



УДК 547.458

© 1992 г. В. И. Молчанова, Л. В. Михайская,  
В. В. Исаков, Ю. С. ОводовСТРОЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПОНЕНТА БИОГЛИКАНА  
МОРСКОГО ГРЕБЕШКА *Patinopecten yessoensis*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Получен и охарактеризован биогликан из морского гребешка *Patinopecten yessoensis*, обитающего в Японском море. Показано, что биогликан представляет собой комплекс  $\alpha$ -D-глюкана (83%) с белковым компонентом (13%). Углеводная часть биогликана имеет основную цепь из  $\alpha$ -1,4-связанных остатков D-глюкопиранозы. Боковые цепи присоединены  $\alpha$ -1,6-связями к каждому четвертому моносахаридному остатку основной цепи; возможно наличие небольшого числа разветвлений при С3 остатков глюкозы основной цепи. Белковый компонент охарактеризован по аминокислотному составу.

По структуре и свойствам биогликан морского гребешка близок биогликанам-иммуномодуляторам из других морских беспозвоночных.

В последние годы нами проводится систематическое исследование биогликанов различных видов морских беспозвоночных [1–8]. Показано, что биогликан моллюсков представляют собой комплексы D-глюкана с белковым компонентом с прочной нековалентной связью [2, 3, 5, 8] и проявляют выраженное иммуностимулирующее действие в отношении различных заболеваний [2, 3, 7].

Японские исследователи [9, 10] из гребешка *Patinopecten yessoensis* выделили гликопротеин, обладающий противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Структурных исследований гликопротеина не проводилось.

Настоящая работа посвящена структурному исследованию биогликана-иммуномодулятора из морского гребешка *P. yessoensis*, представителя семейства Pectinidae класса двустворчатых моллюсков Bivalvia. Морской гребешок *P. yessoensis* широко распространен на сублиторали Японского моря и является промысловым объектом. Пищевую ценность представляет мускул гребешка.

Нами была разработана схема выделения и очистки биогликана из мантии гребешка. При водно-солевой экстракции измельченной свежей мантии гребешка получали суммарную биополимерную фракцию. Сопутствующие белки удаляли по методу Севага [11]. Экстракт подвергали хроматографии на DEAE-целлюлозе (рис. 1). Фракция А, содержащая основное количество полисахаридного компонента суммарного экстракта, рассматривалась нами как сырой биогликан. Фракции В и С, содержащие значительное количество белка, далее не изучались. Очистка сырого препарата достигалась хроматографией на колонке с сефарозой 6В (рис. 2). Очищенный биогликан элюировали пиридин-ацетатным буфером в виде фракции А, при этом минорные сопутствующие примеси отделялись, давая фракцию В.

Полученный биогликан представляет собой углевод-белковый комп-

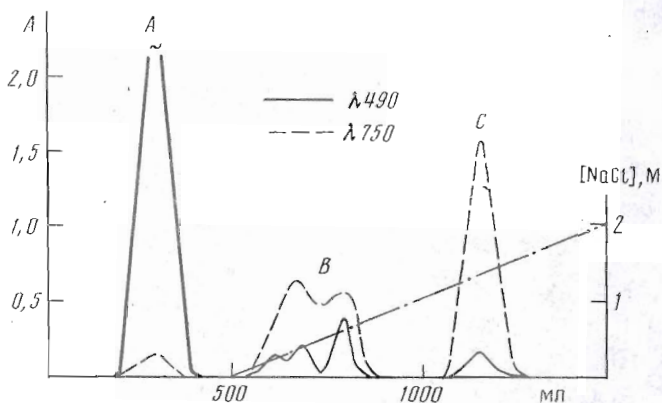


Рис. 1. Ионнообменная хроматография суммарного экстракта мантии гребешка на колонке с DEAE-целлюлозой. *A* — сырой биогликан, *B*, *C* — сопутствующие примеси

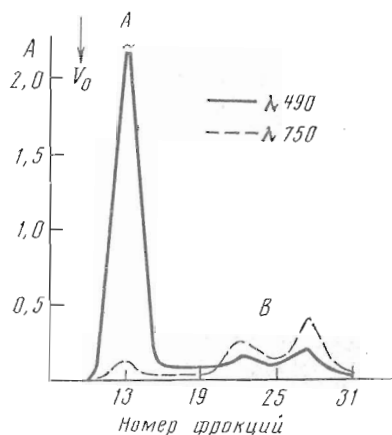


Рис. 2. Гель-хроматография сырого биогликана на колонке с сефарозой 6В. *A* — очищенный биогликан, *B* — сопутствующие примеси

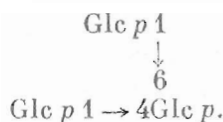
лекс, в состав которого входит 83% полисахарида и 13% белка, не удаляемого при дальнейшей обработке по методу Севага [11]. Биогликан является гомогенным препаратом по данным гель-фильтрации на сефадексах и сефарозе и по результатам ультрацентрифугирования. Его средневесовая молекулярная масса, определенная гель-фильтрацией на сефарозе CL-4В, составляет 4 МДа.

Очищенный биогликан был подвергнут полному кислотному гидролизу. В кислом гидролизате обнаружена только *D*-глюкоза, и, следовательно, полисахаридная часть биогликана представляет собой *D*-глиюкан. Высокое положительное вращение биогликана,  $[\alpha]_D^{20} +144^\circ$  (*c* 0,7, вода), свидетельствует об  $\alpha$ -конфигурации глюкозидных связей.

В результате действия амилазы на биогликан получена смесь олигосахаридов и частично деградированный глюкан. Олигосахаридную фракцию разделяли на колонке с биогелем Р-2 с последующей бумажной хроматографией. В результате наряду с мальтозой выделены три олигосахариды (I–III) с  $R_{Glc}$  0,63; 0,32; 0,16.

Ультразвуковая обработка биогликана также приводит к образованию наряду с мальтозой серии олигосахаридов (IV–VI) с  $R_{Glc}$  0,63;

0,32 и 0,27. Олигосахариды (I), (II), (IV) и (V) изучали методом метилирования. В гидролизате перметилированных олигосахаридов (I) и (IV) методом хроматомасс-спектрометрии в виде соответствующих ацетатов метилгликозидов идентифицировали 2,3,4,6-тетра- и 2,3-ди-О-метилглюкозу в соотношении 2:1. Следовательно, олигосахариды (I) и (IV) идентичны, являются трисахаридами и имеют структуру



В гидролизате сполна метилированных олигосахаридов (II) и (V) идентифицировали 2,3,4,6-тетра-, 2,3,6-три- и 2,3-ди-О-метилглюкозу в соотношении 2:1:1. Следовательно, олигосахариды (II) и (V) — это тетрасахариды со структурой



Олигосахариды (III) и (VI) выделены в количествах, недостаточных для структурного изучения.

Данные спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР биогликана (рис. 3) указывает на пиранозную форму остатков *D*-глюкозы в углеводной цепи и соответствуют данным для глюканов с  $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями [12, 13]. Сигналы в спектре с хим. сдвигом 100,9 (C1), 72,6 (C2), 74,4 (C3), 78,6 (C4), 72,6 (C5), 61,8 (C6) м.д. относятся к C-атомам  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозных остатков с  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Для остатков, имеющих 1,4,6-замещение, характерны сигналы при 68,6 (C6) и 71,6 м.д. (C5). Характеристичными для концевых невосстанавливающих  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозных остатков полисахарида являются сигналы с  $\delta$  99,6 (C1) и 70,6 м.д. (C4).

В спектре ПМР биогликана наблюдаются два уширенных сигнала аномерных протонов (5,23 и 4,85 м.д.) в интегральном соотношении 4:1, соответствующих аномерным протонам  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозных остатков с  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями.

Сравнение  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров гликогена [14, 15] с  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектром биогликана морского гребешка свидетельствует о том, что, несмотря на некоторые различия, имеется много общего в характере спектров обоих соединений. Эти результаты указывают на гликогенподобную структуру полисахаридного компонента биогликана.

Биогликан метилировали по методу Хакомори [16]. Сполна метилированный глюкан подвергали гидролизу или метанолизу. Гидролизат анализировали в виде метилированных производных ацетатов полиолов и ацетатов метилгликозидов методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Как показано в табл. 1, метилированный биогликан содержит 2,3,4,6-тетра-, 2,3,6-три-, 2,3- и 2,6-ди-О-метил-*D*-глюкозу в молярных отношениях 1,6 : 4,4 : 1,5 : 0,3.

Полученные данные указывают на наличие в глюкане большого числа невосстанавливающих концевых групп (20,5%), основной цепи из 1,4-связанных остатков *D*-глюкозы (56,4%) и многих точек разветвления (19,2%) при C6 остатков *D*-глюкозы основной цепи.

Биогликан окисляли 0,04 М метапериодатом натрия в течение 10 сут при 4°C. Окисленный полисахарид обрабатывали боргидридом натрия, образовавшийся полиспирт гидролизали серной кислотой. Гид-

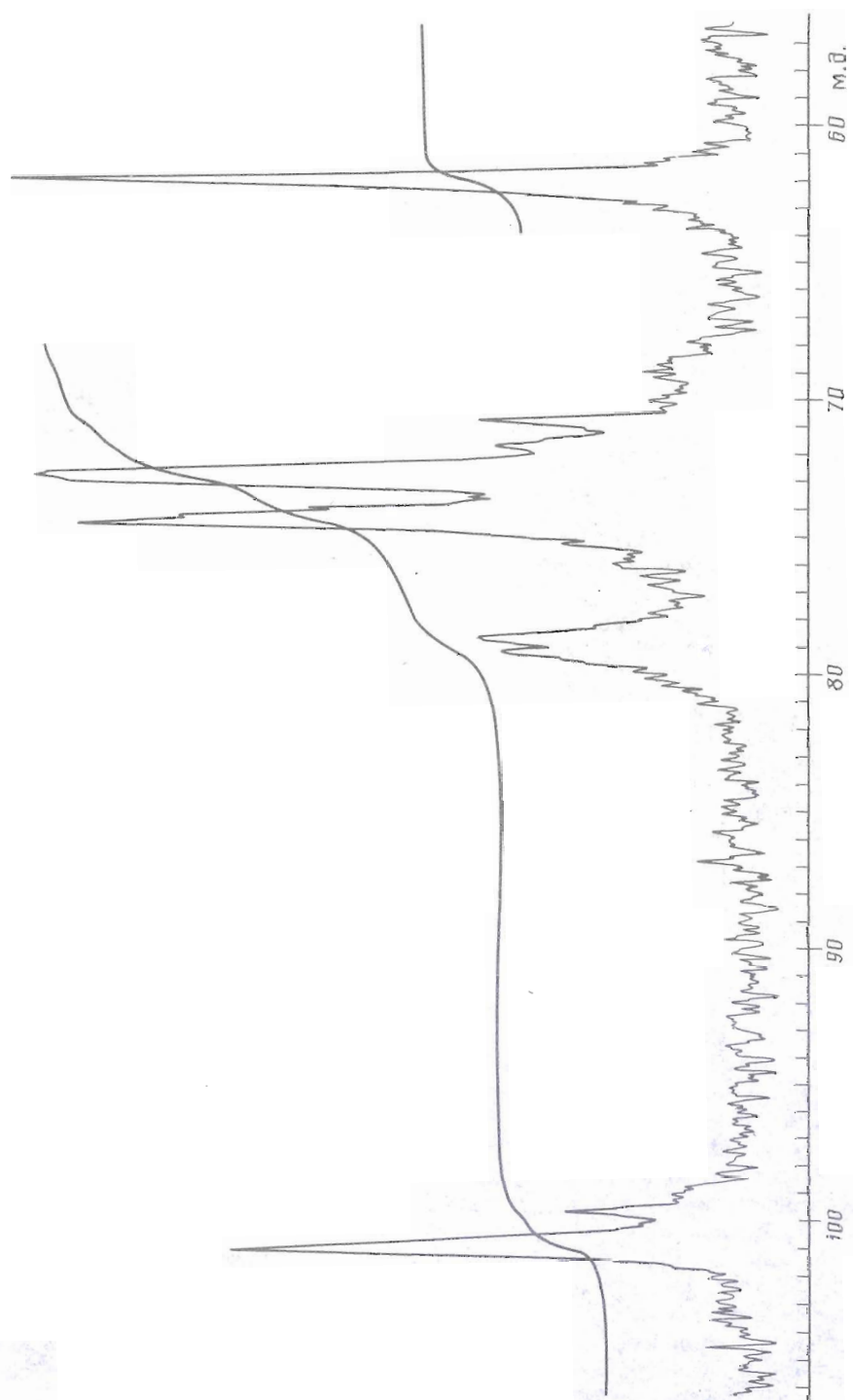


Рис. 3.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр блягликана

Результаты изучения биогликана методом метилирования

Метилированные производные <i>D</i> -глюкопиранозы	Молярные соотношения	Тип связи
2,3,4,6-Me <sub>4</sub>	1,6	Glc <sub>1</sub> →
2,3,6-Me <sub>3</sub>	4,4	→4Glc <sub>1</sub> →
2,3-Me <sub>2</sub>	1,5	→4,6Glc <sub>1</sub> →
2,6-Me <sub>2</sub>	0,3	→3,4Glc <sub>1</sub> →

Таблица 2

Аминокислотный состав биогликана (мольные доли, %)

Аминокислота	Содержание	Аминокислота	Содержание
Asp	9,5	Met	1,4
Thr	7,3	He	2,8
Ser	5,7	Leu	3,1
Glu	8	Tyr	15,6
Pro	4,3	Phe	18,6
Gly	5,4	Lys	6,4
Ala	4,7	Arg	1,9
Cys	2,2		
Val	2,9		

ролизат в виде адетатов полиолов анализировали с помощью ГЖХ. В результате идентифицировали глицерин, эритрит и глюкозу в мольном отношении 1:2,6:0,07. Глицерин и эритрит образуются из концевых и 1,4-связанных остатков *D*-глюкозы соответственно. Наличие глюкозы может свидетельствовать о присутствии в углеводной цепи полисахарида разветвлений при C3 остатков глюкозы, что согласуется с данными метилирования.

Таким образом, из всех полученных результатов можно сделать вывод, что основная углеводная цепь полисахаридного компонента биогликана состоит из  $\alpha$ -1,4-связанных остатков *D*-глюкопиранозы, а боковые цепи присоединены  $\alpha$ -1,6-связями к каждому четвертому остатку глюкозы основной цепи. Возможно также наличие остатков *D*-глюкопиранозы при C3 остатков основной цепи.

Белковый компонент биогликана характеризуется аминокислотным составом, представленным в табл. 2.

Аминокислотный анализ свидетельствует о высоком содержании кислот и оксааминокислот, тирозина и фенилаланина и низком содержании валина, метионина, аргинина, изолейцина.

Ранее было показано, что биогликан морского гребешка обладает выраженной иммуностимулирующей активностью [17] и, таким образом, по своему строению и свойствам он близок другим биогликанам-иммуномодуляторам, выделенным из морских беспозвоночных, в частности митилану из мидий семейства *Mytilidae* [2] и рапанану из *Rapana thomasi* [5].

#### Экспериментальная часть

Для бумажной хроматографии использовали бумагу Filtrak FN-2,3,15 и системы растворителей: *n*-бутанол — виридин — вода, 6:4:3; *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 4:5:1. Индикация пятен достигалась с

помощью кислого фталата анилина или щелочного раствора азотнокислого серебра.

Газожидкостную хроматографию (ГЖХ) проводили на хроматографе Pye-Uniscam (Англия) с пламенно-ионизационным детектором на колонке (0,4×150 см), заполненной Gas-Chrom Q (100–120 меш) с 3% QF-1. Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [18]. Метилированные моносахариды анализировали в виде ацетатов метилгликозидов и метилированных производных ацетатов полиолов с помощью хроматомасс-спектрометрии.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141.

ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-20 (Германия). Хроматомасс-спектрометрию выполняли на приборе LKB-900 (Швеция), используя ту же колонку, что и при ГЖХ. <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры получали на приборе WM-250 Bruker (Германия). Образец глюкана исследовали в виде раствора в D<sub>2</sub>O при 80°С. Химические сдвиги даны относительно тетраметилсилана.

Гель-фильтрацию проводили на колонках с сефадексом G-50, G-75 и G-100, используя 0,2 М хлористый натрий как элюент.

Ультрацентрифугирование выполняли на аналитической ультрацентрифуге MOM 3170 со шпирен-оптикой при 6000 об/мин при 20°С в воде.

Для обработки ультразвуком использовали ультразвуковой диспергатор УЗДН-2Т (0°С, ток аргона, 22 кГц). Ферментативную обработку биогликана проводили α-амилазой (Reanal, Венгрия) и β-амилазой (Merck, Germany).

*Выделение биогликана.* Мантию свежельовленного гребешка экстрагировали водно-солевым раствором и обрабатывали трижды по методу Севага [11]. После диализа и лиофилизации получали суммарный препарат в виде кремового порошка (выход 150 мг на 100 г веса сырого исходного материала), который хранили при 4°С. Содержание моносахарида 28,6%, белка — 68,4%.

*Ионообменная хроматография.* 250 мг сырого экстракта из мантии гребешка растворяли в 25 мл 0,01 М ацетатного буфера (рН 4,5), центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин, осадок отделяли, а супернатант после диализа против этого же буфера наносили на колонку (3×25 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной исходным буфером. После промывки стартовым буфером проводили элюцию линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 2 М в том же буфере (рис. 1). Получены три фракции. После диализа и лиофилизации выход фракций А, В, С составил 48, 40 и 34,5 мг. Основной пик, элюирующийся стартовым буфером с колонки, соответствует сырому биогликану. Фракции В и С далее не изучались.

*Хроматография на сефарозе 6В.* Сырой биогликан (фракция А, рис. 1; 8 мг) в 1 мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера (рН 5,3) наносили на колонку (2×60 см) с сефарозой 6В, элюировали тем же буфером. Собирали фракции по 1 мл, аликвоты каждой фракции анализировали фенол-серноокислотным методом [19] и по методу Лоури [20] (рис. 2). Выход очищенного биогликана (фракция А после лиофилизации) 5 мг.

*Моносахаридный состав.* Биогликан (3–5 мг) гидролизovali 5 ч 2 н. серной кислотой в запаянной ампуле при 100°С. После нейтрализации моносахаридный состав исследовали с помощью ВХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. В результате обнаружена только глюкоза.

*Определение молекулярной массы.* Раствор биогликана (8 мг) в 0,2 М NaCl (1 мл) наносили на колонку (1,4×35 см) с сефарозой CL 4В, элюцию проводили 0,05 М раствором NaCl со скоростью

7 мл/ч. Собирали фракции по 1 мл, аликвоты каждой фракции анализировали на присутствие углеводов [19] и белка [20]. Средневесовую молекулярную массу определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных декстранов Т-70, Т-110, Т-250, Т-500.

**Амилолиз биогликана.** Биогликан (20 мг) растворяли в 5 мл дистиллированной воды, добавляли 200 мкг смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы и инкубировали 2 ч при 37°С. Ферменты инактивировали кипячением в течение 10 мин. Выпавший небольшой осадок отделяли, супернатант концентрировали и выливали в этанол (4 объема). Выпавший осадок отделяли, лиофильно высушивали. Выход ~6 мг. Супернатант упаривали досуха. Выход олигосахаридов 12 мг.

**Фракционирование олигосахаридов.** 12 мг смеси олигосахаридов, полученной при амилолизе биогликана, наносили на колонку (1,8×80 см) с биогелем Р-2. Элюцию проводили водой, собирая фракции по 1,5 мл. Фракции, соответствующие пикам на кривой элюции, объединяли, концентрировали. Получили четыре олигосахаридные фракции. Дальнейшую очистку олигосахаридов проводили препаративной ВХ. Выход олигосахаридов составил: мальтоза ~5 мг, (I) ( $R_{\text{ГЛС}}$  0,63) 2,6 мг; (II) ( $R_{\text{ГЛС}}$  0,32) 2,9 мг; (III) ( $R_{\text{ГЛС}}$  0,16) 0,69 мг.

**Метилирование.** Биогликан (5 мг) или олигосахариды (1–1,5 мг) метилировали по методу Хакомори [16]. Обработку проводили дважды. Сполна метилированные соединения подвергали метанолизу, нагревая с 0,5 М HCl в абс. метаноле при 100°С в течение 6 ч. HCl удаляли многократным упариванием с метанолом, полученные метилгликозиды ацетилювали уксусным ангидридом в пиридине и анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии.

Сполна метилированное соединение (1 мг) гидролизovali 1 ч 90% муравьиной кислотой (1 мл) в запаянной ампуле при 100°С. После удаления муравьиной кислоты упариванием остаток гидролизovali 10 ч 0,25 М серной кислотой (1 мл) при 100°С. После нейтрализации смесь восстанавливали NaBH<sub>4</sub> (2 мг) и ацетилювали уксусным ангидридом в пиридине. Частично метилированные ацетаты полиолов анализировали с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

**Периодатное окисление.** Биогликан (10 мг) окисляли 0,04 М NaIO<sub>4</sub> (10 мл) в темноте при 4°С в течение 10 сут. Избыток периодата разрушали этиленгликолем (0,5 мл), раствор диализовали против дистиллированной воды. Полиальдегид восстанавливали NaBH<sub>4</sub> (10 мг) в течение 16 ч. Избыток боргидрида разрушали уксусной кислотой, раствор диализовали и лиофилизovali. Выход 6,5 мг. Полученный полиспирт (2 мг) гидролизovali 4 ч 2 М серной кислотой при 100°С. Гидролизат анализировали ВХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Идентифицировали глицерин, эритрит и сорбит в мольных отношениях 1 : 2,6 : 0,07.

**Обработка ультразвуком.** Биогликан (20 мг) в дистиллированной воде (15 мл) обрабатывали 1 мин ультразвуком при 22 кГц в токе аргона при 4°С. Раствор концентрировали и осаждали четырьмя объемами этанола. Осадок отделяли и лиофилизovali. Выход 7 мг. В супернатанте с помощью ВХ идентифицировали глюкозу, мальтозу и серию олигосахаридов (IV–VI) с  $R_{\text{ГЛС}}$  0,63; 0,32 и 0,27, которые были выделены с помощью препаративной ВХ. Выход олигосахаридов (IV–VI) составил 2,1, 1,7 и 0,7 мг соответственно.

**Аминокислотный анализ.** Аминокислоты определяли с помощью аминокислотного анализатора после гидролиза образцов 6 М HCl при 100°С в течение 20 ч в запаянных вакуумированных ампулах в аргоне.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оводов Ю. С., Оводова Р. Г., Лоечко Ю. Н. // Химия и биохимия углеводов. Тез. VII Всесоюз. конф. Пушкино, 1982. С. 4-5.
2. Оводов Ю. С., Оводова Р. Г., Лоечко Ю. Н. // Химия природн. соедин. 1983. № 6. С. 675-694.
3. Молчанова В. И., Оводова Р. Г., Перера Идалия, Оводов Ю. С. // Химия природн. соедин. 1982. № 6. С. 677-680.
4. Оводова Р. Г., Лоечко Ю. Н., Прокофьева Н. Г., Командрова Н. А., Новикова О. Д., Оводов Ю. С. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1985. № 3. С. 121-122.
5. Михайская Л. В., Оводова Р. Г., Гефр В. Н., Исаков В. В., Оводов Ю. С. // Химия природн. соедин. 1986. № 1. С. 25-28.
6. Ovodova R. G., Mikheyskaya L. V., Molchanova V. I., Glazkova V. E., Ovodov Yu. S. // Proc. 6th Intern. Symp. Marine Natural Products, Dakar, Senegal, 1989. P. 15.
7. Цыбульский А. В., Оводова Р. Г., Глазкова В. Е., Беседнова Н. И., Оводов Ю. С. // Вопр. вирусол. 1990. Т. 35. № 3. С. 194-197.
8. Оводова Р. Г., Молчанова В. И., Михайская Л. В., Оводов Ю. С. // Химия природн. соедин. 1990. № 6. С. 738-742.
9. Sasaki T., Takasuka N., Abiko N. // J. Nat. Cancer. Inst. 1978. V. 60. P. 1499-1500.
10. Sasaki T., Uchida H., Uchida N., Nakasuka N., Tachibana Y., Nakamichi K., Endo Y., Kamiya H. // Nippon Suisan Gakkaishi. 1987. V. 53(2). P. 267-272.
11. Sevag M. // Biochem. J. 1934. V. 273. P. 419-423.
12. Шашков А. С. // Изв. АН СССР. 1983. № 6. С. 1328-1336.
13. Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Turimura K., Sugiyama H., Seto S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1973. № 20. P. 2425-2432.
14. Dais P., Perlin A. S. // Carbohydr. Res. 1982. V. 100. P. 103-116.
15. Colson P., Jennings H. J., Smith J. C. P. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. P. 8081-8087.
16. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205-208.
17. Беседнова Н. И. // Актуальные проблемы иммунологии. Иммунодефициты и иммунокоррекция. Тез. Всесоюз. конф. Владивосток, 1987. С. 128.
18. Слонекер Дж. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 22.
19. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350.
20. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. G. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.

Поступила в редакцию  
27.VI.1994

После доработки  
20.IV.1992

V. I. MOLCHANOVA, L. V. MIKHEYSKAYA, V. V. ISAKOV, Yu. S. OVODOV

### THE STRUCTURE OF THE POLYSACCHARIDE CONSTITUENT OF BIOGLYCAN FROM THE SCALLOP *PATINOPECTEN YESSOENSIS*

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

A bioglycan,  $[\alpha]_D^{20} +144^\circ$  (c 0,7, water), was isolated from the mantle of the scallop *Patinopecten yessoensis*, which is widespread in the Sea of Japan. The bioglycan represents a complex of  $\alpha$ -D-glucan (83%) and protein (13%) and was homogeneous as judged by gel-filtration and ultracentrifugation. By means of molecular-sieve chromatography on Sepharose CL-4B, its average molecular weight was estimated as 4 MDa.

Methylation studies, periodate oxidation and amylolysis showed that the polysaccharide part of the bioglycan consisted of  $\alpha$ -1,4-linked D-glucopyranose residues, with side chains attached to every fourth sugar unit of the backbone through  $\alpha$ -1,6-linkages (some side chains seem to be 1,3-linked). The structure of the bioglycan was confirmed by NMR spectral data.

Amino acid composition of the protein part of the bioglycan was elucidated.

The scallop bioglycan is related to the known bioglycans-immunomodulators of marine invertebrates with regard to the structure and immunological behaviour.