



УДК 547.458.02:543.422.23

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА,  
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА  
*YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*  
СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ПОДВАРИАНТА 1А

Командрова Н. А., Горшкова Р. П., Исаков В. В.,  
Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии  
ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

Выделен и охарактеризован О-специфический полисахарид из липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* серологического подварианта 1А. Показано, что специфический полисахарид содержит паратозу, 6-дезоксид-манно-гептозу, D-галактозу и N-ацетил-D-глюкозамин в эквимольном соотношении. На основании данных метилирования, частичного кислотного гидролиза,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии предложена структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида.

Псевдотуберкулезный микроб *Yersinia pseudotuberculosis* вызывает распространенное инфекционное заболевание — дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку и по своему антигенному составу делится на шесть серологических вариантов (сероваров) [1]. Установлено, что в последнее время в Приморском крае наряду с 1В-подсероваром циркулируют штаммы 1А-подсеровара [2].

Настоящая работа посвящена выяснению химического строения повторяющегося звена О-специфического полисахарида, полученного из липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* 1А-подсеровара (штамм № 341, патогенный для человека).

О-Специфический полисахарид  $[\alpha]_D^{20} +32^\circ$  (с 0,18; вода) получали при расщеплении липополисахарида 1% уксусной кислотой с последующей гель-фильтрацией углеводного компонента на сефадексе G-50. По данным электрофореза на бумаге, полисахарид имеет нейтральную природу.

В гидролизате специфического полисахарида бумажной и газожидкостной хроматографией (ГЖХ) идентифицированы паратоза (3,6-дидезокси-D-рибо-гексоза), D-галактоза, 6-дезоксид-манно-гептоза примерно в эквимольном соотношении.

Для определения нейтральных моносахаридов и гексозаминов специфический полисахарид гидролизовали 2 н. соляной кислотой и полученный гидролизат дезаминировали [3]. При этом ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицировали 2,5-ангидроманнозу, D-галактозу и 6-дезоксид-манно-гептозу в соотношении 0,8 : 1,0 : 0,7. Паратоза в данных условиях гидролиза разрушается. Наличие D-глюкозамина (17,17%) подтвердили аминокислотным анализом продуктов гидролиза полисахарида 4 н. соляной кислотой. Присутствие в полисахариде ацильных групп (3,4%) [4] указывает на то, что D-глюкозамин ацетилирован.

Таким образом, из приведенных выше данных следует, что повторяющимся звеном специфического полисахарида является тетрасахарид, построенный из остатков паратозы, D-галактозы, 6-дезоксид-манно-гептозы и D-глюкозамина в эквимольном соотношении.

В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР специфического полисахарида (рис. 1) в области апомерных C-атомов наблюдается два сигнала единичной интегральной интенсивности при 99,6; 102,4 м.д. и сигнал двойной интегральной интенсивности при 101,3 м.д.

Сокращения: Par — паратоза (3,6-дидезокси-D-рибо-гексоза), 6dНер — 6-дезоксид-манно-гептоза.

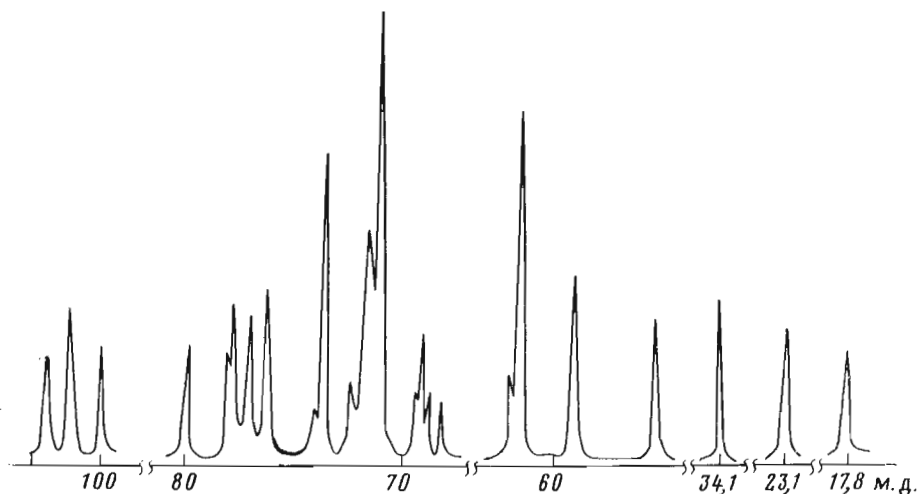


Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида 1А-подсеровара. (На рисунке не приведен сигнал 174,7 м. д., относящийся к С-О ацетиамидной группы, сигналы с малой интенсивностью относятся к примесному глюкану)

Анализ, основанный на общих закономерностях спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР углеводов [5], позволяет отнести ряд характерных сигналов. Сигнал с химическим сдвигом 17,8 м. д. относится к С-атому метильной группы 6-дезоксигексоз, а сигнал 34,1 м. д. — к С-атому метиленовых групп. Сигналы с химическими сдвигами 55,8; 23,1 и 174,7 м. д. относятся к С2-атому 2-ацетиамидо-2-дезоксигексозы и ацетиамидной группе [6]. Сигнал 61,5 м. д. указывает на наличие оксиметильных групп, а сигнал 59,0 м. д. характерен для оксиметильной группы 6-дезоксигептозы (сигнал интерпретирован из спектра моносахарида 6-дезокси-*D*-манно-гептозы) (таблица).

Следовательно, спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида подтверждает моносахаридный состав повторяющегося звена.

Для определения типов связей специфический полисахарид метилировали [7]. Полностью метилированный полисахарид подвергали метанолизу с последующим ацетилированием и смесь продуктов анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии. В виде ацетатов метилгликозидов идентифицированы 2,3,4,7-тетра-*O*-метил-6-дезоксид-*D*-манно-гептоза, 2,4,7-три-*O*-метил-6-дезоксид-*D*-манно-гептоза, 2,6-ди-*O*-метилгалактопираноза, 2-(*N*-метил)ацетиамидо-2-дезоксид-4,6-ди-*O*-метилглюкопираноза. Метилированный паратозид обнаружить не удалось из-за большой его летучести. Паратоза была идентифицирована в смеси частично метилированных ацетатов полиолов специфического полисахарида в виде 2,4-ди-*O*-метилпаратита, масс-спектр которого совпадает с масс-спектрами соответствующих производных других 3,6-дидезоксигексоз [8]. Наличие в метанолизате специфического полисахарида наряду с гликозидом 2,4,7-три-*O*-метил-6-дезоксид-*D*-манно-гептозы незначительных количеств полностью метилиро-

Химические сдвиги сигналов (м. д.) в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР О-специфического полисахарида 1А-подсеровара и модельных моносахаридов

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Par $\alpha$ →	99,6	68,0	34,1	71,1	68,9	17,8	
→ 3GlcNAc $\beta$ →	102,4	55,8	79,9	68,9	76,1	61,4	
→ 3-6dHep1 $\beta$ →	101,3	71,6	77,8	71,1	73,5	34,1	59,0
→ 3,4Gal $\alpha$ →	101,3	68,9	76,9	76,1	71,1	61,4	
6dHep1 $\beta$ →	101,3	71,2	73,5	71,2	73,5	34,1	58,8
$\alpha$ - <i>D</i> -манно-Гептоза	94,9	71,3	71,3	69,6	71,3	67,0	63,8
$\beta$ - <i>D</i> -манно-Гептоза	94,7	71,7	74,0	69,6	75,3	66,8	63,6
$\alpha$ -Par	93,4	67,8	33,6	70,4	68,8	17,5	
$\beta$ -Par	98,5	69,6	38,9	70,4	76,4	17,5	

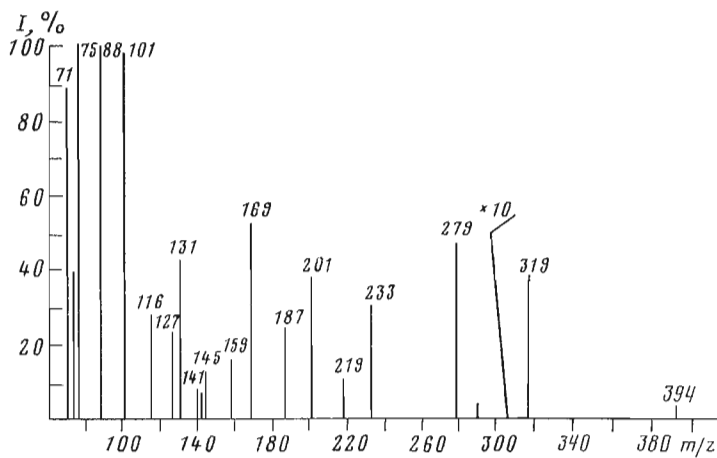


Рис. 2. Масс-спектр полностью метилированного дисахарида

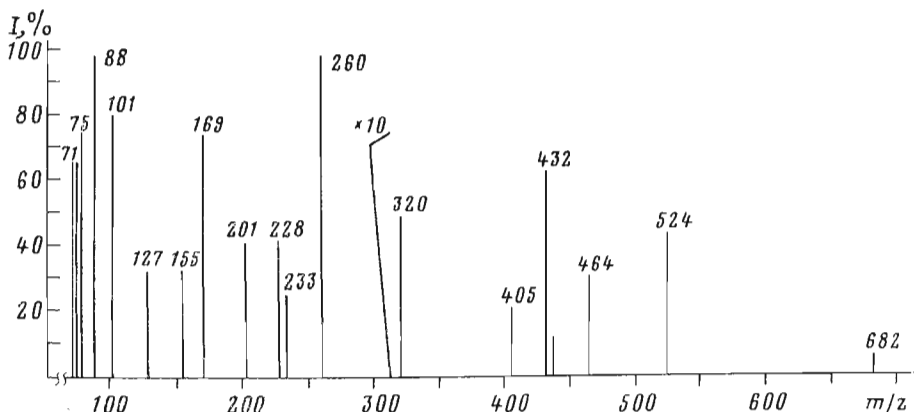


Рис. 3. Масс-спектр полностью метилированного трисахарида

ванного 6-дезоксид-манно-гептозида указывает на частичное разрушение специфического полисахарида в процессе гидролиза уксусной кислотой и отщепление при этом остатков детерминантной паратозы.

Результаты метилирования свидетельствуют о том, что специфический полисахарид представляет собой разветвленный тетрасахарид. В точке разветвления углеводной цепи полисахарида расположен остаток *D*-галактозы, концевым является остаток паратозы, связанный с остатком 6-дезоксид-манно-гептозы; остаток *D*-глюкозамина имеет замещение в положение С3.

Последовательность моносахаридных остатков в полисахариде определяли, применяя частичный кислотный гидролиз 0,1 н. соляной кислотой. Из гидролизата препаративной хроматографией на бумаге выделили олигосахаридную фракцию. В ее гидролизате ГЖХ в виде ацетатов полнолюв идентифицировали галактозу, 6-дезоксид-манно-гептозу, глюкозамин. Для определения восстанавливающего конца олигосахаридную фракцию восстанавливали, подвергали метанолизу с последующим ацетилированием и исследовали хроматомасс-спектрометрией. При этом обнаружили ацетаты метилгликозидов 6-дезоксид-манно-гептозы, галактозы и ацетаты дульцита и глюкозаминита. Одновременная идентификация дульцита и глюкозаминита свидетельствует о том, что олигосахаридная фракция является смесью двух олигосахаридов, имеющих на восстанавливающем конце соответственно галактозу и глюкозамин.

Олигосахаридную фракцию метилировали по стандартной методике [7]. Сполна метилированная олигосахаридная фракция при ГЖХ (см. «Экспериментальную часть») выходила двумя пиками, при 235 и 290° С, что

подтверждает наличие двух олигосахаридов. Масс-спектры олигосахаридов (рис. 2 и 3) указывают на то, что они представляют собой соответственно ди- и трисахарид:  $6d\text{Hex}1 \rightarrow 4\text{Gal}$ ;  $6d\text{Hex}1 \rightarrow 4\text{Gal}1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$ .

Ионы серии  $abJ$ , с  $m/z$  279 и 219 в масс-спектре дисахарида (рис. 2) свидетельствуют о наличии на восстанавливаемом конце остатка *D*-галактозы; ионы серии  $baB$ , с  $m/z$  394 и 233 подтверждают наличие 1,4-гликозидной связи между моносахаридными остатками [9]. В масс-спектре трисахарида (рис. 3) ионы с  $m/z$  682 ( $cabA_1$ ), 524 ( $abcJ_1$ ), 320 ( $bcJ_1$ ) и 260 ( $caA_2$ ) указывают на наличие остатка *D*-глюкозамина на восстанавливаемом конце. Ионы серий  $baA_1$  ( $m/z$  437),  $baA_2$  ( $m/z$  405),  $aA_1$  ( $m/z$  233),  $aA_2$  ( $m/z$  201) свидетельствуют о последовательности  $6d\text{Hex} \rightarrow \text{Gal}$ , в то время как последовательность  $\text{Gal} \rightarrow \text{GlcNAc}$  подтверждается наличием ионов серий  $bcA_2$  ( $m/z$  464),  $bcA_3$  ( $m/z$  432).

Кроме того, полностью метилированную олигосахаридную фракцию подвергали метаноллизу с последующим ацетилированием. В смеси в виде ацетатов метилгликозидов хроматомасс-спектрометрически идентифицировали 2,3,4,7-тетра-*O*-метил-6-дезоксид-*D*-манно-гептозу, 2,3,6-три-*O*-метил-*D*-галактозу и 2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксид-4,6-ди-*O*-метил-*D*-глюкозу.

Из приведенных выше данных следует, что в основной цепи полисахарида находятся остатки *D*-галактозы и *D*-глюкозамина, соединенные 1 $\rightarrow$ 3-гликозидной связью. В боковую цепь входят остатки паратозы и 6-дезоксид-*D*-манно-гептозы, которая присоединяется в 4-е положение к остатку *D*-галактозы, а паратоза соединена с остатком 6-дезоксид-*D*-манно-гептозы 1 $\rightarrow$ 3-гликозидной связью.

Конфигурацию гликозидных связей моносахаридных остатков в специфическом полисахариде определяли на основании данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии (см. таблицу).

Конфигурация гликозидной связи остатка паратозы следует из величины химического сдвига С3-атома 34,1 м.д., характерного для  $\alpha$ -аномера паратозы, находящейся в пиранозной форме (таблица).

О  $\beta$ -конфигурации гликозидной связи *D*-глюкозамина свидетельствует величина химического сдвига сигнала С2-атома 55,8 м.д., характерная для 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ -*D*-глюкопиранозиды, имеющего замещение по С3-атому [6].

Конфигурация гликозидной связи остатка *D*-галактозы следует из рассмотрения области аномерных С-атомов. Сигнал С1-атома галактозного остатка расположен в области 100–102 м.д. для  $\alpha$ -аномера и 104–105 м.д. для  $\beta$ -аномера [10]. Отсутствие в спектре полисахарида сигнала в области 104–105 м.д. позволяет утверждать, что остаток *D*-галактозы в специфическом полисахариде имеет  $\alpha$ -конфигурацию.

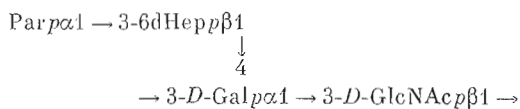
В спектре специфического полисахарида невозможно однозначно выделить сигналы, характеризующие конфигурацию гликозидной связи остатка 6-дезоксид-*D*-манно-гептозы. Анализ спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридной фракции, содержащей дисахарид  $6d\text{Hex}1 \rightarrow 4\text{Gal}$ , с привлечением данных спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы (таблица) позволил выделить сигналы 6-дезоксид-манно-гептозы (таблица). Величины химических сдвигов сигналов С3- и С5-атомов (73,5 м.д.) указывают на  $\beta$ -конфигурацию остатка 6-дезоксид-манно-гептозы.

Выводы о конфигурации гликозидных связей моносахаридных остатков подтверждает и анализ области 74–80 м.д., в которой расположены сигналы кольцевых С-атомов, участвующих в образовании гликозидной связи, и С3-, С5-атомов  $\beta$ -аномеров гексоз [5]. В данной области наблюдается только пять сигналов, четыре из которых (76,1; 76,9; 77,8; 79,9 м.д.) необходимо отнести к С-атомам, участвующим в образовании гликозидной связи, а пятый (76,1 м.д.) — к С5-атому остатка  $\beta$ -*D*-глюкозамина.

Отнесение сигналов в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида (таблица) проведено на основании данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР моносахаридов, входящих в состав полисахарида, с учетом эффектов гликозилирования [10, 11].

Таким образом, на основании результатов химического исследования и данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии повторяющегося звена специфического полисахарида из *Y. pseudotuberculosis* 1А-подсеровара может быть пред-

ставлено следующим образом:



### Экспериментальная часть

Хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-3 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3). Для обнаружения моносахаридов и аminosахаров использовали щелочной раствор азотнокислого серебра и 0,2% раствор нилгидрина в ацетоне.

Электрофорез на бумаге осуществляли в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5, при 28 В/см в течение 90 мин.

Аминокислотный анализ выполняли на аминокислотном анализаторе LKB-Biocal 32001 (Швеция) в колонках (45×0,9 см), упакованных смолой Jeol LC-R-2.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141.

Газожидкостную хроматографию проводили на хроматографе Pye-Universal 104 с пламенно-ионизационным детектором на стеклянных колонках А (150×0,4 см), содержащей 3% QE-1 на газхроме Q (100—120 меш), и В, содержащей 5% SE-30 на хроматоне (100—120 меш). Моносахариды анализировали на колонке А в виде ацетатов полиолов (175—225° С, 5°/мин), ацетатов частично метилированных метилгликозидов и полиолов (120—225° С, 5°/мин), метилированную олигосахаридную фракцию — на колонке В (200—290° С, 5°/мин).

Хроматомасс-спектрометрию выполняли на приборе LKB-9000 при использовании колонок А и В.

Спектры <sup>13</sup>С-ЯМР снимали на приборе Bruker Physics HX-360 с рабочей частотой по углероду 90,55 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали метанол (49,6 м.д.). Химические сдвиги пересчитаны относительно тетраметилсилана. Полисахарид и олигосахаридную фракцию исследовали растворенными в D<sub>2</sub>O.

Использовали микроорганизм *Y. pseudotuberculosis* 1А-подсеровара (штамм № 341, патогенный для человека). Бактерии выращивали, применяя неорганическую среду с пептоном [12]. Микробную массу выделяли из раствора на проточной центрифуге, промывали ацетоном и сушили.

**Липополисахарид** выделяли из сухих бактериальных клеток (60 г) методом Вестфэля [13] экстракцией горячим водным фенолом. Примесь нуклеиновых кислот удаляли трехкратным ультрацентрифугированием при 105 000g в течение 3 ч. Осадок липополисахарида сушили липофильно. Выход липополисахарида 820 мг.

**О-Специфический полисахарид.** Липополисахарид (500 мг) гидролизуют 1% уксусной кислотой (50 мл) 2,5 ч при 100° С. Липид А (182 мг), выпавший в осадок, удаляли ультрацентрифугированием в течение 1 ч при 105 000g. Супернатант сушили липофильно, затем растворяли в 5 мл дистиллированной воды и добавляли 25 мл этанола. Осадок полисахаридной фракции отделяли центрифугированием и разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 на высокомолекулярную (47 мг) и низкомолекулярную (83 мг) фракции.

Высокомолекулярная фракция представляет собой О-специфический полисахарид,  $[\alpha]_D^{20} +32^\circ$  (с 0,18; вода).

**Частичный кислотный гидролиз.** О-Специфический полисахарид (160 мг) гидролизуют 0,1 н. соляной кислотой в течение 30 мин при 100° С. Кислоту удаляли четырехкратным упариванием с метанолом. С помощью препаративной хроматографии на бумаге выделяли олигосахаридную фракцию (9 мг),  $R_{\text{Gal}} 0,55$ ,  $[\alpha]_D^{20} +20^\circ$  (с 0,75; вода).

**Метилирование.** О-Специфический полисахарид (10 мг) и олигосахаридную фракцию (5 мг) метилировали по описанной методике [7]. Ме-

тилированный полисахарид очищали диализом, олигосахаридную фракцию экстрагировали хлороформом.

Полностью метилированный полисахарид (~5 мг) и олигосахаридную фракцию (~5 мг) подвергали метанолизу (хлорная кислота — метанол, 1 : 10; 1 мл) при 100°С в течение 4 ч, нейтрализовали дауэксом (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>), упаривали, ацетилювали, анализировали хроматомасс-спектрометрически.

Другую часть полностью метилированного полисахарида (~5 мг) нагревали с 90% муравьиной кислотой (1 мл) 2 ч при 100°С и концентрировали досуха. Остаток гидролизовали 0,13 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 мл) 12 ч при 100°С, нейтрализовали углекислым барием, дехонизовали смолой КУ-2 (Н<sup>+</sup>) и упаривали. Моносахариды идентифицировали в виде ацетатов полиолов с помощью хроматомасс-спектрометрии [8].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Tsubakura M., Itagaki K., Kawamura K., Sasaki T., Nagai T.* Jap. J. Vet. Sci., 1971, v. 33, № 3, p. 137—144.
2. *Кузнецова Т. А., Беседнова Н. Н., Шаранова Т. А., Горшкова Р. П., Командрова Н. А., Тимченко Н. Ф.* Ж. микробиол., 1981, т. 5, с. 111—112.
3. *Nase S., Matsushima J.* J. Biochem. (Tokyo), 1969, v. 66, № 1, p. 57—62.
4. *Trutnovsky H., Sakla A. B., Taleb S. A.* Microchem. J., 1975, v. 20, p. 415—420.
5. *Шашков А. С., Чижов О. С.* Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437—497.
6. *Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1495—1506.
7. *Накомори С. J.* Biochem. (Tokyo), 1964, v. 55, № 2, p. 205—208.
8. *Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S.* Carbohydr. Res., 1968, v. 8, № 1, p. 43—45.
9. *Чижов О. С., Полякова Л. А., Кочетков Н. К.* Докл. АН СССР, 1964, т. 158, № 3, с. 685—688.
10. *Шашков А. С.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 246—252.
11. *Шашков А. С., Усов А. И., Киурель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1364—1371.
12. *Ovodov Yu. S., Gorshkova R. P., Tomshich S. V.* Immunochem., 1974, v. 11, № 2, p. 777—780.
13. *Westphal O., Luderitz O., Bister F.* Z. Naturfor., 1952, v. 7B, № 1, p. 148—155.

Поступила в редакцию  
15.VI.1983  
После доработки  
30.VIII.1983

### STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE ISOLATED FROM LIPOPOLYSACCHARIDE OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* 1A SEROVAR

KOMANDROVA N. A., GORSHKOVA R. P., ISAKOV V. V., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Biorganic Chemistry, Far East Sciences Center,  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

An O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide *Yersinia pseudotuberculosis* 1A serovar has been isolated and characterized. This compound was shown to contain residues of paratose, 6-deoxy-D-manno-heptose, D-galactose and 2-amino-2-deoxy-D-glucose in equimolar ratios. Using methylation studies, partial acid hydrolysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, the following structure was proposed for the repeating unit of the O-specific polysaccharide:

