

Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *V. fluvialis*

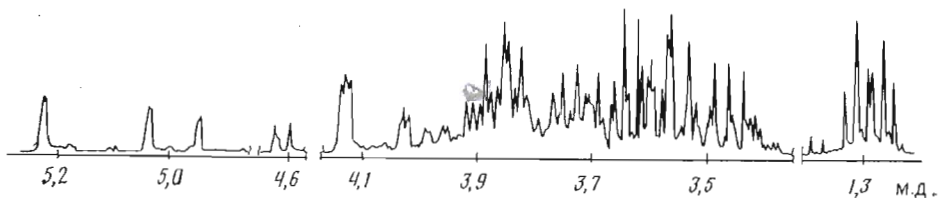


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *V. fluvialis*

протонов при 5,23 (двойной интенсивности), 5,04; 4,95 (все уширенные синглеты) и 4,61 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 8,0 Гц).

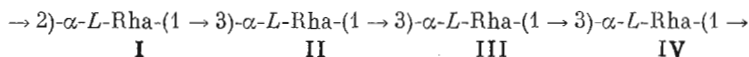
В гидролизате полисахарида методами хроматографии на бумаге и ГЖХ идентифицированы рамноза и глюкозамин. Соотношение этих моносахаридов, определенное методом ГЖХ после дезаминирования гидролизатов и превращения сахаров в ацетаты полиолов [6], составило $\sim 4:1$. Таким образом, пентасахаридное повторяющееся звено полисахарида содержит четыре остатка рамнозы и один остаток N-ацетилглюкозамина. Рамноза была выделена из гидролизата в индивидуальном состоянии препаративной хроматографией на бумаге, и на основании величины оптического вращения этого моносахарида и полученного из него метилрамнозида установлено, что рамноза имеет *L*-конфигурацию.

Из ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, определены константы спин-спиновой взаимодействия (КССВ) $^1J_{\text{C,H}}$ для аномерных атомов. Относительно небольшая константа ($^1J_{\text{C,H}}=163,6$ Гц) для сигнала при 104,0 м.д. указывает на то, что он соответствует β -связанному моносахариду, а сравнительно большие константы ($^1J_{\text{C,H}}\approx 171$ Гц) для остальных аномерных сигналов свидетельствуют об α -конфигурации соответствующих моносахаридов [7]. Химический сдвиг 57,0 м.д. сигнала C2 остатка N-ацетилглюкозамина до-

казывает, что β -конфигурацию имеет именно этот моносахарид, так как в случае α -конфигурации C2 резонировал бы в значительно более сильном поле (от 55 м.д. и выше) [8]. Величины КССВ свидетельствуют также о пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют значения в области 172–175 Гц) [9].

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде установлен методом метилирования. После гидролиза метилированного по Хакомори [10] полисахарида методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов были идентифицированы 1,2,5-три-О-ацетил-3,4-ди-О-метилрамноза, 1,3,5-три-О-ацетил-2,4-ди-О-метилрамноза, 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-4-О-метилрамноза в соотношении 1:2:1, а также 1,5-ди-О-ацетил-2-дезоксид-2-(N-метил)ацетамидо-3,4,6-три-О-метилглюкоза. Таким образом, это разветвленный полисахарид; терминальный моносахарид представлен остатком N-ацетилглюкозамина, в узле разветвления находится остаток рамнозы, замещенный в положении 2 и 3, два других остатка рамнозы замещены в положение 3, а четвертый остаток рамнозы — в положение 2.

С целью отщепления терминального остатка N-ацетилглюкозамина было применено N-дезацетилирование с последующим дезаминированием по методике [11]. В гидролизате образовавшегося модифицированного полисахарида, выделенного гель-хроматографией на фрактогеле TSK HW 40S, идентифицирован единственный моносахарид — рамноза. ^{13}C -ЯМР-спектр полученного рамнана содержит сигналы 4 метильных групп 6-дезоксисахаров при 17,9 м.д., 4 аномерных атомов углерода при 103,3 (тройной интенсивности) и 102,0 м.д., а также 15 вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 70–80 м.д. При анализе рамнана методом метилирования идентифицированы 1,2,5-три-О-ацетил-3,4-ди-О-метилрамноза и 1,3,5-три-О-ацетил-2,4-ди-О-метилрамноза в соотношении $\sim 1:3$. Из данных метилирования и ^{13}C -ЯМР-спектра следует, что полученный в результате N-дезацетилирования и дезаминирования модифицированный полисахарид представляет собой линейный рамнан, повторяющееся звено которого содержит четыре остатка рамнозы, три из которых замещены в положение 3 и один — в положение 2, и, таким образом, имеет следующую структуру:



Сопоставление данных метилирования исходного и модифицированного полисахарида показывает, что терминальный остаток N-ацетилглюкозамина присоединен в положение 2 одного из остатков рамнозы, замещенных в основной цепи в положение 3. Для определения, какой именно остаток рамнозы (II, III или IV) находится в узле разветвления, была использована ^1H -ЯМР-спектроскопия.

^1H -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида был расшифрован с помощью методики селективного гомоядерного двойного резонанса и двумерной спектроскопии, коррелирующей химические сдвиги протонов, связанных друг с другом спин-спиновым взаимодействием (COSY), и химические сдвиги протонов A и X в системе AMX, в которой есть спин-спиновое взаимодействие протонов A с M и M с X, но нет взаимодействия A с X (RCT, Relayed Coherence Transfer) [12, 13]. Применение этой методики позволило скоррелировать химические сдвиги сигналов H1, H2 и H3 каждого из четырех остатков рамнозы (рис. 3). Результаты расшифровки ^1H -ЯМР-спектра приведены в табл. 1.

Далее были определены ядерные эффекты Оверхаузера (ЯЭО), возникающие при предоблучении аномерных протонов каждого из пяти моносахаридных остатков, входящих в повторяющееся звено (табл. 2). Наличие ЯЭО на H2 остатка рамнозы-II, возникающего при предоблучении протона H1 остатка N-ацетилглюкозамина, показывает, что эти два моносахарида соединены 1,2-связью. Следовательно O-специфический поли-

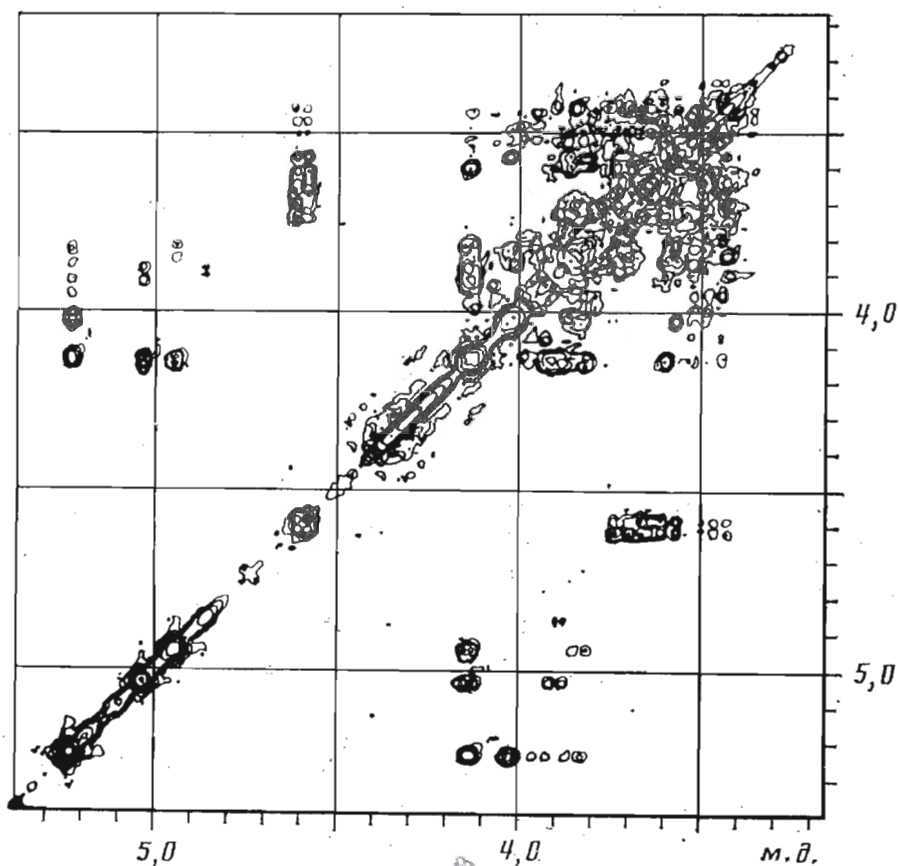
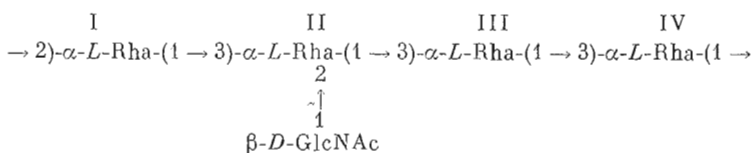


Рис. 3. COSY RCT-спектр О-специфического полисахарида *V. fluvialis*. Видны корреляционные пики в координатах химических сдвигов Н1 и Н2, а также Н1 и Н3 каждого из остатков (см. табл. 1)

сахарид имеет структуру



Структура этого полисахарида была подтверждена результатами полной расшифровки его ^{13}C -ЯМР-спектра, а также спектра полученного из него рамнана (табл. 3), которая была проведена с использованием данных [15].

Экспериментальная часть

^1H -ЯМР-спектры сняты на приборе WM-250 (Bruker) в D_2O при 70°C с 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоной кислотой в качестве внутреннего стандарта. Двумерный спектр COSY RCT [12, 13] получен с последовательностью задержек и импульсов ($\text{D1} - 90^\circ - t_1 - 90^\circ - \text{D2} - 180^\circ - \text{D2} - 90^\circ - \text{СИС}^*$) $_n$, где $\text{D1}=2$ с (релаксационная задержка, $\text{D2}=33$ мс; оптимизировано для максимальной КССВ 10 Гц), $n=32$, t_1 — переменный период эволюции. Использовано 256 эквидистантных значений t_1 в диапазоне 0,003–208 мс с шагом 0,814 мс. Ширина спектра по координате f_1 1200 Гц, по f_2 — 600 Гц. Размер матрицы 1024×512 точек; разрешение — 2,4 Гц на точку по обоим координатам. При фурье-преобразовании использовалась синусоидальная функция с нулевым сдвигом. Матрица сим-

* СИС — спад индуцированного сигнала.

Данные ¹H-ЯМР-спектра О-специфического полисахарида *

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг	KCCB, Гц		Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг	KCCB, Гц	
GlcNAc	H1	4,61	$J_{1,2}$	8,0	Rha-II	H1	5,23	$J_{1,2}$	≤2
	H2	3,69	$J_{2,3}$	10,0		H2	4,13	$J_{2,3}$	3,1
	H3	3,62	$J_{3,4}$	10,0		H3	3,97	$J_{3,4}$	9,2
	H4	3,46	$J_{4,5}$	9,5		H4	3,47	$J_{4,5}$	9,2
	H5	3,40	$J_{5,6a}$	2,4	Rha-III	H1	5,04	$J_{1,2}$	≤2
	H6a	3,86	$J_{6a,6b}$	12,4		H2	4,13	$J_{2,3}$	3,2
H6b	3,74	$J_{5,6b}$	4,8	H3	3,89	$J_{3,4}$	9,2		
Rha-I	H1	5,23	$J_{1,2}$	≤2	Rha-IV	H1	4,95	$J_{1,2}$	≤2
	H2	4,02	$J_{2,3}$	~3		H2	4,13	$J_{2,3}$	3,4
	H3	3,84	$J_{3,4}$	9,6	H3	3,83	$J_{3,4}$	9,3	
	H4	3,56	$J_{4,5}$	9,6	H4	3,57	$J_{4,5}$	9,3	

* Химические сдвиги сигнала CH_2CON 2,06 м. д., сигналов H6 остатков рамнозы 1,32; 1,30; 1,27 и 1,25 м. д.; положение сигналов H5 остатков рамнозы не определялось.

Таблица 2

Ядерные эффекты Оверхаузера, возникающие при преоблучении аномерных протонов

Преоблучаемый моносахаридный остаток	Наблюдаемые сигналы в ЯЭО-спектре *												
	GlcNAc				RhaI		RhaII			RhaIII		RhaIV	
	H2	H3	H4	H5	H2	H3	H1	H2	H3	H2	H3	H2	H3
GlcNAc	+	+	+ 2*	+		+ 3*	+	+					
Rha-I+Rha-II					+			+					
Rha-III										+			
Rha-IV					+							+	+

* Плюс означает наличие сигнала отрицательного ЯЭО в разностном спектре.

** Возникает из-за диффузии спиновой плотности с сигнала H5.

** Возникает из-за пространственной близости протона H1 GlcNAc и H3 Rha-I в энергетически выгодной конформации [14].

Таблица 3

Данные ¹³C-ЯМР-спектров (δ, м. д.) *

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
О-Специфический полисахарид						
-2Rhaα (I)	102,5	79,3	71,1	73,8	70,6	17,9
-2,3Rhaα (II)	101,7	76,7	79,1	73,4	70,5	17,7
-3Rhaα (III)	103,1	71,1	79,1	72,6	70,6	17,9
-3Rhaα (IV)	103,2	71,1	79,3	72,7	70,5	17,9
GlcNAcβ	104,0	57,0	74,3	71,1	77,2	61,8
Основная цепь						
-2Rhaα (I)	102,0	79,6	71,2	73,5	70,5	17,9
-3Rhaα (II)	103,3	71,2	79,4	72,9	70,5	17,9
-3Rhaα (III)	103,3	71,2	79,1	72,6	70,5	17,9
-3Rhaα (IV)	103,3	71,2	79,1	72,6	70,5	17,9

* Отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,5 м. д., может быть обратным. Химические сдвиги N-ацетильной группы 23,6 (CH_3) и 175,3 (C=O) м. д.

метризована относительно диагонали. ЯЭО определяли разностным способом по методике [16] при задержке релаксации 4 с и времени построения ЯЭО 0,5 с.

^{13}C -ЯМР-спектры сняты на приборе AM-300 (Bruker) в D_2O 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 лиофилизировали или упаривали в вакууме. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15, Whatman 3MM в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, при обнаружении веществ щелочных нитратом серебра. Гель-хроматографию осуществляли на колонке (3,5×70 см) с гелем Sephadex G-50 в пиридин-ацетатном буфере (pH 5,5) и на колонке с сорбентом Fraktogel TSK HW 40(S) в воде. Элюционные кривые строили с помощью углеводного анализатора Technicon (США) и дифференциального рефрактометра Кнауер (ФРГ). ГЖХ проводили на приборе Hewlett-Packard (модель 5890) на капиллярной колонке (0,2 мм×25 м) с фазой Ultra-1 в интервале температур $140 \rightarrow 290^\circ\text{C}$; газ-носитель — аргон. ГЖХ-масс-спектрометрию проводили на приборе Varian MAT Gnom 111 на колонке (0,3×150 см) с SE-30 на сорбенте Chromosorb W (100—120 меш), газ-носитель — гелий.

Продуцирование микроорганизма Vibrio fluvialis, штамм ОКА-82-708, полученного от д-ра S. Shinoda (Япония), проводили на среде Youshimizu-Kimura [17] на качалках в течение 2 сут при 20°C . Взвесь клеток центрифугировали при 3000 об/мин 1 ч, биомассу обрабатывали ацетоном и сушили. Выход биомассы 1—2 г на 1 л среды.

Выделение ЛПС и О-специфического полисахарида. 46 г сухой биомассы экстрагировали 45% водным фенолом [4] и обрабатывали далее, как описано в работе [5]. Выход ЛПС 800 мг (1,7%).

ЛПС (800 мг) гидролизovali 4 ч 1% уксусной кислотой при 100°C , осадок липида А удаляли центрифугированием, раствор упаривали до небольшого объема, гель-хроматографией на сефадексе G-50 выделили О-специфический полисахарид, выходящий непосредственно вслед за свободным объемом колонки (выход 11,7% от веса ЛПС, $[\alpha]_{578}^{20} - 56,3^\circ$ (с 0,2, вода)) и олигосахаридную фракцию (выход 20,4% от веса ЛПС), которая в дальнейшем не исследовалась.

Кислотный гидролиз полисахарида (1 мг) проводили 2 н. соляной кислотой (1 мл, 100°C , 3 ч), гидролизат анализировали хроматографией на бумаге и ГЖХ в виде ацетатов полиолов; часть гидролизата подвергали дезаминированию и исследовали методом ГЖХ, как описано в работе [6]. В препаративном варианте гидролиза использовали 10 мг полисахарида и 2 мл 1 н. H_2SO_4 ; препаративной хроматографией на бумаге выделили *L*-рамнозу (2 мг) $[\alpha]_{578}^{20} - 6,4^\circ$ (с 0,11, вода), которую метанолизом 1 н. хлористым водородом в метаноле (2 мл, 100°C , 2 ч) превратили в метил-*L*-рамнозид, $[\alpha]_{578}^{20} - 64,9^\circ$ (с 0,1, вода) (ср. с данными [18], $[\alpha]_{578}^{20} - 67,2^\circ$, вода).

Метилирование полисахаридов проводили по методу [10], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированные полисахариды выделяли с помощью патрона Sep-Pak- C_{18} (Waters), подвергали формолизу и гидролизу, как описано в работе [19]. Продукты расщепления превращали в ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

N-Дезацетилирование О-специфического полисахарида (30 мг) с последующим дезаминированием проводили по методике, описанной в работе [11]. Полисахарид растворяли в 2,5 мл 1 н. NaOH, содержащего 1 мг боргидрида натрия, и нагревали 2 ч при 100°C . После нейтрализации реакционной смеси гель-хроматографией на сефадексе G-50 получили *N*-дезацетилированный полисахарид, который далее растворяли в 0,6 мл уксусной кислоты, добавляли 3 мл 5% NaNO_2 и выдерживали 45 мин. После деионизации катионитом КУ-2 (H^+ -форма) полученный продукт очищали на сорбенте Fraktogel TSK HW 40(S). Выход рамнана 17 мг, $[\alpha]_{578}^{20} - 60^\circ$ (с 0,2, вода).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Furniss A. L., Lee J. V., Donovan T. J. // Lancet. 1977. V. 2. P. 565-566.
2. Jensen M. J., Baumann P., Mandel M., Lee J. V. // Curr. Microbiol. 1980. V. 3. № 6. P. 373-376.
3. Hisatsune K., Iguchi T., Haishima Y., Kondo S. // Intern. Symp. Endotoxin. Japan. 1988. P. S1-5.
4. Wesiphal O., Lüderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. B 7B. № 1. S. 148-155.
5. Львов В. Л., Яковлев А. П., Плужникова Г. Н., Лапина Е. Б., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1256-1265.
6. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 10. С. 2335-2338.
7. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293-297.
8. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495-1506.
9. Cyr N., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2504-2511.
10. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 1. P. 205-208.
11. Altman E., Brisson J.-R., Bundle D. R., Perry M. B. // Biochem. Cell Biol. 1987. V. 65. № 10. P. 876-889.
12. Wagner G. // J. Magn. Reson. 1983. V. 55. № 1. P. 151-156.
13. Vax A., Drobny G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 61. № 2. P. 306-320.
14. Мамян С. С., Липкин Г. М., Шашков А. С., Байрамова Н. Э., Николаев А. В., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 205-215.
15. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Khirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59-75.
16. Wagner G., Wütrich K. // J. Magn. Reson. 1979. V. 33. № 3. P. 675-680.
17. Youshimizu P., Kimura T. // Fish Pathol. 1976. V. 10. № 2. P. 243-259.
18. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. // Chem. Ber. 1920. V. 53. № 11. P. 2362-2388.
19. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касячук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851-1859.

Поступила в редакцию
25.XI.1988

STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT OF O-SPECIFIC
POLYSACCHARIDE CHAIN OF *VIBRIO FLUVIALIS*
LIPOPOLYSACCHARIDE

NAZARENKO E. L., GORSHKOVA R. P., OVODOV Yu. S., SHASHKOV A. S.,
KNIREL Yu. A.*

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Division
of the Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok;*

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

O-Specific polysaccharide chain of the *Vibrio fluvialis* lipopolysaccharide is built up of pentasaccharide repeating units, containing one N-acetyl-D-glucosamine and four L-rhamnose residues. The structure of the polysaccharide was elucidated using two-dimensional correlation ¹H-NMR-spectroscopy, ¹³C-NMR-spectroscopy and nuclear Overhauser effect and confirmed by methylation analysis and selective cleavage of N-acetylglucosamine residues by the N-deacetylation-deamination method which yielded linear L-rhamnan representing the backbone of the polysaccharide. Thus, the repeating unit of the O-specific polysaccharide has the following structure:

