



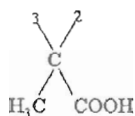
УДК 577.114.5:576.852.21

© 1993 В. А. Зубков, Е. Л. Назаренко,
И. В. Ботвинко *СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА ВНЕКЛЕТОЧНОГО
ПОЛИСАХАРИДА *Mycobacterium convolutum* 240

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;

* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

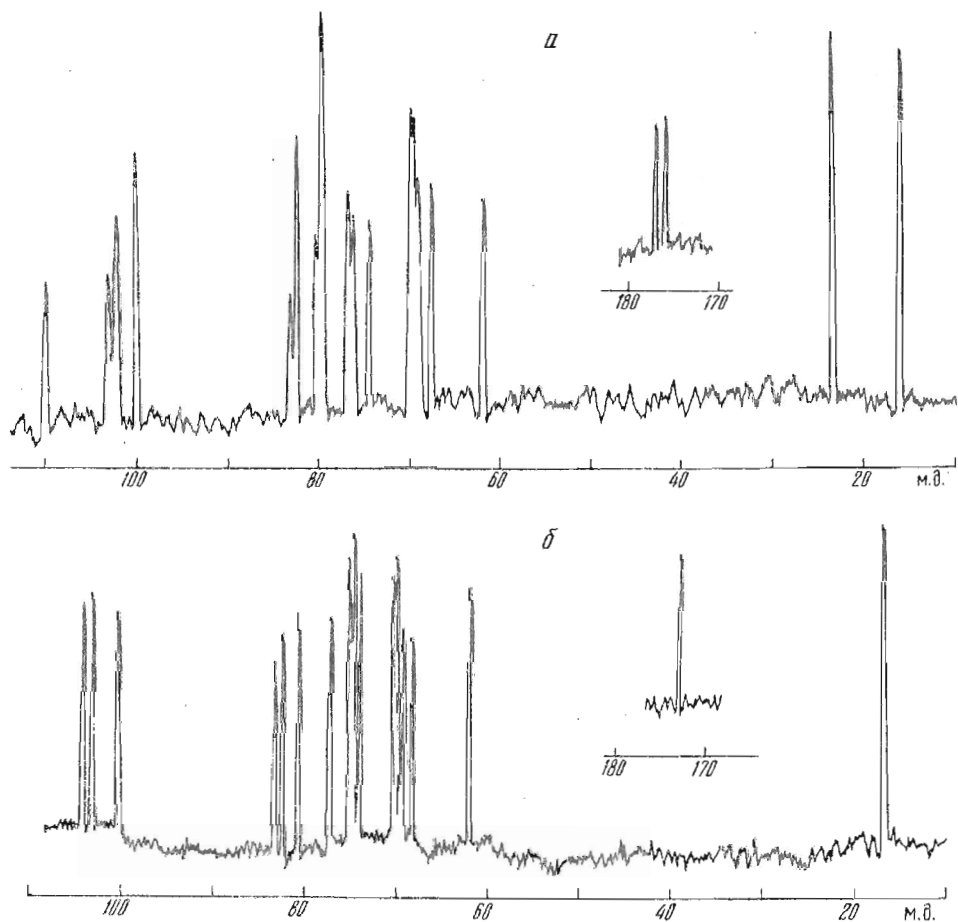
Из культуральной жидкости *Mycobacterium convolutum* 240 выделен кислый внеклеточный полисахарид, построенный из остатков *D*-глюкозы, *L*-фукозы и *D*-глюкуроновой кислоты, несущей остаток пирувата. На основании данных метилирования и ¹³С-ЯМР-спектроскопии предложена следующая структура повторяющегося звена полисахарида:



Способность к биосинтезу внеклеточных полисахаридов распространена среди бактерий. По мере накопления экспериментального материала по химическому строению этих полимеров, выделенных из микроорганизмов различных групп, появляются данные, свидетельствующие, по-видимому, об их филогенетическом родстве или сходстве эколого-трофических признаков. Ранее было установлено строение повторяющихся звеньев кислых внеклеточных гетерогликанов сапротрофных микобактерий *Mycobacterium lacticolum* 121 [1] и *M. album* [2], интересных наличием маннолактиловой кислоты, и *M. salivarium* 76, содержащего пируват и имеющего строение, близкое к структуре К-антигена *Klebsiella* K5 [3]. Настоящая работа посвящена структурному исследованию внеклеточного полисахарида *M. convolutum* 240.

Внеклеточный полисахарид ($[\alpha]_D^{20} -73^\circ$) выделен как описано в работе [4]. В гидролизате полисахарида с помощью БХ, ГЖХ, а также высоковольтного электрофореза на бумаге идентифицированы глюкоза, фукоза и глюкуроновая кислота. Уроновая кислота дополнительно идентифицирована ВЭЖХ на сильно-кислотном катионообменнике. Препаративной БХ с последующей очисткой микропрепаративной ВЭЖХ все три моносахарида выделены в индивидуальном состоянии. На основании величин удельного вращения показано, что глюкоза и глюкуроновая кислота имеют *D*-, а фукоза — *L*-конфигурацию.

¹³С-ЯМР-спектр (рисунок) указывает на регулярный характер полисахарида и трисахаридный размер его повторяющегося звена. В спектре наблюдаются сигналы трех аномерных атомов углерода (103,1, 102,2 и 100,0 м. д.), один сигнал метильной группы 6-дезоксисахара при 16,0 м. д., один сигнал СН₃-группы при 23,5 м. д., единственный сигнал гидроксиметильной группы при 61,9 м. д., необычно слабополюсный сигнал при 109,9 м. д., два сигнала карбоксылных групп при 175,5 и 176,6 м. д., а также 12 сигналов вторичных углеродных атомов,



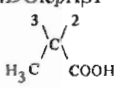
¹³C-ЯМР-спектр нативного (а) и модифицированного (б) полисахарида

связанных с кислородом, в области 66—83 м. д. Первичный анализ спектра позволяет предположить, что полисахарид построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, включающих в себя по одному остатку *D*-глюкозы, *L*-фукозы и *D*-глюкуроновой кислоты. Наличие трех сигналов при 23,5, 109,9 и 176,6 м. д. свидетельствует о наличии в составе повторяющегося звена остатка пировиноградной кислоты [3].

При обработке полисахарида хатионитом с последующим нагреванием раствора был получен модифицированный полисахарид, в составе которого полностью отсутствовали остатки пировиноградной кислоты.

Характер замещения моносахаридных остатков в модифицированном полисахариде был установлен методом метилирования. После гидролиза метилированного по Хакомори [5] полисахарида методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов были идентифицированы 2,4,6-три-*O*-метил-глюкоза и 2,3-ди-*O*-метилфукоза. Для выяснения характера замещения остатка *D*-глюкуроновой кислоты смесь частично метилированных полиолов была подвергнута мягкому метанолизу с последующим ацетилированием. В результате наряду с идентифицированными ранее метилированными производными был обнаружен метиловый эфир 2,3,6-три-*O*-ацетил-4,5-ди-*O*-метил-*L*-гулоновой кис-

Данные ^{13}C -ЯМР-спектров (хим. сдвиги в м. д.)

Остаток		C1	C2	C3	C4	C5	C6
Нативный полисахарид							
$\rightarrow 3\text{DGlc}p \beta 1 \rightarrow$		103,1	74,5	83,0	69,6*	76,7	61,9
$\rightarrow 4\text{DGlc}pA\beta 1 \rightarrow$		102,2	79,6	79,6	80,1	76,3	175,5
		176,6	109,9	23,5			
$\rightarrow 4\text{LFuc}p \alpha 1 \rightarrow$		100,0	69,3	69,8*	82,4	67,6	16,0
Модифицированный полисахарид							
$\rightarrow 3\text{DGlc}p \beta 1 \rightarrow$	расч.	103,4	73,2	83,6	69,6*	77,2	62,1
	эксп.	103,2	74,1	83,3	70,2*	77,3	62,0
$\rightarrow 4\text{DGlc}pA \beta 1 \rightarrow$	расч.	104,1	74,1	75,1	81,3	76,0	—
	эксп.	104,2	74,9	74,9	80,8	75,2	173,0
$\rightarrow 4\alpha\text{Fuc}p \alpha 1 \rightarrow$	расч.	100,4	69,1	71,0	81,9	67,8	15,9
	эксп.	100,5	69,4*	70,3*	82,5	68,3	16,5

* Отнесение сигналов может быть обратным.

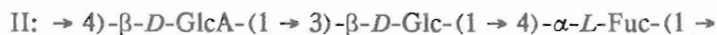
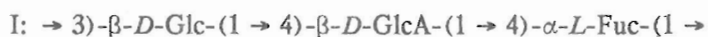
лоты, который образовался из частично метилированной *D*-глюкуроновой кислоты [6]. Из приведенных данных следует, что полисахарид линейен и построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, в состав которых входят остатки *L*-фукозы и *D*-глюкуроновой кислоты, замещенные в положение 4, и остаток *D*-глюкозы, замещенный в положение 3.

В аномерной области ^{13}C -ЯМР-спектра модифицированного полисахарида наблюдаются три сигнала — при 104,2, 103,2 и 100,5 м. д. При сравнении со спектром исходного полисахарида видно, что сигнал при 102,2 м. д. сместился в слабое поле почти на 2 м. д., произошло некоторое смещение сигналов в области 71—80 м. д. и полностью отсутствуют сигналы остатка пировиноградной кислоты.

Из ^{13}C -ЯМР-спектра модифицированного полисахарида, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, определены константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{\text{C,H}}$ для аномерных атомов. Относительно небольшие константы ($^1J_{\text{C,H}} \sim 160$ Гц) для сигналов при 104,2 и 103,2 м. д. указывают на то, что они соответствуют β -связанным моносахаридам, а сравнительно большая константа ($^1J_{\text{C,H}} \sim 170$ Гц) для сигнала 100,5 м. д. свидетельствует об α -конфигурации гликозидной связи соответствующего моносахарида [7]. Величины КССВ также говорят о пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют значения ~ 173 — 175 Гц [8]).

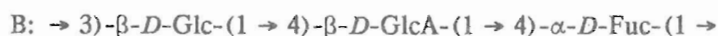
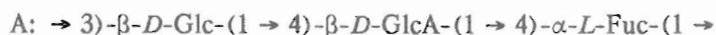
Более подробный анализ спектра позволяет сделать вывод о конфигурации гликозидных связей моносахаридных остатков и последовательности их соединения в полисахаридной цепи. Так, сигнал при 68,3 м. д. в данном случае может принадлежать только C-5-атому *L*-фукозы, имеющей α -конфигурацию гликозидной связи [9]. Следовательно, остатки *D*-глюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты выключены в полисахаридную цепь β -гликозидными связями. Последовательность моносахаридных остатков однозначно вытекает из анализа области резонанса аномерных атомов углерода и углеродных атомов, принимающих участие в

образовании гликозидных связей. В случае трисахаридного повторяющегося звена возможны лишь два варианта последовательности моносахаридных остатков:



В случае последовательности II при наличии дисахаридного фрагмента $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1} \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc-(1} \rightarrow$ должны наблюдаться большие α - и β -эффекты гликозилирования и в спектре должны присутствовать слабopольные сигналы при 105 и 85 м. д. [10]. Однако в спектре модифицированного полисахарида сигналы в этой области отсутствуют и, следовательно, единственно приемлемым является вариант I.

Для подтверждения структуры I использован компьютерный метод, основанный на расчете с помощью ЭВМ ^{13}C -ЯМР-спектров теоретически возможных линейных регулярных полисахаридов данного моносахаридного состава, исходя из химических сдвигов атомов углерода свободных моносахаридов и средних эффектов гликозилирования [10]. Проведен поиск структуры, теоретический спектр которой наиболее близок к экспериментальному. При этом принималось, что остаток фукозы может иметь как *D*-, так и *L*-конфигурацию. В результате расчета для всех возможных линейных структур были найдены две структуры, дающие наименьшую сумму квадратичных отклонений (1,5 и 1,6) химических сдвигов расчетного и экспериментального спектров:



Для всех остальных рассмотренных структур сумма квадратичных отклонений составляет более 3,5. Структура B не удовлетворяет данным моносахаридного состава, так как однозначно доказано, что остаток фукозы имеет *L*-конфигурацию.

Таким образом, компьютерный расчет в сочетании с данными моносахаридного состава и анализом методом метилирования позволил однозначно определить структуру модифицированного полисахарида. Полное отнесение сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре этого полисахарида, а также химические сдвиги атомов углерода, рассчитанные для него, приведены в таблице.

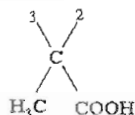
Полная структура внеклеточного полисахарида, и в частности локализация пирувилденевой группы, была установлена с использованием данных метилирования нативного и модифицированного полисахаридов и сравнительного анализа ^{13}C -ЯМР-спектров этих полисахаридов.

Наличие слабopольного сигнала при 109,9 м. д. в спектре нативного полисахарида свидетельствует о том, что пируват образует пятичленный кетальный цикл (по C2 и C3 или C3 и C4) с остатком моносахарида [3]. Из данных метилирования модифицированного полисахарида следует, что локализация пирувилденевой группы по C3 и C4 для всех моносахаридных остатков исключена; таким образом, пируват замещает в положениях 2 и 3 либо остаток β -*D*-глюкуроновой кислоты, либо остаток α -*L*-фукозы. Однако смещение в слабое поле на 2 м. д. сигнала аномерного атома углерода β -связанного моносахаридного остатка в ^{13}C -ЯМР-спектре модифицированного полисахарида однозначно свидетельствует о том, что указанный способ замещения возможен только для остатка *D*-глюкуроновой кислоты.

Это заключение подтверждено с помощью метода метилирования. С целью уменьшения вязкости раствор нативного полисахарида в диметилсульфоксиде был предварительно подвергнут обработке ультразвуком. После гидролиза метилированного по Хакомори [5] полисахарида методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов были идентифицированы те же производные глюкозы и фукозы, что и в модифицированном полисахариде. Однако в результате метанолиза и ацетилирования смеси частично метилиро-

ванных полиолов вместо метилового эфира 2,3,6-три-О-ацетил-4,5-ди-О-метил-L-гулоновой кислоты, обнаруженного в модифицированном полисахариде, идентифицирован метиловый эфир пентаацетата L-гулоновой кислоты, масс-спектр которого был полностью идентичен спектру заведомого образца. Образование такого производного можно объяснить только этщеплением пирувилденной группы от C2 и C3 остатка D-глюкуроновой кислоты в процессе гидролиза метилированного нативного полисахарида.

Таким образом, на основании всех приведенных данных предложена следующая структура повторяющегося звена внеклеточного полисахарида *M. convolutum* 240:



Интересно, что абсолютно такую же структуру основной цепи имеет капсультный полисахарид из *Klebsiella*, тип I [11]. Однако, как и в приведенном нами сообщении, в работе [11] не определена абсолютная ((R) либо (S)) конфигурация пируваткетальной группировки.

Экспериментальная часть

¹³C-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM 250 в D₂O при 40°C с метанолом (50,15 м. д.) в качестве внутреннего стандарта. Оптическое вращение определяли на приборе Perkin — Elmer 141 в воде при 20°C. Растворы лиофилизовали или упаривали в вакууме. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6:4:3), электрофорез на бумаге — в 0,25 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 10 В/см в течение 90 мин, при обнаружении моносахаридов щелочным нитратом серебра. ВЭЖХ проводили на колонках (0,4×25 см) с сорбентами Силасорб (Сульфо) в 15 мМ формиатном буфере и Силасорб SPH C₁₈ (LC) в воде. Элюционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK 101 (ЧСФР). ГЖХ проводили на приборе Pye Unicam 104 на колонке (0,4 ×150 см), упакованной 3% QF-1 на Gas Chrom Q (100—120 меш) в интервале температур 175—225° С (газ-носитель — аргон), ГЖХ-масс-спектрометрию — на приборе LKB 9000 S на той же колонке.

Продуцирование микроорганизма *M. convolutum* и выделение внеклеточного полисахарида проводили как описано в работе [4]. Культура микроорганизма любезно предоставлена Т. В. Коронелли (кафедра физиологии растений МГУ).

Полный кислотный гидролиз. Полисахарид (4 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (1 мл, 100°C, 3 ч), гидролизат упаривали и анализировали БХ, электрофорезом и ГЖХ в виде ацетатов полиолов [12]. В препаративном варианте гидролиза использовали 10 мг полисахарида и 2 мл кислоты; получили L-фукозу (2 мг), [α]₅₇₈²⁰ —65° (с 0,2, вода) (ср. [13]: —76°), D-глюкозу (2,5 мг), [α]₅₇₈²⁰ +50° (с 0,25, вода) (ср. [13]: +52,7°) и глюкуроновую кислоту (1,5 мг), [α]₅₇₈²⁰ +10° (с 0,15, вода) (ср. [13]: +11,7°).

Получение модифицированного полисахарида. Исходный полисахарид (100 мг) растворяли в 10 мл воды, добавляли 5 мл катионита КУ-2 (H⁺) и выдерживали 15 мин. Смолу отделяли фильтрованием, фильтрат нагревали (100° С, 5 ч), трижды экстрагировали эфиром и лиофилизовали. Выход модифицированного полисахарида 85 мг.

Метилирование полисахаридов. Нативный полисахарид (10 мг) в диметилсульфоксиде (2 мл) обрабатывали ультразвуком (44 КГц, 10 мин) при охлаждении. Нативный и модифицированный полисахариды метилировали по методу [5], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированные полисахариды

выделяли с помощью патрона Sep Pak C₁₈ (Waters). Продукты подвергали формолизу и гидролизу, как описано в работе [14], восстанавливали NaBH₄. Часть восстановленного гидролизата ацетиловали и анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией. Вторую часть смесей частично метилированных полиолов подвергали мягкому метанолизу (1 М HCl в метаноле, 65°С, 0,5 ч) и ацетилрованию, как описано в [6], и анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией.

Авторы благодарят д-ра хим. наук Ю. А. Книреля (ИОХ РАН) за помощь в компьютерном расчете структуры полисахарида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochetkov N. K., Sviridov A. F., Arifkhodzhaev K. A., Chizov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1979. V. 71. № 2. P. 193—203.
2. Шашков А. С., Свиридов А. Ф., Арифходжаев Х. А., Чижов О. С., Ботвинко И. В. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1252—1255.
3. Свиридов А. Ф., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Ботвинко И. В., Егоров Н. С. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1242—1251.
4. Егоров Н. С., Гречушкина Н. Н., Ботвинко И. В., Свиридов А. Ф., Семенова Е. В. // Микробиология. 1984. Т. 53. Вып. 2. С. 199—202.
5. Nakotari S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 1. P. 205—208.
6. Львов В. Д., Яковлев А. П., Плужникова Г. Н., Лапина Е. Б., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1256—1265.
7. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1984. № 3. P. 293—297.
8. Сур Н., Ferlin A. S. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2504—2511.
9. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биоорганическая химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—496.
10. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
11. Erbing S., Kenne L., Lindberg B., Löngren J. // Carbohydr. Res. 1976. V. 50. № 1. P. 115—120.
12. Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. № 12. P. 1602—1604.
13. Micheel F., Klemer A. // Chemie der Zucker und Polysaccharide. Leipzig, 1956. P. 400, 418, 463.
14. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорганическая химия. 1980. Т. 13. № 9. С. 1851—1859.

Поступила в редакцию
18.II.1992

После доработки
15.IX.1992

V. A. Zubkov, E. L. Nazarenko, I. V. Botvinko*

STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT OF THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM *Mycobacterium convolutum* 240

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

*M. V. Lomonosov State University, Moscow

An acidic extracellular polysaccharide composed of D-glucose, L-fucose, D-glucuronic acid and pyruvic acid residues has been isolated from the *Mycobacterium convolutum* culture fluid. On the basis of methylation analysis and ¹³C NMR data, the structure of the repeating unit of the polysaccharide was deduced as follows:

