため頻用されている。これはガラクトマンナンに含まれるオリゴガラクトフラノース(Galf)鎖が特異的な抗原性を有するため、この抗原に対するモノクローナル抗体を診断に応用したものである²⁷⁾。

これまでに真菌の細胞壁抗原多糖の研究は広く行われている。特に *Candida* 属菌の細胞壁の最外層に存在するマンナンタンパク質複合体

²⁸⁾は、宿主細胞への付着^{29, 30)}、マクロファージとの相互作用^{31, 32)}、細胞壁の構築^{33, 34)}、病原性への関与³⁵⁾等に関する解析が進められている。一方で細胞壁ガラクトマンナンについては、これまでに *Penicillium*³⁶⁾, *Malassezia*³⁷⁾, *Trichophyton*³⁸⁾で構造解析の報告があり、また Galf を有する菌の細胞壁糖鎖構造として *Cladosporium*³⁹⁾や *Lactobacillus*^{40, 41)}, *Fusarium*⁴²⁾が近年報告されており、自然界での Galf の存在が徐々に明らかとなっている。この *Aspergillus* 属菌が有する Galf については、*A. fumigatus* において病原性への関与^{43, 44)}や *Aspergillus nidulans* において抗真菌薬に対する感受性への影響⁴⁵⁾といった報告があり、ヒトが有していない糖鎖構造という特徴を利用した Galf の機能に関する研究の進展が期待されている。一方で、近年遺伝子欠損株の作製による Galf の機能解析は盛んに行われているものの、Galf 鎖の構造に着目した研究はほとんど行われていなかった。

現在臓器移植などの医療技術の進歩に伴う真菌症の増加が危惧されており⁴⁶⁾、特に内臓真菌症の中で検出割合の大きい *Aspergillus* 属菌は今後更に増加する可能性がある。また抗真菌薬は細菌感染症と異なり治療薬が限られていることや耐性化の懸念もあることから、*Aspergillus* 属菌の性質及び病原性に関する研究を更に進める必要がある。そこで本研究では、アスペルギルス症の新たな診断法や治療薬開発のために、その基礎となる *Aspergillus* 属菌の細胞壁構造の理解を目的とし、細胞壁に特徴的に存在するガラクトマンナンに着目し構造解析を行った。その結果、培養条件、菌種により Galf 側鎖の長さが大きく変化すること、更に新規糖鎖構造の存在することを明らかにした。

第一章では異なる培地で培養した *A. fumigatus* の O-結合型オリゴ糖の構造の変化、第二章では異なる培地で培養した *A. fumigatus* の N-結合型ガラクトマンナンの構造の変化、第三章では *Aspergillus niger* 及び *A. terreus* の N-結合型ガラクトマンナンの詳細な構造について解析した結果を報告する。

第一章

異なる培地で培養した *Aspergillus fumigatus* の O-結合型オリゴ糖の構造解析

第一節 緒論

糖タンパク質とはタンパク質に糖鎖が結合したものであるが、その中でもO-結合型糖鎖はセリンまたはスレオニン残基に結合したものを指す。人類が有するO-結合型糖鎖としては免疫グロブリン⁴⁷⁾やヒト絨毛性ゴナドトロピン⁴⁸⁾の構造が解析されており、特に α -ジストログリカンについてはSia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Manというシアル酸を含む糖鎖を初め⁴⁹⁾、様々な構造を持つ一連のO-結合型糖鎖構造が報告されている⁵⁰⁻⁵³⁾。一方、哺乳類とは異なり *Saccharomyces cerevisiae* などの真菌が持つO-結合型糖鎖は全てO-mannose型糖鎖である⁵⁴⁾。パン酵母は α -1,2結合及び α -1,3結合のmannoseが1-5残基繋がる糖鎖を有しており、O-結合型糖鎖は酵母の生存や細胞壁の生合成に関与していると報告されている⁵⁵⁾。また *Candida albicans* の構造は *S. cerevisiae* の糖鎖と類似しており α -1,2結合のmannoseが2-3残基結合しているが⁵⁶⁾、*Cryptococcus neoformans* ではmannose以外にgalactoseやxyloseを有する特徴的な構造であり⁵⁷⁾、真菌のO-結合型糖鎖は菌種によって様々な構造の糖鎖を有することが知られている。一方 *Aspergillus* 属菌についての構造解析では、*A. fumigatus* のO-結合型糖鎖はGlc α 1 \rightarrow 6Man, Gal β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man, Gal β 1 \rightarrow 5Gal β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man, Gal β 1 \rightarrow 5Gal β 1 \rightarrow 5Gal β 1 \rightarrow 5Gal β 1 \rightarrow 6Manを有すること⁵⁸⁾や、*Aspergillus awamori* のglucoamylase I はmannose, α -1,2-mannotrioseを有するという報告がある⁵⁹⁾。また近年タンパク質のセリンあるいはスレオニン残基にmannoseを転移する酵素であるprotein O-mannosyltransferaseに関する研究も行われており、*A. fumigatus* のAfPmt1p, AfPmt2p, AfPmt4p^{60, 61)}や、*A. nidulans* のPmtA⁶²⁾の欠損により細胞壁構築に影響が生じることから、

Aspergillus 属菌が有するO-結合型糖鎖も重要な役割を有していると考えられている。しかし、様々な構造の糖鎖の存在理由や遺伝子欠損状態での糖鎖構造は明らかになっていない。

これまでに *C. albicans* を yeast nitrogen base 培地で培養した際に yeast extract-peptone-dextrose 培地で培養した場合よりも細胞壁表面の疎水性の増加することが報告されている⁶³⁾。また同培地で培養した際のマンナン構造や抗原性について、リン酸基や β -1,2 結合 mannose が消失し、非還元末端 α -1,3 結合が増加することや抗原性の変化することが報告されている⁶⁴⁾。これらの結果は *Aspergillus* 属菌においても細胞壁糖鎖の構造が変化する可能性を示唆していた。そこで、本章では *A. fumigatus* を yeast nitrogen base 培地及び yeast extract-peptone-dextrose 培地で培養を行い、得られた O-結合型オリゴ糖鎖の構造の違いについて検討を行った。

第二節 実験材料及び実験方法

1. 使用菌株

Aspergillus fumigatus var. *fumigatus* NBRC 33022 を用いた。菌体は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部より入手した。

2. 菌の培養

培地は yeast extract-peptone-dextrose 培地 (0.5% yeast extract (透析後の透析外液を使用), 1% peptone, 2% glucose) (以下 YPD 培地と略す) は 500 mL 三角フラスコに分注しオートクレーブ滅菌を行い使用した。yeast nitrogen base-galactose 培地 (9% galactose, 0.67% yeast nitrogen base (0.5% ammonium sulfate, 少量のアミノ酸, ミネラル, ビタミンを含む)) (以下 YNB 培地と略す) は, まず galactose を三角フラスコに分注しオートクレーブを行い, YNB は 0.22 μm メンブランフィルターを用いて分注することにより調製した。本菌は 2% agar を含む YPD 斜面寒天培地で前培養の後, 上記の培地に適量移植し, 28°C, 14 日間静地培養した。

3. 培養濾液粗画分の調製

培養後 formaldehyde を最終濃度が 1%になるよう加え一晩静置した後, ろ紙を用いて培養濾液と菌体を分離した。培養濾液は 30-40°C で減圧濃縮し, 2-3 日流水透析を行い, 再度減圧濃縮し凍結乾燥を行った。

4. ガラクトマンナンの分離

培養濾液粗画分を精製水で溶解後 3000 rpm, 10 分間遠心分離し, 上清を DEAE-Sepharose Fast Flow column (5×20 cm) にかけて水, 0.1 M NaCl, 1 M NaCl で溶出した。溶出液の糖含量をフェノール・硫酸法で測定後回収し, 減圧濃縮, 2-3 日流水透析を行った後, 再び減圧濃縮して凍結乾燥した。YPD 培地及び YNB 培地で培養して得られたガラクトマン

ナンを以下それぞれ P-GM 及び N-GM と略す。

5. 菌体からのオートクレーブ粗抽出物の調製

菌体はろ紙を用いて分離した後，生理食塩水で洗浄し，acetone を加えて沈積し 4°C で保存した．acetone 脱脂した菌体を濾紙濾過し，再度 acetone に沈積し濾過した．これを 3 回繰り返した後，菌体を室温で乾燥させ乳鉢中で粉碎した．粉碎した菌体に精製水を加え，121°C，3 時間，オートクレーブにかけ熱水抽出を行った．冷後，3000 rpm，20 分間遠心分離し上清を 2-3 日流水透析した後，凍結乾燥を行った．

6. Cetavlon 法による粗ガラクトマンナンの分離

オートクレーブ粗抽出物を Cetavlon 法により精製した⁶⁵⁾．粗抽出物 2 g を精製水 40 mL に溶かし，9% Cetavlon (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) 溶液 20 mL を加え室温で 1 時間攪拌後，3000 rpm，25°C で 30 分間遠心分離を行った．得られた上清に 1% boric acid 40 mL を加え攪拌しながら 1 M NaOH 溶液を滴下し pH 9.5 に調整した．生じた沈殿を 3000 rpm，10 分間遠心分離で回収し，0.5% sodium acetate 溶液 (pH 9.5) 100 mL で洗浄後，2% acetic acid 2 mL で溶かし，0.8% sodium acetate/ethanol 溶液に少量ずつ加えた．生じた沈殿を 3000 rpm で 10 分間遠心分離し，沈殿を 2% acetic acid/ethanol 溶液で洗浄し乾燥後，適量の水に溶かし 2-3 日流水透析し，回収後凍結乾燥を行った．

7. O-結合型糖鎖の分離

O-結合型糖鎖は 2 種の条件で β -elimination により分離した．還元条件下でのオリゴ糖調製は，粗ガラクトマンナン 300 mg に 0.5 M NaBH₄/0.1 M NaOH 30 mL を加え，室温で 24 時間反応させることにより遊離させた⁶⁶⁾．その後 acetic acid で中和し，Amberlite IR-120 (H⁺型) で脱イオンし，生成物を Bio-Gel P-6 column (2.5×100 cm) にかけた．非還元条件下でのオリゴ糖調製は，粗ガラクトマンナン 300 mg に 0.1 M NaOH 30 mL を加え室温で 24 時間反応させることにより遊離させた

67). その後 1 M HCl 3 mL で中和し, Bio-Gel P-6 column (2.5×100 cm) にかけた. 両溶出液の糖含量をフェノール・硫酸法で測定後各オリゴ糖別に回収し, 更に Bio-Gel P-2 column (2.5×100 cm) 又は Bio-Gel P-4 column (2.5×200 cm) にかける. 同様に発色後それぞれのオリゴ糖を回収し凍結乾燥を行うことにより精製した. 溶出位置は *Candida* マンナンのアセトリシスにより得られた 2 糖から 6 糖までのオリゴ糖⁶⁸⁾を標準品として用いた.

8. メチル化分析

メチル化分析は多糖, オリゴ糖共に Ciucanu らの方法⁶⁹⁾に準じ, 次のように行った. 試料 1 mg に DMSO 1 mL を加え, 1 時間攪拌し試料を溶解した. 次に多糖の場合は乳鉢ですりつぶした粉状の NaOH 50 mg を添加し, 3 時間攪拌後 CH₃I を 500 μL 加え, 更に 3 時間攪拌した. オリゴ糖の場合は同様に粉状の NaOH を 50 mg 添加し, 30 分攪拌後 CH₃I を 500 μL 加え, 更に 30 分攪拌した. 反応液に, 水 1 mL と chloroform 1 mL を加え激しく振り混ぜて抽出後, 1500 rpm, 3 分間遠心分離を行い chloroform 層を回収し, 水で 3 回洗浄後 chloroform 層に無水硫酸ナトリウムを適量加え脱水しメチル化誘導体を得た.

続いて, 得られたメチル化誘導体を GC/MS で解析を行うために, 部分メチル化アルジトールアセテートを以下のように調製した. まず 2 M trifluoroacetic acid (TFA) 3 mL (TFA 450 μL と水 2.55 mL を混和して調製した) を加え 110°C で 3 時間加水分解し, 濃縮乾固した. その後 2-propanol を 2 mL 加え 40°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した. 次に NaBD₄ 15 mg, 水 1 mL を加え一晩放置し還元した. その後 acetic acid 50 μL で中和し濃縮乾固の後, methanol を 2 mL 加え 40°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した. 更に acetic anhydride と pyridine の混合溶液 (1:1, v/v) 4 mL を加え 100°C で 3 時間反応させアセチル化を行った. その後減圧乾固し, 更に toluene を 2 mL 加え 50°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した. その後 chloroform 1 mL で抽出し, 水で 3 回洗浄し chloroform 層を濃縮乾固後, acetone 5 mL に溶解し GC/MS で解析した. GC/MS の条件は以下の

通りである.

カラム名 : DB-5

カラムサイズ : 0.32 mm × 30 m

He ガス : 20.4 mL/min

カラム充填剤 : (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane

昇温プログラム :

100 °C (10 min), 20 °C/min (2.5 min) → 5 °C/min (18 min) → 20 °C/min (3 min) → 300 °C

9. HPLC による Galf オリゴ糖異性体の分離

得られたオリゴ糖を精製水 100 μL に溶解し, 50 μL ずつ TOSOH 製高速液体クロマトグラフ装置 (PX-8010) を用い分離しエルマ光学製示差屈折計でピークを検出し, 各ピークを回収した. 回収したピークを再度 HPLC で分離し, 異性体のピークを除去してオリゴ糖を精製した. 分離したオリゴ糖は減圧濃縮後凍結乾燥した. HPLC の条件は以下の通りである.

カラム名称 : YMC-PACK PA-25

カラムサイズ : 10×500 mm

移動相 : acetonitrile : H₂O (63 : 37)

10. 核磁気共鳴スペクトル分析

¹H-NMR, ¹³C-NMR, total correlation spectroscopy (TOCSY), 2D nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) の測定は日本電子核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-LA600) を用いて行った. ¹H-NMR の測定は試料 1-10 mg を重水 (D₂O) 0.7 mL に溶解し, acetone を内部標準物質 (¹H-NMR は 2.225 ppm, ¹³C-NMR は 31.07 ppm) として室温, 45 °C 又は 70 °C で行った.

11. 糖量測定

糖量はフェノール・硫酸法⁷⁰⁾により次のように測定した。試料を試験管に 20, 50 又は 100 μL ずつ取り, 5% phenol 100 μL , sulfuric acid 500 μL を加え, 37°C, 20 分インキュベートし, TOSOH 製マイクロプレートリーダー (MPR-A4) で 492 nm の吸光度を測定した。

12. α -mannosidase 処理

還元条件下で得た糖アルコール型の各オリゴ糖 20 mg を 50 mM borate buffer (pH 4.5) 1 mL に溶解し, Jack bean 由来 α -mannosidase を 5 unit 加え, 37°C で 24 時間インキュベートした⁷¹⁾。次にこの α -mannosidase 処理成績体混合物を Bio-Gel P-2 column (2.5 \times 100 cm) にかけて分画し, それぞれのオリゴ糖を分取した。

第三節 結果

O-結合型糖鎖に及ぼす培地の影響

2 種の異なる培地で培養した菌体から培地中に遊離した細胞壁ガラクトマンナンの O-結合型糖鎖について差異を検討するために、 β -elimination で遊離したオリゴ糖を Bio-Gel P-6 column にかけて多糖画分とオリゴ糖画分に大きく分けて分取し、その後オリゴ糖画分を再度 Bio-Gel P-2 column もしくは Bio-Gel P-4 column にかけて分離した (Fig. 1-1). その結果 P-GM は 4 糖までのオリゴ糖しか得られなかったのに対し、N-GM では 10 糖前後までのオリゴ糖が得られた. このことから、培地の変化は O-結合型糖鎖の Galf オリゴ糖鎖の長さに影響することが明らかとなった.

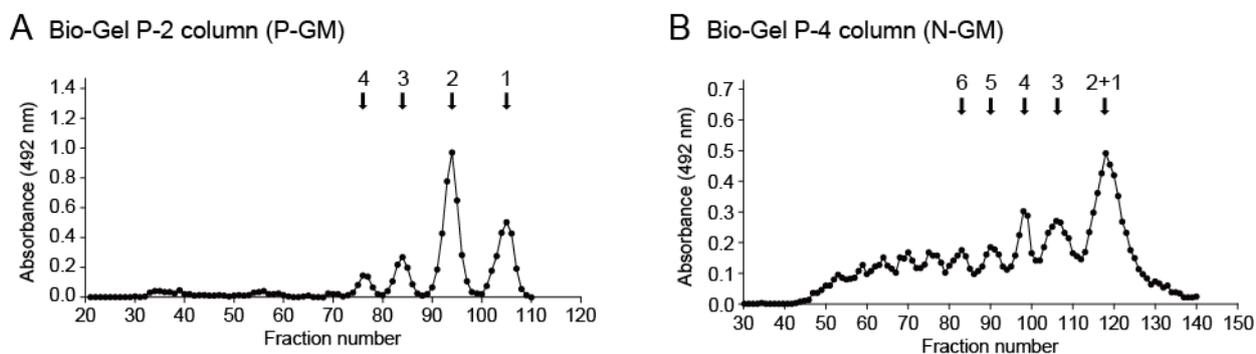


Fig. 1-1. Comparison of the chain length of O-linked oligosaccharides obtained from *A. fumigatus* grown under distinct culture conditions. Cultures were grown in YPD or YNB medium; galactomannans were isolated by DEAE-Sephacrose column chromatography; and the resulting P-GM and N-GM (respectively) were subjected to β -elimination under non-reducing conditions (see Materials and methods for full description.) The O-linked oligosaccharides released from P-GM were separated by a column (2.5 \times 100 cm) of Bio-Gel P-2 (A) and from N-GM by a column (2.5 \times 200 cm) of Bio-Gel P-4 (B). The carbohydrate content in each fraction was determined by the phenol/sulfuric acid method. The numbers from 1 to 6 indicate the elution position of mannose and manno-oligosaccharides from biose to hexaose obtained from *Candida* mannan by acetolysis.

新規 O-結合型糖鎖の構造解析

これら O-結合型糖鎖の構造を NMR 及びメチル化分析により解析した。菌体抽出物から得たガラクトマンナンの O-結合型糖鎖は培養上清から回収したガラクトマンナンの O-結合型糖鎖と同じ構造であった。オリゴ糖は非還元条件下で β -elimination することにより得られた還元末端がアノマー異性体 (α 体及び β 体) の平衡状態のものと、還元条件下で β -elimination することにより得られた還元末端糖残基が糖アルコール型のものの 2 種類を用いて解析した。メチル化分析の結果 (Table 1-1), 2 糖は $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta$ であることが明らかとなり, また 3 糖以上では糖アルコール型のオリゴ糖の還元末端が 2,6-di-O-substituted mannitol (2,6-Man-ol) と 6-O-substituted mannitol (6-Man-ol) の 2 種類存在することが明らかとなった。この 2,6-Man-ol 残基のメチル化で得られた 2,6-di-O-acetyl-1,3,4,5-tetra-O-methyl mannitol (2,6-Man-ol) (Fig. 1-2B) は非還元末端の mannose 残基由来の 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl mannitol (t-Man β) (Fig. 1-2A) の 180° 回転対称体であるためガスクロマトグラフィーでは同じピークとして検出され区別できなかつた。そこで還元条件下, 非還元条件下それぞれで β -elimination を行い両者を比較した。すなわち非還元条件下で β -elimination を行った際に得られたオリゴ糖について GC-MS 分析を行ったところ, 非還元末端 mannose 残基 (t-Man β) からは m/z 102, m/z 118, m/z 162 のフラグメントイオンが現れる (Fig. 1-2C) のに対し, 還元条件下で得たオリゴ糖を同様にメチル化分析すると m/z 101 と m/z 102, m/z 117 と m/z 118, m/z 161 のフラグメントイオンが強く現れ (Fig. 1-2D), 2 種の部分メチル化アルジトールアセテートが確認できた。従って還元条件下で得たオリゴ糖のメチル化物中に 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl mannitol (t-Man β) 及び 2,6-di-O-acetyl-1,3,4,5-tetra-O-methyl mannitol (2,6-Man-ol) が含まれていること, すなわち 2,6-分岐マンノースの存在が明らかとなった。以上の結果は結合様式が異なる 2 種類のオリゴ糖の存在を示しており, その構造は 3 糖では分岐オリゴ糖である $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Man}\beta$ と直鎖オリゴ

糖の $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 5\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 6\text{Manp}$ であることが明らかとなった。また 4 糖以上の構造は 3 糖と同様の 2 種類の基本構造の末端に *Gal* が β -1,5 結合で伸長しており、長いオリゴ糖では β -1,6 結合の存在も示していた (Table 1-1)。

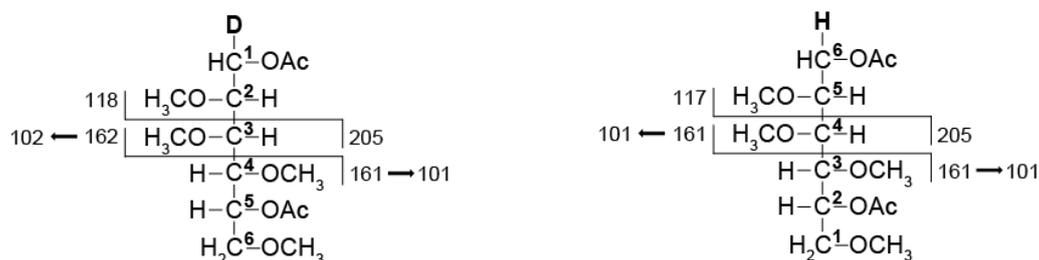
Table 1-1. GC-MS analysis of *O*-methylalditol acetates derived from methylation analyses of *O*-linked oligosaccharides

<i>O</i> -Methylalditol acetate	Sugar linkage	RRT ^a	Biose fraction		Triose fraction		Tetraose fraction		Pentose fraction	
			NaBH ₄		NaBH ₄		NaBH ₄		NaBH ₄	
			-	+	-	+	-	+	-	+
2,3,4,6-Me ₄ -Man	t-Manp	1.00	1.00	1.00	2.60	-	3.00	-	1.40	-
3,4,6-Me ₃ -Man	2-Manp	1.08	0.80	-	-	-	-	-	-	-
1,3,4,5,6-Me ₅ -Man	2-Man-ol	0.88	-	0.80	-	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Man +	t-Manp +	1.00	-	-	-	6.00	-	4.10	-	2.50
1,3,4,5-Me ₄ -Man	2,6-Man-ol									
3,4-Me ₂ -Man	2,6-Manp	1.20	-	-	2.10	-	3.40	-	1.40	-
2,3,4-Me ₃ -Man	6-Manp	1.11	-	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
1,2,3,4,5-Me ₅ -Man	6-Man-ol	0.90	-	-	-	1.00	-	1.00	-	1.00
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	t-Galp	1.01	-	-	3.40	2.60	3.20	1.70	2.40	1.50
2,3,6-Me ₃ -Gal	5-Galp	1.09	-	-	1.60	1.50	7.00	4.30	8.00	5.70
2,3,5-Me ₃ -Gal	6-Galp	1.14	-	-	-	-	0.10	0.10	0.50	0.30

Released oligosaccharides by β -elimination in the presence (+) or the absence (-) of NaBH₄ were separated using Bio-Gel P-2 column and eluates corresponding to biose fraction to pentaose fraction were analyzed by methylation analysis.

^aRetention time relative to that of 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol.

A 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol (t-Manp) **B** 2,6-di-*O*-acetyl-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl mannitol (2,6-Man-ol)



C 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol (t-Manp) **D** 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol (t-Manp) + 2,6-di-*O*-acetyl-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl mannitol (2,6-Man-ol)

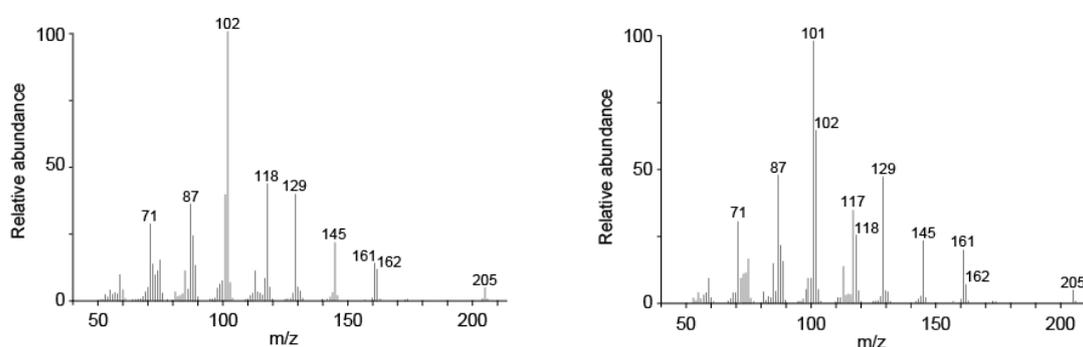


Fig. 1-2. Mass spectra of partially methylated alditol acetate derived from *O*-linked oligosaccharides. (A) Fragmentation scheme of deuterium labeled 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol, which corresponds to a non-reducing terminal mannose (t-Manp). (B) Fragmentation scheme of reversed 2,6-di-*O*-acetyl-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl mannitol, which corresponds to 2,6-di-*O*-substituted mannitol (2,6-Man-ol). (C) Mass fragment ions of deuterium-labeled 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol (t-Manp) as the standard. (D) Mass fragment ions of a mixture of deuterium-labeled 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol (t-Manp) and 2,6-di-*O*-acetyl-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl mannitol (2,6-Man-ol) obtained from oligosaccharides longer than biose fraction released by β -elimination under reducing conditions.

この構造の確認のために $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った結果、還元末端 mannose (5.35-5.37 ppm), 非還元末端及び中間 Galf (5.19-5.22 ppm)及び mannose に結合する Galf (5.02-5.05 ppm) のシグナルが得られた (Fig. 1-3A). 還元条件下の β -elimination で得たオリゴ糖(2糖-5糖をそれぞれ O2-O5 と略す)は還元末端の mannose (Man-A) のシグナルが消失し, これに隣接する α -1,2-結合 mannose (Man-B) のシグナルの高磁場シフトが観測された (Fig. 1-3B). そこで分岐オリゴ糖の α -1,2 結合 mannose を除去し構造解析を進めるために, これらのオリゴ糖について α -mannosidase 処理を行い, 再度 Bio-Gel P-2 column にかける α -mannosidase 抵抗性の直鎖オリゴ糖(n)と分岐オリゴ糖由来の α -mannosidase 分解成績体である直鎖オリゴ糖(n-1)を分離し (Fig. 1-3E), それぞれについて $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った (Fig. 1-3C,1-3D). その結果, オリゴ糖異性体混合物中の直鎖オリゴ糖と分岐オリゴ糖由来のオリゴ糖が区別でき, 主鎖の mannose に結合する非還元末端 Galf は 5.045 ppm, mannose に結合する Galf は 5.022 ppm, 1,5 結合中間 Galf は 5.195 ppm, 非還元末端 Galf は 5.220 ppm であることが明らかとなった. また, mannose に Galf が直鎖状に繋がるものと, mannose に Galf と mannose が分岐状に繋がるものの存在は3糖の α -mannosidase 抵抗性直鎖オリゴ糖(O3-3)と4糖の分岐オリゴ糖由来の α -mannosidase 分解成績体である直鎖オリゴ糖の3糖(O4-3)の $^1\text{H-NMR}$ シグナルが一致すること, さらに4糖の α -mannosidase 抵抗性直鎖オリゴ糖(O4-4)と5糖の分岐オリゴ糖由来の α -mannosidase 分解成績体である直鎖オリゴ糖の4糖(O5-4)の $^1\text{H-NMR}$ シグナルが一致することから確認できた. またこれらの O-結合型糖鎖の $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト値を Table 1-2 に示した.

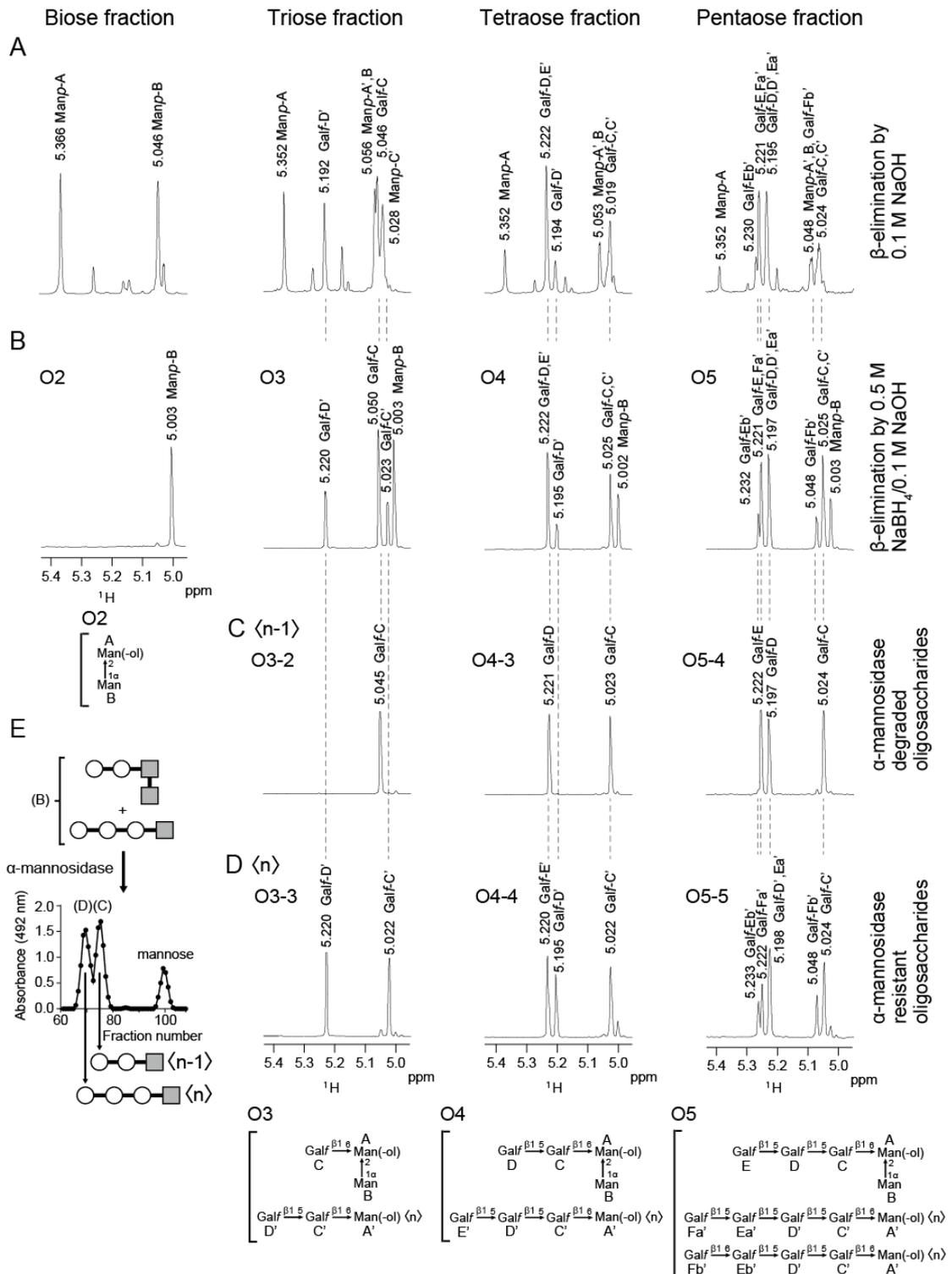


Fig. 1-3. ^1H NMR spectra of O-linked oligosaccharides. (A) Oligosaccharides obtained by β -elimination under non-reducing conditions. (B) Oligosaccharides obtained by β -elimination under reducing conditions. The biose fraction to pentose fraction were designated as O2 to O5, respectively. O3 to O5 were treated with α -mannosidase and downsized (n-1) oligosaccharides (C) and α -mannosidase resistant (n) oligosaccharides (D) were separated by Bio-Gel P-2 column chromatography. (E) The separation scheme of α -mannosidase degradation products. For the structure in this figure, symbols \bigcirc and \square indicate galactofuranose (GalF) and mannopyranose (Man) residues, respectively. O3-3 and O3-2 indicate α -mannosidase resistant triose and its degradation product, biose, respectively. O4-3 and O5-4 indicate triose and tetraose obtained from O4 and O5, respectively, by α -mannosidase degradation.

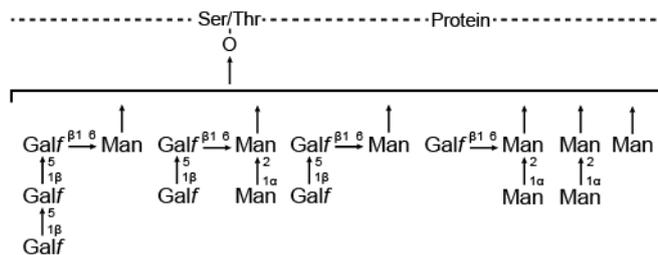
Table 1-2. ¹H NMR chemical shifts (δ) of O-linked oligosaccharides

Oligosaccharides	Sugar residue and structure					Reduction by NaBH ₄	H-1 Chemical shift, δ (ppm)							
	F	E	D	C	A B		F	E	D	C	A B			
Biose fraction					Man α	—					5.366			
					\uparrow 2 Man α 1						5.046			
					Mannitol	+					-			
					\uparrow 2 Man α 1						5.003			
Triose fraction				Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—				5.046	5.352			
				\uparrow 2 Man α 1							5.056			
				Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+				5.05	-			
				\uparrow 2 Man α 1							5.003			
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—			5.192	5.028	5.056		
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+			5.22	5.023	-		
Tetraose fraction				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—			5.222	5.019	5.352		
				\uparrow 2 Man α 1							5.053			
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+			5.222	5.025	-		
				\uparrow 2 Man α 1							5.002			
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—		5.222	5.194	5.019	5.053	
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+		5.222	5.195	5.025	-	
Pentaose fraction				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—		5.221	5.195	5.024	5.352	
				\uparrow 2 Man α 1								5.048		
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+		5.221	5.197	5.025	-	
				\uparrow 2 Man α 1								5.003		
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—	5.221	5.195	5.195	5.024	5.048
				Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+	5.221	5.197	5.197	5.025	-
				Gal β 1 \rightarrow 6	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Man α	—	5.048	5.23	5.195	5.024	5.048
				Gal β 1 \rightarrow 6	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 5	Gal β 1 \rightarrow 6	Mannitol	+	5.048	5.232	5.197	5.025	-

O-結合型糖鎖の全体構造

これらの結果から 2 種の異なる培地で培養し産生されるガラクトマンナンの O-結合型糖鎖の構造を Fig. 1-4 に示す. P-GM から得た O-結合型糖鎖は直鎖状及び分岐状のものが 4 糖までしか存在していないのに対し, N-GM から得たものでは Galf 鎖が長く, 10 糖前後までのオリゴ糖の存在していることが明らかとなった.

A P-GM



B N-GM

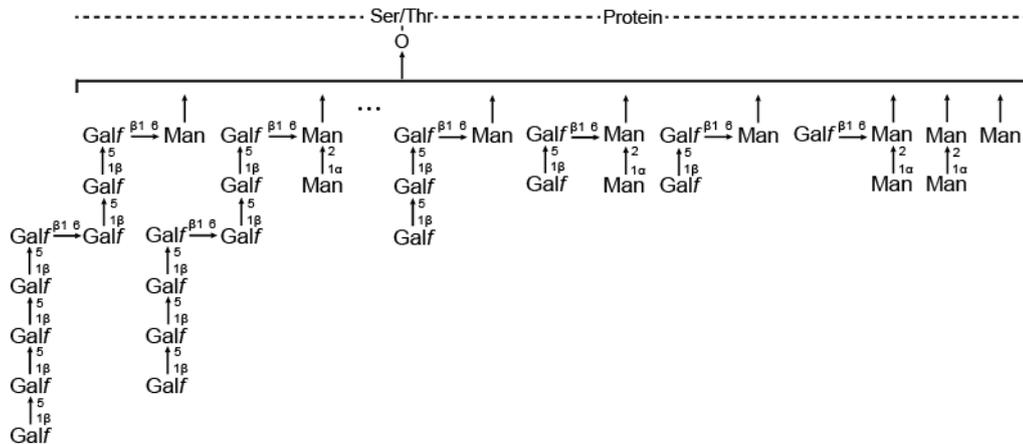


Fig. 1-4. Proposed structures for P-GM (A) and N-GM (B). Each of the structures is one of the possibilities out of the statistical ensemble. Man and Galf denote D-mannopyranose and D-galactofuranose residues, respectively. The side chain sequence is not specified.

第四節 考察

通常、O-結合型糖鎖の解析の際に β -elimination を行う場合には、 NaBH_4 下での還元を行いながらオリゴ糖を得る。これは、 β -elimination の際に遊離するオリゴ糖の還元末端が異性化もしくはピーリング反応を起こす恐れがあるためである。また還元末端を糖アルコール型とすることで異性体の存在がなくなるため、 $^1\text{H-NMR}$ シグナルが単純となり解析しやすいという利点もある。一方で、フェノール・硫酸法による発色の際に通常単糖として現れる糖が糖アルコールとなるため検出できないことや、メチル化分析を行った際に還元末端の糖のガスクロマトグラフのピークが糖アルコールの場合異なる位置に現れてしまい解析が複雑になる場合がある。そこで今回は還元条件下及び非還元条件下で β -elimination を行い、ガスクロマトグラフィーで retention time が同じになる 2 種類のオリゴ糖を区別し、それぞれメチル化分析、NMR 解析を行うことで詳細な解析を行った。

これまでも *A. fumigatus* の O-結合型糖鎖の構造は報告されているが⁵⁸⁾、今回同様の構造が確認できたのは 5 糖のみであり、新たに分岐状の $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Man}$ と直鎖状の $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 5\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}$ 及び長い Gal 鎖の中に β -1,6 結合を有している糖鎖の存在を明らかにした。特に mannose と Gal の分岐オリゴ糖は今まで報告されている O-結合型糖鎖の中でも珍しく、これまでの報告では *Fusarium* 属菌に関する報告⁵⁴⁾のみである。今回 *A. fumigatus* に新たな構造の O-結合型糖鎖を発見したが、*A. niger* では糖の種類や結合様式が異なる 5 種類の O-結合型糖鎖の存在が報告されているため⁷²⁾、菌種、菌株により存在するオリゴ糖の構造が僅かに異なっている可能性が考えられる。また O-結合型糖鎖の役割として細胞壁の形成や維持への関与が報告されているが^{54, 73)}、これらの構造の違いが与える影響については未解明であり今後の研究課題となっている。

本研究により培地成分の違いが、O-結合型糖鎖の Gal 鎖の長さに影響を及ぼすことが明らかとなった。 Gal 鎖の生合成に関与する遺伝子

としては、近年 galactofuranosyltransferase (GfsA) が報告されている⁷⁴⁾。今回解析した Galf 鎖は β -1,5 結合及び β -1,6 結合が共存した構造となっていたが、GfsA により合成される Galf 鎖の結合様式については未だ明らかとなっていない。*Mycobacterium tuberculosis* が有する UDP-galactofuranosyl transferase (UGT) は β -1,5 結合 Galf 及び β -1,6 結合 Galf 両転移酵素活性を有するため⁷⁵⁾、GfsA も同様の活性を有する可能性があり今後検討する必要がある。

Leitao ら⁵⁸⁾は *A. fumigatus* の O-結合型オリゴ糖に抗原活性があることを報告しているが、今回解析した構造にも Galf 鎖が存在していることから同様に抗原活性を有すると考えられる。しかし N-結合型ガラクトマンナンと比較すると糖鎖の長さが短いことから、O-結合型糖鎖は N-結合型ガラクトマンナンに覆われて存在している可能性があるがその立体的位置関係は未だ明らかになっていない。そのためアスペルギルス症の診断用モノクローナル抗体の O-結合型オリゴ糖との反応性の程度は不明であり、今後更なる解析が求められる。

第二章

異なる培地で培養した *Aspergillus fumigatus* の N-結合型ガラクトマンナンの構造解析

第一節 緒論

真菌類や細菌類は細胞壁を有しているが、特に酵母は細胞壁に特徴的な β -グルカンとマンナンの存在がよく知られている。その構造は属や種によって異なっており、当研究室では *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* などの細胞壁マンナン構造の解析が進められてきた^{68, 76-83)}。これらの構造は代表的な酵母である *S. cerevisiae* と同様の櫛型構造である。ヒトはこれらの糖鎖を有していないため、抗体を用いた感染症診断のための抗原として利用してきた。またグルカンに対しては β -1,3-グルカン合成酵素をターゲットとし、副作用の少ない薬が開発され用いられている。

一方で *A. fumigatus* のガラクトマンナンの構造はこれまでも解析されているが、部分的に異なった解析結果が報告されている⁸⁴⁻⁸⁸⁾。その原因として、解析に用いた菌種が異なることや、異なる培養条件で培養を行っていることが考えられる。Latgé ら⁸⁸⁾はガラクトマンナンの構造を α -1,2 結合の mannotetraose が α -1,6 結合で繋がった直鎖状の繰り返し構造をしているコアマンナンに、側鎖として 4-5 残基からなる β -1,5 結合 Galf オリゴ糖側鎖が mannose の C-3 位又は C-6 位に結合した構造であると報告している (Fig. 2-1)。一方 Van Bruggen-Van Der Lugt ら⁸⁹⁾はガラクトマンナンの構造の中に β -1,6 結合が存在していることを示しており、これは Latgé ら⁸⁸⁾の報告には含まれていない結合様式であった。Latgé ら⁸⁸⁾は *A. fumigatus* の培養の際に YPD 培地を用いていたが、Van Bruggen-Van Der Lugt ら⁸⁹⁾は YNB 培地を使用していた。YNB 培地は酵母や真菌を培養するための代表的な培地の 1 つであり、窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含み、pH は酵母や真菌の成長のため

第二節 実験材料及び実験方法

1. 使用菌株及び材料

Aspergillus fumigatus var. *fumigatus* NBRC 33022 及びマンナン構造の確認のために *Candida krusei* NBRC 1395 を用いた。菌株は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部より入手した。*C. albicans* のマンナンは教室の標品を用いた。

2. 菌の培養

A. fumigatus の培養は第一章に記載した方法と同一の方法で行った。*C. krusei* は YPD 培地 (0.5% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose) で 28°C, 2 日間振とう培養した。培地の pH は 0.1 M sodium citrate buffer を用いてそれぞれ pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 に調整した。

3. 培養濾液粗画分の調製

培養濾液粗画分の調製は第一章に記載した方法で行った。

4. ガラクトマンナンの分離

ガラクトマンナンの分離は第一章に記載した方法で行った。

pH の異なる培地での培養については、YPD 斜面寒天培地で培養した本菌を pH 調整済みの YNB 培地に接種し、28°C, 6 日間静置培養した。培養上清を 3 日間流水透析後、凍結乾燥によりガラクトマンナンを回収した。各 pH で培養して得られたガラクトマンナンをそれぞれ pH3-GM, pH4-GM, pH5-GM, pH6-GM と略す。

5. *C. krusei* マンナンの分離

菌体はろ紙を用いて分離した後、生理食塩水で洗浄し、acetone に沈積した。その後の粗抽出物の調製は熱水抽出法により行った⁹⁰⁾。即ち、acetone 脱脂菌体を精製水に懸濁し、121°C, 2 時間オートクレーブ中で熱水抽出した。冷後、3000 rpm, 10 分間遠心分離し、上清を 2-3 日流

水透析し，減圧濃縮後凍結乾燥を行った．

6. Cetavlon 法による粗マンナンの分離

Cetavlon 法による粗マンナンの分離は第一章に記載した方法で行った．

7. Galf 残基の選択的除去

試料 50 mg を取り，0.1 M HCl 5 mL を加え，100°C，1 時間加水分解を行った⁶⁷⁾．その後 1 M NaOH 1 mL で中和し，Bio-Gel P-2 column (2.5×100 cm) にかけて水溶出した．溶出液の糖含量をフェノール・硫酸法⁹¹⁾で測定後回収し，減圧濃縮して凍結乾燥した．

8. 分子量測定

各試料 5 mg を Sephacryl S-300 HR column (1.0 × 100 cm) にかけて 0.2 M NaCl で溶出し，溶出液の糖含量をフェノール・硫酸法⁷⁰⁾で発色した．基準物質として dextran standard 12000, 25000, 80000 (Fluka analytical, average mol. wt. 11600, 23800, 80900, *Leuconostoc mesenteroides* 由来) を用いた．

9. 糖組成分析

各試料 1 mg に 2 M TFA (TFA 450 μL 及び水 2.55 mL を混和して調製) を 3 mL 加え 110°C で 3 時間加水分解し，濃縮乾固した．その後 2-propanol を 2 mL 加え 40°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した．次に 1% NaBH₄ 1 mL を加え，一晩放置し還元した．その後 50 % acetic acid 数滴で中和し，濃縮乾固の後，methanol を 2 mL 加え 40°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した．更に acetic anhydride と pyridine の混合溶液 (1 : 1, v/v) 4 mL を 100°C で 3 時間反応させアセチル化を行った．その後濃縮乾固し，更に toluene を 2 mL 加え 50°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した．その後 chloroform 1 mL で抽出し，水で 3 回洗浄し濃縮乾固後，acetone 5 mL に溶解し GC/MS で解析した．GC/MS の条件は以下の通りである．

カラム名：DB-5

カラムサイズ：0.32 mm × 30 m

He ガス：20.4 mL/min

カラム充填剤：(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane

昇温プログラム：

100°C (10 min), 20°C/min (20 min) → 5°C/min (8 min) → 20°C/min (3 min)
→ 300°C

10. メチル化分析

メチル化分析は第一章に記載した方法で行った。

11. アセトリシス

試料 200 mg に acetic anhydride と pyridine の混合溶液 (1 : 1, v/v) 50 mL を加え溶液が透明となるまで攪拌した後 40°C で 12 時間インキュベートした。次にエバポレーターで徐々に温度を上げて濃縮し、最後に真空ポンプにより完全に溶媒を留去した。ここに得られたマンナンのアセチル化体について温和な条件でアセトリシスを行った。温和な条件は、acetic anhydride, acetic acid, sulfuric acid の組成を 100 : 100 : 1 (v/v/v) としたアセトリシス溶媒 100 mL に溶解し、40°C で正確に 36 時間反応を行った。これらの反応混合物を氷水で冷却し、pyridine 20 mL 添加で反応を停止させ、次いで溶液を濃縮し、chloroform 20 mL で抽出した。この chloroform 層を水で 3 回洗浄した後、sodium sulfate 1-2 g を加え脱水後濾過し濃縮乾固した。これを methanol 5 mL に溶解し、28% sodium methoxide/methanol 溶液を脱アセチル化体が析出するように 0.2-0.3 mL 加え、室温で 15 分間放置した。次に 50% acetic acid で中和後減圧濃縮した。前処理として陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120, H⁺型) 及び陰イオン交換樹脂 (Amberlite IR-410, OH⁻型) のカラムを通して脱塩を行い濃縮乾固した。この濃縮物を 2 mL の水に溶解し、Bio-Gel P-2 column (2.5×100 cm) にかけて水溶出した。溶出液の糖含量をフェノール・硫酸法⁷⁰⁾で測定後回収し、減圧濃縮して凍結乾燥した⁹⁰⁾。

12. Galf オリゴ糖の調製

試料 200 mg に 0.15 M TFA (TFA 80 μ L 及び水 6.92 mL を混和して調製) 7 mL を加え, 100°C, 15 分間加熱し加水分解を行った. その後濃縮乾固し, 更に methanol を 2 mL 加え 40°C で濃縮乾固を 3 回繰り返した. この濃縮物を 2 mL の精製水に溶解し, Bio-Gel P-2 column (2.5 \times 100 cm) にかけて水溶出した. 溶出液の糖含量をフェノール・硫酸法⁷⁰⁾で測定後それぞれを回収し, 減圧濃縮して凍結乾燥した.

13. 核磁気共鳴(NMR)スペクトル分析

NMR スペクトルの測定は日本電子核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-LA600) を用いて行った. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, TOCSY, NOESY, distortionless enhancement by polarization transfer 135 (DEPT-135), 2D heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (HSQC), 2D heteronuclear multiple bound coherence spectroscopy (HMBC), double quantum filtered-correlation spectroscopy (DQF-COSY)の測定は試料 70 mg を重水 (D₂O) 0.7 mL に溶解し, acetone を内部標準物質 (¹H-NMR は 2.225 ppm, ¹³C-NMR は 31.07 ppm)として 45°C で行った.

14. 糖量測定

糖量測定は第一章に記載した方法で行った.

15. β -1,5 結合ガラクトフラノシル基に対するモノクローナル抗体との反応性

各試料の抗体との反応性は Bio-Rad 製 Platelia *Aspergillus* EIA により測定を行った. すなわちマイクロプレートのウェルに酵素標識抗体 (抗ガラクトマンナンモノクローナル抗体) と抗原溶液を 50 μ L ずつ分注し, マイクロプレートを粘着フィルムでシールし, 37°C, 90 分反応させた. 洗浄液 (370 μ L 以上) で 5 回洗浄後, 基質発色液 200 μ L を添加し, 暗所で室温において 30 分反応させた. その後反応停止液 100 μ L を添加しよく混和後, TOSOH 製マイクロプレートリーダー (MPR-A4)

で 430 nm の吸光度を測定した。

16. 粗酵素(galactofuranosidase)画分の調製

YPD 培地及び YNB 培地で培養後ろ紙を用いて培養濾液と菌体を分離した。培養濾液を 30°C で減圧濃縮し、4 日間流水透析を行い、再度減圧濃縮し凍結乾燥を行ったものを粗酵素画分とした。

17. galactofuranosidase 活性の測定

各培地の粗酵素画分 5 mg と N-GM 5 mg を 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) 1 mL に溶解し、37°C で 24 時間反応させた。反応後、silicagel 60 F₂₅₄ TLC aluminium sheets にスポットし、展開溶媒として 1-butanol : ethanol : water (2/1/1)を用い 2 回展開させ、発色剤として *p*-anisaldehyde 溶液 (*p*-anisaldehyde : acetic acid : sulfuric acid : ethanol) (2.5/1/3.5/90) を噴霧後 80°C で 15 分加熱しスポットの確認を行った。

第三節 結果

ガラクトマンナンの構造解析

YPD 培地及び YNB 培地で増殖した菌体が培地中に産生した細胞壁多糖であるガラクトマンナン (P-GM 及び N-GM) 及び, これらの 0.1M HCl, 100°C, 1 時間処理で得られた多糖 (P-GMa) の構成糖分析の結果を Table 2-1 に示す. P-GM と N-GM を比較すると, P-GM では mannose 4 残基に対し galactose 1-2 残基の割合で存在するが, N-GM では mannose 4 残基に対し galactose 10 残基程度の割合で存在しており, N-GM の galactose の割合が非常に大きいことが明らかとなった. 一方部分酸加水分解後のガラクトマンナン(P-GMa 及び N-GMa) には galactose 及び glucose がほとんど含まれておらず, 部分酸加水分解により側鎖の Galf が除かれ, 主鎖のコアマンナンのみになっていることが明らかとなった.

Table 2-1. Carbohydrate composition of GMs (P-GM, N-GM and P-GMa) of *A. fumigatus*.

GM	Carbohydrate composition (%)		
	Mannose	Galactose	Glucose
P-GM	81.0	16.1	2.9
	(4.0) ^a	(0.8)	(0.1)
N-GM	27.5	71.9	0.6
	(4.0)	(10.4)	(0.1)
P-GMa	96.0	2.8	1.2
	(4.0)	(0.1)	(0.1)

^aRelative molar ratio

各多糖の分子量を Sephacryl S-300 HR カラムクロマトグラフィーにより測定したところ (Fig. 2-2E), P-GM は約 15 kDa であったが, N-GM は非常に大きく約 40 kDa であった. 一方 P-GMa 及び N-GMa は共に約 6 kDa と同程度であったことから, ガラクトマンナンの主鎖であるマンナン骨格の大きさに変化はないこと, また N-GM の Galf 鎖は P-GM と比較して大きくなっていることが明らかとなった.

これらの構造がどのように変化しているかを調べるために $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った (Fig. 2-2A, 2-2B). その結果, P-GM では 5.0-5.3 ppm の間に多くのシグナルが現れていたのに対し, N-GM では主に 5.233, 5.195, 5.024 ppm の 3 本のシグナルが現われ, 大きく異なっていた. そこで, それぞれのガラクトマンナンを酸処理し Galf を除いた多糖 (P-GMa 及び N-GMa) の $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ (Fig. 2-2C, 2-2D) 両者のシグナルに差は見られなかった. この結果及び P-GMa 及び N-GMa の分子量は同程度であったことから, 基本骨格のマンナン構造は同一であることが明らかとなった.

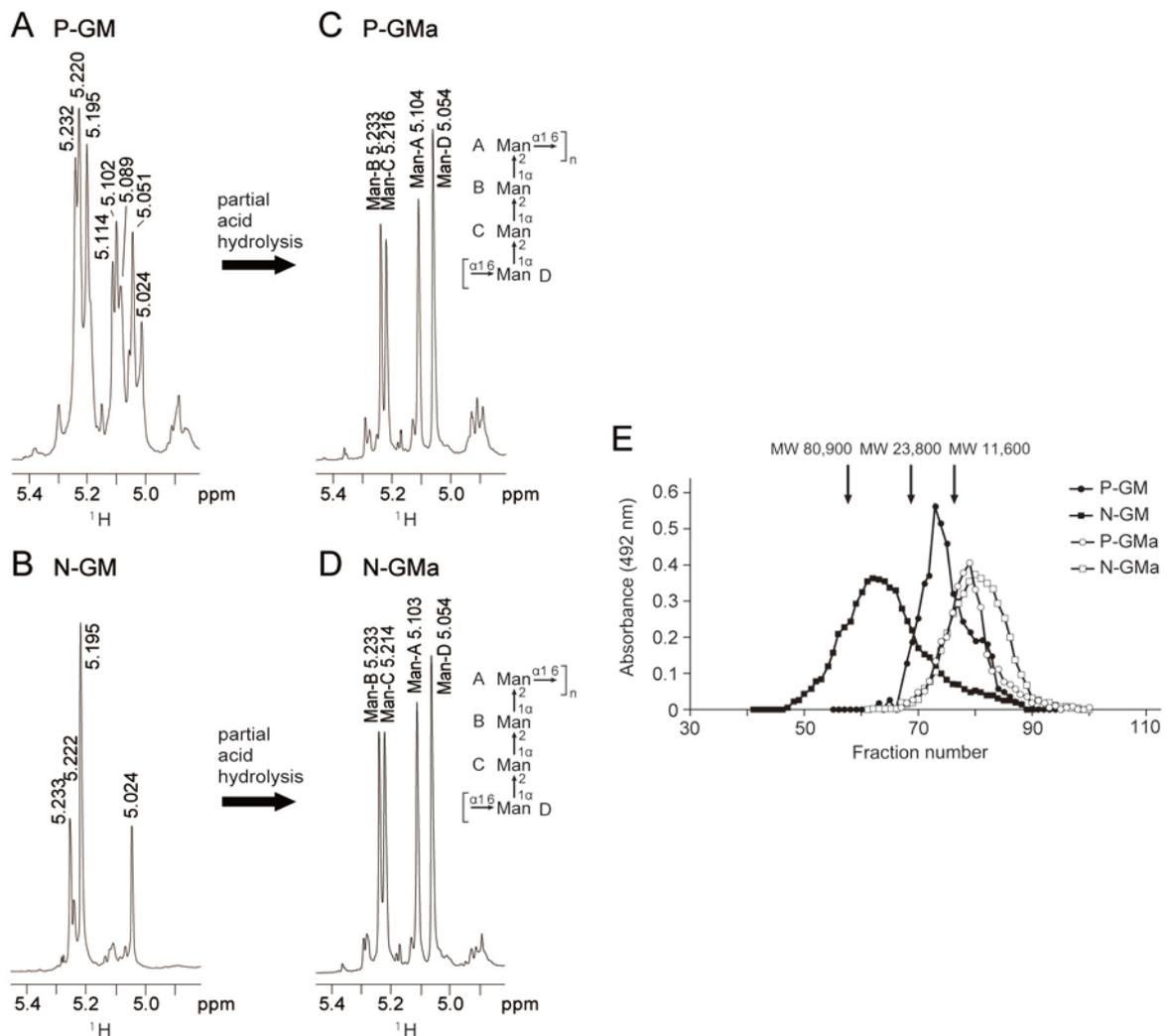


Fig. 2-2. ¹H NMR spectra and molecular mass of N-linked polysaccharides. P-GM (A) and N-GM (B) were treated with 0.1 M HCl to remove the Gal residues, yielding P-GMa (C) and N-GMa (D), respectively. (E) Estimation of the average molecular mass of galactomannans by Sephacryl S-300 column (1.0 × 100 cm) chromatography. Elution was performed with 0.2 M NaCl and the carbohydrate content was assayed by the phenol/sulfuric acid method. Arrows indicate the elution position of the dextran molecular mass standards. ●, P-GM; ■, N-GM; ○, P-GMa; □, N-GMa.

コアマンナン構造を確認するために、*A. fumigatus* のマンナン構造と同様の $^1\text{H-NMR}$ シグナルが得られる *C. krusei* マンナンを用いて温和な条件でのアセトリシスを行い、8糖を分離しその $^1\text{H-NMR}$ を測定した。Fig. 2-3 に示す二次元 NMR スペクトルで対角線の左半分は NOESY、右半分は TOCSY のクロスピークを示している。NOESY では2つの隣接する糖の H-1-H-2' や H-1-H-6' 間に見られる nuclear Overhauser effect (NOE) のクロスピークが現れており、一方 TOCSY からは各糖残基内の H-1-H-2 を含む環プロトンの Jカップリングに基づくクロスピークが現れている。この解析により、A2-A2'-B2-B2'-C2-C2'-D6-D6'-E2-E2'-F2-F2'-G2-G2'-H2 と連鎖帰属することができ、この8糖が α -1,2 結合の mannotetraose が α -1,6 結合で繋がった直鎖構造であることが確認できた。この結果からコアマンナンはパン酵母マンナン様の楕型構造とは異なり、これまでは多糖のまま解析され報告されていた α -1,2 結合 mannotetraose のタンデムリピート型直鎖構造が、オリゴ糖を直接解析することにより確認できた。

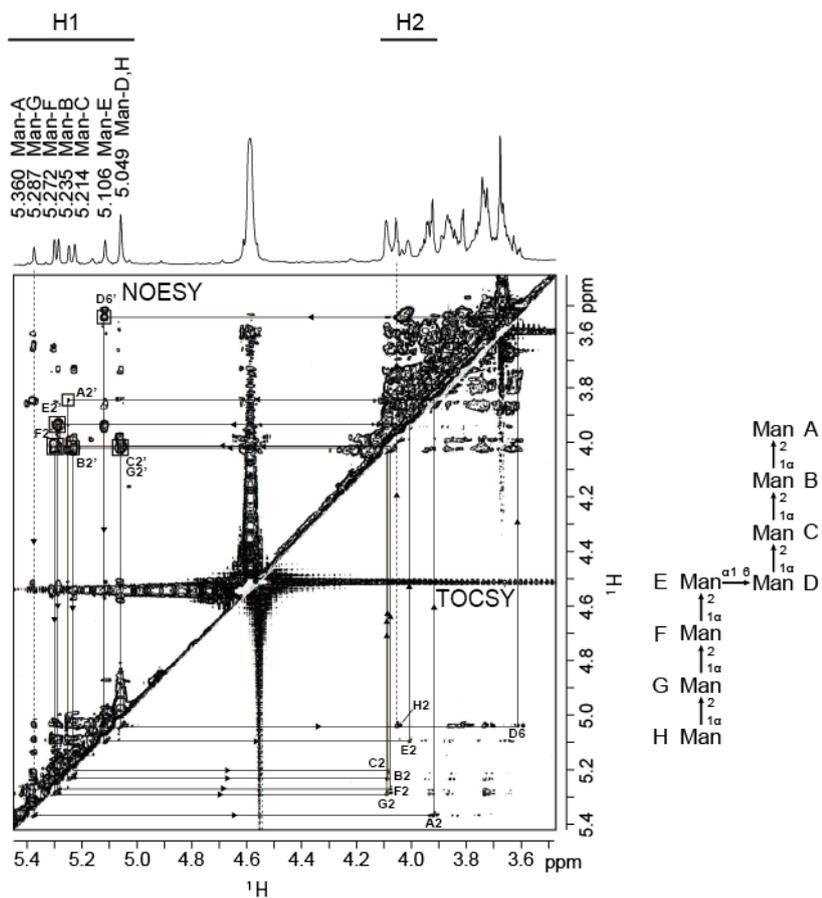


Fig. 2-3. H-1-H-2' sequential connectivity of sugar residues of mannooctaose obtained by mild acetolysis of *C. krusei* mannans. The right side of the diagonal shows TOCSY, and the left side of the diagonal shows NOESY. The primed letters indicate the inter-residue H-1-H-2' NOE cross-peaks, and the unprimed letters indicate the H-1-H-2 correlation cross-peaks due to J-coupling, respectively. The sequential assignment result indicates the tandem repeat structure of mannotetraose connected by β -1,6-linkage.

全体構造を推定するために P-GM, N-GM 及び P-GMa についてメチル化分析を行ったところ (Table 2-2), コアマンナンの結合様式としては non-reducing terminal mannopyranose (t-Man_p), 2-*O*-substituted mannopyranose (2-Man_p), 6-*O*-substituted mannopyranose (6-Man_p), 2,3-di-*O*-substituted mannopyranose (2,3-Man_p), 2,6-di-*O*-substituted mannopyranose (2,6-Man_p) が検出され, 一方 Gal_f の結合様式としては P-GM では non-reducing terminal galactofuranose (t-Gal_f), 5-*O*-substituted galactofuranose (5-Gal_f) が検出されたのに対し, N-GM では t-Gal_f, 5-Gal_f, 6-*O*-substituted galactofuranose (6-Gal_f) が検出された. この結果から N-GM には 1,6 結合で繋がる Gal_f が存在しており, 1,5 結合と 1,6 結合の比は 4 : 1 程度であることが明らかとなった. さらにコアマンナン 4 残基に対し N-GM では Gal_f が約 10 残基, P-GM ではコアマンナン 4 残基に Gal_f が約 1-2 残基存在していることが明らかとなった.

Table 2-2. Methylation GC-MS analysis of N-linked galactomannans of *A. fumigatus*

<i>O</i> -methylalditol acetate	Sugar linkage	Relative retention time ^a	Molar ratio ^b		
			P-GM	N-GM	P-GMa
2,3,4,6-Me ₄ -Man	t-Man _p	1.00	1.6	1.7	0.9
3,4,6-Me ₃ -Man	2-Man _p	1.08	4.3	2.8	2.3
2,3,4-Me ₃ -Man	6-Man _p	1.11	1.0	1.0	1.0
4,6-Me ₂ -Man	2,3-Man _p	1.16	0.1	0.4	0.2
3,4-Me ₂ -Man	2,6-Man _p	1.20	0.9	1.6	0.2
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	t-Gal _f	1.01	0.2	2.2	-
2,3,6-Me ₃ -Gal	5-Gal _f	1.09	0.6	7.9	-
2,3,5-Me ₃ -Gal	6-Gal _f	0.94 ^c +1.14	-	2.3	-

^aRetention time relative to that of 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylmannitol.

^bMolar ratio was calculated based on the 6-*O*-substituted mannose residue (6-Man_p) of the core mannan structure.

^c1,6-anhydro-2,3,5-tri-*O*-methyl galactofuranose + 1,4,6-tri-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl galactitol.

N-GM に含まれる 1,6 結合の存在は ^{13}C -NMR DEPT-135 (Fig. 2-4) から明らかとなった. すなわち P-GM の ^{13}C -NMR シグナル(63.60 ppm) は Galf が 1,5 結合のみであることを示しているのに対し, N-GM では 1,5 結合に加え 1,6 結合 Galf に特異的な 70.09 ppm のシグナルが現れた. 更に HMBC では Galf-G C6 の 70.09 ppm のシグナルと Galf-H H1 の 5.024 ppm のシグナルの相関クロスピーク (Fig. 2-4B) が現れており 1,6 結合の存在が確認された.

コアマンナンに直接結合する Galf の存在を確認するために P-GM を 0.15 M TFA で 100°C, 20 min の短時間加水分解を行い, P-GMb を得た. そこで NOESY を測定し糖残基間の連続的結合の解析を行った. H-1-H-2 を含む環プロトンの J カップリングに基づくクロスピーク (ボックスで囲んだクロスピーク) 及び H-1-H-2' の NOE に基づくクロスピークを利用して Fig. 2-5B に示す連鎖帰属を行い, Man-D に結合する Galf-E の存在が明らかとなった. これらの N-結合型ガラクトマンナンの $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト値を Table 2-3 に示した.

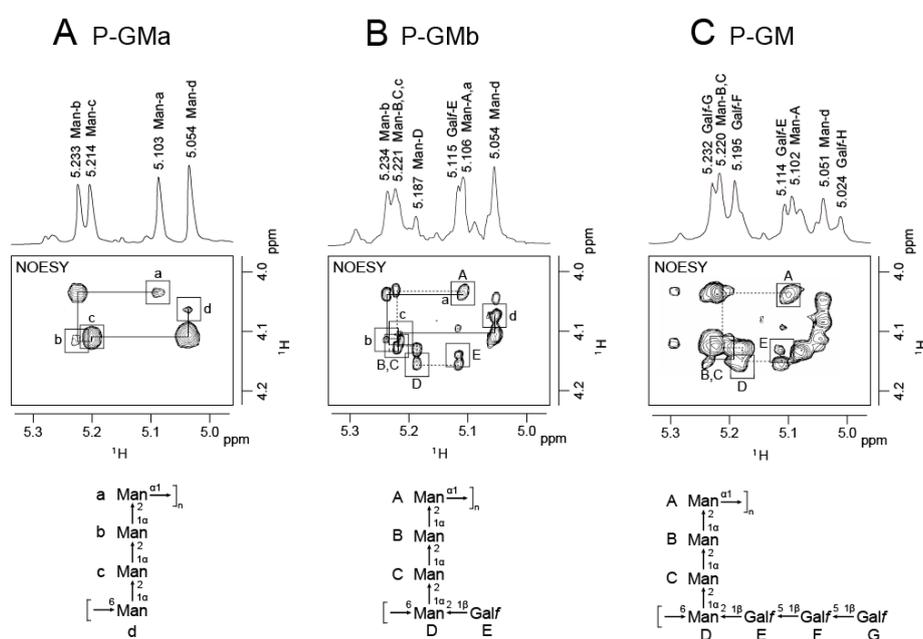


Fig. 2-5. H-1-H-2' sequential connectivity of sugar residues. NOESY spectra of P-GMa (A), P-GMb (B), and P-GM (C) are shown. The boxed cross-peaks in the spectra indicate the intra-residue H-1-H-2-correlation cross-peaks due to J-coupling, which was confirmed by DQF-COSY, and cross-peaks without box indicate the inter-residue H-1-H-2' NOE cross-peaks, respectively. This result indicates that Galf-E was connected to Man-D by α -1,2-linkage.

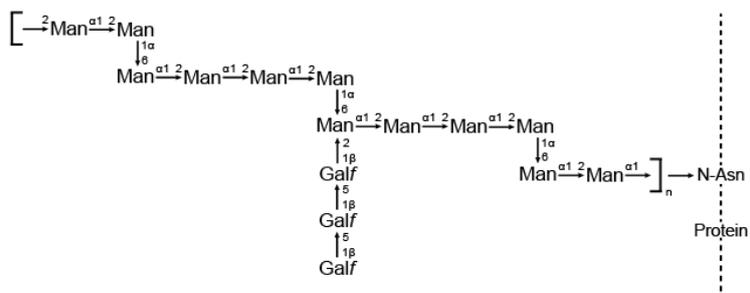
Table 2-3. NMR chemical shifts (δ) of galactomannans of *A. fumigatus*

Residue	δ (ppm)	
	H-1	C-1
$\rightarrow 5\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 5\mathbf{Gal}f\beta 1\rightarrow 5\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 5$	5.195	107.75 ~ 107.87
$\rightarrow 5\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 5\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 6\mathbf{Gal}f\beta 1\rightarrow 5$	5.232	107.75 ~ 107.87
$\rightarrow 5\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 5\mathbf{Gal}f\beta 1\rightarrow 6\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 5$	5.024	108.64 ~ 108.70
$\rightarrow 2(\mathbf{Gal}f\beta 1\rightarrow 6)\text{Man}p\alpha 1\rightarrow$	5.114	106.69
$\rightarrow 6\mathbf{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 6$	5.051	103.01
$\rightarrow 6\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\mathbf{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 6$	5.22	101.44
$\rightarrow 6\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\mathbf{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 6$	5.22	101.44
$\rightarrow 6\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}p\alpha 1\rightarrow 2\mathbf{Man}p\alpha 1\rightarrow 6$	5.102	99.22
$\rightarrow 2(\text{Gal}f\beta 1\rightarrow 6)\mathbf{Man}p\alpha 1\rightarrow$	5.187	100.26

N-結合型ガラクトマンナンの全体構造

以上の結果を総合すると、ガラクトマンナンの全体構造は Fig. 2-6 のように表すことができる。異なる培地で培養した場合のガラクトマンナンの構造は、両ガラクトマンナン間でコアマンナン部分は変わらず α -1,2 結合 mannotetraose が α -1,6 結合で直鎖状に繋がっており、P-GM は側鎖の Galf 鎖が短く β -1,5 結合で繋がる Galf が 3 残基程度存在するのに対し、N-GM は Galf 鎖が長く β -1,5 結合及び β -1,6 結合で繋がる Galf 鎖が 10 残基程度存在することが明らかとなった。

A P-GM



B N-GM

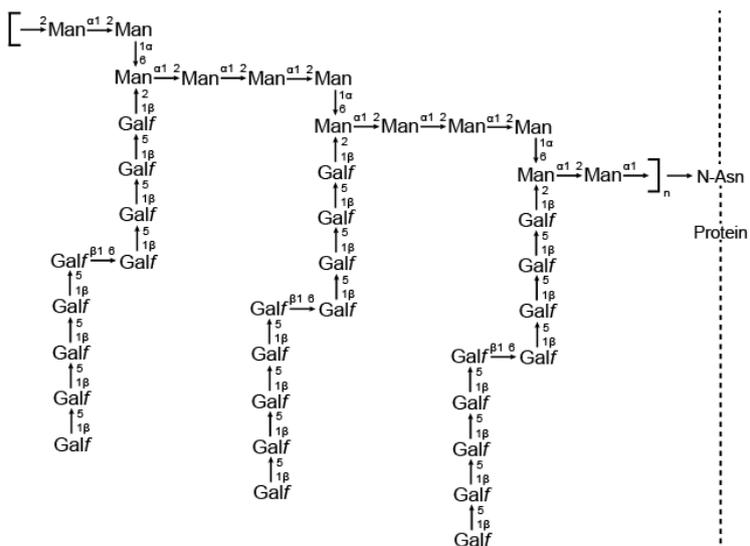


Fig. 2-6. Proposed structures for P-GM (A) and N-GM (B). Each of the structures is one of the possibilities out of the statistical ensemble. Man and Gal denote D-mannopyranose and D-galactofuranose residues, respectively. The side chain sequence is not specified.

β-1,5 結合ガラクトフラノシル基に対するモノクローナル抗体との反応性

これらの構造の違いが抗体との反応性にどのような影響をもたらすかを検討するために、β-1,5 結合 Galf オリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体との反応性を検討した (Fig. 2-7). その結果、P-GM では全く反応を示さなかったものの、N-GM は非常に高い反応性を示した. また、*A. fumigatus* のコアマンナンと同じ構造である *C. krusei* マンナン、櫛型構造のマンナンからなる *C. albicans* マンナンは反応性を全く示さなかった. このことからこのモノクローナル抗体がマンナン構造は認識せず Galf のみを認識していること、P-GM には短いオリゴ Galf 側鎖が存在し、N-GM にはこの抗体と強く反応する長いオリゴ Galf 側鎖の存在していることが確認できた.

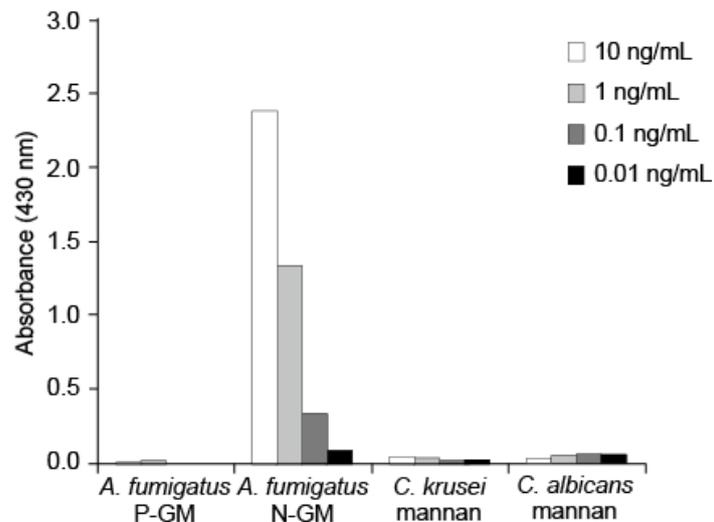


Fig. 2-7. Reactivity of several fungal polysaccharides to anti-β-1,5-linked Galf mAb. The assay was performed using the sandwich EIA system of Platelia *Aspergillus* EIA.

Galactofuranosidase による Galf 鎖の分解

構造の違いの原因について，培養上清中に菌体が産生している酵素により Galf 鎖が切断されている可能性を考え，galactofuranosidase に着目し各培地から得た粗酵素画分と N-GM を反応させ遊離する galactose の量を解析した．その結果，Fig. 2-8 に示すように YPD の培養上清を粗酵素画分として用いた処理では galactose が多く遊離して来たのに対し，YNB の培養上清を用いた処理では全く遊離が認められなかった．基質としてのガラクトマンナンを加えない培養上清単独の反応では galactose の遊離は認められないことから，YPD 培地では galactofuranosidase が培養上清中に多く遊離されるが YNB 培地では全く遊離されていないことが明らかとなった．更に，N-GM を galactofuranosidase で分解した際に galactose だけではなく galacto-oligosaccharide の遊離も認められることから，この粗酵素画分には endo-galactofuranosidase が含まれている可能性を示している．

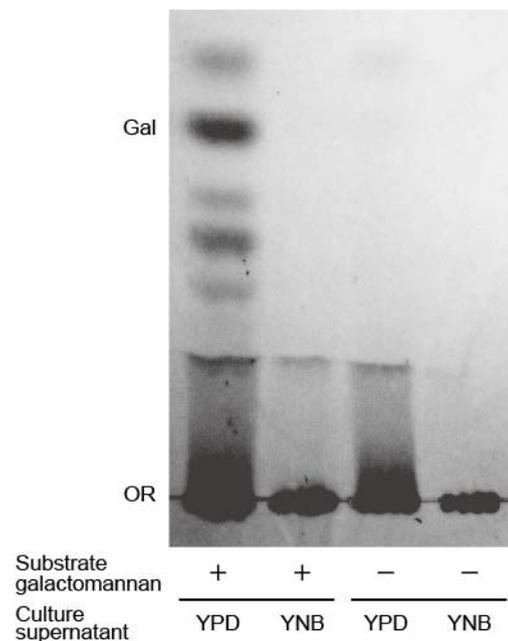


Fig. 2-8. TLC of the reaction products of galactomannans treated with culture supernatants. Substrate galactomannan (N-GM) was treated with supernatant of *A. fumigatus* cultured in YPD or YNB medium. The carbohydrates on the plate were detected with anisaldehyde reagent. The positions of the TLC origin (OR) and galactose (Gal) are indicated.

培地 pH のガラクトマンナンの構造への影響

これらのガラクトマンナンの構造の違いは、何らかの培養条件が影響していると考えられる。そこで、YNB 培地に各種の栄養成分を加え培養を行い、産生されるガラクトマンナンの $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った。その結果、各種の糖やアミノ酸の添加では変化が見られなかったのに対し、0.1 M sodium citrate buffer で培地の pH を調節した際には H-1 シグナルの大きな変化が認められた (Fig. 2-9)。特に β -1,5 結合 Galf に対応する 5.195 ppm のシグナルが pH3-GM では大きいのに対し、pH4-GM, pH5-GM, pH6-GM になるにつれて小さくなっていることから、pH に依存して Galf の量が少なくなっていることが示唆された。

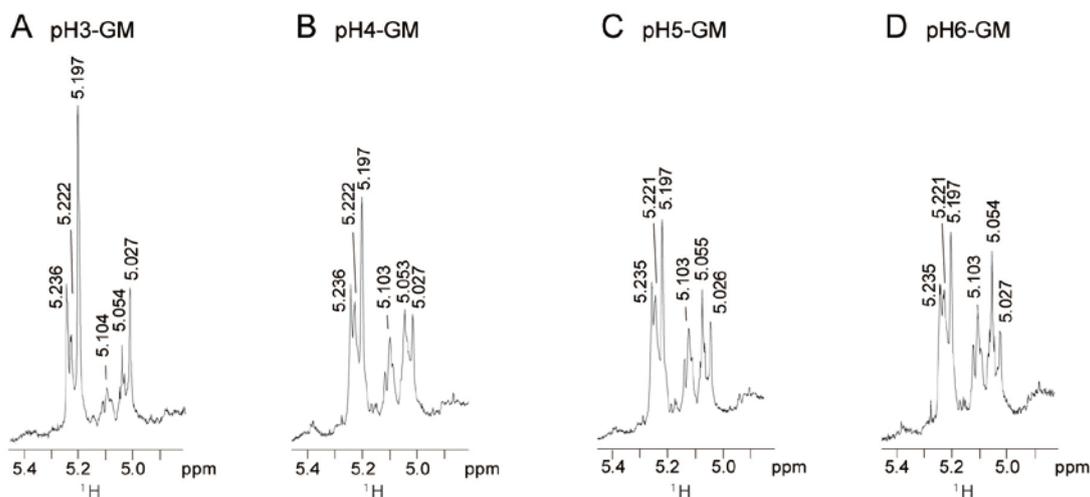


Fig. 2-9. ^1H NMR spectra and molecular mass of N-linked galactomannans (pH3-GM, pH4-GM, pH5-GM, pH6-GM) of *A. fumigatus*.

この pH の変化による構造の違いを詳細に明らかにするために、糖組成分析及びメチル化分析を行い、各糖鎖の存在について検討した。その結果、pH3-GM では $^1\text{H-NMR}$ のシグナルの変化と相関して 1,5 結合 Galf の量が多く、pH4-GM, pH5-GM, pH6-GM になるにつれて 1,5 結合 Galf の量が少なくなっていることが明らかとなった (Table 2-3, 2-4)。

Table 2-3. Carbohydrate composition of N-linked galactomannans (pH3-GM, pH4-GM, pH5-GM, pH6-GM, P-GM, N-GM) of *A. fumigatus*.

	Molar ratio ^a		
	Mannose	Galactose	Glucose
pH3-GM	1.0	1.1	0.7
pH4-GM	1.0	0.6	0.2
pH5-GM	1.0	0.5	0.1
pH6-GM	1.0	0.4	0.2
P-GM	1.0	0.2	0.0
N-GM	1.0	2.6	0.0

^aMolar ratio was calculated based on the mannose.

Table 2-4. Methylation GC-MS analysis of N-linked galactomannans of *A. fumigatus*

<i>O</i> -methylalditol acetate	Sugar linkage	Relative retention time ^a	Molar ratio ^b					
			pH3-GM	pH4-GM	pH5-GM	pH6-GM	P-GM	N-GM
2,3,4,6-Me ₄ -Man	t-Man _p	1.00	1.9	2.1	1.4	1.6	1.6	1.7
3,4,6-Me ₃ -Man	2-Man _p	1.08	2.7	3.5	3.8	4.0	4.3	2.8
2,3,4-Me ₃ -Man	6-Man _p	1.11	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3,4-Me ₂ -Man	2,6-Man _p	1.20	1.5	1.3	1.4	1.2	0.9	1.6
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	t-Galf	1.01	1.0	0.8	0.8	0.8	0.2	2.2
2,3,6-Me ₃ -Gal	5-Galf	1.09	4.6	2.2	1.7	1.8	0.6	7.9

^aRetention time relative to that of 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylmannitol.

^bMolar ratio was calculated based on the 6-*O*-substituted mannose residue (6-Man_p) of the core mannan structure.

第四節 考察

今回我々は、真菌の培養に一般的に用いられている YPD 培地と、*C. albicans* で大きく構造の変化することが報告されている YNB 培地⁶⁴⁾を用いて培養を行い、それぞれの N-結合型ガラクトマンナンを分離し詳細に構造の変化を解析した。その結果、両 N-結合型ガラクトマンナンの構造は大きく異なり、P-GM は Galf が β -1,5 結合で 3 残基程度繋がる短鎖であり、N-GM は β -1,5 結合及び β -1,6 結合で 10 残基程度繋がる長鎖が側鎖として存在しており、両者のコアマンナン部分の構造及び大きさは同一であることが明らかとなった。YNB 培地を用いて培養して得たガラクトマンナンに β -1,6 結合 Galf が含まれることはこれまでも報告されているが⁸⁹⁾、今回我々は β -1,5 結合から成る側鎖の中に僅かに β -1,6 結合が存在していることや培地成分の変化により Galf の長さが大きく変化することを明らかにした。また、Galf が β -1,5 結合及び β -1,6 結合で繋がる類似構造の Galf 鎖を持つ菌として *Neosartorya stramentia* のガラクタンがあるが⁹²⁾、その ¹H-NMR のシグナルが今回得た N-GM と同様であったことから Galf β 1 \rightarrow 5Gal β 1 \rightarrow 6Gal β 1 の結合様式の存在することが確認された。

これまでに様々なマンナンの構造解析が行われてきたが櫛型に分岐する構造のマンナンが主であり、直鎖状のマンナンの構造解析例は少ない。 α -1,2 結合で繋がる mannotetraose が α -1,6 結合で直鎖状に繋がる多糖では中間の α -1,2 結合 mannose 残基の H-1 シグナルは 5.214 及び 5.233 ppm に現れるが、この断片化により得られた 8 糖の場合還元末端側 mannotetraose に存在する中間の α -1,2 結合 mannose 残基の H-1 シグナルは 5.214 及び 5.235 ppm と多糖と変わらないものの、非還元末端側 mannotetraose に存在する中間の α -1,2 結合 mannose 残基の H-1 シグナルは 5.272 及び 5.287 ppm に現れていた。これは非還元末端側 mannotetraose が α -1,6 結合 mannose による立体的な影響を受けていないことを示している。

Galf 残基と mannose 残基との結合については、P-GM の短時間加水

分解処理を行い約 1 残基の Galf を有する P-GMb を得て、TOCSY 及び NOESY を利用し Galf 残基が α -1,2 結合で mannose 残基に結合していることを明らかにした。また、Galf と methyl α -D-mannopyranoside が結合した場合の ^{13}C -NMR シグナルは既に解析されており⁹³⁾、Gal β 1 \rightarrow 3Man α 1-Me は 106.5 ppm, Gal β 1 \rightarrow 2Man α 1-Me は 107.6 ppm, Gal β 1 \rightarrow 6Man α 1-Me は 109.5 ppm と報告されている。この結果は Galf と mannose の結合様式が 1,2 結合であることを支持している。

今回 β -1,5 結合 Galf 及び β -1,5 結合と β -1,6 結合 Galf が混在している糖鎖の ^1H -NMR シグナルについて、結合様式の違いで大きくシグナルがシフトすることを明らかにしたが、メチル化分析を行った際にも特徴的な違いが現れた。 β -1,6 結合 Galf のメチル化分析は、通常の 1,4,6-tri-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-galactitol だけでなく 1,6-anhydro-2,3,5-tri-*O*-methylgalactofuranose の検出されることが報告されている⁹⁴⁾。しかし、 β -1,5 結合 Galf をメチル化した際にも同様の誘導体が検出される場合があった。これは Galf の 5 員環という不安定な構造が部分メチル化体の加水分解過程で anhydro 体を作り出すものと考えられる。

ガラクトマンナンのメチル化分析でもう 1 つ問題となるのは、マンナンの非還元末端 mannose の検出割合が多くなることである。これまでの報告でもガラクトマンナンのメチル化分析を行ったところ非還元末端 mannose の量に差があり、Latgé ら⁸⁸⁾はガラクトマンナンを細胞壁から抽出した場合と上清に遊離した細胞外ガラクトマンナンを回収した場合で酵母様の分岐マンナン量が異なると考察している。しかし、今回静置培養した際の培養上清及び菌体からガラクトマンナンを分離し解析を行ったところ、両者とも比較的多くの分岐鎖マンナン由来と考えられる非還元末端 mannose 残基が存在していたが、振とう培養上清から得たガラクトマンナンでは少なかった。この結果は静置培養で産生される孢子と振とう培養で産生される菌糸などの形態の違いにより、分岐鎖マンナンの存在割合が異なる可能性を示している。

ガラクトマンナンに対するモノクローナル抗体を用いた ELISA の結果、P-GM と N-GM に大きな違いが認められた。このモノクローナル

抗体は 4 残基以上の β -1,5 結合 Galf 鎖に対する反応性が高いため²⁷⁾, N-GM の長い Galf と強く結合するものの P-GM の短い Galf 鎖との反応性が弱いことで, 大きな違いが現れたものと考えられる. この抗体は β -1,6 結合 Galf に対する反応性は低いことから⁸⁴⁾, N-GM の Galf 鎖には β -1,5 結合 Galf 鎖が 4 残基以上連続して結合していると考えられる. しかし, 詳細な Galf 鎖の β -1,5 結合と β -1,6 結合の割合についてはメチル化分析以外では確認が取れていない. 緩和アセトリシスはマンナンにおいて α -1,6 結合を選択的に切断する方法として知られているが, Galf においては 1,5 結合も 1,6 結合と同時に分解されてしまい選択的に切断することができなかつた. この点を解決するには, より緩和なアセトリシス条件を決定し β -1,6 結合 Galf のみを切断できる方法の開発や, end- β -1,6-galactofuranosidase の探索, 分離が必要である.

Galactofuranosidase は Galf 鎖を切断する酵素として 1997 年に発見され⁹⁵⁾その後も真菌では *Aspergillus* 属菌⁹⁶⁾や *Penicillium* 属菌⁹⁷⁾などで存在が報告されている. またその性質について研究されてきており, これまでに 4-aminophenyl thioglycoside⁹⁸⁾や D-galactono-1,4-lactone^{96, 99)}が阻害剤になることや, Galf 残基の 3 位の水酸基が酵素の認識に必要であることが報告されている¹⁰⁰⁾.

Preston ら¹⁰¹⁾は *Penicillium charlesii* の培養上清から得られた Galf 残基を含む多糖の galactose 量や分子量が分取法により変化することを見出し, 後の galactofuranosidase の発見に繋がったが, *Aspergillus* 属菌では遊離するガラクトマンナンの構造と galactofuranosidase の関連性についての報告はなかつた. 培地の違いによる酵素産生量の変化についてはこれまでに chitinase¹⁰²⁾, cellulase¹⁰³⁾, mannanase¹⁰⁴⁾, glucosidase¹⁰⁵⁾等で解析されているが, その原因はそれぞれ異なつた炭素源及び窒素源であり各酵素の合成の際に要求される栄養成分は異なっていると考えられる. また, galactofuranosidase の役割はこれまで *Penicillium* 属菌で検討されており, 栄養成分が無くなつた場合に上清中に存在するペプチドホスホガラクトマンナンを分解し galactose を遊離させ, 栄養源として利用していると考えられている⁹⁵⁾. そのため,

galactofuranosidase の遊離は培地中の栄養条件も影響している可能性があり、今後検討する必要がある。

培養条件によって異なる構造のガラクトマンナンが得られる原因を検討するために培地の pH を変えて培養したところ、Gal_f 側鎖の長さが変化することが明らかとなった。炭素源である glucose と galactose の違いや各種のアミノ酸の添加でも構造に変化は認められなかったことから、pH が Gal_f 鎖に何らかの影響を与えていると考えられる。pH に関するこれまでの報告として、液胞の H⁺-ATPase が細胞壁の生合成に関与しているという報告はあるが¹⁰⁶⁾細胞外の pH に関する論文は存在せず、pH の違いが構造の変化を引き起こす機構は未だ不明である。一方で pH が 6.0 と高い状態で培養して得られたガラクトマンナンの Gal_f 鎖は短鎖になっていたが、同じく pH が約 6 である P-GM と比較した場合 Gal_f 鎖は P-GM の方がさらに短いことから、pH 以外にも Gal_f 鎖が短くなる原因があると考えられる。例えばペプトンを加えて培養を行った場合に Gal_f 鎖が短くなるデータが得られており、何らかのタンパク質成分の関与も考えられるがこれらの関与と機構の解析は今後の課題である。また今回の実験では pH が高い場合 Gal_f 鎖が短くなっていたが、体内の pH は 7.4 であることから血中に遊離されるガラクトマンナンは *in vitro* で培養して得られた構造よりも短い Gal_f 鎖を有している可能性がある。

第三章

Aspergillus niger 及び *Aspergillus terreus* の N-結合型ガラクトマンナンの構造解析

第一節

アスペルギルス症を引き起こす原因真菌のうち最も多いのは *A. fumigatus* であり，次いで *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* が原因真菌となることが報告されている¹⁰⁷⁾。しかし近年これらの non-*fumigatus Aspergillus* によるアスペルギルス症の報告が増加しており，重症化する症例も見られていることから注意が必要と指摘されている^{23, 108-110)}。これまでに *A. terreus* ではアムホテリシン B に対して耐性を有していること，*A. niger* ではアゾール耐性株の存在が報告されていることや^{111, 112)}，non-*fumigatus Aspergillus* 感染症の発症要因として好中球減少症患者で多くなるという報告がある¹¹³⁾。

これらの non-*fumigatus Aspergillus* に対する研究はこれまでも行われており，*A. terreus* は孢子に *A. fumigatus* と共通の phialidic conidia (PC)の他に，特徴的な accessory conidia (AC)を有していることが明らかとなっている¹¹²⁾。この PC と AC では β -1,3 グルカンの局在が異なることは報告されているが，その役割については不明な点が多い¹¹⁴⁾。また *A. niger* は感染時に他のアスペルギルス感染症の際には認められないシュウ酸カルシウムの析出が特徴的であると報告されている¹¹⁵⁾。一方で *Aspergillus* 属菌の細胞壁に存在するガラクトマンナンについては，*A. niger* は直鎖の α -1,6 結合で繋がる mannotetraose に Galf と Galp が結合している構造であること¹¹⁶⁾や海洋由来の *A. terreus* は主に α -1,2 結合で繋がるマンナンの中に一部 α -1,6 結合が存在し，枝分かれで Galf も存在しているという報告がある¹¹⁷⁾。また各種 *Aspergillus* 属菌の細胞壁多糖に galactose 残基が存在するという報告はあるが¹¹⁸⁾，病原性の non-*fumigatus Aspergillus* のガラクトマンナンの詳細な構造については未だ明らかにされていない。また *A. fumigatus* は Galf を有するが，

A. niger は Galp を有するという報告があり，構造の再確認が必要とされていた．

ガラクトマンナンはヒトには存在しないため，アスペルギルス症の診断として血中に存在するガラクトマンナン抗原の量をモノクローナル抗体を用いて特異的に検出するという方法が開発されている．これは迅速診断ができるため有用な検査法の1つとして使われているが，偽陽性や偽陰性の報告^{119, 120)}があることから特異性を上げることが求められている．また，このモノクローナル抗体は *Aspergillus* 属菌を認識できるものだが¹²¹⁾，菌種により検出率に差があるという報告がある¹²²⁾．その結果は Galf 残基の量に依存すると考えられているが，各 *Aspergillus* 属菌の詳細な構造解析は未だ行われていない．そこで本章では，*A. niger* 及び *A. terreus* のガラクトマンナンについて検出の精度と感度を改善するための知見を得る目的でこれらの構造解析を行い，菌種による構造の違いについて検討を行った．

第二節 実験材料及び実験方法

1. 使用菌株及び材料

Aspergillus niger NBRC 33023 及び *Aspergillus terreus* var. *terreus* NBRC 33026 を用いた。菌体は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部より入手した。*Malassezia furfur* 及び *Trichophyton rubrum* のガラクトマンナンは教室の標品を用いた。

2. 菌の培養

菌の培養は第一章に記載した方法で行った。

3. 培養濾液粗画分の調製

培養濾液粗画分の調製は第一章に記載した方法で行った。

4. ガラクトマンナンの分離

ガラクトマンナンの分離は第一章に記載した方法で行った。*A. niger* 及び *A. terreus* から得られたガラクトマンナンを以下それぞれ AN-GM 及び AT-GM と略す。

5. 部分酸加水分解による Galf 残基の除去

部分酸加水分解による Galf 残基の除去は第二章に記載した方法で行った。

6. メチル化分析

メチル化分析は第一章に記載した方法で行った。

7. 核磁気共鳴(NMR)スペクトル分析

核磁気共鳴(NMR)スペクトル分析は第二章に記載した方法で行った。

8. 糖量測定

糖量測定は第一章に記載した方法で行った.

9. β -1,5 結合ガラクトフラノシル基に対するモノクローナル抗体との反応性

β -1,5 結合ガラクトフラノシル基に対するモノクローナル抗体との反応性は第二章に記載した方法で行った.

10. 部分酸加水分解による *Galf* オリゴ糖の調製

ガラクトマンナン 1 mg を 1 M HCl 1 mL に溶解し, 100°C, 7 分間加水分解を行った. 次に, エバポレーターにて濃縮乾固し, ANTS ラベル化用の試料とした.

11. ANTS ラベル化オリゴ糖を用いた蛍光標識電気泳動

部分酸加水分解後のガラクトマンナンの糖量を 5 μ g となるように調製し, 凍結乾燥させた. その後, 5 μ L の ANTS 溶液(酢酸/水, 3:17, v/v, に disodium 8-amino-1,3,6-naphthalenetrisulfonate hydrate (ANTS)を溶解したもの) 及び, 5 μ L の 0.1 M NaCNBH₃/DMSO 溶液を加え, 10,000 $\times g$ で 30 秒遠心し, 37°C, 15 時間インキュベートさせ, 反応後 loading buffer (20% glycerol 及び少量の phenol red を含む 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) 5 μ L を加え, ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った. なお, ポリアクリルアミドゲルは, 濃縮ゲル 8%, 分離ゲル 35%, 厚さ 0.75 mm で作製し, 泳動 buffer (19.2 mM glycine を含む 2.5 mM Tris, pH 8.3) を用いて, 100 V, 120 分間泳動後, 200 V, 180 分間, 300 V, 90 分間泳動した⁹¹⁾.

第三節 結果

A. niger と *A. terreus* を YNB 培地で培養し得られたガラクトマンナン (AN-GM, AT-GM) の糖組成分析の結果を Table 3-1 に示す. その結果 mannose と galactose の割合は, AN-GM は 1.0 : 0.18, AT-GM は 1.0 : 3.3 であった. すなわち AT-GM は AN-GM と比較し galactose 含有割合の大きいことが明らかとなった.

Table 3-1. Carbohydrate composition of GMs of *A. niger* and *A. terreus*.

GM	Carbohydrate composition (%)		
	Mannose	Galactose	Glucose
AN-GM	82.6	14.5	3.0
	(1.0)*	(0.18)	(-)
AT-GM	21.9	73.1	5.0
	(1.0)	(3.3)	(-)

* Relative molar ratio

続いて AN-GM, AT-GM の結合様式を推定するためにメチル化分析を行った (Table 3-2). その結果, mannose 残基は non-reducing terminal mannopyranose (t-Manp), 2-O-substituted mannopyranose (2-Manp), 6-O-substituted mannopyranose (6-Manp), 2,3-di-O-substituted mannopyranose (2,3-Manp), 2,6-di-O-substituted mannopyranose (2,6-Manp) が検出され, 一方 Galf 残基は non-reducing terminal galactofuranose (t-Galf), 5-O-substituted galactofuranose (5-Galf) が検出された. すなわちガラクトマンナンの構成糖としては *A. fumigatus* と同様であるが 6-O-substituted galactofuranose (6-Galf) は検出されなかった. またそれぞれの構成割合が異なっており, AN-GM では t-Galf と 5-Galf の割合は僅かであったのに対し, AT-GM では 5-Galf の割合が非常に大きいことが明らかとなった.

Table 3-2. GC-MS analysis of *O*-methylalditol acetates derived from methylation analysis of GMs of *A. niger* and *A. terreus*

<i>O</i> -methylalditol acetate	Sugar linkage	Relative retention time ^a	Molar ratio ^b	
			AN-GM	AT-GM
2,3,4,6-Me ₄ -Man	t-Man _p	1.00	2.3	1.3
3,4,6-Me ₃ -Man	2-Man _p	1.08	3.4	2.9
2,3,4-Me ₃ -Man	6-Man _p	1.11	1.0	1.0
3,4-Me ₂ -Man	2,6-Man _p	1.20	0.7	1.0
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	t-Gal _f	1.01	1.1	4.0
2,3,6-Me ₃ -Gal	5-Gal _f	1.09	1.0	17.8

^aRetention time relative to that of 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl mannitol.

^bMolar ratio was calculated based on the 6-*O*-substituted mannose residue (6-Man_p) of the core mannan structure.

これらの全体構造を推定するために、¹H-NMR 解析を行った結果 (Fig. 3-1A, 3-1B), AN-GM と AT-GM はシグナルが大きく異なっていた。すなわち AT-GM では 5.192 ppm のシグナルが強く現れていたのに対し、AN-GM では主に 5.212, 5.065 及び 5.054 ppm のシグナルが強くなっているが、これらに加えて 5.231, 5.195, 5.106 及び 5.082 ppm のシグナルも認められた。続いて、コアマンナン部分の構造を推定するために、それぞれのガラクトマンナンを 0.1 M HCl で酸処理し Gal_fを除いた多糖 (AN-GMa 及び AT-GMa) の ¹H-NMR 解析を行った (Fig. 3-1C, 3-1D)。その結果、両者のシグナルは同じであり、*A. fumigatus* のシグナルと同一であるということが明らかとなった。すなわちこのマンナンは α-1,2 結合 mannotetraose が α-1,6 結合で直鎖状に繋がっている構造であることが明らかとなった。

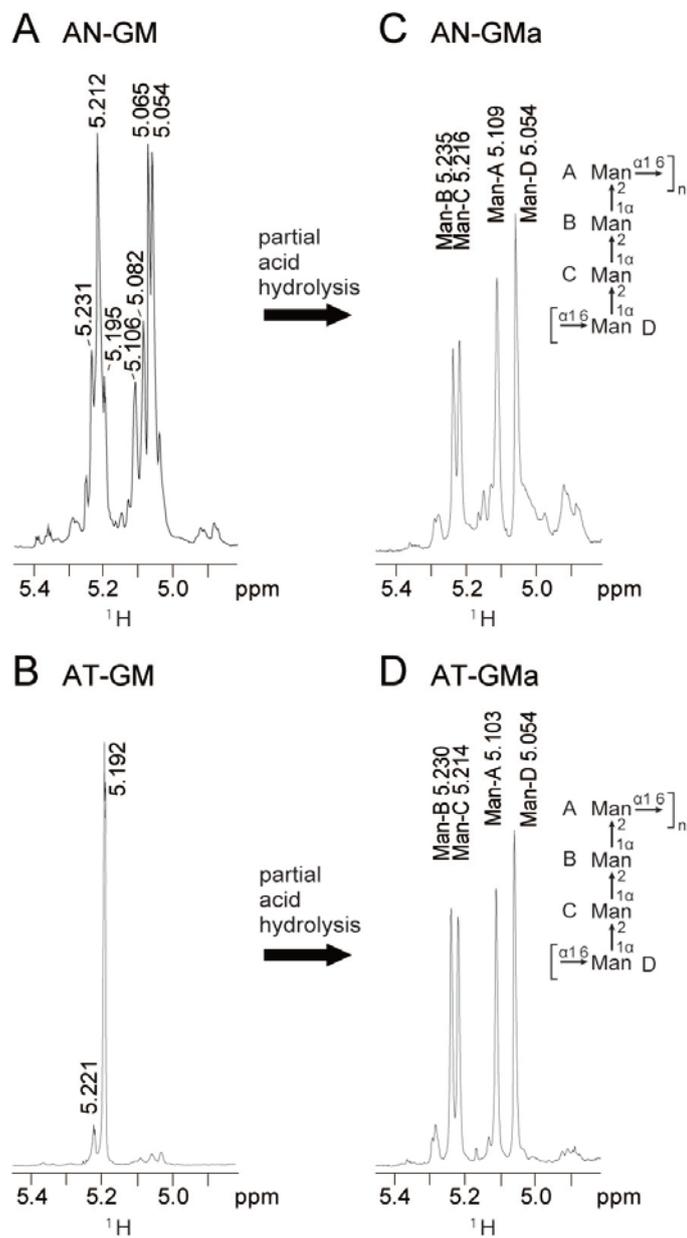


Fig. 3-1. ^1H NMR spectra of N-linked polysaccharides. AN-GM (A) and AT-GM (B) were treated with 0.1 M HCl to remove the galactofuranose residues, yielding AN-GMa (C) and AT-GMa (D), respectively.

更なる構造の解析を行うため、 ^{13}C -NMR の測定を行った (Fig. 3-2A). すなわち、AN-GM では 107.74 及び 108.55 ppm の 2 本の Galf 残基を示すシグナルが存在するのに対し、AT-GM では 107.74 ppm に Galf 残基のシグナルが 1 つ存在していた. また、このコアマンナンに対する Galf 残基の結合様式を検討するために、短時間の TFA 処理を行い側鎖の Galf 残基を 1 残基のみとした AN-GMb を得て、同様に ^{13}C -NMR の測定を行った (Fig. 3-2B). その結果、未処理の場合 2 本存在していた Galf 残基のシグナル (107.74 及び 108.55 ppm) が、TFA 処理を行うことで 107.74 ppm のシグナルが消失し、108.55 ppm のシグナルのみになった. このシグナルに対応する構造を確認するために、 ^{13}C -NMR DEPT135, HSQC, HMBC を測定し解析を行った. ^{13}C -NMR DEPT135 において 6 位の炭素は低磁場シフトするが、AN-GMb において Man C6 を示す 67.57 ppm のシグナルは HMBC において H1/C6 のクロスピーク (Galf-E H1 5.065 ppm/Man-a C6 67.57 ppm) を示していた. すなわち 5.065 ppm のシグナルは 1,6 結合 Galf 残基の H1 を示すことが明らかとなった. また AT-GM のシグナルについては、クロスピーク H1/C5 (Galf H1 5.192 ppm/Galf C5 76.49 ppm) が存在していることから、1,5 結合 Galf から成る構造であることが確認できた.

これらの *Galf* 側鎖の長さの違いを明らかにするために、AN-GM、AT-GM 及び *A. fumigatus* から得られたガラクトマンナン (AF-GM) について短時間の酸加水分解を行い、側鎖から得られるオリゴ糖の組成を蛍光標識電気泳動法により比較解析した (Fig. 3-3). その結果、AN-GM では単糖と 2 糖を示すバンドしか得られなかったのに対し、AT-GM では単糖から 10 糖以上のオリゴ糖が遊離した. AF-GM については、第二章までの解析により AF-GM から得られた単糖から 5 糖までのオリゴ糖には β -1,5 結合 *Galf* に加えて β -1,6 結合 *Galf* が含まれていることが明らかとなっており、得られたバンドは結合様式の異なる異性体の存在を示すと考えられる. 一方、AT-GM から得られたオリゴ糖では β -1,5 結合 *Galf* オリゴ糖と考えられる異性体の存在しないバンドが得られた. さらに、AT-GM から得られたオリゴ糖は AF-GM から得られたものよりも大きなオリゴ糖が得られていることから、AT-GM は長鎖の *Galf* 鎖を有していることが明らかとなった.

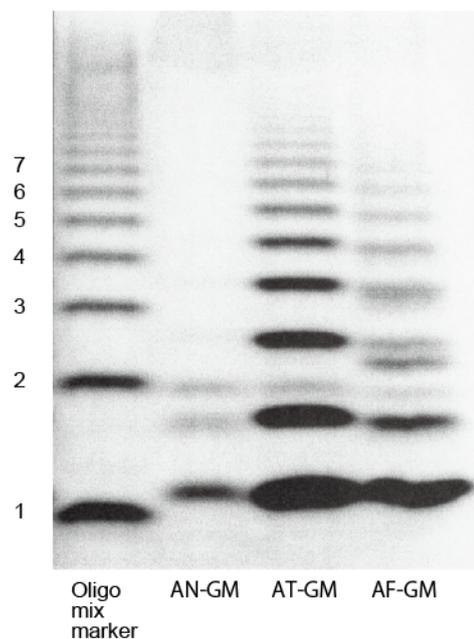


Fig. 3-3. Photograph of an electrophoretogram of ANTS-derivatized AN-GM, AT-GM and AF-GM.

これらの結果より，AN-GM 及び AT-GM の推定構造を Fig. 3-4 に示した．すなわち，AN-GM 及び AT-GM のコアマンナン構造は同一であり α -1,2 結合 mannotetraose が α -1,6 結合で直鎖状に繋がっている構造を有している．しかし Galf 側鎖は大きく異なっており，AN-GM は β -1,6 結合で mannose に結合する Galf が約 2 残基存在しているのに対して，AT-GM は同様に β -1,6 結合で mannose に結合する β -1,5 結合 Galf 側鎖が平均して約 13 残基の長さで存在していることが明らかとなった．すなわち AF-GM と比較すると，mannose に結合する Galf の結合様式が異なっており，AF-GM では 1,2 結合であるのに対し AN-GM 及び AT-GM では 1,6 結合であること，Galf 側鎖に関しては AF-GM では β -1,5 結合 Galf 及び β -1,6 結合 Galf の両者が存在していたのに対し AN-GM 及び AT-GM では β -1,5 結合 Galf のみから構成されていることが明らかとなった．

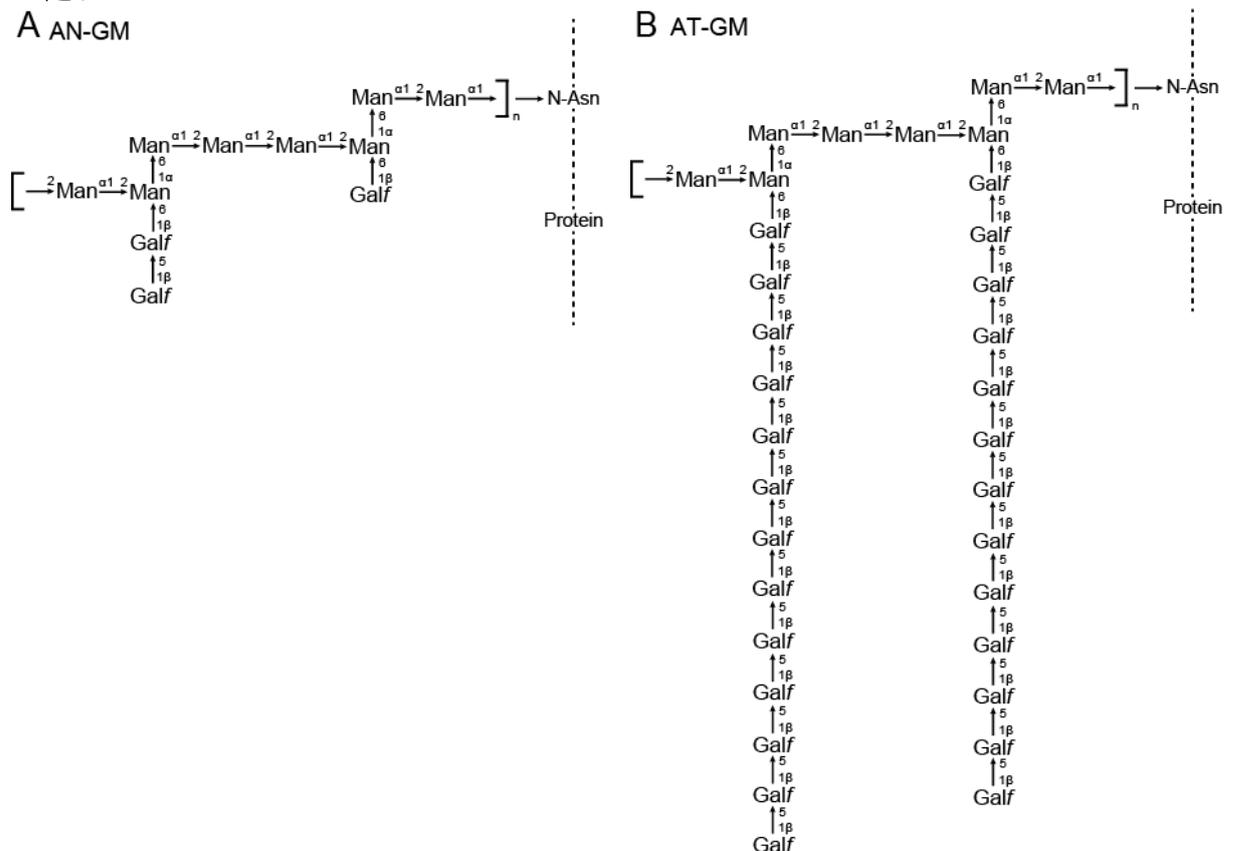


Fig. 3-4. Proposed structures for AN-GM (A) and AT-GM (B). Each of the structures is one of the possibilities out of the statistical ensemble. Man and Galf denote D-mannopyranose and D-galactofuranose residues, respectively.

これらの構造の違いが抗体との反応性に与える影響を検討するために、 β -1,5 結合 Galf オリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体との反応性を検討した (Fig. 3-5). その結果, AT-GM は AF-GM と同等の反応性を示すのに対し, AN-GM はほとんど反応性を示さなかった. また, β -1,6 結合 Galf からなる *M. furfur* のガラクトマンナン及び Galf 側鎖が 1 残基である *T. rubrum* のガラクトマンナンでは全く反応性を示さなかった.

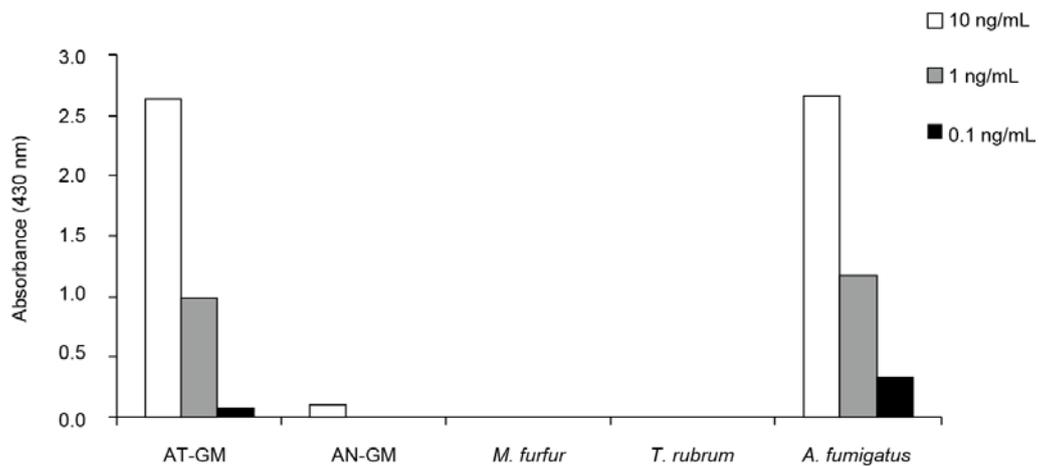


Fig. 3-5. Reactivity of several fungal polysaccharides to anti- β -1,5-linked Galf mAb. The assay was performed using the sandwich EIA system of *Plateria Aspergillus* EIA.

第四節 考察

A. niger は既にガラクトマンナンの構造解析が行われており、そこでは α -1,2 結合の mannotetraose が α -1,6 結合で直鎖状に繋がっているコアマンナンに、側鎖として Galp が 1,4 結合で繋がり末端に Galf が結合しているという構造が報告されていた¹¹⁶⁾。しかし、*A. fumigatus* のガラクトマンナンとして報告されている構造の側鎖である β -1,5 結合 Galf とは大きく異なる構造であり、診断の際に使われている β -1,5 結合 Galf に対する抗体と反応することから、報告とは異なる構造を有している可能性が示唆されていた。そこで今回 *A. niger* の構造解析を詳細に行ったところ、*A. fumigatus* と同様の β -1,5 結合 Galf 側鎖を有することが明らかとなった。しかし、今回得た AN-GM の Galf 側鎖は非常に短く約 2 残基程度であり、抗体との反応性も認められなかった。臨床では *A. niger* も *Plateria Aspergillus* EIA で検出できる場合もあり、また YPD 培地で培養した際には比較的長い Galf 鎖を有しているという結果も得られていることから、*A. fumigatus* と同様に栄養成分の変化で構造が変わる可能性がある。今後の研究により、この相違を明らかにすることで、Galf 側鎖の生合成経路が詳細に解明されることが期待される。

これまでに Galf 残基を含む細胞壁多糖の構造としては *Mycobacterium*¹²³⁾, *Leishmania*¹²⁴⁾, *Trypanosoma*¹²⁵⁾, *Penicillium*³⁶⁾, *Paracoccidioides*¹²⁶⁾, *Trichophyton*³⁸⁾, *Malassezia*³⁷⁾, *Fonsecaea*⁶⁷⁾ など解析が行われている。特に *Malassezia* の Galf は β -1,6 結合の直鎖であり、単一の結合様式から成る糖鎖を有していたが、その他の多糖は Galf 単一ではなく、異なる糖を含むヘテロ多糖を構成している。すなわち AT-GM のような単一糖鎖の連続構造は珍しく、特に長鎖であるため β -1,5 結合 Galf オリゴ糖を得ることが容易であるため、今後 Galf に関する研究への利用も考えられる。

今回の実験で、*Aspergillus* 属菌のうち、*A. terreus* や *A. niger* が有する細胞壁ガラクトマンナンの構造は *A. fumigatus* と同一のマンナン構造を有しており、異なる点は側鎖の Galf 鎖の長さであることが明らか

となった。同じ β -1,5 結合 *Galf* 鎖を有するという事実は、*Aspergillus* 属菌が β -1,5 結合 *Galf* を認識するモノクローナル抗体と反応するというこれまでの報告が確認されたことになる。そのためその他の *Aspergillus* 属菌も同様の構造を有している可能性が考えられる。また、菌種により抗体との反応性に大きな差があるという報告の中で、*A. terreus* は *A. niger* に比べて反応性が高くなっており、*Galf* 鎖の長さの違いが原因の 1 つに考えられる。一方で同じ菌種であっても抗体との反応性が異なる場合も存在しているため¹²²⁾、菌株により *Galf* 鎖やガラクトマンナンの生合成系に違いの存在している可能性がある。これらの事実は *Galf* 鎖と病原性の関係など、*Aspergillus* 属菌が有する *Galf* 鎖の詳細な理解を進めるための 1 つの手掛かりになるため、今後の研究により *Galf* 鎖の役割等の解明の進展が期待される。

総括

本研究で *Aspergillus* 属菌が細胞壁に有するガラクトマンナンの構造の増殖条件による変化及び新たな構造を含む詳細な構造を明らかにした。

第一章では異なる培地で培養した *A. fumigatus* ガラクトマンナンの O-結合型糖鎖について検討した。*A. fumigatus* を YPD 培地と YNB 培地で培養し得られたガラクトマンナンの O-結合型糖鎖に及ぼす影響を検討したところ、YPD 培地から得た O-結合型糖鎖は直鎖状、分岐状のものが 4 糖までしか存在しないのに対し、YNB 培地から得たものでは Galf 鎖が長く、10 糖以上の糖鎖も存在していることが明らかとなった。またそれらの構造として、新たに分岐状の Galf β 1 \rightarrow 6(Man α 1 \rightarrow 2)Man と直鎖状の Galf β 1 \rightarrow 5Galf β 1 \rightarrow 6Man 及び長い β -1,5 結合 Galf 鎖の中に β -1,6 結合 Galf 残基が含まれていることを明らかにした。

第二章では異なる培地で培養した *A. fumigatus* の N-結合型ガラクトマンナンについて検討した。*A. fumigatus* を第一章と同様の培地で培養し得られた N-結合型ガラクトマンナンの構造解析を行ったところ、両ガラクトマンナン間でコアマンナンの構造は変わらず α -1,2 結合 mannotetraose が α -1,6 結合で直鎖状に繋がっており、P-GM は側鎖の Galf 鎖が短く β -1,5 結合で繋がる Galf 鎖が 3 残基程度存在するのに対し、N-GM は Galf 鎖が長く β -1,5 結合及び β -1,6 結合で繋がる Galf 鎖が長い側鎖では 10 残基程度存在することが明らかとなった。さらに β -1,5 結合 Galf に対するモノクローナル抗体との反応性が両ガラクトマンナンで大きく異なることを明らかにした。さらにこの長さの違いの原因の 1 つとして galactofuranosidase の関与する可能性を示した。

第三章では *A. niger* 及び *A. terreus* の N-結合型ガラクトマンナンについて解析した。*A. niger* 及び *A. terreus* を YNB 培地で培養し得られた N-結合型ガラクトマンナンの構造解析を行ったところ、両ガラクトマンナン間でコアマンナンの構造は *A. fumigatus* の構造と変わらなかつたものの、側鎖の Galf 鎖が AN-GM では約 2 残基しか存在していな

いのに対し、AT-GM では約 13 残基存在していることが明らかとなった。

Aspergillus 属菌は様々な栄養を取り込み生存することが可能である。一方で、栄養条件が異なる場合、必ずしも同じ代謝物を合成するとは限らず、特に *Aspergillus* 属菌が産生する酵素は特定の栄養成分や pH で産生量が増加することが知られている^{104, 127, 128)}。本研究により Galf 鎖も同様に特定の栄養条件で産生量または分解量に変化のあることが明らかとなった。近年異なる培地を用いた際に β -1,6 結合グルカンの代謝が変わること¹²⁹⁾や血清存在下で抗真菌薬の活性に変化が生じること¹³⁰⁾が報告されており、栄養条件の違いと細胞壁の関心に注目が集まっている。一方で Galf 鎖の長さの変化とその機能については未だ不明であり、細胞壁グルカンやマンナンが生体の防御機構からの認識を阻害する作用を持つことや、栄養源の貯蓄として細胞外に作り出した糖鎖を飢餓時に分解して利用するということが考えられているが、これらの関与についての検討は今後の課題となっている。

近年 Galf 残基を認識するレクチンとしてインテレクチンが発見され¹³¹⁾、Galf 残基を有している *Mycobacterium* 属菌を用いた研究が行われている¹³²⁾。特に悪性中皮腫患者の胸水中に高濃度でインテレクチンが含まれること¹³³⁾から腫瘍マーカーになり得ると期待されているが、一方で肺に存在するインテレクチンの報告はあるものの¹³⁴⁾、インテレクチンとアスペルギルス症の関連についてはこれまで報告がない。すなわち Galf と生体防御機構の関係は未だ不明であり今後の研究の進展が期待される。

アスペルギルス症の診断法の 1 つとして Galf 鎖に対するモノクローナル抗体が利用されているが、これは ELISA 法で簡便に検出できるという利点をもつ。その後新たに PCR 法¹³⁵⁾も開発されているものの、装置などの準備が必要であることから臨床の現場では依然として ELISA 法が用いられている。一方で偽陽性や偽陰性の報告もあり、今回の結果からも原因菌種や増殖環境次第では偽陰性となることが明らかとなった。そのため、複数の診断法を用いて総合的に判断すること

が必要と考えられる。

本研究で、栄養条件の違いによって **Galf** 鎖の長さが増えることが明らかとなったが、この事実は菌体を用いて **Galf** 鎖の機能に関する研究を行う上で注意が必要であることを示している。**Galf** 鎖欠損株作製時における近年の報告に、**Galf** 鎖の残存の確認をモノクローナル抗体との反応性で検討し、実際の構造の変化は確認していないというものがある。特に **UDP-galactopyranose mutase** 欠損株においては **Galf** 鎖欠損により病原性が減弱する報告⁴³⁾と減弱しない報告¹³⁶⁾の2種類がある。この原因として **Galf** 鎖の存在量に違いがある可能性があるため構造の確認が必要と思われる。

Galf 残基は人類が有していない特徴的な糖であり、未だ解明されていないことも多く存在する。今後、今回の知見をもとに **Galf** 鎖の更なる研究が進むことで、*Aspergillus* 属菌に対する新たな治療戦略に繋がることを期待する。

論文目録

本研究は以下の雑誌に公表した。

1. Kudoh A, Okawa Y, Shibata N. 2015. Significant structural change in both O- and N-linked carbohydrate moieties of the antigenic galactomannan from *Aspergillus fumigatus* grown under different culture conditions. *Glycobiology*. 25:74-87.

謝 辞

本研究を実施するにあたり，終始御指導，御鞭撻を賜りました感染生体防御学教室恩師 柴田 信之 教授に厚く御礼申し上げます．本論文の御校閲を賜りました 大久保 恭仁 教授並びに 山下 幸和 教授に深く感謝申し上げます．

また，本研究を遂行するにあたり有益な御助言を頂きました 佐々木 雅人 准教授，多大なご協力を頂きました 伊藤 文恵 助手並びに 田中 大 助手に心より感謝申し上げます．

そして，本研究に多大なる御協力を頂きました 荒川 駿 学士を始めとする感染生体防御学教室の諸氏に心より感謝申し上げます．

本研究に対して御支援を賜りました本学理事長・学長 高柳 元明 博士に深く感謝の意を表します．

さらに，本研究の機会を与えて下さいました，公益財団法人 仙台市医療センター 仙台オープン病院 薬剤部 枡窪 克行 課長，研究の時間を与えて頂きました薬剤部の皆様並びに病院職員の皆様に厚く御礼申し上げます．

最後に，大学院で研究を行うにあたり御支援，御協力を頂きました両親，友人諸氏に心より感謝申し上げます．

引用文献

- 1) Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124:837-848.
- 2) Deresinski S. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin: minimum inhibitory concentration matters. *Clin Infect Dis*. 54:772-774.
- 3) Deep-seated mycoses guidelines committee. 2014. Clinical practice guidelines for diagnosis and treatment of deep-seated mycoses.
- 4) Kume H, Yamazaki T, Abe M, Tanuma H, Okudaira M, Okayasu I. 2006. Epidemiology of visceral mycoses in patients with leukemia and MDS - Analysis of the data in annual of pathological autopsy cases in Japan in 1989, 1993, 1997 and 2001. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 47:15-24.
- 5) Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. 2001. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 32:358-366.
- 6) Dalle F, Charles PE, Blanc K, Caillot D, Chavanet P, Dromer F, Bonnin A. 2005. *Cryptococcus neoformans* Galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* Galactomannan. *J Clin Microbiol*. 43:2929-2931.
- 7) Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 12:310-350.
- 8) Loo VG, Bertrand C, Dixon C, Vitye D, DeSalis B, McLean AP, Brox A, Robson HG. 1996. Control of construction-associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematology unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 17:360-364.
- 9) VandenBergh MF, Verweij PE, Voss A. 1999. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 34:221-227.

- 10) Mattner F, Gastmeier P. 2005. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 40:79-84.
- 11) Sherertz RJ, Belani A, Kramer BS, Elfenbein GJ, Weiner RS, Sullivan ML, Thomas RG, Samsa GP. 1987. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of bone marrow transplant recipients. *Am J Med.* 83:709-718.
- 12) Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidallo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latgé JP. 2003. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun.* 71:3034-3042.
- 13) Mircescu MM, Lipuma L, van Rooijen N, Pamer EG, Hohl TM. 2009. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect Dis.* 200:647-656.
- 14) Park SJ, Mehrad B. 2009. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev.* 22:535-551.
- 15) Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. 1997. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis.* 175:1459-1466.
- 16) Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 34:909-917.
- 17) Denning DW, Stevens DA. 1990. Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2,121 published cases. *Rev Infect Dis.* 12:1147-1201.
- 18) Barnes PD, Marr KA. 2006. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 20:545-561.
- 19) Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning

- NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1364-1368.
- 20) Chryssanthou E. 1997. In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. acquired resistance to itraconazole. *Scand J Infect Dis.* 29:509-512.
- 21) Dannaoui E, Persat F, Monier MF, Borel E, Piens MA, Picot S. 1999. In-vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* 44:553-555.
- 22) van der Linden JW, Jansen RR, Bresters D, Visser CE, Geerlings SE, Kuijper EJ, Melchers WJ, Verweij PE. 2009. Azole-resistant central nervous system aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 48:1111-1113.
- 23) Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, Afif C, Cooksley C, Bodey GP, Chatzinikolaou I, Perego C, Kantarjian HM, Raad II. 2004. *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer.* 101:1594-1600.
- 24) Moudgal V, Little T, Boikov D, Vazquez JA. 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:767-769.
- 25) Hakki M, Staab JF, Marr KA. 2006. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:2522-2524.
- 26) Laverdiere M, Lalonde RG, Baril JG, Sheppard DC, Park S, Perlin DS. 2006. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicrob Chemother.* 57:705-708.
- 27) Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, Latgé JP. 1992. Rat monoclonal antibodies against

- Aspergillus galactomannan. Infect Immun.* 60:2237-2245.
- 28) Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:130-180.
- 29) Kanbe T, Cutler JE. 1998. Minimum chemical requirements for adhesin activity of the acid-stable part of *Candida albicans* cell wall phosphomannoprotein complex. *Infect Immun.* 66:5812-5818.
- 30) Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, d'Athis P, Poulain D, Bonnin A. 2003. β -1,2- and α -1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect Immun.* 71:7061-7068.
- 31) Castro M, Ralston NV, Morgenthaler TI, Rohrbach MS, Limper AH. 1994. *Candida albicans* stimulates arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through α -mannan and β -glucan cell wall components. *Infect Immun.* 62:3138-3145.
- 32) Hobson RP, Munro CA, Bates S, MacCallum DM, Cutler JE, Heinsbroek SE, Brown GD, Odds FC, Gow NA. 2004. Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J Biol Chem.* 279:39628-39635.
- 33) Singleton DR, Masuoka J, Hazen KC. 2005. Surface hydrophobicity changes of two *Candida albicans* serotype B *mnn4* Δ mutants. *Eukaryot Cell.* 4:639-648.
- 34) Moreno I, Pedreno Y, Maicas S, Sentandreu R, Herrero E, Valentin E. 2003. Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcriptional factor required for cell wall integrity. *FEMS Microbiol Lett.* 226:159-167.
- 35) Mille C, Janbon G, Delplace F, Ibata-Ombetta S, Gaillardin C, Strecker G, Jouault T, Trinel PA, Poulain D. 2004. Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan

- β -mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein β -mannosylation. *J Biol Chem.* 279:47952-47960.
- 36) Unkefer CJ, Gander JE. 1990. The 5-*O*- β -D-galactofuranosyl-containing peptidophosphogalactomannan of *Penicillium charlesii*. Characterization of the mannan by ^{13}C NMR spectroscopy. *J Biol Chem.* 265:685-689.
- 37) Shibata N, Saitoh T, Tadokoro Y, Okawa Y. 2009. The cell wall galactomannan antigen from *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* contains β -1,6-linked linear galactofuranosyl residues and its detection has diagnostic potential. *Microbiology.* 155:3420-3429.
- 38) Ikuta K, Shibata N, Blake JS, Dahl MV, Nelson RD, Hisamichi K, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y. 1997. NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem J.* 323:297-305.
- 39) Calixto R, Mattos B, Bittencourt V, Lopes L, Souza L, Sasaki G, Cipriani T, Silva M, Barreto-Bergter E. 2010. β -Galactofuranose-containing structures present in the cell wall of the saprophytic fungus *Cladosporium (Hormoconis) resinae*. *Res Microbiol.* 161:720-728.
- 40) Gorska-Fraczek S, Sandstrom C, Kenne L, Pasciak M, Brzozowska E, Strus M, Heczko P, Gamian A. 2013. The structure and immunoreactivity of exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus johnsonii* strain 151. *Carbohydr Res.* 378:148-153.
- 41) Vinogradov E, Valence F, Maes E, Jebava I, Chuat V, Lortal S, Grard T, Guerardel Y, Sadovskaya I. 2013. Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BRO1, and LH1. *Carbohydr Res.* 379:7-12.
- 42) Guo S, Mao W, Li Y, Tian J, Xu J. 2013. Structural elucidation of the

- exopolysaccharide produced by fungus *Fusarium oxysporum* Y24-2. *Carbohydr Res.* 365:9-13.
- 43) Schmalhorst PS, Krappmann S, Vervecken W, Rohde M, Muller M, Braus GH, Contreras R, Braun A, Bakker H, Routier FH. 2008. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 7:1268-1277.
- 44) Engel J, Schmalhorst PS, Dork-Bousset T, Ferrieres V, Routier FH. 2009. A single UDP-galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem.* 284:33859-33868.
- 45) Alam MK, El-Ganiny AM, Afroz S, Sanders DA, Liu J, Kaminskyj SG. 2012. *Aspergillus nidulans* galactofuranose biosynthesis affects antifungal drug sensitivity. *Fungal Genet Biol.* 49:1033-1043.
- 46) Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature.* 484:186-194.
- 47) Baenziger J, Kornfeld S. 1974. Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. I. Composition, glycopeptide isolation, and structure of the asparagine-linked oligosaccharide units. *J Biol Chem.* 249:7260-7269.
- 48) Hanover JA, Elting J, Mintz GR, Lennarz WJ. 1982. Temporal aspects of the *N*- and *O*-glycosylation of human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem.* 257:10172-10177.
- 49) Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T. 1997. Structures of sialylated *O*-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α -dystroglycan. The role of a novel *O*-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of α -dystroglycan with laminin. *J Biol Chem.* 272:2156-2162.
- 50) Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, Endo T. 1998. Detection of *O*-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle

- α -dystroglycan. *Biochim Biophys Acta*. 1425:599-606.
- 51) Chai W, Yuen CT, Kogelberg H, Carruthers RA, Margolis RU, Feizi T, Lawson AM. 1999. High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur J Biochem*. 263:879-888.
- 52) Yuen CT, Chai W, Loveless RW, Lawson AM, Margolis RU, Feizi T. 1997. Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). *J Biol Chem*. 272:8924-8931.
- 53) Smalheiser NR, Haslam SM, Sutton-Smith M, Morris HR, Dell A. 1998. Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J Biol Chem*. 273:23698-23703.
- 54) Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W. 1999. Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1426:297-307.
- 55) Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S. 2003. O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol*. 13:621-630.
- 56) Gemmill TR, Trimble RB. 1999. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta*. 1426:227-237.
- 57) Schutzbach J, Ankel H, Brockhausen I. 2007. Synthesis of cell envelope glycoproteins of *Cryptococcus laurentii*. *Carbohydr Res*. 342:881-893.
- 58) Leitaó EA, Bittencourt VC, Haido RM, Valente AP, Peter-Katalinic J, Letzel M, de Souza LM, Barreto-Bergter E. 2003. β -galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology*. 13:681-692.

- 59) Oka T, Sameshima Y, Koga T, Kim H, Goto M, Furukawa K. 2005. Protein *O*-mannosyltransferase A of *Aspergillus awamori* is involved in *O*-mannosylation of glucoamylase I. *Microbiology*. 151:3657-3667.
- 60) Zhou H, Hu H, Zhang L, Li R, Ouyang H, Ming J, Jin C. 2007. *O*-Mannosyltransferase 1 in *Aspergillus fumigatus* (AfPmt1p) is crucial for cell wall integrity and conidium morphology, especially at an elevated temperature. *Eukaryot Cell*. 6:2260-2268.
- 61) Fang W, Ding W, Wang B, Zhou H, Ouyang H, Ming J, Jin C. 2010. Reduced expression of the *O*-mannosyltransferase 2 (AfPmt2) leads to deficient cell wall and abnormal polarity in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*. 20:542-552.
- 62) Oka T, Hamaguchi T, Sameshima Y, Goto M, Furukawa K. 2004. Molecular characterization of protein *O*-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 150:1973-1982.
- 63) McCourtie J, Douglas LJ. 1981. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun*. 32:1234-1241.
- 64) Okawa Y, Miyauchi M, Goto K, Giummelly P. 2005. Antigenicity of cell wall mannans of *Candida albicans* NIH A-207 strain cells cultured in galactose-added yeast nitrogen base medium. *Biol Pharm Bull*. 28:391-393.
- 65) Lloyd KO. 1970. Isolation, characterization, and partial structure of peptido galactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*. *Biochemistry*. 9:3446-3453.
- 66) Takahashi S, Kudoh A, Okawa Y, Shibata N. 2012. Significant differences in the cell-wall mannans from three *Candida glabrata* strains correlate with antifungal drug sensitivity. *FEBS J*. 279:1844-1856.
- 67) Shibata N, Okawa Y. 2011. Chemical structure of

- β -galactofuranose-containing polysaccharide and *O*-linked oligosaccharides obtained from the cell wall of pathogenic dematiaceous fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Glycobiology*. 21:69-81.
- 68) Shibata N, Suzuki A, Kobayashi H, Okawa Y. 2007. Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem J*. 404:365-372.
- 69) Ciucanu I, Kerek F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res*. 131:209-217.
- 70) DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances *Analytical Chemistry*. 28:350-356.
- 71) Li YT. 1967. Studies on the glycosidases in jack bean meal. I. Isolation and properties of α -mannosidase. *J Biol Chem*. 242:5474-5480.
- 72) Gunnarsson A, Svensson B, Nilsson B, Svensson S. 1984. Structural studies on the *O*-glycosidically linked carbohydrate chains of glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem*. 145:463-467.
- 73) Lommel M, Strahl S. 2009. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology*. 19:816-828.
- 74) Komachi Y, Hatakeyama S, Motomatsu H, Futagami T, Kizjakina K, Sobrado P, Ekino K, Takegawa K, Goto M, Nomura Y, Oka T. 2013. *gfsA* encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of *O*-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*. 90:1054-1073.
- 75) Kremer L, Dover LG, Morehouse C, Hitchin P, Everett M, Morris HR, Dell A, Brennan PJ, McNeil MR, Flaherty C, Duncan K, Besra GS. 2001. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase. *J Biol Chem*. 276:26430-26440.

- 76) Shibata N, Fukasawa S, Kobayashi H, Tojo M, Yonezu T, Ambo A, Ohkubo Y, Suzuki S. 1989. Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form cells of *Candida albicans* NIH A-207 serotype a strain. *Carbohydr Res.* 187:239-253.
- 77) Kobayashi H, Shibata N, Mitobe H, Ohkubo Y, Suzuki S. 1989. Structural study of phosphomannan of yeast-form cells of *Candida albicans* J-1012 strain with special reference to application of mild acetolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 272:364-375.
- 78) Kobayashi H, Shibata N, Osaka T, Miyagawa Y, Ohkubo Y, Suzuki S. 1992. Structural study of cell wall mannan of a *Candida albicans* (serotype A) strain. *Phytochemistry.* 31:1147-1153.
- 79) Kobayashi H, Matsuda K, Ikeda T, Suzuki M, Takahashi S, Suzuki A, Shibata N, Suzuki S. 1994. Structures of cell wall mannans of pathogenic *Candida tropicalis* IFO 0199 and IFO 1647 yeast strains. *Infect Immun.* 62:615-622.
- 80) Shibata N, Akagi R, Hosoya T, Kawahara K, Suzuki A, Ikuta K, Kobayashi H, Hisamichi K, Okawa Y, Suzuki S. 1996. 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.
- 81) Shibata N, Onozawa M, Tadano N, Hinosawa Y, Suzuki A, Ikuta K, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y. 1996. Structure and antigenicity of the mannans of *Candida famata* and *Candida saitoana*: comparative study with the mannan of *Candida guilliermondii*. *Arch Biochem Biophys.* 336:49-58.
- 82) Shibata N, Kobayashi H, Okawa Y, Suzuki S. 2003. 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.

- 83) Kobayashi H, Mitobe H, Takahashi K, Yamamoto T, Shibata N, Suzuki S. 1992. Structural study of a cell wall mannan-protein complex of the pathogenic yeast *Candida glabrata* IFO 0622 strain. *Arch Biochem Biophys.* 294:662-669.
- 84) Reiss E, Lehmann PF. 1979. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun.* 25:357-365.
- 85) Barreto-Bergter E, Gorin PAJ, Travassos LR. 1981. Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydr Res.* 95:205-217.
- 86) Bennett JE, Bhattacharjee AK, Glaudemans CPJ. 1985. Galactofuranosyl groups are immunodominant in *Aspergillus fumigatus* galactomannan. *Mol Immunol.* 22:251-254.
- 87) Mischnick P, De Ruiter GA. 1994. Application of reductive cleavage in the structural investigation of the antigenic polysaccharides of *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium digitatum* with respect to the determination of the ring size of the galactose moieties. *Carbohydr Polym.* 23:5-12.
- 88) Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszeski JM, Parra E, Bouchara JP, Fournet B. 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 62:5424-5433.
- 89) Van BruggenVan Der Lugt AW, Kamphuis HJ, De Ruiter GA, Mischnick P, Van Boom JH, Rombouts FM. 1992. New structural features of the antigenic extracellular polysaccharides of *Penicillium* and *Aspergillus* species revealed with exo- β -D-galactofuranosidase. *J Bacteriol.* 174:6096-6102.
- 90) Okubo Y, Ichikawa T, Suzuki S. 1978. Relationship between phosphate content and immunochemical properties of subfractions of bakers' yeast mannan. *J Bacteriol.* 136:63-68.

- 91) Goins TL, Cutler JE. 2000. Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 38:2862-2869.
- 92) Leal JA, Jimenez-Barbero J, Gomez-Miranda B, Parra E, Prieto A, Bernabe M. 1995. Structural investigation of cell-wall polysaccharides from *Neosartorya*: relationships with their putative anamorphs of *Aspergillus*. *Carbohydr Res.* 273:255-262.
- 93) Marino C, Varela O, de Lederkremer RM. 1989. Synthesis of galactofuranose disaccharides of biological significance. *Carbohydr Res.* 190:65-76.
- 94) D'Ambra AJ, Rice MJ, Zeller SG, Gruber PR, Gray GR. 1988. Analysis of positions of substitution of *O*-methyl or *O*-ethyl groups in partially methylated or ethylated cellulose by the reductive-cleavage method. *Carbohydr Res.* 177:111-116.
- 95) Rietschel-Berst M, Jentoft NH, Rick PD, Pletcher C, Fang F, Gander JE. 1977. Extracellular exo- β -galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*: isolation, purification, and properties. *J Biol Chem.* 252:3219-3226.
- 96) Wallis GL, Hemming FW, Peberdy JF. 2001. An extracellular β -galactofuranosidase from *Aspergillus niger* and its use as a tool for glycoconjugate analysis. *Biochim Biophys Acta.* 1525:19-28.
- 97) Cousin MA, Notermans S, Hoogerhout P, Van Boom JH. 1989. Detection of β -galactofuranosidase production by *Penicillium* and *Aspergillus* species using 4-nitrophenyl β -D-galactofuranoside. *J Appl Bacteriol.* 66:311-317.
- 98) Marino C, Marino K, Miletto L, Manso Alves MJ, Colli W, de Lederkremer RM. 1998. 1-Thio- β -D-galactofuranosides: synthesis and evaluation as β -D-galactofuranosidase inhibitors. *Glycobiology.* 8:901-904.
- 99) Repetto E, Marino C, Uhrig ML, Varela O. 2009. Thiodisaccharides

- with galactofuranose or arabinofuranose as terminal units: synthesis and inhibitory activity of an exo β -D-galactofuranosidase. *Bioorg Med Chem.* 17:2703-2711.
- 100) Marino C, Chioconni A, Varela O, de Lederkremer RM. 1998. The glycosyl-aldonolactone approach for the synthesis of β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-Manp and 3-deoxy- β -D-xylo-hexofuranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-Manp. *Carbohydr Res.* 311:183-189.
- 101) Preston JF 3rd, Lapis E, Gander JE. 1969. Isolation and partial characterization of the exocellular polysaccharides of *Penicillium charlesii*. 3. Heterogeneity in size and composition of high molecular weight exocellular polysaccharides. *Arch Biochem Biophys.* 134:324-334.
- 102) Khan MA, Hamid R, Ahmad M, Abdin MZ, Javed S. 2010. Optimization of culture media for enhanced chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *J Microbiol Biotechnol.* 20:1597-1602.
- 103) Maeda RN, da Silva MM, Santa Anna LM, Pereira N Jr. 2010. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. *Appl Biochem Biotechnol.* 161:411-422.
- 104) Kote NV, Patil AG, Mulimani VH. 2009. Optimization of the production of thermostable endo- β -1,4 mannanases from a newly isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. *Appl Biochem Biotechnol.* 152:213-223.
- 105) Spratt DA, Greenman J, Schaffer AG. 1999. Growth and hydrolytic enzyme production of *Capnocytophaga gingivalis* on different protein substrates. *Oral Microbiol Immunol.* 14:122-126.
- 106) Schachtschabel D, Arentshorst M, Legendijk EL, Ram AF. 2012. Vacuolar H(+)-ATPase plays a key role in cell wall biosynthesis of *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol.* 49:284-293.

- 107) Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, Ito JI, Balajee SA, Pappas PG, Moser SA. 2009. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol.* 47:3271-3275.
- 108) Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. 2011. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol.* 49:581-587.
- 109) Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. 2009. *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus Aspergillus* species of significance. *Mycoses.* 52:206-222.
- 110) Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. 2001. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 32:1319-1324.
- 111) Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, Sein T, Schaufele R, Peter J, Bacher J, Casler H, Armstrong D, Espinel-Ingroff A, Rinaldi MG, Lyman CA. 2003. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis.* 188:305-319.
- 112) Deak E, Nelson M, Hernandez-Rodriguez Y, Gade L, Baddley J, Momany M, Steele C, Balajee SA. 2011. *Aspergillus terreus* accessory conidia are multinucleated, hyperpolarizing structures that display differential dectin staining and can induce heightened inflammatory responses in a pulmonary model of aspergillosis. *Virulence.* 2:200-207.
- 113) Torres HA, Rivero GA, Lewis RE, Hachem R, Raad II, Kontoyiannis DP. 2003. Aspergillosis caused by non-*fumigatus Aspergillus* species:

- risk factors and in vitro susceptibility compared with *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 46:25-28.
- 114) Deak E, Wilson SD, White E, Carr JH, Balajee SA. 2009. *Aspergillus terreus* accessory conidia are unique in surface architecture, cell wall composition and germination kinetics. *PLoS One*. 4:e7673.
- 115) Oda M, Saraya T, Wakayama M, Shibuya K, Ogawa Y, Inui T, Yokoyama E, Inoue M, Shimoyamada H, Fujiwara M, Ota T, Takizawa H, Goto H. 2013. Calcium oxalate crystal deposition in a patient with Aspergilloma due to *Aspergillus niger*. *J Thorac Dis*. 5:E174-178.
- 116) Bardalaye PC, Nordin JH. 1977. Chemical structure of the galactomannan from the cell wall of *Aspergillus niger*. *J Biol Chem*. 252:2584-2591.
- 117) Wang C, Mao W, Chen Z, Zhu W, Chen Y, Zhao C, Li N, Yan M, Liu X, Guo T. 2013. Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. *Process Biochem*. 48:1395-1401.
- 118) Barreto-Berter ME, Travassos LR, Philip AJG. 1980. Chemical structure of the D-galacto-D-mannan component from hyphae of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* spp. *Carbohydr Res*. 86:273-285.
- 119) Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JH, Bretagne S, Meis JF. 2000. Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 38:3900-3901.
- 120) Yeo SF, Wong B. 2002. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 15:465-484.
- 121) Hao W, Pan YX, Ding YQ, Xiao S, Yin K, Wang YD, Qiu LW, Zhang QL, Woo PC, Lau SK, Yuen KY, Che XY. 2008. Well-characterized

- monoclonal antibodies against cell wall antigen of *Aspergillus* species improve immunoassay specificity and sensitivity. *Clin Vaccine Immunol.* 15:194-202.
- 122) Xavier MO, Araujo JS, Aquino VR, Severo CB, Guazzelli LS, Severo LC, Pasqualotto AC. 2013. Variability in Galactomannan detection by Platelia *Aspergillus* EIA according to the *Aspergillus* species. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 55(3)
- 123) Vilkas E, Amar C, Markovits J, Vliegenthart JF, Kamerling JP. 1973. Occurrence of a galactofuranose disaccharide in immunoadjuvant fractions of *Mycobacterium tuberculosis* (Cell walls and wax D). *Biochim Biophys Acta.* 297:423-435.
- 124) McConville MJ, Homans SW, Thomas-Oates JE, Dell A, Bacic A. 1990. Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *J Biol Chem.* 265:7385-7394.
- 125) de Lederkremer RM, Lima C, Ramirez MI, Ferguson MA, Homans SW, Thomas-Oates J. 1991. Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *J Biol Chem.* 266:23670-23675.
- 126) Lavery SB, Toledo MS, Suzuki E, Salyan ME, Hakomori S, Straus AH, Takahashi HK. 1996. Structural characterization of a new galactofuranose-containing glycolipid antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 222:639-645.
- 127) Rajoka M, Akhtar M, Hanif A, Khalid, AM. 2006. Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* 22:991-998.
- 128) Lin T, Chen C. 2004. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. *Proc Biochem.* 39:1103-1109.

- 129) Clavaud C, Beauvais A, Barbin L, Munier-Lehmann H, Latgé JP. 2012. The composition of the culture medium influences the β -1,3-glucan metabolism of *Aspergillus fumigatus* and the antifungal activity of inhibitors of β -1,3-glucan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:3428-3431.
- 130) Elefanti A, Mouton JW, Krompa K, Al-Saigh R, Verweij PE, Zerva L, Meletiadi J. 2013. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:1625-1631.
- 131) Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsuhisa A, Toyoshima K, Seya T. 2001. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem.* 276:23456-23463.
- 132) Tsuji S, Yamashita M, Hoffman DR, Nishiyama A, Shinohara T, Ohtsu T, Shibata Y. 2009. Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin by intelectin-1 deposited on cell surfaces. *Glycobiology.* 19:518-526.
- 133) Tsuji S, Tsuura Y, Morohoshi T, Shinohara T, Oshita F, Yamada K, Kameda Y, Ohtsu T, Nakamura Y, Miyagi Y. 2010. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. *Br J Cancer.* 103:517-523.
- 134) Gu N, Kang G, Jin C, Xu Y, Zhang Z, Erle DJ, Zhen G. 2010. Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemotactic protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 298:L290-296.
- 135) Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H. 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive

aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 33:1504-1512.

- 136) Lamarre C, Beau R, Balloy V, Fontaine T, Wong Sak Hoi J, Guadagnini S, Berkova N, Chignard M, Beauvais A, Latgé JP. 2009. Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol.* 11:1612-1623.