



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 14 * № 11 * 1988

УДК 577.114.5.088:579.842.16

СТРОЕНИЕ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *KLEBSIELLA OZAENAE* K4, СОДЕРЖАЩЕГО 3-ДЕЗОКСИНОУЛОЗОНОВУЮ КИСЛОТУ

Книрель Ю. А., Мамонтова В. А.*^{*}, Кочарова Н. А.,
Шашков А. С., Соловьева Т. Ф.*^{*}, Кочетков Н. Е.

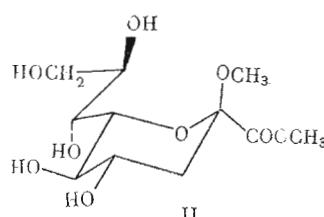
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
Академии наук СССР, Владивосток

Klebsiella ozaenae (серотип K4) является возбудителем озены — тяжелого заболевания верхних дыхательных путей человека [1]. Установлено, что антигенный капсулный полисахарид (КПС) штамма *K. ozaenae*, выделенного от больного, имеет повторяющееся звено, включающее D-глюкозу, D-маннозу и D-глюкуроновую кислоту в соотношении 2 : 1 : 1, а также О-ацетильную группу [2]. В то же время в составе КПС музейного штамма *K. ozaenae* 2211 (серотип K4) обнаружена 3-дезоксиноулозоновая кислота [3]. В настоящем сообщении приведены результаты идентификации этой кислоты и установления структуры КПС штамма 2211.

¹³C-ЯМР-спектр КПС указывал, что этот полимер построен из пентасахаридных повторяющихся звеньев (присутствовали сигналы пяти аномерных атомов углерода в области 100,6—105,2 м. д.), содержащих три остатка гексоз (сигналы трех гидроксиметильных групп в области 61,6—62,2 м. д.), остаток уроновой кислоты (сигнал C6 при 175,1 м. д.), остаток 3-дезоксиноулозоновой кислоты (сигналы C1, C3 и C9 с типичными химическими сдвигами 176,4; 41,7 и 64,3 м. д. соответственно) и О-ацетильную группу (сигнал CH₃ при 22,3 м. д., CO при 174,3 м. д.).

Анализ гидролизата КПС с помощью углеводного анализатора привел к идентификации глюкозы и маннозы в соотношении 3 : 1 и глюкуроновой кислоты. D-Конфигурация глюкозы и глюкуроновой кислоты была установлена по окислению D-глюкозооксидазой (для уроновой кислоты после ее восстановления в глюкозу), D-конфигурация маннозы — по величине удельного оптического вращения. Кроме моносахаридов в гидролизате была обнаружена альдебиоуроновая кислота α -D-GlcA-(1→3)-D-Man (I), строение которой было установлено методом ¹H-ЯМР-спектроскопии с применением ядерного эффекта Оверхаузера. Присутствием этого дисахарида объясняется заниженное относительное содержание маннозы в гидролизате КПС (Glc : Man ~3 : 1 вместо ожидаемого ~2 : 1). Таким образом, совокупность данных моносахаридного анализа и ЯМР-спектроскопии указывает на то, что в состав КПС входят D-глюкоза, D-манноза, D-глюкуроновая кислота, 3-дезоксиноулозоновая кислота и О-ацетильные группы в соотношении ~2 : 1 : 1 : 1 : 1.



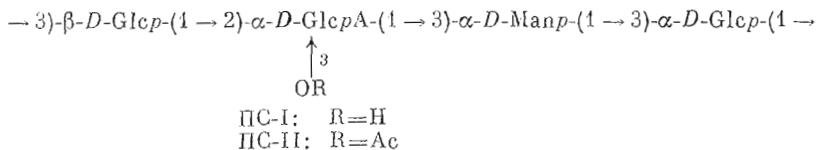
Для идентификации 3-дезоксионулозоновой кислоты КПС был подвергнут метанолизу, который привел к гликозиду (II), выделенному ВЭЖХ на обращенной фазе C18. Он был идентичен по времени удерживания и ^1H -ЯМР-спектру заведомому образцу (полученному дезаминированием действием HNO_2 метилового эфира метилгликозида нейраминовой кислоты [4]) и имел близкое с ним удельное оптическое вращение. Таким образом, присутствующий в КПС высший сахар имеет такую же конфигурацию, что и нейраминовая кислота, т. е. является 3-дезокси-D-глициро-D-галакто-ионулозоновой кислотой. Этот же моносахарид, предположительно с такой же абсолютной конфигурацией, был найден недавно в гликопротеине икры радужной форели *Salmo gairdneri* [5].

Конфигурация гликозидной связи 3-дезоксионулозоновой кислоты в КПС была установлена по данным ^1H -ЯМР-спектра. Положение сигналов протонов Н3а и Н3е (1,54 и 2,59 м. д. соответственно) свидетельствовало об аксиальной ориентации карбоксильной группы (при ее экваториальной ориентации разница между химическими сдвигами этих протонов не превышает 0,8 м. д. [6]; например, в β -гликозиде (II) она составляет 0,61 м. д.). Следовательно, остаток высшего кетосахара в КПС имеет α -конфигурацию.

Константы спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$, определенные из снятого без подавления С,Н-взаимодействий ^{13}C -ЯМР-спектра КПС, показывали, что все четыре альдозных остатка находятся в пиранозной форме, три из них присоединены α -гликозидными связями, а четвертый — β -гликозидной связью [7].

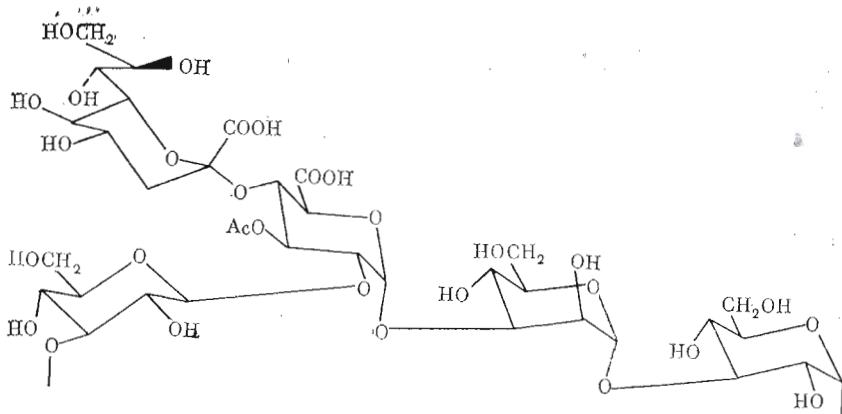
Мягкий кислотный гидролиз КПС разбавленной CH_3COOH удалял остатки 3-дезоксионулозоновой кислоты и одновременно О-ацетильные группы и привел к модифицированному полисахариду (ПС-І). Анализ методом метилирования показал, что в КПС и ПС-І оба остатка глюкозы и остаток маннозы замещены в положение 3, а остаток глюкуроновой кислоты в КПС замещен в положения 2 и 4, а в ПС-І — только в положение 2. Таким образом, ПС-І является линейным, а КПС — разветвленным, с остатком глюкуроновой кислоты в узле разветвления и терминальным остатком 3-дезоксионулозоновой кислоты.

Структура ПС-І была установлена методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии с использованием компьютерного подхода, основанного на расчете спектров для всех возможных линейных структур полисахарида данного моносахаридного состава и выборе структуры, спектр которой наилучшим образом удовлетворяет экспериментальному спектру [8]. В результате расчета была найдена единственная структура (она приведена ниже), которая одновременно удовлетворяет данным ^{13}C -ЯМР-спектра, данным метилирования и образованию при гидролизе КПС дисахарида (І).



Распад КПС по Смиту привел к удалению остатков 3-дезоксионулозоновой кислоты и образованию другого модифицированного полисахарида (ПС-ІІ), содержащего О-ацетильные группы. ПС-ІІ был устойчив к периодатному окислению, и, следовательно, О-ацетильные группы находятся в положении 3 остатков глюкуроновой кислоты, так как при любом другом их положении эти остатки подверглись бы разрушению.

Таким образом, на основании полученных данных КПС *K. ozaenae* (K4), штамм 2211, имеет следующую структуру:



Эта структура отличается от структуры КПС штамма этого серотипа, выделенного от больного [2], присутствием дополнительного остатка 3-дезокси-D-глицеро-D-галакто-нонулозоновой кислоты, присоединенного в виде ответвления, и взаимным расположением остатков α - и β -глюкозы в основной цепи.

Авторы благодарят Г. М. Липкинда (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР) за проведение компьютерного анализа ^{13}C -ЯМР-спектра.

ЛИТЕРАТУРА

- Красильников А. П., Мякинников М. В., Крылов И. А. Озена. Минск: Беларусь, 1974. 125 с.
- Merrifield E. H., Stephen A. M. // Carbohydr. Res. 1981. V. 96. № 1. P. 113–120.
- Елькин Ю. Н., Мамонтова В. А., Соловьева Т. Ф. // Химия природн. соедин. 1985. № 1. С. 115–116.
- Mononen I. // Carbohydr. Res. 1981. V. 88. № 1. P. 39–50.
- Nadano D., Iwasaki M., Endo S., Kitajima K., Inoue S., Inoue Y. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 25. P. 11 550–11 557.
- Dabrowski U., Friebolin H., Brossmer R., Supp M. // Tetrahedron Lett. 1979. № 48. P. 4637–4640.
- Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
- Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59–75.

Поступило в редакцию
13.VI.1988

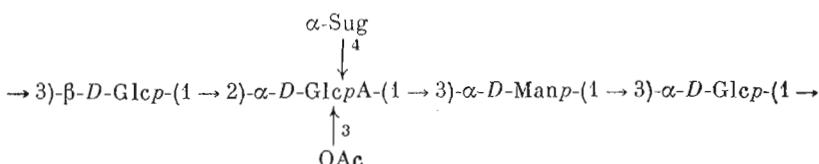
STRUCTURE OF THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE OF *KLEBSIELLA OZAENAE* K4 CONTAINING A 3-DEOXYNONULOSONIC ACID

KNIREL Y. A., MAMONTOVA V. A.*^{*}, KOCHAROVA N. A., SHASHKOV A. S.,
SOLOV'EVA T. F.*^{*}, KOCHETKOV N. K.

Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;

* Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East
Branch of Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid was identified as a component of the *Klebsiella ozaenae* K4 capsular polysaccharide. On the basis of methylation, complete and partial acid hydrolyses, Smith degradation, and NMR analysis including computer-assisted ^{13}C NMR evaluation, the following structure of the polysaccharide has been established:



where Sug is the residue of the above-mentioned nonulosonic acid.