

研究ノート

病原性 *Candida* 酵母から調製した粗抽出物の $^1\text{H-NMR}$ 分析によって得られる細胞壁マンナンの構造情報について

川上 晋, 江嶋 彩香, 仲 彩香,
小川 由起子, 小林 秀光*
(長崎国際大学 薬学部 薬学科, *連絡対応著者)

Structural Information of the Cell Wall Mannan Obtained by $^1\text{H-NMR}$ Analysis for Crude Extract of Pathogenic *Candida* Yeast cells

Susumu KAWAKAMI, Ayaka EJIMA, Ayaka NAKA,
Yukiko OGAWA and Hidemitsu KOBAYASHI*
(Dept. of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagasaki International University, *Corresponding author)

Abstract

In the measurement of $^1\text{H-NMR}$ of purified mannan obtained from dried cells of pathogenic *Candida* yeast, the extremely clear signal is observed anomeric proton region (4.5~6.0 ppm) based on mannose residues. On the other hand, in the $^1\text{H-NMR}$ analysis of the crude extract obtained from the same yeast, part obscured slightly observed, but the signal pattern equivalent to purified mannan substantially was observed. Therefore, it was demonstrated that $^1\text{H-NMR}$ analysis of the crude extract obtained in the previous step of purification of mannan give the rough information for the chemical structure of the yeast cell wall mannan.

Key words

Candida, pathogenic yeast, cell wall mannan, $^1\text{H-NMR}$ analysis

要旨

病原性 *Candida* 酵母の乾燥菌体から精製されたマンナンのプロトン核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) 分析 (測定温度45°C) において、マンノース残基に基づくアノメリックプロトンシグナル領域 (4.5~6.0 ppm) に観察されるシグナルは極めて明瞭であった。一方、同一酵母の粗抽出物の $^1\text{H-NMR}$ 分析 (測定温度70°C) におけるこの領域のシグナルは、僅かに不明瞭な部分が観察されるものの、ほぼ精製マンナンに匹敵するシグナルパターンを観察することができた。従って、酵母細胞壁マンナンの化学構造に関して、マンナンを精製する前段階である粗抽出物の NMR 分析によって、精製マンナンの NMR 分析とほぼ同等の情報が得られることが明らかになった。

キーワード

カンジダ、病原性酵母、細胞壁マンナン、プロトン核磁気共鳴分析

近年、カンジダ症の原因菌である *Candida* 酵母のうち、複数の菌種からアゾール系薬剤に対する耐性菌が出現するようになった¹⁾。従って、

カンジダ症の診断において、*Candida* 属の菌種同定は適切な治療薬選択の観点からますます重要になっているが、現在の臨床現場で行われて

いる診断法や菌種同定法は、簡便性、迅速性の観点からも十分とは言えず、より正確に菌種を分別同定できる新しい診断法の必要性がクローズアップされている²⁾。*Candida* 酵母の特異的遺伝子を検出する診断法も検討されているが、高感度であることが仇となり、常在する菌を誤って検出してしまふ「偽陽性」が問題視される。そこで、古典的ではあるが菌体表面の細胞壁マンナン-タンパク質複合体（以下、マンナンと省略）を標的とする免疫化学的手法による菌種同定法が見直されるに至った。

これまでに我々は、頻繁に臨床分離される *Candida* 酵母の主要 8 菌種のうち、*C. krusei* を除く 7 菌種に加え、*C. catenulata* や *C. zeylanoides* 等のマンナンの全体構造及び抗原決定基について報告してきた³⁾。カンジダ酵母の細胞壁マンナンの化学構造の共通点として、 α -1,6結合マンノース残基から構成される「主鎖」に、2 糖から 8 糖程度のオリゴ糖が「側鎖」として連結する「クシ型構造」を呈することが見出されている (Fig. 1)。これらの構造研究の過程で例外なく行われてきた手法は、マンナン分子を何らかの方法で分離精製後、核磁気共鳴法 (NMR 法) により分析することで糖鎖の化学構造に関する情報を得ることである。マンナンを分離精製するために繁用される方法は、Fehling 液沈

殿法⁴⁾ と Cetavlon 法⁵⁾ であるが、いずれの方法も乾燥菌体から得られる熱水抽出物 (粗抽出物) から最終目的のマンナン分子を得るまでに 3 ~ 4 日間を要する。

今回、我々は長時間におよぶマンナン精製過程を省略し、*Candida* 属の菌体粗抽出物を直接 NMR 分析しても細胞壁マンナンの糖鎖構造に関するおおよその知見が得られることを見出したので報告する。

方 法

1. 使用菌株

Candida albicans NBRC 10108 株 (血清型 B) は、独立行政法人・製品評価技術基盤機構 (千葉) より購入した。

2. 菌の培養

酵母エキス加サブロー液体培地 (Yeast Extract 0.5%、Peptone 1.0%、Glucose 2.0%) を用い、26°C、100rpm で 72 時間振とう培養した。

3. 粗抽出物の調製

培養液に少量のホルムアルデヒドを加えて菌を不活化し、上清を取り除いて生理食塩水で 3 回洗浄を繰り返した後、遠心分離 (4°C、3,000

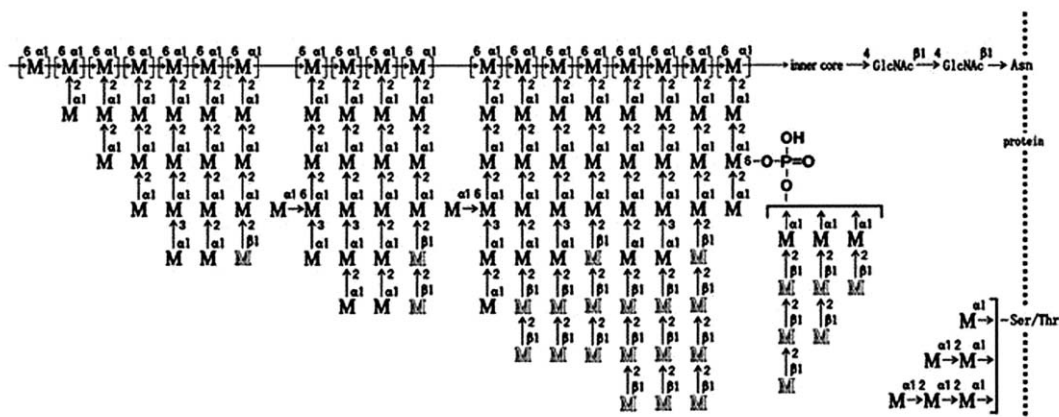


Fig. 1. Overall chemical structure of cell wall mannan of pathogenic yeast genus *Candida*. M, GlcNAc, Ser, and Thr denote D-mannose, N-acetyl-D-glucosamine, Serine, and Threonine residues, respectively.

rpm、10分間)して菌体を集め、アセトンによって脱脂処理後、デシケーター上で乾燥した。Kobayashi らの方法⁶⁾に従い、脱脂乾燥菌体に適量の精製水を加えて130°Cで180分間熱水抽出を行い、遠心分離した上清を48時間流水透析して濃縮後、凍結乾燥して粗抽出物とした。粗抽出物の収率は、脱脂乾燥菌体の17.1%であった。

4. マンナンの調製

Kobayashi らの方法⁴⁾に従い、Fehling 液 (CuSO₄ 及び NaOH を 1 : 1 (v/v) で混合 : 用時調製) を用いて次のように行った。粗抽出物 100 mg を少量の精製水に溶解し、Fehling 液 10ml を加えて室温に10分間放置後、生じた沈殿を 3,000rpm で10分間遠心分離して集め、70°C の温湯 30ml で洗浄した。得られた銅-マンナン錯体に、アンバーライト IR-120 (H⁺型) 樹脂を適量加え、銅イオンの青色が完全に消えるまで攪拌を継続した。この混合物をガラスフィルターで濾過、48時間流水透析を経て濃縮後、凍結乾燥して調製した。マンナンの収率は、粗抽出物に対して31.3%であった。

5. 粗抽出物とマンナンのゲル濾過

粗抽出物または精製マンナンを 20mg 秤量し、Shephadex-G75 カラム (4 × 100cm) で溶出した⁷⁾。溶出は流速 0.15ml/min の水で行った。溶出液中の総糖量は、フェノール硫酸法⁸⁾により発色して 490nm で吸光度測定した。溶出液中のタンパク質量は Lowry らの Folin 改良法⁹⁾により発色して 750 nm で吸光度測定した。溶出液中の核酸含量は、各溶出液を水で 5 倍希釈した後に、260nm の吸光度を測定した⁷⁾。分子量の標準物質は、Dextran T-2000、T-250、T-40 及び T-10 を用いた。

6. ¹H-NMR 分析

Nuclear magnetic resonance (NMR) は、日本電子 JNM-AL400 (400MHz) 核磁気共鳴装置を用いて測定した。粗抽出物 30mg 及び精

製マンナン 20mg を秤量し、D₂O 0.7ml に溶解して45°Cで測定した¹⁰⁾。プロトンシグナルの内部標準物質として、アセトン (2.217ppm) を用いた。

結果及び考察

Candida 属酵母のうち、その細胞壁マンナンの化学構造が比較的複雑とされる *C. albicans*¹¹⁾ を実験材料に選び、以降の実験を進めた。

粗抽出物の Bio-Gel A-5m カラムによるゲル濾過の結果 (Fig. 2A)、分子量約25万を中心に分布する多糖のピークと、分子量約1~4万を中心に分布する可溶性タンパク質及び核酸のピークが得られた。D-マンノースおよび牛血清アルブミンを糖およびタンパク質の各標準物質として用い、粗抽出物中の総糖量、総タンパク質量及び核酸含量を求めた結果、各々72.8 (w/w) % 20.5 (w/w) %及び5.1%であった。一方、Fehling 液による精製マンナンの同一カラムによるゲル濾過の結果 (Fig. 2B)、タンパク質と核酸類のピークが明らかに小さくなったことより、多くの低分子タンパク質が精製過程で除去されたことがわかる。マンナン中の総糖量、総タンパク質量及び核酸含量を求めた結果、各々92.3 (w/w) %、5.9 (w/w) %及び0.1%であった。ここで少量検出されたタンパク質の一部は、ハイマンノース型の糖タンパク質複合体であるマンナンのコア部分に相当するタンパク質と考えられる。

粗抽出物を ¹H-NMR 分析した結果 (Fig. 3A)、広範囲におよぶブロードなシグナルが見られる。高磁場領域 (1~3.5 ppm) におけるシグナルは、可溶性タンパク質に起因するものと考えられ、低磁場領域 (5.5ppm 以上) のブロードシグナルは、核酸のリン酸基 (リン酸ジエステル結合) 等に起因するものと考えられる。一方、精製マンナンの ¹H-NMR パターン (Fig. 3B) のこれらの領域においては、可溶性タンパク質や核酸が除去された結果、高磁場領域 (1~3.5ppm) および低磁場領域 (5.5ppm 以上) の

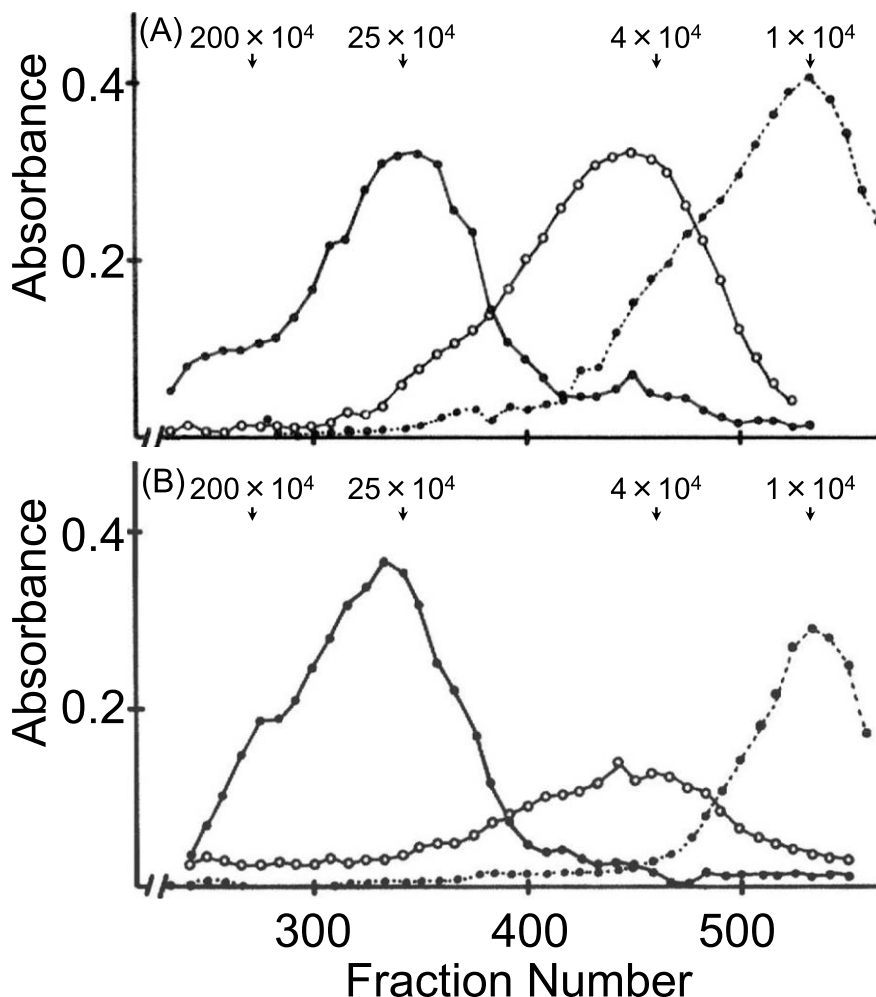


Fig. 2. Elution patterns of crude extract (A) and mannan (B) obtained from *C. albicans* cells on a column of Sephadex G-75, 4×100cm. The arrows indicate the elution positions of Dextran T-2000, T-250, T-40, and T-10, and numbers subsequently indicate the molecular weights. Carbohydrate content (○) was measured by the Phenol-H₂SO₄ method. Protein content (●) was measured by Lowry-Folin method. Nucleic acid content (×) was measured by absorption at 260nm.

ブロードシグナルがほぼ消失したものと解釈できる。

マンナンを構成するマンノース残基に基づくアノメリックプロトンシグナルは、4.5～6.0ppmに出現することが知られている。精製マンナンの¹H-NMRスペクトルにおける本領域に観察されるシグナルは極めてシャープであることから、マンナンが良好に分離精製されていることを示す (Fig. 3B)。一方、粗抽出物におけるこの領域のスペクトル (Fig. 3A) は、4.5～5 ppm

付近が不明瞭になるものの、ほぼ精製マンナンと同等のシグナルパターンを与えた。すなわち、いずれのスペクトルパターンにも、α-1,6結合マンノース残基に関連する 4.92ppm のシグナル、非還元末端α-1,2結合マンノース残基に関連する5.06 ppm のシグナル、中間α-1,2結合マンノース残基の存在を示す 5.06ppm のシグナル、α-1,3結合マンノース残基に関連する5.37ppm のシグナル、リン酸ジエステル結合マンノース残基の存在を示す5.55ppm 付近のカル

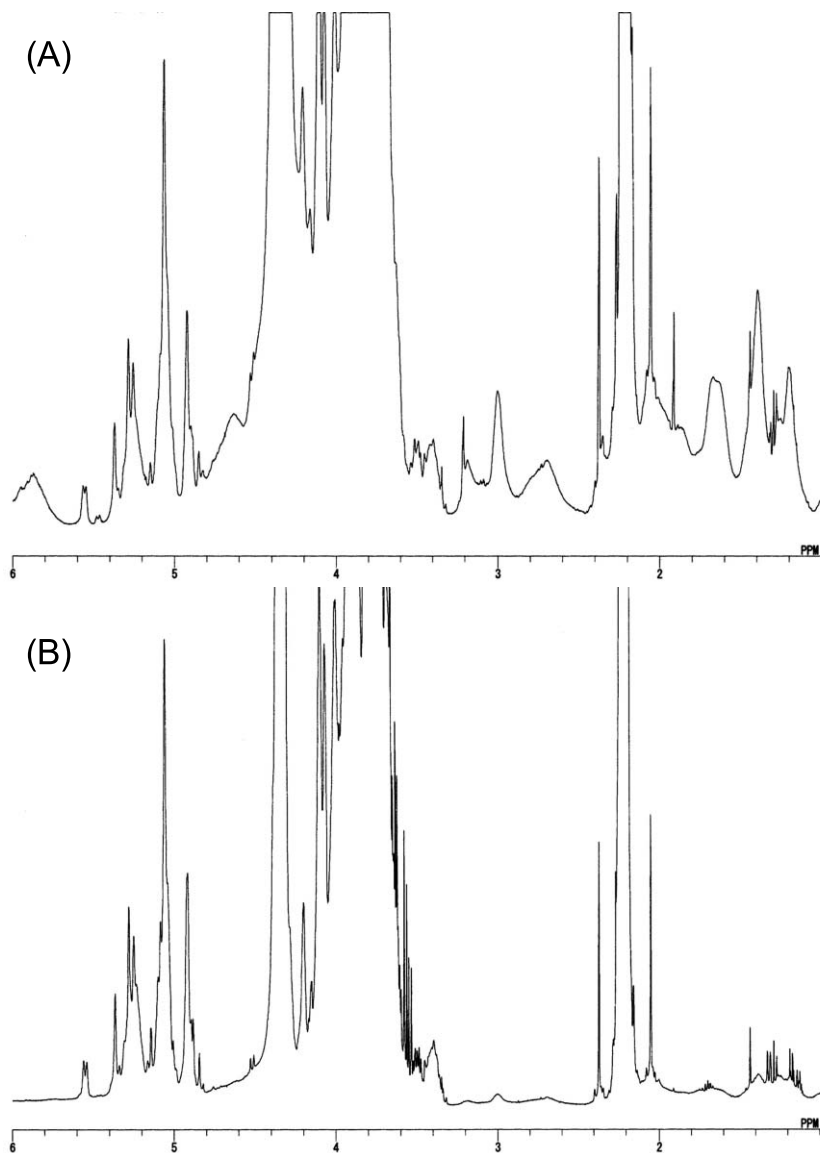


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra of crude extract (A) and mannan (B) obtained from *C. albicans* cells measured in D_2O at 45°C , respectively. Acetone (2.217ppm) was used as an internal standard.

レットシグナルが観察された。

今回の我々の研究で、酵母細胞壁マンナンの化学構造に関する情報は、粗抽出物からマンナンを精製する前段階である粗抽出物の NMR 分析で、精製マンナンの場合とほぼ匹敵する情報が得られることが明らかになった。酵母マンナンの詳細な化学構造を分析する場合、少なくとも菌体の粗抽出物からマンナン分子を精製する

ことが必須である¹³⁾。しかし、それ以降の構造解析の方法はマンナンを構成するマンノース残基の結合様式によって大きく異なる¹⁴⁻¹⁶⁾。従って、長時間におよぶ Fehling 法や Cetavlon 法による精製を行う前に、粗抽出物の段階で NMR 分析を行い、より早くマンナン分子の構造に関する情報を得ることは、以降の実験操作をスムーズに進行させるために極めて有意義である。

引用文献

- 1) Mean M., Marchetti O., Calandra T. (2008) 'Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit.' *Critical Care* 12(1), PP. 204-216.
- 2) Ghannoum M. A., Herbert J., Isham, N. (2011) 'Repeated exposure of *Candida* spp. to miconazole demonstrates no development of resistance.' *Mycoses* 54(4), PP. 175-177.
- 3) Shibata N., Kobayashi H., Suzuki S., (2012) 'Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan.' *Proc. Jpn. Acad. Sci. Ser. B*, 88(6), PP. 250-265.
- 4) Kobayashi H., Oyamada H., Matsuda K., Shibata N., Suzuki S., (2003) 'Distribution of antigenic oligomannosyl side chains in the cell wall mannans of several strains of *Candida tropicalis*.' *Arch. Microbiol.* 180, PP. 76-80.
- 5) Kobayashi H., Shibata S., Yonezu T., Suzuki S. (1987) 'Structural study of phosphomannan-protein complex of *Citeromyces matritensis* containing β -1,2 linkage: Application of partial acid degradation and acetolysis techniques under mild conditions.' *Arch. Biochem. Biophys.* 256(1), PP. 381-396.
- 6) Kobayashi H., Takahashi S., Shibata N., Miyauchi M., Ishida M., Sato J., Maeda K., Suzuki S. (1994) 'Structural modification of cell wall mannans of *Candida albicans* serotype A strains grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions.' *Infect. Immun.* 62(3), PP. 968-973.
- 7) Okubo Y., Shibata S., Ichikawa T., Chaki S., Suzuki S. (1981) 'Immunochemical study on bakers' yeast mannan prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide.' *Arch. Biochem. Biophys.* 212(1), PP. 204-215.
- 8) Dubois M., Gilles, K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) 'Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.' *Anal. Chem.* 28(3), PP. 350-356.
- 9) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) 'Protein measurement with the Folin phenol reagent.' *J. Biol. Chem.* 193(1), PP. 265-275.
- 10) Kobayashi H., Kawakami S., Ogawa Y., Shibata N., Suzuki S. (2013) 'Isolation of Manno-oligosaccharides Corresponding to Antigenic Determinants of Pathogenic Yeast *Candida catenulata* Cell Wall Mannan.' *Adv. Microbiol.* 3, PP. 222-226.
- 11) Kobayashi K., Shibata S., Nakada M., Chaki S., Mizugami K., Ohkubo Y., Suzuki S. (1990) 'Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to ^1H and ^{13}C NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues.' *Arch. Biochem. Biophys.* 278(1), PP. 195-204.
- 12) Shibata N., Akagi R., Hosoya, T., Kawahara K., Suzuki A., Ikuta K., Kobayashi H., Hisamichi K., Ogawa 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(16), PP. 9259-9266.
- 13) Kobayashi H., Shibata N., Suzuki A., Takahashi S., Suzuki M., Matsuda K., Hisamichi K., Suzuki S. (1994) 'Expression of α -1,3 linkage-containing oligomannosyl residues in a cell-wall mannan of *Candida tropicalis* grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions.' *FEBS Lett.* 342(1), PP. 19-22.
- 14) Kobayashi H., Komido M., Watanabe M., Matsuda K., Suzuki M., Ikeda T., Oyamada H., Shibata N., Suzuki S. (1994) 'Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586.' *Infect. Immun.* 62(10), PP. 4425-4431.
- 15) Oyamada H., Ogawa Y., Shibata N., Okawa Y., Suzuki S., Kobayashi H. (2008) 'Structural analysis of wall mannan of *Candida sojae*, a new yeast species isolated from defatted soybean flakes.' *Arch. Microbiol.* 189, PP. 483-490.
- 16) Kobayashi H., Kawakami S., Ogawa Y., Shibata N., Suzuki S. (2013) 'Structural Investigation of Cell Wall Mannan Antigen Obtained from Pathogenic Yeast *Candida zeylanoides*.' *Open J. Med. Microbiol.* 3, PP. 139-143.