



УДК 547.114.5:579.842.23

СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *Yersinia mollaretii* ШТАММА WS 42/89

© 1997 г. Р. П. Горшкова[#], В. В. Исаков, Е. Л. Назаренко, Л. С. ШевченкоТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 08.01.97 г. Принята к печати 07.05.97 г.

Выделен и охарактеризован О-специфический полисахарид из *Yersinia mollaretii* штамма WS 42/89. На основании данных частичного гидролиза, метилирования, а также ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии предложена следующая структура повторяющегося звена полисахарида:



Идентичное строение имеет О-специфический полисахарид *Yersinia enterocolitica* серовара О:6.31. Различие в составе О-антигенов двух видов *Yersinia* заключается в отсутствии в составе липополисахарида *Y. mollaretii* D-глицеро-D-манно-гептозы.

Ключевые слова: О-специфический полисахарид, *Yersinia*, ЯМР-спектроскопия.

Новые виды рода *Yersinia*: *Y. bercovieri* и *Y. mollaretii* выделены из *Y. enterocolitica* на основании биохимических характеристик, серотипирования и ДНК-ДНК-гибридизации [1, 2]. При этом показано, что некоторые штаммы *Y. mollaretii* имеют общие антигены с *Y. enterocolitica* О:6.30 и О:3, а *Y. bercovieri* – с *Y. enterocolitica* О:8. Идентичность антигенов установлена с помощью перекрестной адсорбции [2].

Данная работа – продолжение систематического исследования соматических О-антигенов рода *Yersinia* и посвящена структурному изучению О-специфического полисахарида *Y. mollaretii* штамма WS 42/89.

Липополисахарид (ЛПС) выделен из микробной биомассы экстракцией водным фенолом и освобожден от нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой. ЛПС содержал 40% липида А, 44.5% моносахаридов, 7.8% гептоз и 2.8% 2-кето-3-дезоксиктулозоновой кислоты. При двойной диффузии в агаре ЛПС давал одну полосу преципитации с гомологичной антисывороткой, а также с антисыворотками к *Y. enterocolitica* сероваров О:6.30 и О:6.31 и не реагировал с антисыворотками к типовому *Y. mollaretii* CNY 7263 и *Y. bercovieri* штаммов CNY 7506 и CNY 315.

В гидролизате ЛПС *Y. mollaretii* с помощью БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов при сравнении с

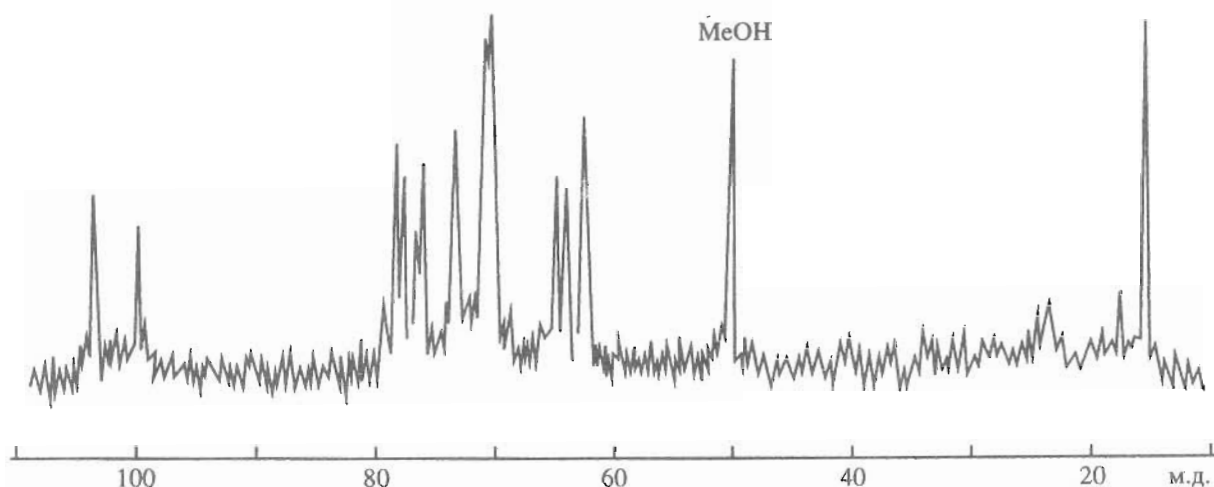
заведомыми образцами моносахаридов, а также ГЖХ-масс-спектрометрии идентифицированы остатки рамнозы, глюкозы, 6-дезоксигексозы, галактозы, L-глицеро-D-манно-гептозы и 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы в соотношении 1 : 4 : 2 : 4 : 1 : 1 соответственно. При этом D-глицеро-D-манно-гептоза, содержащаяся в олигосахариде кора ЛПС изученных нами ранее видов *Yersinia* [3], не обнаружена. В ЛПС *Y. bercovieri* О:10 D-глицеро-изомер присутствовал в следовых количествах [4], а в ЛПС типового штамма *Y. enterocolitica* CNY 7263 соотношение D- и L-глицеро-изомеров D-манно-гептозы составляло 1 : 3. Идентификация изомеров гептоз проведена с помощью ГЖХ при использовании синтетических образцов ацетатов полиолов соответствующих сахаров.

При мягкой уксуснокислотной деградации ЛПС с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50 получены три фракции. По данным ¹³C-ЯМР-спектроскопии, вещество фракции 1 представляло собой α-1,4-связанный резервный D-глюкан (наличие в спектре сигналов при 100.4, 78.0, 74.0, 73.3, 72.0 и 61.3 м. д. [5]). По данным моносахаридного анализа, фракция содержала О-специфический полисахарид с примесью олигосахарида кора, а фракция 3 – олигосахарид кора.

В ¹H-ЯМР-спектре полисахарида наблюдаются интенсивные сигналы двух аномерных протонов при 5.01 и 4.33 м. д. ($J_{H,H}$ 3.8 и 7.9 Гц соответственно) и дублет протонов СН₃-группы при 1.0 м. д. ($J_{H,H}$ 6.6 Гц), что свидетельствует о дисахаридном размере повторяющегося звена и присутствии в его составе 6-дезоксигексозы.

Сокращения: 6dGul – 6-деокси-D-гулоза, ЛПС – липополисахарид.

[#] Автор для переписки.



^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *Y. mollaretii* WS 42/89.

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (рисунок, таблица) указывает на регулярный характер полимера, дисахаридный размер повторяющегося звена и идентичен спектру О-специфического полисахарида *Y. enterocolitica* O:6.31, описанному нами ранее [6]. В спектре присутствуют сигналы аномерных атомов углерода при 99.3 и 103.0 м.д., а также сигналы при 64.8, 64.0 и 15.9 м.д., характерные для С2, С5 и С6 α -аномера 6-дезоксигулопиранозы [6]. Практически полное совпадение величин химических сдвигов углеродных атомов в спектрах полисахаридов *Y. mollaretii* и *Y. enterocolitica* (таблица) позволяет говорить об их структурной идентичности.

При частичном кислотном гидролизе полисахарида 0.1 М HCl с последующей гель-хроматографией полученной смеси, препаративной БХ и ВЭЖХ получены 6-дезоксид-гулоза (R_{Hra} 0.94, $[\alpha]_D -37^\circ$, ср. [7]: $[\alpha]_D -38^\circ$) и D-галактоза ($[\alpha]_D +68^\circ$, ср. [8]: $[\alpha]_D +80.5^\circ$), а также дисахарид (R_{Gal} 0.92, $[\alpha]_D +5^\circ$), в гидролизате которого БХ и ГЖХ идентифицированы галактоза и 6-дезоксид-гулоза в эквимольных количествах. В результате восстановления дисахарида с последующим метанолизом показано, что на восстанавливаемом конце дисахарида находится остаток 6-дезоксигулозы.

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде доказан методом метилирования [9]. Частично метилированные моносахариды, образующиеся при гидролизе метилированного полимера, анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией в виде ацетатов полиолов. В результате идентифицированы 3,4,6-три-О-метилгексоза и 2,4-ди-О-метил-6-дезоксигексоза, что подтверждает замещение остатка галактозы в положение 2, а остатка 6-дезоксигулозы – в положение 3.

Таким образом, на основании полученных данных установлена следующая структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Y. mollaretii* штамма WS 42/89:



Идентичное строение имеет О-специфический полисахарид *Y. enterocolitica* серовара O:6.31 [6]. Различие в составе О-антигенов двух видов *Yersinia* заключается в отсутствии в составе ЛПС *Y. mollaretii* D-глицеро-D-манно-гептозы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры получали на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 80 и 60°C соответственно; в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ_{H} 3.50, δ_{C} 50.15 м. д.). Аналитическую и препаративную БХ, определение удельного оптического вращения, высоковольтный электрофорез, гель-хроматографию, ГЖХ-масс-спектрометрию, ГЖХ, кислотный гидролиз, метилирование, продуцирование микробной биомассы, выделение ЛПС и полисахарида, получение антисывороток проводили так, как описано ранее [6].

В работе использовали микроорганизмы *Y. mollaretii* (штаммы WS 42/89 и CNY 7263), полученные от д-ра Ваутерса (Dr. G. Wauters, Бельгия).

ВЭЖХ проводили на колонке (0.4 × 25 см) с сорбентом Silasorb SPH C₁₈ в воде. Элюционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK 101 (ЧСФР).

Выделение полисахарида. ЛПС (500 мг) гидролизовали 1% уксусной кислотой (50 мл, 100°C, 2 ч), липид А отделяли центрифугированием (200 мг), супернатант концентрировали и осаждали пятью объемами этанола. В полученном этанольном растворе (30 мг) высоковольтным бумажным

Данные ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида *Y. mollaretii* WS 42/89 (δ , м. д.)*

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→ 3)- α -D-6dGulp-(1 →	99.3 (99.4)	64.8 (65.0)	77.4 (77.7)	70.3 (70.4)	64.0 (64.1)	15.9 (15.9)
→ 2)- β -D-Galp-(1 →	103.0 (103.2)	78.0 (78.3)	73.2 (73.3)	70.5 (70.5)	75.8 (75.9)	62.5 (62.5)

* Химические сдвиги измерены относительно $\delta_{\text{C}} \text{MeOH} = 50.15$ м. д. В скобках приведены данные работы [6].

электрофорезом в реакции с тиобарбитуровой кислотой [10] обнаруживали 2-кето-3-дезоксиктулозоновую кислоту. Осадок полисахаридной фракции лиофилизировали (200 мг) и хроматографировали на сефадексе G-50. Получили три фракции: 1) D-глюкан (20 мг, $[\alpha]_{\text{D}} + 160^\circ$ (с 0.5, вода)); 2) O-специфический полисахарид (80 мг, $[\alpha]_{\text{D}} + 60^\circ$ (с 0.5, вода)); 3) олигосахарид кора с примесью моносахаридов (70 мг).

Частичный кислотный гидролиз. O-Специфический полисахарид (100 мг) гидролизировали 0.1 М HCl (15 мл, 1 ч, 100°C), концентрировали и хроматографировали на геле TSK HW-40(F). В результате получены три фракции: высокомолекулярная (15 мг), олигомерная (50 мг) и низкомолекулярная (8 мг). Из олигомерной фракции, представляющей собой смесь дисахарида и галактозы, препаративной БХ выделена D-галактоза (10 мг, $[\alpha]_{\text{D}} + 68^\circ$ (с 1.0, вода)) и дисахарид, который дополнительно очищали ВЭЖХ (3 мг, $R_{\text{Gal}} 0.92$, $[\alpha]_{\text{D}} + 5^\circ$ (с 0.2, вода)). Дисахарид (1 мг) восстанавливали NaBH_4 (2 мг), подвергали метанолизу смесью хлористый ацетил-метанол, 1 : 10 (0.5 мл, 100°C , 4 ч) и ацетиловали. ГЖХ-масс-спектрометрией идентифицировали ацетаты метилгликозидов галактозы и ацетат 6-дезоксигексита. Из низкомолекулярной фракции микропре-

паративной ВЭЖХ выделена 6-дезоксид-гулоза (5 мг, $R_{\text{Rha}} 0.94$, $[\alpha]_{\text{D}} - 37^\circ$ (с 0.5, вода)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bercovier H., Brault J., Barre N., Treignier M., Alonso J.M., Mollaret H.H. // Curr. Microbiol. 1978. V. 1. P. 353-357.
2. Wauters G., Janssens M., Steigerwalt A.G., Brenner D.J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1988. V. 38. P. 427-429.
3. Ovodov Yu.S., Gorshkova R.P., Tomshich S.V., Komandrova N.A., Zubkov V.A., Kalmykova E.N., Isakov V.V. // J. Carbohydr. Chem. 1992. V. 11. P. 21-35.
4. Горшкова Р.П., Исаков В.В., Зубков В.А., Оводов Ю.С. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. С. 1231-1235.
5. Dutton G.G.S., Folkman T.E. // Carbohydr. Res. 1980. V. 80. P. 147-161.
6. Калмыкова Е.Н., Горшкова Р.П., Исаков В.В., Оводов Ю.С. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. С. 652-656.
7. Kaufmann H., Muhradt P., Reichstein T. // Helv. Chim. Acta. 1976. V. 50. P. 2287-2298.
8. Micheel F., Klemer A. Ghemie der Zucker und Polysaccharide. Leipzig: Acad. Verlag., 1956. P. 400.
9. Hakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. P. 205-208.
10. Weissbach A., Hurwitz J. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. P. 705-709.

Structural Study of the Repeating Unit of the O-Specific Polysaccharide from *Yersinia mollaretii* Strain WS 42/89

R. P. Gorshkova, V. V. Isakov, E. L. Nazarenko, and L. S. Shevchenko

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

Abstract—The O-specific polysaccharide was isolated from *Yersinia mollaretii* strain WS 42/89 and characterized. Studies of the partial hydrolysis and methylation products and the ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy data enabled the following structure to be proposed for the repeating unit of the polysaccharide:



The same structure was ascribed to the O-specific polysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serovar O:6.31. The difference between these two O-antigens from various *Yersinia* species is in the absence of D-glycero-D-manno-heptose residues in the structure of the lipopolysaccharide from *Y. mollaretii*.

Key words: O-specific polysaccharide, *Yersinia*, NMR spectroscopy.