



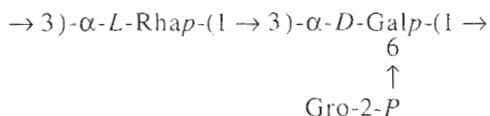
СТРУКТУРА ГЛИЦЕРОФОСФАТСОДЕРЖАЩЕГО О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639

© 1998 г. Р. П. Горшкова[#], Е. Л. Назаренко, В. В. Исаков,
В. А. Зубков, Н. М. Горшкова, Л. А. Романенко, Е. П. Иванова

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159*

Поступила в редакцию 27.02.98 г. Принята к печати 17.03.98 г.

На основании данных кислотного гидролиза, дефосфорилирования, метилирования и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии показано, что О-специфический полисахарид *Pseudoalteromonas* sp. KMM 639 представляет собой глицерофосфатсодержащий полимер, построенный из дисахаридных повторяющихся звеньев следующего строения:



Ключевые слова: *Pseudoalteromonas*; глицерофосфатсодержащий полисахарид; ЯМР-спектроскопия; метилирование.

Микроорганизмы рода *Alteromonas* – грамотрицательные гетеротрофные аэробные морские бактерии, имеющие один полярный жгутик. Данный род выделен в 1972 г. [1] из рода *Pseudomonas* на основании более низкого содержания G/C-пар в ее ДНК. В 1995 г. по результатам сиквенса rPHK род был подвергнут ревизии, в результате которой к роду *Alteromonas* отнесен только один вид – *A. macleodii*; все остальные виды отнесены к новому роду *Pseudoalteromonas* [2].

Ранее нами установлено строение антигенных полисахаридов нескольких видов рода *Alteromonas*, в составе которых идентифицирован ряд необычных моносахаридов, а также *N*-ацильных заместителей неуглеводной природы [3–7]. Данная работа посвящена дальнейшему структурному исследованию полисахаридов этого рода. В настоящем сообщении приведены результаты структурного анализа О-специфического полисахарида *Pseudoalteromonas* (*Alteromonas*) sp. КММ 639 из Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН.

Из влажной микробной биомассы *Pseudoalteromonas* sp. KMM 639 при экстракции водным фенолом [8] выделен липополисахарид (ЛПС), который далее очищен ионообменной хроматографией от примесного глюкана на геле DEAE TSK

650(М) (соотношение ЛПС и глюкана по весу – 2 : 7 соответственно).

Моносахаридный анализ глюкана ($[\alpha]_D +176^\circ$) показал наличие в составе полимера единственного моносахарида – D-глюкозы. Обработка полисахарида амилазой (α -1,4-глюканазой) с последующей препаративной БХ привела к выделению глюкозы ($[\alpha]_D +37^\circ$) и олигосахарида (R_{Gal} 0.74, $[\alpha]_D +107.3^\circ$), который, по данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и метилирования, являлся малтозой. В ^{13}C -ЯМР-спектре глюкана наблюдались сигналы при 100.4 (C-1); 72.4 (C-2); 74.0 (C-3); 77.6 (C-4); 72.0 (C-5); 61.3 м.д. (C-6), характерные для полимера, построенного из α -1,4-связанных остатков D-глюкозы [9].

В продуктах кислотного гидролиза ЛПС с помощью БХ и ГЖХ (в последнем случае в виде ацетатов полиолов) идентифицированы остатки глицерина, рамнозы, глюкозы, галактозы и глюкозамина. В результате мягкой кислотной деградации с последующим осаждением этанолом и гель-хроматографией ЛПС фракционирован на О-специфический полисахарид (ПС) и липид А. В этанольном растворе с помощью БХ и высоковольтного электрофореза при сравнении с заведомым образцом идентифицирована 3-дезокси-2-октулозоновая кислота (КДО). Липид А очищен двукратным экстрагированием смесью хлороформ–метанол – 2 : 1 и осаждением ацетоном. В хлороформном экстракте гидролизата липида А ГЖХ в виде метилового эфира, наряду с другими жирными кис-

Автор для переписки (факс: (4232)31-40-50; e-mail: elnaz@piboc.maine.su).

Данные ^{13}C -ЯМР-спектров (δ , м. д.)* ДПС и ПС *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
ДПС						
→3)- α -L-Rhap-1→	102.8 (102.9)	67.9 (68.3)	76.8 (76.8)	72.0 (71.8)	70.3 (70.4)	18.0 (18.0)
→3)- α -D-Galp-1→	96.8 (96.9)	68.8 (68.9)	78.3 (78.5)	70.5 (70.2)	71.7 (72.2)	62.0 (62.4)
ПС						
→3)- α -L-Rhap-1→	102.7	67.9	76.8	71.6	70.3	18.0
→3, 6)- α -D-Galp-1→	96.8	68.8	78.3	70.3	71.6	65.5
Gro	62.0**	74.4	62.0**			

* В скобках приведены расчетные данные.

** Уширенный дублет.

лотами, идентифицирована 3- β -гидроксимиристиновая кислота – обычный компонент ЛПС грамотрицательных бактерий, а в водном растворе (с помощью БХ и ГЖХ) – D-глюкозамин, элемент основной цепи липополисахарида А.

По данным элементного анализа, содержание фосфора в ПС составляло $\approx 3.6\%$. Кроме того, в ^{31}P -ЯМР-спектре ПС наблюдался сигнал при $+1.6$ м.д., что свидетельствует о наличии в цепи дизамещенного монофосфата [10].

В гидролизате ПС БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы *D*-галактоза, *L*-рамноза, абсолютная конфигурация которых определена на основании величин их удельного оптического вращения, а также глицерин. Кроме того, с помощью высоковольтного бумажного электрофореза показано наличие кислого компонента с M_{GalA} 0,7, дающего положительную реакцию с молибденовым реагентом Хейнса-Ишервуда на фосфор и являющийся, таким образом, неорганическим фосфатом.

Порядок замещения моносахаридных остатков в ПС определен методом метилирования [11]. При этом ГЖХ-МС идентифицированы 2,4-ди-*O*-метилрамноза и 2,4-ди-*O*-метилгалактоза, что указывает на разветвленный характер полисахарида и замещение остатка рамнозы в положение 3, а остатка галактозы – в положения 3 и 6.

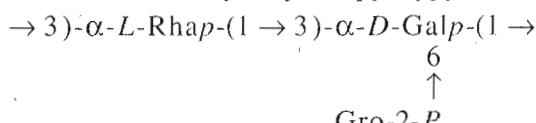
В результате дефосфорилирования полисахарида с последующей гель-хроматографией продуктов реакции на геле TSK HW-40(F) получен дефосфорилированный полисахарид (ДПС), в составе которого БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов обнаружены галактоза и рамноза. В ^{13}C -ЯМР-спектре ДПС присутствовали сигналы аномерных атомов углерода при 102.8 и 96.8 м.д. (таблица), а также сигналы метильной (18.0 м.д.) и гидроксиметильной (62.4 м.д.) групп, относящиеся к С-6 моносахаридных остатков. Из этих данных следует, что молекула ДПС построена из повторяющихся дисахаридных звеньев, содержащих один остаток гексозы и один – 6-дезоксигексозы. Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $J_{\text{C},\text{H}}$, определенные из ^{13}C -ЯМР-спектра, снятого

без подавления углерод-протонных взаимодействий, составляли 170 Гц для обоих аномерных атомов, что указывает на α -конфигурацию всех гликозидных связей в ДПС [12]. Анализ химических сдвигов углеродных атомов и эффектов гликозилирования позволил надежно отнести сигналы остатков рамнозы и галактозы [13]. Сигнал при 96.8 м.д. может принадлежать только аномерному атому остатка с D -конфигурацией, гликозилирующему в положение 3 остаток с L -конфигурацией, имеющий аксиальную OH-группу в положении 2 или 4 [13]. При обработке периодатом ПС не окислялся (^{13}C -ЯМР-спектры нативного и окисленного ПС были идентичны). Этот факт подтверждает данные метилирования, а также указывает на то, что остаток фосфорной кислоты замещает остаток глицерина в положение 2. Таким образом, анализ спектров подтвердил строение ДПС:



Для подтверждения приведенной структуры проведен компьютерный расчет ^{13}C -ЯМР-спектра ДПС по методу [14] (таблица). При этом величины расчетных химических сдвигов оказались близкими к экспериментальным (сумма квадратичных отклонений химических сдвигов атомов углерода составила 0,7).

При сопоставлении ^{13}C -ЯМР-спектров нативного ПС и ДПС видно, что в спектре исходного ПС имеются дополнительные сигналы при 62.0 (двойной интегральной интенсивности), 65.5 и 74.4 м.д. Форма двух последних сигналов углеродных атомов (уширенные дублеты) указывает на то, что они связаны с остатком фосфата [15], а величины их химических сдвигов позволяют отнести первый к C-2 атому глицерина, а второй – к C-6 остатка галактозы [13]. Таким образом, О-специфический полисахарид *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639 имеет следующую структуру:



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование микроорганизма *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639, выделение ЛПС, аналитическую и препаративную БХ, ГЖХ и ГЖХ-МС, жидкостную хроматографию, электрофорез, измерение оптического вращения, полный кислотный гидролиз ЛПС, ПС и липида А, метилирование выполняли как описано ранее [3]. ^{13}C -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 60°C ; внутренний стандарт – метанол ($\delta_{\text{C}} 50.15$ м.д.). ^{31}P -ЯМР-спектр записан на том же приборе при 20°C относительно H_3PO_4 . Содержание фосфора определяли по методу [16].

ЛПС, выделенный по методу Вестфала [9] (2.4 г), подвергали анионообменной хроматографии на геле DEAE TSK 650(M). При этом резервный D-глюкан (1.63 г) элюировался 50 мМ Трис-HCl-буфером (рН 7.0), а ЛПС – 0.5 М NaCl в том же буфере (480 мг). ЛПС (400 мг) гидролизовали 1% уксусной кислотой (40 мл, 100°C , 2 ч), осадок липида А отделяли центрифугированием (20 мг), водорастворимую фракцию осаждали этанолом, осадок хроматографировали на геле TSK-65(F), получая при этом ПС (300 мг). Водно-этанольный раствор упаривали досуха. Выход остатка 15 мг.

Дефосфорилирование ПС (100 мг) проводили 40% водной HF (10 мл, 4°C , 48 ч), кислоту удаляли над щелочью в вакуум-эксикаторе, полученный продукт хроматографировали на геле TSK HW 40(F). Выход ДПС – 58 мг.

Работа финансирована РФФИ (грант № 96-04-49028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

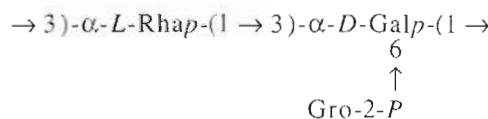
1. Baumann L., Baumann P., Mandel M., Allen R.D. // J. Bacteriol. 1972. V. 110. P. 402–429.
2. Gauthier G., Gauthier M., Christen R. // Intern. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 755–761.
3. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков В.А., Иванова Е.П., Оводов Ю.С., Шашков А.С., Книрель Ю.А. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 327–336.
4. Назаренко Е.Л., Зубков В.А., Шашков А.С., Книрель Ю.А., Горшкова Р.П., Иванова Е.П., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 740–751.
5. Назаренко Е.Л., Горшкова Р.П., Зубков В.А., Шашков А.С., Иванова Е.П., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 733–739.
6. Zubkov V.A., Nazarenko E.L., Gorshkova R.P., Ivanova E.P., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Paramonov N.A., Ovodov Y.S. // Carbohydr. Res. 1995. V. 275. P. 147–154.
7. Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov V.A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Paramonov N.A., Meshkov S.V., Ivanova E.P. // Carbohydr. Res. 1997. V. 299. P. 69–76.
8. Westphal O., Luderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. B. 7B. P. 148–155.
9. Dutton G.G.S., Folkman T.E. // Carbohydr. Res. 1980. V. 80. P. 147–161.
10. Egan W., Schneerson R., Werner K.E., Zon G. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2898–2910.
11. Hakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. P. 205–208.
12. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans II. 1974. № 3. P. 293–297.
13. Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.
14. Kochetkov N.K., Виноградов Е.В., Книрель Ю.А., Шашков А.С., Липкинд Г.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 116–125.
15. Jennings H.J., Lugowski C., Young N.M. // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 4712–4719.
16. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 1756–1758.

Structure of the Glycerophosphate-containing O-Specific Polysaccharide of *Pseudoalteromonas* sp. KMM 639

R. P. Gorshkova[#], E. L. Nazarenko, V. V. Isakov, V. A. Zubkov,
N. M. Gorshkova, L. A. Romanenko, and E. P. Ivanova

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

On the basis of acid hydrolysis, dephosphorylation, methylation, and ^{13}C NMR spectroscopy data, the O-specific polysaccharide of *Pseudoalteromonas* sp. KMM 639 was shown to be a glycerophosphate-containing polymer built of repeating disaccharide units of the following structure:



Keywords: *Pseudoalteromonas*, glycerophosphate-containing polysaccharide, NMR spectroscopy, methylation

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 314050; e-mail: elnaz@piboc.marine.su.