



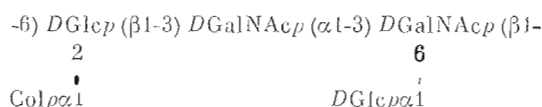
УДК 577.114.5:543.422.23

СТРОЕНИЕ O-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* СЕРОВАРА VII

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

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
Академии наук СССР, Владивосток

Выделен и охарактеризован O-специфический полисахарид из липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* серовара VII, повторяющееся звено которого представляет собой разветвленный пентасахарид. На основании данных метилирования, частичного кислотного гидролиза, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии предложена структура повторяющегося звена O-специфического полисахарида:



Как известно, псевдотуберкулезный микроб *Yersinia pseudotuberculosis* вызывает инфекционное заболевание — дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку и по своему антигенному составу делится на шесть серологических вариантов [1]. В 1984 г. японские исследователи выделили и описали три новых серологических варианта псевдотуберкулезного микроба: IIC (выделенный от человека), VII и VIII [2].

Настоящая работа продолжает систематическое изучение строения O-специфических полисахаридов из липополисахаридов *Y. pseudotuberculosis* различных сероваров и посвящена структурному исследованию O-специфического полисахарида серовара VII (штамм № 257).

Липополисахарид выделяли из сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом. Нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном. Выход липополисахарида 2,3%.

Липополисахарид обладает высокой серологической активностью, дает одну полосу преципитации при двойной диффузии в агаре.

O-Специфический полисахарид получали при автогидролизе водного раствора липополисахарида. Осадок липида отделяли ультрацентрифугированием. Полисахаридную фракцию, осажденную этанолом, подвергали гелефильтрации на сефадексе G-100. При этом были получены три фракции: резервный глюкан, выходящий сразу за свободным объемом колонки, O-специфический полисахарид и олигосахарид кора. Первая и последняя фракции в дальнейшем не исследовались. Этанольный раствор содержал колитозу и КДО. Колитозу выделяли в индивидуальном состоянии из этанольного раствора препаративной хроматографией на бумаге и идентифицировали по удельному оптическому вращению свободного моносахарида $[\alpha]_D^{+4^\circ}$ (с 0,9; H_2O) и соответствующего полиола $[\alpha]_D^{-39,8^\circ}$ (с 0,7; H_2O), что согласуется с литературными данными [3]. Кроме того, присутствие колитозы подтверждали реакцией геммаглютинации липополисахарида с антисывороткой *Y. pseudotuberculosis* серовара VI * и O-факторной сывороткой *Salmonella* 50 [5].

В гидролизате O-специфического полисахарида хроматографией на бумаге и газожидкостной хроматографией идентифицировали колитозу, глю-

Сокращения: Col — колитоза (3,6-дидезоксн-*L*-псило-гексопираноза), KDO — кетодезоксиоктоновая кислота.

* Структуру O-специфического полисахарида серовара VI см. [4].

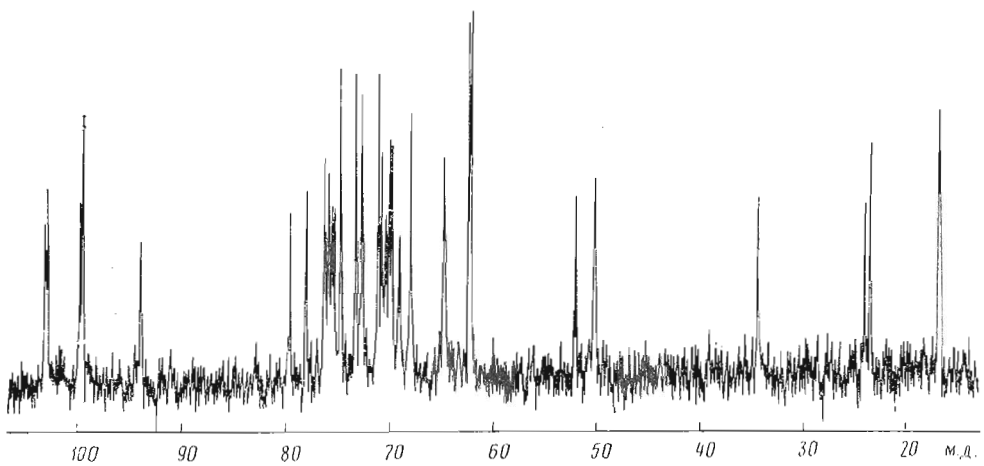


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида из ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серовара VII

козу и галактозамин в соотношении 1 : 2 : 2. Наличие галактозамина (27,8%) определяли также анализом продуктов гидролиза полисахарида 4 н. соляной кислотой с помощью аминокислотного анализатора.

В спектре ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида (рис. 1, таблица) в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдаются пять сигналов единичной интенсивности с химическими сдвигами 94,5; 99,6; 99,9; 103,0 и 103,3 м.д. Это указывает на то, что полисахарид построен из регулярно повторяющихся пентасахаридных звеньев. Отнесение некоторых сигналов в спектре очевидно из общих закономерностей в спектрах ^{13}C -ЯМР углеводов [6]. Так, сигнал с химическим сдвигом 16,7 м.д. относится к С6-атому колитозы, а сигнал при 34,3 м.д. принадлежит ее С3-атому. О наличии двух остатков 2-ацетида-2-дезоксигексоз свидетельствуют сигналы С2-атомов, связанных с ацетидамой группой (52,0 и 50,1 м.д.), а также сигналы с химическими сдвигами 23,3; 23,9 и 175,0; 175,2 м.д., относящиеся к CH_3 - и СО-атомам ацетидамидных групп. В области резонанса С-атомов гидроксиметильных групп наблюдаются два сигнала (62,2 и 62,0 м.д.) единичной интегральной интенсивности, а общее количество сигналов С6-атомов (6-дезоксидных и оксиметильных), как видно, равняется трем. Это означает, что в составе повторяющегося звена имеются два 1,6-замещенных углеводных остатка. Отнесение сигналов замещенных С6-атомов (68,9 и 67,8 м.д.) проведено с применением эксперимента по неселективному переносу поляризации [7].

Данные ^{13}C -ЯМР-спектров О-специфического и модифицированного полисахаридов (δ, м. д.)

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
О-Специфический полисахарид						
-2,6)Glcβ1-	103,3	79,5	75,5	70,7	75,9	68,9
-3)GalNAcα1-	94,5	50,1	77,9	69,9	71,0	62,2
-3,6)GalNAcβ1-	103,0	52,0	76,3	64,7	75,3	67,8
Glcα1-	99,6	72,6	74,7	70,2	73,2	62,0
Colα1-	99,9	87,8	34,3	69,7	64,6	16,7
Модифицированный полисахарид						
-6)Glcβ1-	105,3	75,5	76,9	70,6	75,8	69,2
-3)GalNAcα1-	94,5	49,3	78,9	69,6	71,0	62,2
-3,6)GalNAcβ1-	102,9	51,8	76,2	64,9	74,7	67,9
Glcα1-	99,7	72,5	74,3	70,4	73,2	62,1
Олигосахарид						
GalNAcα1-	94,8	50,6	68,9	69,5	72,4	62,1
-3)GalNAcβ1-	102,7	51,8	76,1	64,8	76,6	62,1
1Gro	77,7	63,7	62,2			

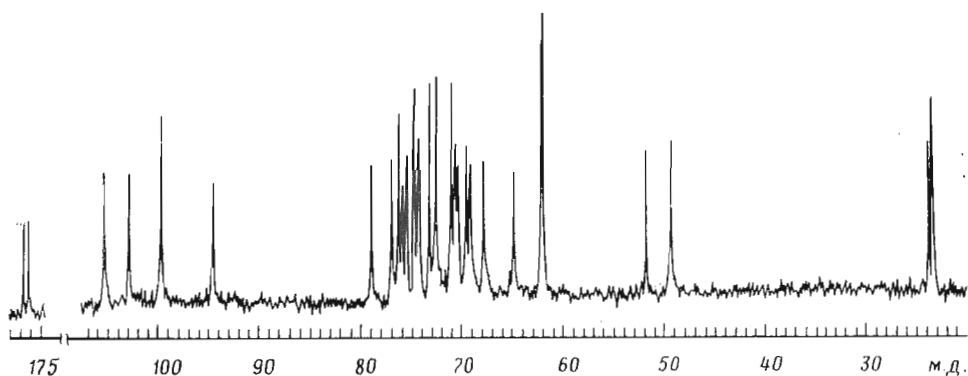


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР модифицированного полисахарида

Таким образом, результаты анализа спектра ^{13}C -ЯМР *O*-специфического полисахарида находятся в соответствии с химическими данными и свидетельствуют о том, что повторяющимся звеном *O*-специфического полисахарида является пентасахарид, содержащий остаток колитозы и по два остатка глюкозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы.

Для определения характера замещений моносахаридных остатков *O*-специфический полисахарид метилировали [8]. Полностью метилированный полисахарид подвергали метанолизу с последующим ацетилированием и смесь частично метилированных ацетатов метилгликозидов исследовали с помощью хроматомасс-спектрометрии. При этом в виде ацетатов метилгликозидов идентифицированы 2,3,4,6-тетра-*O*-метилглюкопираноза, незначительные количества 2,3,4-три-*O*-метилглюкопиранозы, 3,4-ди-*O*-метилглюкопираноза, 2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксид-4,6-ди-*O*-метилгалактопираноза и 2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксид-4-*O*-метилгалактопираноза. Наличие незначительных количеств 2,3,4-три-*O*-метилглюкопиранозы в продуктах метилирования *O*-специфического полисахарида и отсутствие его в метилированном липополисахариде, по-видимому, обусловлены отщеплением в процессе выделения от соответствующего остатка глюкозы цепи концевой остатка колитозы. Обнаружить сполна метилированную колитозу в виде ацетатов метилгликозидов не удалось из-за большой ее летучести. Из приведенных выше данных следует, что повторяющееся звено *O*-специфического полисахарида представляет собой разветвленный пентасахарид. В основной цепи полисахарида находятся остаток *D*-глюкозы, имеющий заместители в положениях 2 и 6, и два остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы, замещенных в положение 3, причем один из последних имеет также заместитель и в положении 6. В боковых цепях расположены остатки колитозы и *D*-глюкозы.

Для получения дополнительных сведений о присоединении терминальных моносахаридов *O*-специфический полисахарид подвергали мягкому кислотному гидролизу 0,25 н. серной кислотой и последующей геле-фильтрации на сефадексе G-15. При этом выделили модифицированный полисахарид, в составе которого отсутствовала колитоза.

В спектре ^{13}C -ЯМР модифицированного полисахарида (рис. 2, таблица) в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдаются 4 сигнала единичной интегральной интенсивности с химическими сдвигами 105,3; 102,9; 99,7 и 94,6 м. д. О наличии двух остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы говорят сигналы C2-атомов (51,8 и 49,3 м.д.). В высокопольной области спектра наблюдаются лишь сигналы двух ацетамидных групп. Это указывает на то, что в модифицированном полисахариде полностью отсутствуют остатки колитозы. Положение сигналов C6-атомов (замещенных и незамещенных) осталось прежним. Значительный сдвиг одного из сигналов в аномерной области в слабое поле говорит о замещении одного из моносахаридов в исходном полисахариде остатком колитозы по C2 (в данном случае им может быть только глюкоза). Последовательность

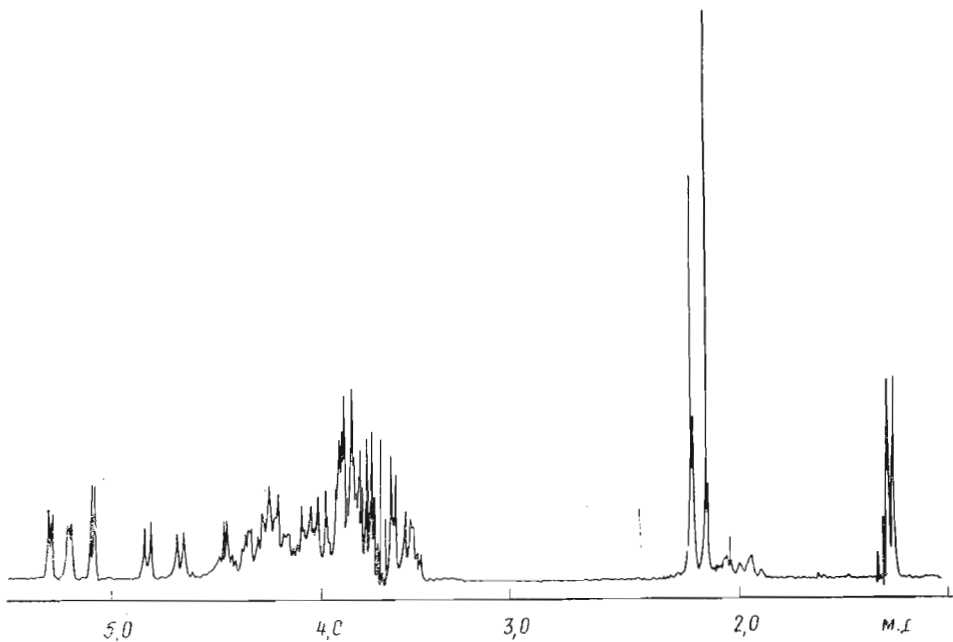


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР специфического полисахарида из ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серовара VII

моносахаридных остатков в О-специфическом полисахариде и конфигурацию гликозидных связей определяли на основании данных ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии исходного и модифицированного полисахаридов.

В ^1H -ЯМР-спектре специфического полисахарида (рис. 3) в области резонанса аномерных протонов имеются пять сигналов единичной интегральной интенсивности. Три из них (5,35; 5,24 и 5,13 м.д.) находятся в области резонанса аномерных протонов α -гликозидов [9], тогда как остальные два (4,86 и 4,70 м.д.) — в области резонанса аномерных протонов β -гликозидов. Конфигурация гликозидных связей подтверждается также и константами спин-спинового взаимодействия. Первые три аномерных протона имеют $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3,5$ Гц, остальные — 8,5 Гц.

Более подробный анализ спектра ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида позволяет определить конфигурацию гликозидной связи каждого из моносахаридных остатков. Конфигурация аномерного центра колитозы следует из химического сдвига С3-атома (34,3 м.д.), который может отвечать только α -колитозе в пиранозной форме [10]. Величина химических сдвигов С2-атомов остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы с учетом замещения по С3 показывает, что один из остатков имеет α -, а другой — β -конфигурацию [11]. Из сопоставления данных ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии следует, что один остаток глюкозы имеет α -, а другой — β -конфигурацию.

Подробный анализ ^{13}C -ЯМР-спектра модифицированного полисахарида позволяет определить последовательность моносахаридных остатков. Так, сигнал с химическим сдвигом 94,5 м.д. отвечает α -*D*-моносахаридному остатку, гликозилирующему *D*-моносахаридный остаток с галакто-конфигурацией в положение 3 [12]. Этим остатком может быть только остаток 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы [4]. В случае гликозилирования остатком α -*D*-глюкозы химический сдвиг ее аномерного атома углерода был бы не менее 96 м. д. [12]. Сигнал с химическим сдвигом 105,3 м.д. принадлежит β -*D*-глюкозе. Этот сигнал появляется в спектре модифицированного полисахарида в результате отщепления колитозы, которая, по данным метилирования, гликозилирует остаток глюкозы в положение 2. Величина химического сдвига (105,3 м.д.) указывает на то, что β -*D*-глюкоза гликозилирует остаток 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы в положение 3. В случае гликозилирования β -*D*-глюкозой остатка аминсахара в положение 6

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3). Для обнаружения нейтральных моносахаридов использовали щелочной раствор азотнокислого серебра, а для обнаружения аминсахаров — 0,2% раствор нингидрида в ацетоне.

Аминокислотный анализ выполняли на аминокислотном анализаторе Biotronik LC-2300 в колонках (0,22 × 6 см), упакованных смолой DC-6A.

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

Газожидкостную хроматографию проводили на хроматографе Pye-Unicam 104 с пламенно-ионизационным детектором на стеклянной колонке (0,4 × 150 см), содержащей 3% QF-1 на газхроме Q (100—120 меш). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов (175—225° С, 5 град/мин), ацетатов частично метилированных метилгликозидов (120—225° С, 5 град/мин).

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР снимали на приборе Bruker Physics HX-360. Растворитель — D₂O. Химические сдвиги приведены относительно метанола (50,1 м.д.). Использовали микроорганизм *Y. pseudotuberculosis*, серовар VII (штамм № 257, лобезно предоставленный в наше распоряжение М. Тзубакура из Японии). Выращивание бактерий, получение сывроток и серологические исследования проводили как описано ранее [14].

Выделение ЛПС и О-специфического полисахарида. Сухой измельченный ацетоновый порошок бактериальных клеток (72 г) экстрагировали 45% водным фенолом. Обработку повторяли трижды. Нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном. Выход липополисахарида 1,63 г. Липополисахарид (1,5 г) растворяли в дистиллированной воде (150 мл) и нагревали 4 ч на кипящей водяной бане. Осадок липида А (623 мг) отделяли ультрацентрифугированием при 105 000 г в течение 1 ч. Супернатант упаривали до 30 мл и осаждали 200 мл этанола. Полисахаридную фракцию (660 мг) подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-100: выделяли фракции — высокомолекулярный глюкан (109 мг), О-специфический полисахарид (245,6 мг) и олигосахарид кора (171,4 мг).

Кислотный гидролиз. По 5 мг полисахаридов гидролизovali 0,5 М трифторуксусной кислотой (0,5 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат упаривали 3 раза с метанолом, исследовали БХ, превращали в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ.

Специфический полисахарид (2 мг) гидролизovali 4 М HCl (0,5 мл, 100° С, 4 ч), упаривали 3 раза с метанолом и исследовали с помощью аминокислотного анализатора.

Выделение колитозы. Этанольный раствор (70 мг) гидролизата разделяли препаративной БХ. Очистку проводили дважды. Выделен полисахарид (15 мг) с R_{Rha} 1,19, $[\alpha]_D^{+4}$ (с 0,8; H₂O). Моносахарид (10 мг) восстанавливали боргидридом натрия (10 мг) 4 ч в темноте. Избыток боргидрида разрушали уксусной кислотой, обрабатывали КУ-2, раствор упаривали с метанолом. Выход 8 мг, $[\alpha]_D^{+39,8}$ (с 0,7; H₂O) (ер. лит. данные [3]).

Частичный кислотный гидролиз. О-Специфический полисахарид (100 мг) гидролизovali 0,25 М H₂SO₄ (10 мл) 20 мин при 100° С. Реакционную смесь нейтрализовали BaCO₃, обрабатывали КУ-2. Остаток упаривали и подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-15. Выделили модифицированный полисахарид (70 мг). Метилирование липополисахарида и О-специфического полисахарида проводили по методу [8]. Метилирование повторяли дважды, продукты подвергали метанолизу 0,55 М раствором хлористого водорода в метаноле (100° С, 12 ч), ацетилировали как обычно, ацетаты частично метилированных метилгликозидов исследовали ГЖХ и хроматомасс-спектрометрией.

Распад по Смуту. Модифицированный полисахарид (35 мг) окисляли 0,1 М метаперодатом натрия (2 мл) при 20° С в темноте 3 сут, добавляли 50 мг боргидрида натрия, через 4 ч избыток боргидрида натрия разрушали уксусной кислотой, диализовали, упаривали. Продукт нагревали с 1% уксусной кислотой (2 мл, 100° С, 2 ч), упаривали 3 раза с метанолом, восстанавливали боргидридом натрия (20 мг в 1 мл воды, 4 ч), гель-фильтрацией на сефадексе G-15 выделяли олигосахарид. Выход 17 мг, $[\alpha]_D^{+37}$ (с 1,4; H₂O).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsubokura M., Itagaki K., Kawamura K., Sasaki T., Nazai T. // Jap. J. Vet. Sci. 1971. V. 33. № 3. P. 137—144.
2. Tsubokura M., Otsuki K., Kawaoaka Y., Fukushima H., Tkemura K., Kanazawa Y. // Cur. Microbiol. 1984. V. 11. P. 89—92.
3. Fouquay C., Polonsky J., Lederer E., Westphal O., Luderitz O. // Nature (London). 1958. V. 182. P. 944.
4. Горшкова Р. П., Зубков В. А., Исаков В. В., Оводов Ю. С. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1068—1073.
5. Luderitz O., Staub A. M., Westphal O. // Bacteriol. Rev. 1966. V. 30. № 1. P. 192—255.
6. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—497.
7. Doddrell D. M., Pegg D. D., Bendal M. P. // J. Org. Res. 1982. V. 48. P. 323—327.
8. Nakomori G. J. // Biochem. J. (Tokyo). 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.

9. *Bebaut G. M., Choy J. M., Dutton G. C. S., Funnell N., Stejffen A. M.* // *J. Bacteriol.* 1973. V. 113. P. 1345—1347.
10. *Bundle R. D., Josephson S.* // *Can. J. Chem.* 1978. V. 56. № 20. P. 2686—2690.
11. *Шашков А. С., Естигнеев А. Ю., Деревицкая В. А.* // *Биоорган. химия.* 1978. Т. 4. № 11. С. 1495—1506.
12. *Шашков А. С.* // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. № 2. С. 246—253.
13. *ЛукинѠ Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К.* // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 6. С. 833—842.
14. *Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S.* // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 156. P. 391—397.

Поступила в редакцию
23.II.1987

THE STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE LIPOPOLYSACCHARIDE OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* SEROVAR VII

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

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

An O-specific polysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* serovar VII has been isolated and characterized. The polysaccharide consists of colitose, *D*-glucose and 2-acetamido-2-deoxy-*D*-galactose in the ratio 1 : 2 : 2. From the results of methylation analysis, partial acid hydrolysis, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy the structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide is deduced as follows:

