



УДК 577.154.5+547.455.628'118.07

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА
САЛМОНЕЛЛ5. СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТСАХАРОВ — ПРОИЗВОДНЫХ
 α -D-ТАЛОПИРАНОЗЫ **Шибанов В. Н., Елисева Г. П., Краевская М. А.,
Кочетков Н. К.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Взаимодействием 1,2,3,4,6-пента-О-ацетил- α -D-талопиранозы с безводной фосфорной кислотой получен α -D-талопиранозилфосфат, который превращен далее в уридин-5'- и гуанозин-5'-пирофосфатные производные. Структура гликозилфосфата подтверждена с использованием методов ПМР, ^{13}C -ЯМР и поляриметрии. Предложены эмпирические уравнения, позволяющие вычислять молекулярное вращение гликопиранозилфосфатов по молекулярному вращению соответствующих метилгликопиранозидов.

В последние годы в нашей лаборатории проводятся исследования по специфичности ферментов, участвующих в биосинтезе О-специфических полисахаридов салмонелл, с использованием синтетических аналогов нуклеотидсахаров (обзор — см. [2]). Эта система включает в себя ферменты, использующие в качестве субстратов уридиндифосфатгалактозу (UDP-Gal) и гуанозиндифосфатманнозу (GDP-Man). В одном из предыдущих сообщений серии [3] было показано, что маннозилтрансфераза из *Salmonella anatum* способна довольно эффективно использовать в качестве субстрата аналоги GDP-Man, содержащие остатки дезоксисахаров, и катализировать образование полипренилпирофосфаттрисахаридов, в которых остаток D-маннозы заменен на остатки 6-дезоксид-маннозы и 3-дезоксид-D-арабиногексозы.

Встает вопрос: позволяет ли специфичность гликозилтрансфераз осуществлять перенос моносахаридов — эномеров нормальных субстратов реакции? В этой связи особый интерес представляют производные α -D-талопиранозы (I) — моносахарида, который является энимером D-галактозы по C2 и D-маннозы по C4. В настоящем сообщении мы описываем синтез α -D-талопиранозилфосфата (II) и превращение его в 5'-пирофосфатные производные уридина и гуанозина.

Как показывают рентгеноструктурные исследования, для моносахарида (I) характерна нормальная конформация $^4\text{C}_1$, [4, 5], появление дополнительного заместителя в аксиальном положении не сказывается заметно на отклонении равновесной конформации моносахарида от идеальной формы кресла: в случае α -D-талопиранозы это отклонение приблизительно такое же, как для α -D-маниопиранозы [6], и лишь немного больше,

* Сообщение 4 — см. [1].

чем для α -*D*-галактопиранозы [7, 8]. В то же время дополнительная неустойчивость формы кресла, обусловленная 2,4-диаксиальным взаимодействием, приводит к значительному содержанию фураноз в равновесии. По данным работы [9], полученным с помощью метода ПМР, в водном растворе *D*-галазы при равновесии присутствуют α -пираноза, β -пираноза, α -фураноза и β -фураноза в отношении 37 : 32 : 17 : 14. При исследовании с помощью метода ^{13}C -ЯМР их отношение оценено как 4 : 3 : 2 : 1 [10]. Это создает определенные трудности при получении производных с фиксированной циклической формой и конфигурацией у гликозидного центра.



(I) X = OH

(II) X = $\text{OPO}_3 \cdot 2\text{Et}_3\text{N}$

(III)

При ацетилировании *D*-галазы уксусным ангидридом в пиридине в стандартных условиях удается выделить кристаллическую 1,2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -*D*-галапиранозу (III) с 55% выходом; продукт однороден по данным ТСХ и ГЖХ, его температура плавления и оптическое вращение совпадают с описанными в литературе.

Фосфорилирование производного (III) действием безводной фосфорной кислоты с последующим дезацетилированием гидроокисью лития привело к смеси гликозилфосфатов, которая была разделена с помощью монообменной хроматографии (разделение контролировали, определяя во фракциях кислотолабильный фосфат и сравнивая скорость кислотного гидролиза гликозилфосфатов, присутствующих в различных фракциях, с помощью недавно разработанного метода [11]).

Основным продуктом реакции, выделенным в виде триэтиламмониевой соли с выходом 39%, является α -*D*-галапиранозилфосфат (II). Структура его вытекает из следующих данных:

1) электрофоретическая подвижность продукта и способность его быстро отщеплять неорганический фосфат в слабокислой среде однозначно указывают на структуру гликозилфосфата;

2) положение сигнала ^1H в спектре ПМР (δ 5,38 м.д.) и характер его расщепления (дд, $J_{1,2}$ 8 Гц, $J_{1,3}$ 1,5 Гц) соответствуют ожидаемым для сигнала ^1H , связанного с фосфатной группой, при 1,2-*транс*-диэкваториальном расположении протонов (ср. [12]);

3) спектр ^{13}C -ЯМР исследуемого фосфата содержит только шесть сигналов причем в области 80–85 м.д., характерной для атома C4 фуранозидов [13], сигналы отсутствуют. Благодаря спин-спиновому взаимодействию с атомом фосфора в спектре легко идентифицировать сигналы C1 и C2. При сопоставлении спектра со спектрами α - и β -*D*-галапиранозы [10] (см. таблицу) можно видеть почти полную идентичность спектра гликозилфосфата и α -пиранозы: сигналы C2, C3, C4 и C6 отличаются не более чем на 0,2 м.д., и лишь сигнал C5 смещен в спектре фосфата на 1,2 м.д. в сторону слабого поля, а сигнал C1 — на 1,6 м.д. в ту же сторону по сравнению со спектром моносахарида. Характерное отличие от спектра β -галапиранозы — отсутствие двух близко расположенных сигналов между 69 и 70 м.д. и сигнала вблизи 76 м.д., присутствие сигнала вблизи 66 м.д. Близость спектров ^{13}C -ЯМР гликозилфосфатов и моносахаридов соответствующей конфигурации была продемонстрирована на целом ряде гликозилфосфатов [12];

4) большое положительное значение молекулярного вращения полученного гликозилфосфата также подтверждает его конфигурацию. Из сопоставления оптического вращения семи пар аномерных гликозилфосфа-

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

Сигналы атомов углерода	(II) *	α -D-Талопираноза **	β -D-Талопираноза **
C1	97.1 (д, 2J 5,5 Гц)	95,5	95,0
C2	71,9 (к, 2J 8,2 Гц)	71,7	72,5
C3	70,8	70,6	69,6
C4	66,0	66,0	69,4
C5	73,2	72,0	76,6
C6	62,6	62,4	62,2

* Спектр $^2\text{H}_2$ с CH_3OH в качестве внутреннего стандарта получен на приборе «Bruker WP-60» с рабочей частотой 15,08 МГц.

** Данные работы [10].

тов и соответствующих метилгликопиранозидов, приведенных в работе [14], нетрудно вывести эмпирические формулы, связывающие величины молекулярного вращения этих соединений. Для соединений, находящихся в $^4\text{C}_1$ -конформации и содержащих заместитель при C1 в экваториальном положении

$$[M]_D^P = [M]_D^{\text{Me}} + 108 (\pm 7),$$

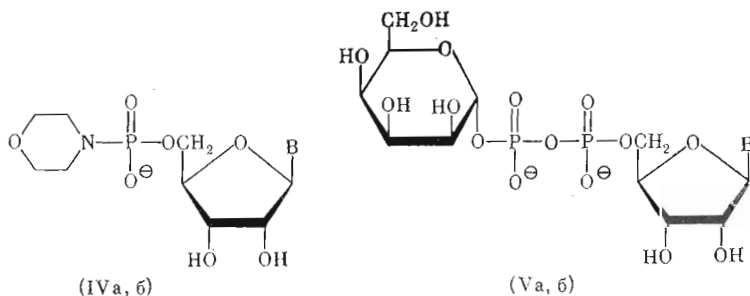
а при аксиальном положении заместителя при C1

$$[M]_D^P = [M]_D^{\text{Me}} - 15 (\pm 6),$$

где $[M]_D^P$ — молекулярное вращение гликозилфосфата, $[M]_D^{\text{Me}}$ — молекулярное вращение аналогичного по структуре метилгликопиранозиды (значения молекулярного вращения, приведенные в работе [14], разделены на 100 в соответствии с обычным способом вычисления молярного вращения; в скобках приведена величина среднего квадратичного отклонения).

Расчет по этим формулам, исходя из данных об оптическом вращении метил- α -D-талопиранозиды [15] и метил- β -D-талопиранозиды [16], дает для фосфата (II) ожидаемое значение $[M]_D = 189 \pm 6^\circ$, а для его β -аномера $53 \pm 7^\circ$. Экспериментальное значение $[M]_D = 180^\circ$ хорошо согласуется с первым вариантом.

Интересно, что в стандартных условиях кислотного гидролиза [11] скорость образования неорганического фосфата из фосфата (II) выше, чем из α -D-маннопиранозилфосфата, но заметно ниже, чем из α -D-галактопиранозилфосфата. Это не соответствует общепринятым представлениям о влиянии структуры моносахаридного остатка на скорость гидролиза гликозилфосфатов (ср. [11]); причины этого остаются неясными.



а: В = урацил-1-; б: В = гуанил-9-

Для превращения фосфата (II) в целевые нуклеотидсахара (Va, б) был использован описанный ранее [17] вариант фосфоморфолидного метода — взаимодействие триэтиламониевых солей соответствующих нуклеозид-5'-фосфоморфолидов (IVa, б) с двукратным избытком триэтила-

мониевой соли (II) в DMSO. Продукты были выделены с 36–38% выходом после препаративного электрофореза на бумаге с последующей хроматографией на бумаге. Их электрофоретическая подвижность соответствует подвижности двузамещенных пирофосфатов. Отношение нуклеозид — кислотолabileный фосфат — общий фосфат, близкое к теоретическому, 1 : 1 : 2, подтверждает структуру нуклеозиддифосфатсахаров.

Экспериментальная часть

Использованное оборудование и техника обнаружения веществ на хроматограммах были такими же, как в предыдущей работе [18]. Определение кислотолabileного фосфата и методика кинетических исследований описана в работе [11]. Общий фосфат определяли по аналогичной методике после озонения образца 57% хлорной кислотой в течение 15 мин при 200° С. Для ГЖХ использован хроматограф «Pye Unicam Series 105» (Англия), колонка с 5% SE-30 (Chromaton N-AW-DMCS) длиной 1,5 м. Аналитическую хроматографию и электрофорез на бумаге проводили с использованием бумаги «Filttrak FN-11» (ГДР), при препаративных разделениях применяли «Whatman 3ММ» (Англия). Для хроматографии на бумаге использована система этанол — 0,5 М ацетат аммония, рН 7,5 (5 : 2) (А), электрофорез проводили в приборе ПВЭФ-1 при градиенте потенциала 10 В/см в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонате, рН 7,5. Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля G (Merck, ФРГ), разрезанных до размера 5×1 см, в системах хлороформ — метанол, 9 : 1 (Б), и хлороформ — метанол — 0,15 М триэтиламмонийбикарбонат (рН 7,5), 10 : 10 : 3 (В), с обнаружением веществ опрыскиванием серной кислотой или реагентом на фосфат [19]. При колоночной хроматографии использовали силикагель L100/160 мк (Chemapol, ЧССР).

1,2,3,4,6-Пента-О-ацетил- α -D-галактопираноза (II). 1 г (5,6 ммоль) *D*-галактозы (Lachema, ЧССР) сушили 2 ч при 20° С/1 мм, растворяли в 8 мл абс. пиридина, добавляли 5 мл уксусного ангидрида и оставляли на 3 сут при 0° С.

Реакционную смесь выливали в ледяную воду и перемешивали 2 ч. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и перекристаллизовывали из этанола, получили 1,2 г (55%) ацетата (III), т.пл. 105–107° С, $[\alpha]_D^{20} +69^\circ$ (с 3,4; хлороформ), R_f 0,8 (Б). Лит. данные: т.пл. 106–107° С [20, 21], 104–105° С [22], $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$ [20], $+68^\circ$ [22]. ГЖХ: время удерживания 8 мин (температура 212° С).

α -D-Галактопиранозилфосфат (II). Смесь 250 мг (0,64 ммоль) ацетата (III) и 1 г кристаллической фосфорной кислоты (Merck, ФРГ) выдерживали в вакууме 30 мин при 30° С, а затем сплавляли 3 ч при 50° С. После охлаждения в смесь при перемешивании добавляли 20 мл охлажденной 2 н. LiOH, перемешивали 16 ч при 20° С. Осадок отделяли центрифугированием, промывали 0,1 н. LiOH, раствор и промывные воды нейтрализовали добавлением дауэкса-50 (H⁺-форма) и пропускали после фильтрации через колонку (17×1,8 см) с дауэксом-1×8 (HCO₃⁻-форма). Колонку промывали водой, элюировали фосфаты линейным градиентом концентрации триэтиламмонийбикарбоната, рН 7,5 (0,075–0,2 М, по 400 мл), собирая фракции по 20 мл и определяя во фракциях кислотолabileный фосфат. Из фракций 26–33 после упаривания и удаления буфера повторной отгонкой с водой и затем со спиртом получали триэтиламмониевую соль (II), выход 250 мкмоль (39%), $[M]_D^{180}$ (с 0,013 М, вода), $E_{\text{ликреат}}$ 1,5, R_f 0,3 (А), 0,45 (В). ПМР-спектр (δ , м.д., ²H₂O): 5,38 (дд, ¹H, $J_{1,2}$ 8 Гц, $J_{1,2}$ 1,5 Гц). Спектр ¹³C-ЯМР — см. таблицу. $K_{\text{гидр}}$ (константа скорости гидролиза в условиях, описанных в работе [11]): $6,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (в параллельном опыте для α -D-маннопиранозилфосфата найдено $K_{\text{гидр}} 4,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, для α -D-галактопиранозилфосфата — $9,2 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$).

Уридин-5'-(α -D-галопиранозилпирофосфат) (Va). Смесь 23 мкмоль триэтиламмониевой соли уридин-5'-фосфоморфолида (получена из 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли [23] как описано в работе [17]) и 46 мкмоль триэтиламмониевой соли (II) высушивали азотропной отгонкой смеси спирт — бензол (1 : 1) и бензола. Остаток растворяли в 0,2 мл абс. DMSO, выдерживали 20 ч при 60° С. Продукт выделяли препаративным электрофорезом на бумаге ($E_{\text{пират}}$ 1,13) с последующей рехроматографией на бумаге в системе (A), R_f 0,44. Выход 8,8 мкмоль (38%), отношение уридин (по поглощению при 260 нм) — кислотолabileный фосфат — общий фосфат найдено равным 1,00—0,97 : 2,03.

Гуанозин-5'-(α -D-галопиранозилпирофосфат) (Vб) получен аналогично из 18,5 мкмоль триэтиламмониевой соли гуанозин-5'-фосфоморфолида [17, 23] и 37 мкмоль фосфата (II). Выход 6,7 мкмоль (37%), $E_{\text{пират}}$ 0,97, R_f 0,21 (A). Отношение гуанозин (по поглощению при 255 нм) — кислотолabileный фосфат — общий фосфат найдено равным 1,00 : 1,03 : 2,06.

Авторы глубоко признательны А. С. Шашкову за съемку спектра ^{13}C -ЯМР и помощь при его интерпретации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кусов Ю. Ю., Киселева Е. В., Данилов Л. Л., Шибяев В. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. (1979) Биоорг. химия, 5, 1863—1872.
2. Shibaev V. N. (1978) Pure Appl. Chem., 50, 1421—1430.
3. Шибяев В. Н., Дружнина Т. Н., Кочетков Н. К., Ручар Ш., Бауэр Ш. (1978) Биоорг. химия, 4, 410—414.
4. Ohanessian J., Avenel D., Kanters J. A., Smits D. (1977) Acta crystallogr., B33, 1063—1066.
5. Hansen L. K., Nordvik A. (1977) Acta chem. scand., A31, 187—191.
6. Longchambon F., Avenel D., Neuman A. (1976) Acta crystallogr., B32, 1822—1826.
7. Sheldrick B. (1976) Acta crystallogr., B32, 1016—1020.
8. Ohanessian J., Gillier-Pandraud H. (1976) Acta crystallogr., B32, 2810—2813.
9. Angyal S. J., Pickles V. A. (1972) Austral. J. Chem., 25, 1695—1710.
10. Pfeffer P. E., Valentine K. M., Parrish F. W. (1979) J. Amer. Chem. Soc., 101, 1265—1274.
11. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибяев В. Н. (1980) Биоорг. химия, 6, 780—782.
12. O'Connor J. V., Nunez H. A., Barker R. (1979) Biochemistry, 18, 500—507.
13. Ritchie R. G. S., Cyr N., Korsch B., Koch H. J., Perlin A. S. (1975) Can. J. Chem., 53, 1424—1433.
14. Prihar H. S., Behrman E. J. (1973) Biochemistry, 12, 997—1002.
15. Gorin P. A. J. (1960) Can. J. Chem., 38, 641—651.
16. Angyal S. J., Bodkin C. L., Parrish F. W. (1975) Austral. J. Chem., 28, 1541—1545.
17. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибяев В. Н., Лебедева К. С. (1969) Изв. АН СССР. Сер. хим., 897—903.
18. Шибяев В. Н., Уткина Н. С., Данилов Л. Л., Елпеева Г. И. (1980) Биоорг. химия, 6, 1778—1781.
19. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasenin I. M. (1975) J. Chromatogr., 114, 129—141.
20. Pigman W. W., Isbell H. S. (1937) J. Res. Nat. Bur. Stand., 19, 184—213.
21. Brimacombe J. S., Gent P. A. (1969) Carbohydr. Res., 9, 231—236.
22. Paulsen H., Espinosa F. G., Trautwein W. P. (1968) Chem. Ber., 101, 186—190.
23. Moffat J. G., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649—658.

Поступила в редакцию
23.VII.1980

SPECIFICITY OF THE ENZYMES OF SALMONELLA O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS. 5. SYNTHESIS OF SUGAR NUCLEOTIDES DERIVED FROM α -D-TALOPYRANOSE

SHIBAEV V. N., ELISEYEVA G. I., KRAYEVSKAYA M. A.,
КОЧЕТКОВ Н. К.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

α -D-Talopyranosyl phosphate was prepared by reaction of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α -D-talopyranose with anhydrous phosphoric acid and further converted to uridine 5'-pyrophosphate and guanosine 5'-pyrophosphate derivatives. Structure of the glycosyl phosphate was confirmed by PMR and ^{13}C NMR spectra, and by polarimetric data. Empirical equations for calculation of molar rotation of glycopyranosyl phosphates from molar rotation of methyl glycopyranosides were suggested.