



УДК 547.455.62/233.1:577.124.5

ОБРАЗОВАНИЕ УРИДИНИРОФОСФАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ХИНОВОЗАМИНА И ФУКОЗАМИНА С ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМОЙ
ИЗ *STREPTOMYCES CHRYSOMALLUS* sp. 2Дружинина Т. Н., Гошадзе М. Ш., Стрешинская Г. М.*,
Шибанов В. Н.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;

* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Продемонстрировано превращение UDP-GlcNAc в производные хиновозамина и фукозамина под действием бесклеточной системы из *Streptomyces chrysomallus* sp. 2 в присутствии NAD⁺ и NADH или NADPH; одновременно происходит образование UDP-GalNAc. Биосинтез 2-ацетида-2,6-дидезоксигексоз происходит, по-видимому, через промежуточное образование производного 2-ацетида-2,6-дидезоксигексозулозы-4, накапливающегося при проведении реакции без восстановленных кофакторов.

Тейхоевые кислоты являются одним из основных компонентов клеточной стенки грамположительных бактерий. Тейхоевая кислота обычно связана с пептидогликаном через олигомер, называемый областью связи. В настоящее время известно несколько типов структур «области связи», в состав которых входят дисахариды: Glc-GlcNAc и ManNAc-GlcNAc [1–6].

Как нами было показано ранее [7, 8], тейхоевая кислота представителя актиномицетов *Streptomyces chrysomallus* sp. 2 относится к типу рибиттейхоевых кислот и «область связи» между тейхоевой кислотой и пептидогликаном содержит остатки глицерофосфата, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, N-ацетилхиновозамина (QuiNAc) и N-ацетилфукозамина. Моносахаридная последовательность в «области связи» *S. chrysomallus*, а также абсолютная конфигурация 2-ацетида-2,6-дидезоксигексоз пока не установлены. Остатки N-ацетилглюкозамина являются компонентами всех известных в настоящее время олигосахаридов «области связи», остатки же галактозамина, хиновозамина и фукозамина ранее не были найдены в составе таких олигосахаридов.

При сборке олигосахаридной последовательности «области связи» донорами моносахаридных остатков служат нуклеотидсахара [9]. Источником остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина обычно служат производные уридицирофосфата, а биосинтез нуклеотидсахаров, производных дидезоксиаминогексоз, практически не изучен. Целью настоящей работы было исследование возможности образования нуклеотидсахаров — предполагаемых доноров N-ацетилированных остатков хиновозамина и фукозамина — при биосинтезе «области связи» из UDP-GlcNAc с ферментной системой из *S. chrysomallus* sp. 2.

Известно, что ферменты, осуществляющие превращение нуклеотидсахаров, локализованы в цитоплазме, и в качестве источника ферментов мы использовали фракцию цитоплазмы, полученную после разрушения клеток стрептомицета действием ультразвука и отделения клеточной стенки и мембран.

Для получения нуклеотидсахаров цитоплазматическую фракцию *S. chrysomallus* sp. 2 инкубировали с NAD⁺, NADPH (или NADH) и UDP-GlcNAc или UDP-[¹⁴C]GlcNAc. Белки удаляли осаждением этанолом и фракцию нуклеотидсахаров выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-15 (22–38 мл рис. 1) и далее разделяли хроматографией на бумаге (система А).

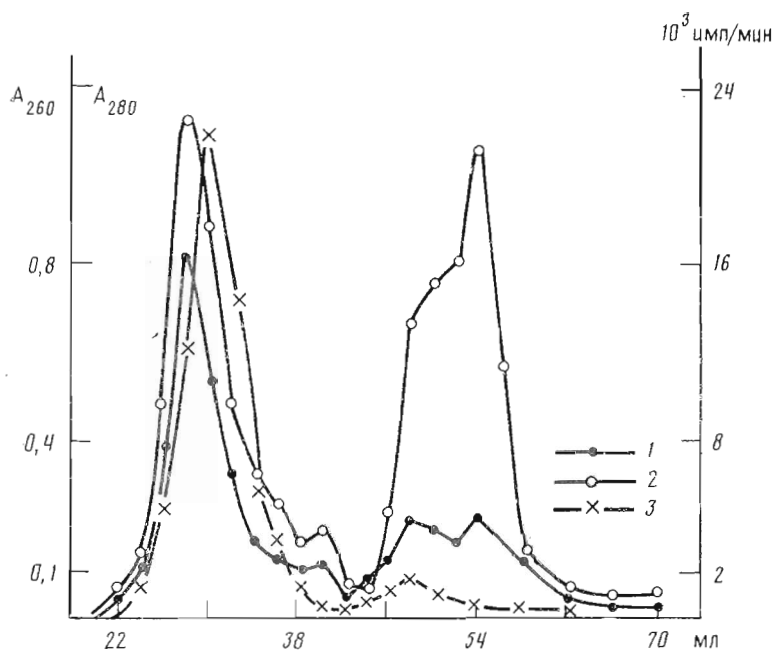


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-15 инкубационной смеси: 1 и 2 — поглощение при 280 и 260 нм, 3 — распределение радиоактивности

Во фракции нуклеотидсахаров были обнаружены три компонента. Соединения с R_f 0,53 и 0,57 по хроматографической подвижности совпали с UDP-GalNAc и UDP-GlcNAc соответственно. Третий компонент с R_f 0,62, как показал последующий анализ на анализаторе аминокислот, соответствовал UDP-QuiNAc и UDP-FucNAc. Все соединения являются производными уридина, что следует из УФ-спектров после их элюции с хроматограммы с максимумом поглощения при 260 нм.

Для решения вопроса о том, являются ли полученные продукты пирофосфатными производными нуклеотида, фракцию, полученную после гель-фильтрации и содержащую радиоактивные нуклеотидсахара, анализировали электрофорезом на бумаге при pH 7,5 и 4,5 (системы Б и В). Было обнаружено, что в том и другом случае 90% радиоактивности сосредоточено в зоне UDP-[^{14}C]GlcNAc, т. е. образующиеся продукты являются двузамещенными пирофосфатами.

Материалом для анализа углеводного компонента на анализаторе аминокислот служили фракции, полученные при гель-фильтрации, и элюаты с хроматограмм (система А) после их жесткого кислотного гидролиза. Наряду с глюкозаминном (время удерживания $t=24$ мин) были обнаружены три аминоксахара — галактозамин ($t=27$ мин), хиновозамин ($t=31$ мин) и фукозамин ($t=35$ мин) — при детекции как пингидридом, так и по радиоактивности. Степень превращения UDP-[^{14}C]GlcNAc, оцененная по данным анализа на анализаторе аминокислот, колебалась в зависимости от использованной порции клеток, и максимальный выход UDP-[^{14}C]GalNAc составлял 50% от исходного субстрата, а для производных 2-амино-2,6-дидезоксигексоз не превышал 10%. В пробе, содержащей UDP-[^{14}C]GlcNAc, помимо упомянутых четырех аминоксахаров обнаружили небольшие количества (<5%) еще двух радиоактивных компонентов, элюирующихся после хиновозаминна с $t=32$ и 33 мин. Природа этих веществ пока нами не установлена.

Известно, что при биосинтезе различных производных 6-дезоксигексоз промежуточными соединениями являются производные 6-дезоксигексозулоз-4 [10]. Чтобы проверить, не протекает ли в нашем случае процесс через образование такого рода соединений, мы провели инкубацию NAD $^+$

и UDP-GlcNAc с цитоплазматической фракцией *S. chryso-mallus* sp. 2. При этом наблюдали образование продуктов, имеющих характерные для гексозулоз-4 УФ-спектры поглощения в щелочной среде (λ_{\max} 325 нм)

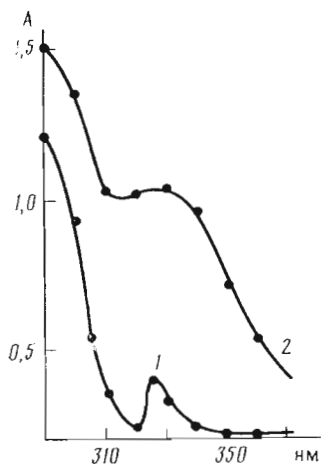


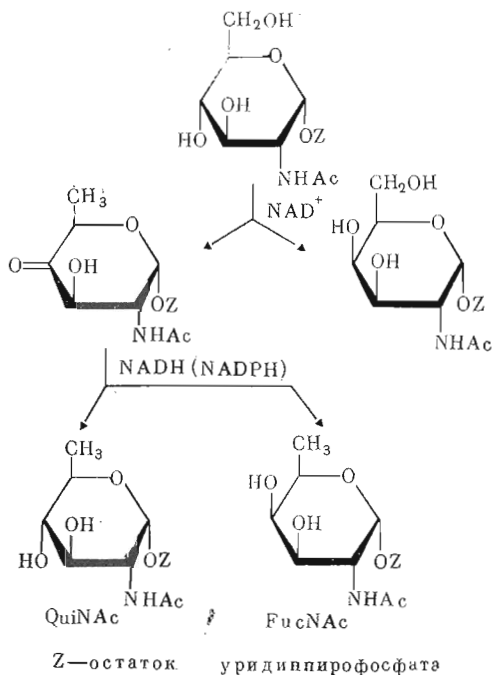
Рис. 2. Спектры поглощения продукта превращения UDP-GlcNAc при инкубации с цитоплазматической фракцией, снятые в 0,1 н. NaOH (1) и после взаимодействия продукта с *o*-фенилендиамином (2)

[11, 12] и при реакции с *o*-фенилендиамином (λ_{\max} 330 нм) [12–14] (рис. 2). Образование производных гексозулоз из UDP-GlcNAc было отмечено ранее с ферментными системами *Citrobacter freundii* [11] и *Streptococcus pneumoniae* [14], но их ферментативное восстановление не было продемонстрировано.

Таким образом, мы показали, что *S. chryso-mallus* sp. 2 обладает набором ферментов, катализирующих целый ряд превращений UDP-GlcNAc. Превращение UDP-GlcNAc в UDP-GalNAc происходит, очевидно, под действием UDP-GlcNAc-4-эпимеразы, которая раньше была обнаружена в клетках ряда других бактерий [15–18]. В клетках *S. chryso-mallus* sp. 2 также имеются ферменты, осуществляющие превращение UDP-GlcNAc в производные 2-ацетиамидо-2,6-дидезоксигексоз, по-видимому, через образование промежуточного соединения 4-кето-2-ацетиамидо-2,6-дидезоксигексозы (схема). Восстанавливающим агентом 4-кетогруппы одинаково эффективно служил как NADPH, так и NADH. Абсолютная конфигурация образующихся дезоксиаминогексоз осталась невыясненной; их изображение на схеме как моносахаридов *D*-ряда носит предположительный характер.

Насколько нам известно, это первый случай демонстрации фермента-

Насколько нам известно, это первый случай демонстрации фермента-



тивного синтеза производных 2-ацетиамидо-2,6-дидезоксигексоз. Можно предположить, что полученные в данной работе нуклеотидсахара выступают в качестве доноров остатков *N*-ацетилхиновозамина и *N*-ацетил-

фукозаминна в биосинтезе «области связи» между тейхоевой кислотой и пептидогликаном в этом организме.

Мы выражаем искреннюю благодарность Л. М. Лихошерстову за оказанную помощь при идентификации аминсахаров.

Экспериментальная часть

В работе использовали 24-часовую культуру клеток *S. chrysomallus* sp. 2 (логарфическая стадия роста). Клетки выращивали как описано ранее [19].

Качественные реакции на образование нуклеотид-4-кето-2,6-дидезокси-2-ацетамидогексоз проводили по описанным методам [11–13] в следующем варианте: а) 0,1 мл анализируемого раствора смешивали с 0,9 мл 0,1 н. NaOH и через 2 мин измеряли УФ-поглощение в области 290–360 нм; б) к 0,8 мл анализируемого раствора прибавляли 0,4 мл 2,5% раствора *o*-фенилендиамина в 0,25 н. HCl, кипятили на водяной бане 30 мин. После охлаждения смеси измеряли УФ-поглощение в той же области.

Гель-фильтрацию проводили в воде на сефадексе G-15, колонка 1,5×65 см. Для хроматографии и электрофореза использовали бумагу марки FN-11 и Whatman 1 и системы растворителей: этанол – 0,5 М ацетат аммония, pH 7,5; 7 : 3 (А), 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатный буфер, pH 7,5 (Б), пиридин-ацетатный буфер, pH 4,5 (В). Нуклеотидсахара обнаруживали по поглощению в УФ-свете на хроматоскопе. Для выделения зон радиоактивности бумагу разрезали на полоски 0,5×4 см и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтиляционном жидкостно-сцинтилляционном счетчике Delta 300, модель 6891 (Голландия). Жесткий кислотный гидролиз проводили в 4 н. HCl при 100° С в течение 4 ч.

Для анализа аминсахаров использовали анализатор аминокислот Т-339 (ЧССР), смола Ostion IG ANB, колонка 3,8×160 мм, 64° С, элюент – 0,35 М Na-цитратный буфер, pH 5,28. Радиоактивные аминсахара идентифицировали на анализаторе аминокислот BC-200 (ФРГ), смола UA 8, колонка 0,9×20 см, 84° С, элюент тот же. Собирали фракции по 0,5 мл и определяли радиоактивность в диоксановом сцинтиляционном анализаторе.

Ферментную систему из клеток *S. chrysomallus* sp. 2 получали после разрушения клеток ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 при 22 кГц 8–10 раз по 2–3 с, при 0–5° С в 50 мМ трис-HCl, pH 7,8, с 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ EDTA. Гомогенат центрифугировали при 8000 об/мин (20 мин) для осаждения неразрушенных клеток и клеточных стенок. Далее мембраны осаждали в течение 1 ч при 105 000 g и надосадочную жидкость использовали в качестве ферментной системы.

Инкубационная смесь содержала: 1 мМ дитиотреит, 1 мМ NAD⁺ (Serva), 1,25 мМ UDP-GlcNAc (Calbiochem, Швейцария) или 0,25 мМ UDP-[¹⁴C]GlcNAc (10 мКи/ммоль, Amersham, Англия), 1 мМ NADPH или NADH (C. F. Boehringer, ФРГ) и надосадочную жидкость, общий объем 1 мл. Смесь инкубировали 3 ч при 37° С, реакцию останавливали добавлением равного объема этанола, смесь выдерживали во льду 10 мин и центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость подвергали далее гель-фильтрации и хроматографии на бумаге. Качественные реакции на 4-кетопроизводное проводили после удаления из инкубационной смеси белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaya Sh., Yokoyama K., Araki Y., Ito E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 111. № 1. P. 312–318.
2. Harrington C. R., Baddiley J. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 153. № 3. P. 634–645.
3. Heptinstall J., Coley J., Ward P. J., Archibald A. R., Baddiley J. // Biochem. J. 1978. V. 169. № 2. P. 329–336.
4. Kaya S., Araki Y., Ito E. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 147. № 3. P. 517–522.
5. Kojima N., Araki Y., Ito E. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 148. № 1. P. 29–34.
6. Kojima N., Iida J., Araki Y., Ito E. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. № 2. P. 331–336.
7. Стрешинская Г. М., Дружинина Т. Н., Наумова И. Б., Шибяев В. Н. // Результаты и перспективы научных исследований микробных полисахаридов. Тез. докл. II Всесоюз. конф. «Результаты и перспективы научных исследований микробных полисахаридов». Л.: Ленинградский хим.-фармацевт. ин-т, 1984. С. 21–22.
8. Streshinskaya G. M., Naumova I. B. // Abstracts of 6th Intern. Symp. Biol. Actinomycetes. 1985. P. 168 Debrecen. Hungary.
9. Yokoyama K., Miyashita T., Araki Y., Ito E. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 161. № 2. P. 479–489.
10. Shibaev V. N. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1986. V. 44. P. 277–339.
11. Daniel A., Raff R. A., Wheat R. W. // J. Bacteriol. 1972. V. 110. № 1. P. 110–116.
12. Okazaki R., Okazaki T., Strominger J. L., Michelson A. M. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 10. P. 3014–3026.
13. Lanning M. C., Cohen S. S. // J. Biol. Chem. 1951. V. 189. № 1. P. 109–114.
14. Distler J., Kaufman B., Roseman S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1966. V. 116. P. 466–478.
15. Glaser L. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 11. P. 2801–2805.

16. Filer D., Kindler S. H., Rosenberg E. // J. Bacteriol. 1977. V. 131. № 3. P. 745-750.
17. Glaser L. // Biochim. et biophys. acta. 1959. V. 31. № 2. P. 575-576.
18. Yamamoto K., Kawai H., Tochikura T. // Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 41. № 2. P. 392-395.
19. Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Пакина Л. И. // Микробиология. 1979. Т. 48. № 5. С. 814-819.

Поступила в редакцию
20.VI.1988

**FORMATION OF URIDINE PYROPHOSPHATE DERIVATIVES
OF QUINOVOSAMINE AND FUCOSAMINE WITH AN ENZYME SYSTEM
FROM *STREPTOMYCES CHRYSOMALLUS* SP. 2**

DRUZHININA T. N., GOSHADZE M. Sh., STRESHINSKAYA G. M.*, SHIBAEV V. N.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; * M. V. Lomonosov Moscow State University*

Transformation of UDP-GlcNAc into UDP-derivatives of quinovosamine and fucosamine by means of the cell free system from *Streptomyces chrysomallus* sp. 2 with NAD⁺ and NADH or NADPH is demonstrated; simultaneously the formation of UDP-GalNAc was observed. Biosynthesis of 2-acetamido-2,6-dideoxyhexosamines appears to proceed through an intermediate 2-acetamido-2,6-dideoxyhexos-4-ulose derivative being accumulated in the absence of the reduced coenzymes.