



УДК 577.352.38 : 579.222'114

© 1990 г.

В. И. Виноков, С. И. Степанов, Г. Д. Танцырев*,
Е. Ф. Харатьян, А. С. Шашков**, Д. Н. Островский

ХАРАКТЕРИСТИКА ОЛИГОСАХАРИДА ИЗ БАКТЕРИИ
MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS (LUTEUS),
ПЕРЕХОДЯЩЕГО
В СОСТОЯНИЕ ДОЛГОЖИВУЩЕГО РАДИКАЛА ПРИ ПОТЕРЕ
ЭЛЕКТРОНА

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;

*Институт энергетических проблем химической физики АН СССР, Москва;

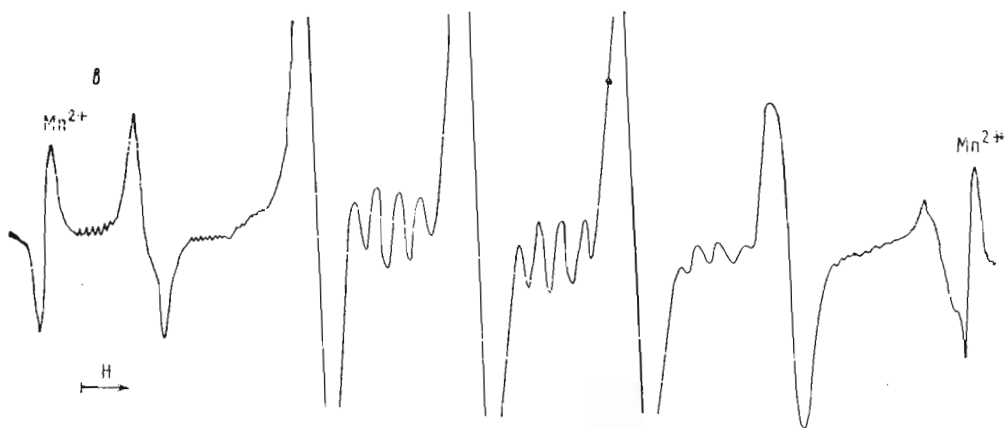
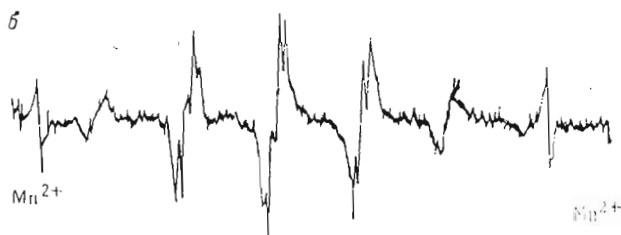
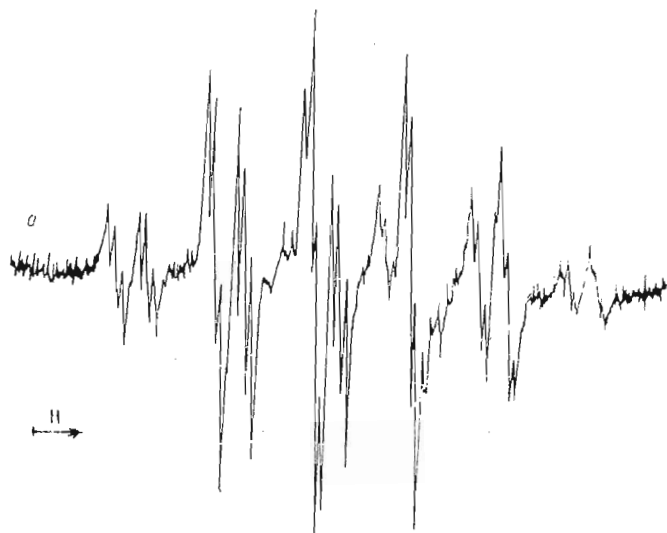
**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Из клеток *Micrococcus lysodeikticus (luteus)* выделен трисахарид (лизодектоза), переходящий при потере электрона в состояние долгоживущего свободного радикала. На основании данных ЯМР- и ЭПР-спектроскопии и изотопного замещения предложена общая формула вещества с локализацией парамагнитного центра на конце молекулы, содержащем нитроксильную группировку. Предполагается, что это вещество участвует в антирадикальной защите и адаптации к экстремальным воздействиям среды у бактерии-продуцента. Рациональное название лизодектозы — 6-О-(2-дезоксигидрокси-2-(N-метил)гидроксиламино-β-D-глюкопиранозил)-α,α-трегалоза.

Ранее нами в клетках бактерии *Micrococcus lysodeikticus* и некоторых других бактерий было обнаружено соединение, переходящее в присутствии слабого окислителя в состояние долгоживущего свободного радикала [1]. Предварительная оценка свойств этого соединения из микрококка (молекулярная масса около 1000, гидрофильность, отсутствие сорбции на катионообменнике типа DEAE-целлюлозы и анионообменнике типа CM-целлюлозы) указывала на возможную олигосахаридную природу соединения. Сигнал ЭПР (секстет с соотношением компонентов 1 : 4 : 6 : 6 : 4 : 1 и константы сверхтонкого взаимодействия 15 Гс) можно было интерпретировать как сигнал от свободного электрона, взаимодействующего в алифатической цепи с пятью эквивалентными и двумя неэквивалентными протонами [2].

В настоящей работе показано, что исследуемое соединение — азотсодержащий трисахарид, в котором азот входит в состав парамагнитного центра. Экстракция, получение дейтерированных производных и идентификация проведены в основном по методикам работ [3—6].

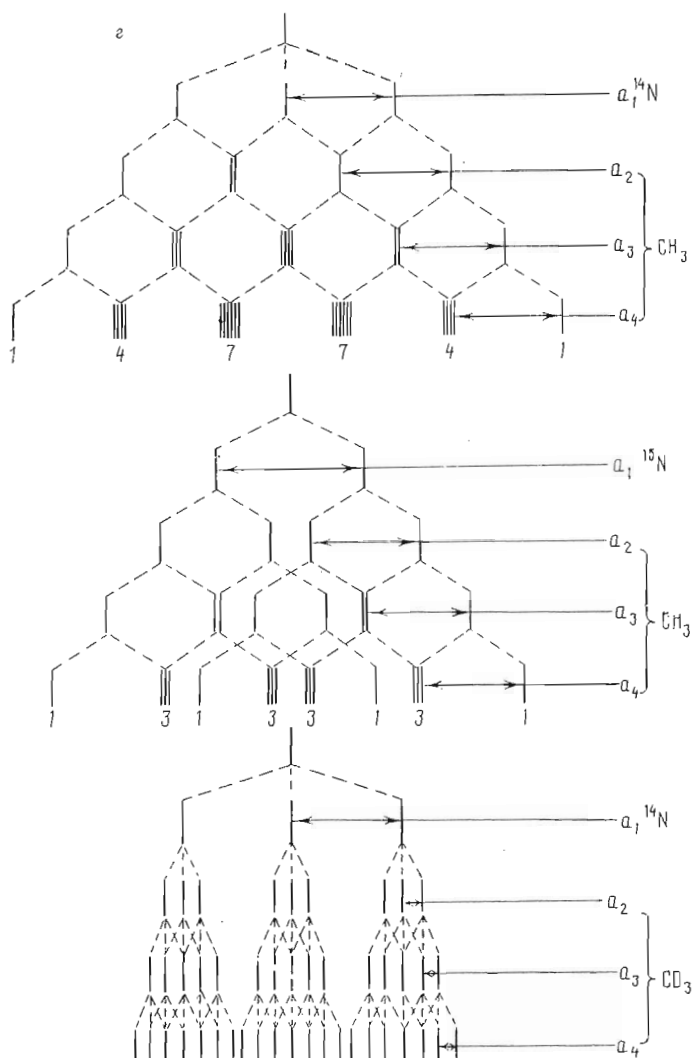
Большие константы сверхтонкого взаимодействия в спектре ЭПР радикальной формы исследуемого соединения склоняли нас к предположению о взаимодействии неспаренного электрона с пятью соседними атомами протонов в алифатической цепи. Однако большинство известных нам долгоживущих природных свободных радикалов относится либо к классу нитроксильных радикалов, либо к ароматическим соединениям. Чтобы выяснить вопрос об участии азота в парамагнитном центре радикала, мы подобрали среды, в которых в качестве единственных источников азота были глутаминовая кислота или сульфат аммония, обогащенные стабильным изотопом ^{15}N , ядро которого обладает собственным спином $s = 1/2$, отличным от спина обычного азота ^{14}N ($s = 1$). Предварительно мы убедились в том, что такое изменение типа азотистого питания бактерий не



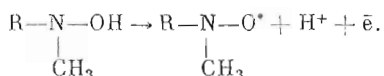
Спектры ЭПР водно-метанольных экстрактов из клеток микрококка, выращенных на среде с ^{16}N - (а), ^{14}N -субстратами (б), или на среде, содержащей гидролизат дейтерированных клеток хлореллы (в). г — схема сверхтонкого взаимодействия в парамагнитном центре

нарушает синтеза исследуемого вещества и что на синтетической ^{14}N -среде сигнал ЭПР имеет такие же параметры, как и в клетках, выращенных на сложной среде, содержащей пептон и дрожжевой экстракт.

На рисунке приведен спектр ЭПР радикальной формы соединения в водно-метанольном экстракте из микрококка после выращивания на синтетических ^{14}N - и ^{15}N -средах. Обогащение синтетических субстратов азотом ^{15}N достигает 90%, хотя эта величина несколько снижается благодаря внесению некоторого количества ^{14}N с инокулятом культуры, но все же на спектре видны характерные изменения. Константы сверхтонкого



взаимодействия, позволяющие удовлетворительно описать спектры ЭПР с помощью схемы (рисунок, з), соответственно равны (гауссы): $a(^{14}\text{N}) = 14,7$, $a(\text{CH}_3) = 15,0$, $\Delta H = 75,4$; $a(^{15}\text{N}) = 20,6$, $a(\text{CH}_3) = 15,0$, $\Delta H = 65,2$. Наблюдается также дополнительное расщепление линий спектра на два дублета с константами $\sim 2,1$ и $\sim 1,0$, по-видимому, от протонов при С-2- и С-1-атомах кольца С молекулы (см. далее). На рисунке з показан сигнал экстрактов после выращивания клеток на дейтерированной среде: $a(\text{CD}_3) = 2,3$, $a(^{14}\text{N}) = 14,7$, $\Delta H = 43,2$ Гс. Таким образом, мы можем представить строение парамагнитного центра радикала следующим образом:



Спектры ^1H -ЯМР указывали на углеводную природу этого соединения. Они были частично расшифрованы (табл. 1) с помощью методики селективного гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте [5, 7]. По величине констант спин-спинового взаимодействия (KССВ) определены размеры циклов моносахаридов, аномерная конфигурация и конфигурация заместителей при атомах углерода в пиранозных циклах [8].

Из анализа табл. 1 следует, что олигосахарид включает в себя три остатка глюкопиранозы, два из которых имеют α -конфигурацию и один — β . Необычное сильнополюсное положение сигнала Н-2 в подспектре β -глю-

Параметры спектра ¹H-ЯМР олигосахарида из микрококка (раствор в тяжеловодородной воде)

Протоны	δ, м.д.	Мультиплетность *	КССВ, Гц
Звено А			
Н-1	5,19	д	<i>J</i> _{1,2} 4,0
Н-2	3,63	дд	<i>J</i> _{2,3} 10,0
Н-3	3,84	т	<i>J</i> _{3,4} 10,0
Н-4	3,76	дд	<i>J</i> _{4,5} 9,0
Звено В			
Н-1	5,19	д	<i>J</i> _{1,2} 4,0
Н-2	3,65	дд	<i>J</i> _{2,3} 10,0
Н-3	3,86	т	<i>J</i> _{3,4} 10,0
Н-4	3,56	дд	<i>J</i> _{4,5} 9,0
Звено С			
Н-1	4,85	д	<i>J</i> _{1,2} 8,5
Н-2	2,61	дд	<i>J</i> _{2,3} 10,0
Н-3	3,81	дд	<i>J</i> _{3,4} 9,0
Н-4	3,44	дд	<i>J</i> _{4,5} 10,0
N-CH ₃	2,41		

* д — дублет, дд — дублет дублетов, т — триплет.

Таблица 2

Химические сдвиги сигналов углерода ¹³C в молекуле олигосахарида из микрококка

Атом	Звено А	Звено В	Звено С
С-1	94,7	94,7	101,4
С-2	72,3	72,3	47,6
С-3	73,8	73,9	73,5
С-4	71,0	71,0	71,4
С-5	72,9	71,9	76,8
С-6	61,9	69,0	62,2
			34,1 (N-CH ₃)

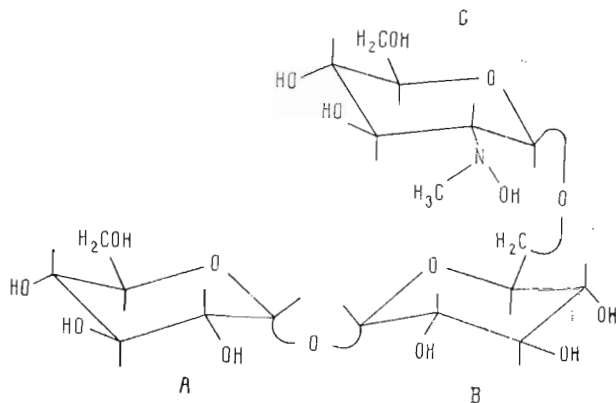
копиранозного остатка (2,61 м. д.) и наличие трехпротонного синглета при 2,91 м. д. указывают на то, что сахар несет в положении 2 атом азота с метильным заместителем.

Окончательный вывод о структуре трисахарида следовал из анализа его спектра ¹³C-ЯМР (табл. 2). В спектре в области резонанса аномерных атомов углерода имеется сигнал с двойной интенсивностью и химическим сдвигом 94,7 м. д.

Анализ литературных данных [9] показывает, что из всех дисахаридов глюкозы только в спектре α,α-трегалозы может быть такой химический сдвиг для сигнала С-1. Таким образом, два α-глюкопиранозных остатка образуют α,α-трегалозный фрагмент трисахарида, а β-глюкопиранозный замещает один из них, очевидно, по гидроксилу у С-6, так как в спектре ¹³C-ЯМР есть сигнал от замещенной СН₂О-группы (69,0 м. д., триплет в спектре, снятом в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия углерода с протонами).

Спектр ¹³C-ЯМР подтверждает наличие в β-глюкопиранозном остатке азотсодержащего заместителя при С-2 (сигнал 47,6 м. д. для С-2) и метила при атоме азота (34,1 м. д.).

Таким образом, выделенное нами соединение представляет собой 6-О-(2-деокси-2-(N-метил)гидроксиламино-β-D-глюкопиранозил)-α,α-трегалозу. По видовому названию бактерии-продуцента мы предлагаем для этого соединения название «лизодектоза».



Какова биологическая роль олигосахида, какое место в метаболизме бактериальной клетки он занимает?

В суспензии интактных клеток в условиях избытка O_2 в среде инкубации (60 мг сырых клеток на 1 мл фосфатного буфера, pH 7) и даже в присутствии менадиона (до 0,1 мг/мл), способствующего генерации радикала O_2^- дыхательной цепью [10], сигнал ЭПР не регистрируется. Два варианта объяснения этого феномена пока остаются в силе: либо радикальная форма лизодектозы сорбирована на каких-то структурах клетки, либо восстановительные ферменты намного превышают по активности активность генераторов O_2^- . Соединения, похожие по химической структуре на лизодектозу, выделены из многих биообъектов [11—17]. Среди них, в частности, имеются вещества, содержащие гидроксамовые группировки, потенциально способные образовывать радикальные формы с нитроксильной группой [14]. Однако мы проверили такую возможность для бензгидроксамата и аскорбигена — азотистого производного аскорбиновой кислоты [13] и показали, что в условиях наших опытов эти вещества не образуют долгоживущих свободных радикалов. Углеводы, которые содержали бы гидроксилламинную группировку, нам не были известны, хотя углеводная природа, по-видимому, и необязательна для природных радикалов подобного типа (если в метаболизме клетки реализуются именно возможности гидроксилламинной части молекулы), так как аналогичное радикалообразующее соединение, выделенное нами из бревибактерий, оказалось производным глутаминовой кислоты. Поскольку других радикалообразующих форм в экстрактах из микрококков не обнаружено, можно предположить, что гидроксигруппа образуется на атоме азота в последней стадии синтеза лизодектозы, хотя сведения о наличии N-метилглюкозамина или других вероятных предшественников, за исключением трегалозы, пока отсутствуют. Ранее нами было показано, что лизодектоза перехватывает радикалы O_2^- в системе, содержащей генератор и акцептор O_2^- (адреналин), и мы склонны к тому, чтобы считать это соединение адаптогеном — веществом, позволяющим бактерии перенести воздействие экстремальных факторов физической и химической природы.

Вовлеченность в конкретные биохимические реакции для исследуемого вещества пока не совсем ясна, но бурное накопление сведений о роли парамагнитных центров [18] и радикальных процессов, включая ферментативные реакции [19, 20], позволяет рассчитывать на значительное место исследуемых веществ в метаболизме бактериальной клетки.

Экспериментальная часть

Клетки бактерий *M. lysodeicticus (luteus)*, штамм Флеминга № 2665, культивировали на питательной среде, содержащей 1% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,5% NaCl, при 30° С на качалках до начала стационарной фазы роста.

Среда для включения тяжелого изотопа азота ^{15}N содержала в 1 л водопроводной воды 5 г глутамата натрия (или сульфата аммония), 10 г глюкозы, 30 мкг биотина, 100 мг K_2HPO_4 , 50 мг NaCl, 50 мг $MgSO_4$.

$\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 мг $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4. Среда для включения тяжелого изотопа водорода готовилась как описано ранее [4].

Экстракцию олигосахарида из бактерий проводили 50% метанолом или смесью хлороформ — метанол — вода в соотношении 1 : 2 : 0,8 с последующим отделением водно-метанольной фазы по Блау и Дайеру [3]. Основные этапы очистки включали в себя пропускание экстракта через колонку с DEAE-целлюлозой для удаления анионогенных примесей, потом через колонку сефадекса G-25 [1]. Окончательную очистку проводили, используя ВЭЖХ на колонке (8×250 мм) с силосорбом C-18, 10 мкм (элюент — H_2O) и УФ-детекцию (220 нм) с последующей рехроматографией. Чистое вещество выходило индивидуальным пиком с объемным отношением распределения $k = 1,72$.

В работе использовали 300 г биомассы, осаждаемой центрифугированием в течение 15 мин при 10 000g. Выход вещества составил 21,3 мг (67% от возможного), вещество хранилось в жидком азоте в запаянных ампулах в атмосфере аргона.

Спектроскопия ЯМР на протонах и ядрах углерода ^{13}C осуществлялась на спектрометрах Bruker WM-250 и AM-300 соответственно с внутренним стандартом DSS* для ПМР (0 м. д.) и MeOH для ^{13}C -ЯМР (50,15 м. д.). Образец вещества перед снятием спектра дважды лиофилизировали из D_2O и растворяли в D_2O . Температура измерения 30°C , рабочая частота спектрометра 250 МГц для протонов и 300 МГц для ^{13}C . Спектры ^1H -ЯМР расшифрованы с использованием методики гомоядерного двойного резонанса [5, 7].

Сигналы ЭПР регистрировали на радиоспектрометре РЭ-1306 в кварцевой ампуле на 0,1 мл при 20°C после добавки (или без добавления) к водному образцу вещества феррицианида калия до 10^{-3} М. Внешним стандартом служил $\text{Mn}^{2+}/\text{MgO}$ (расстояние между линиями стандарта на приводимых спектрах соответствует напряженности магнитного поля 86,76 Гс). В пробу 0,2 мл из каждой фракции добавляли по 20 мкл 0,01 М феррицианида за 3 мин до измерения; сигнал ЭПР стабилен более 30 мин.

Степень очистки. После всех стадий очистки олигосахарид элюировался с колонки Silasorb C-18 одним симметричным пиком, совпадающим с единственным пиком распределения радикальной формы, детектируемой по сигналу ЭПР в присутствии $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Количество лизодектозы определяли путем сравнения двойного интеграла спектров ЭПР ее радикальной формы с таковым для синтетического нитрокислого радикала TEMPO^{**} известной концентрации. Спектры нормированы по интенсивности спектров стандарта.

Метод масс-спектрометрии при бомбардировке быстрыми атомами не выявил посторонних примесей ($m/z = 534$), при электронном ударе $m/z = 534$, 532, 517, что, по-видимому, соответствует ионам $(M + \text{H})^+$, $(M - \text{H})^+$ и $(M - \text{OH} + \text{H})^+$ или $(M - \text{CH}_3 - \text{H})^+$ (приборы МИ-1201-Э и Varian MAT-44).

Спектроскопия ЯМР на ядрах протонов, позволяющая доказать принадлежность протонов к одной молекуле, а не к разным, также не выявила существенных примесей. По этим данным, чистота образцов не ниже 90%.

Авторы выражают благодарность Ю. А. Книрелю (ИОХ АН СССР, Москва) за большую помощь при обсуждении результатов работы, а также Ю. В. Букину (АМН СССР) и В. А. Еремину (Институт биохимии АН СССР, Москва) за предоставление ряда материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бинюков В. И., Лордкипанидзе А. Е., Островский Д. Н. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 11. С. 1927.
2. Бинюков В. И., Талтыкова С. Д., Островский Д. Н. // Микробиология. 1986. Т. 55. № 2. С. 342—344.
3. Bligh E., Dyer W. // Can. J. Biochem. and Physiol. 1959. V. 37. P. 911—917.
4. Еремил В. А., Чекулаева А. Н., Харатьян Е. Ф., Островский Д. Н. // Микробиология. 1978. Т. 47. № 4. С. 629—633.

* 2,2-Диметил-2-сипантэн-5-сульфокислота.

** 1-Оксия-2,2,6,6-тетраметил-4-гидроксипиперидин.

5. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 27—66.
6. Луцк М. Д., Панасюк Е. Н., Луцк А. Д. Лектины. Киев: Вища школа, 1981. С. 13.
7. Беридзе М. М., Джикия О. О., Пхеидзе Г. Л., Кемертелидзе Э. П., Шашков А. С. // Химия природ. соединений. 1987. № 4. С. 537—542.
8. Alton C., Haasnoot A. // Org. magn. resonance. 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
9. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1984. V. 42. P. 193—225.
10. White E., Clark J. // Biochem. J. 1988. V. 253. № 2. P. 425—433.
11. Wagman G. // Ann. Rev. Microbiol. 1980. V. 34. P. 537—557.
12. Chaturvedi P., Sharma C. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 967. № 1. P. 115—121.
13. Букин Ю. В., Плихтяк И. Л., Драудин-Крыленко В. А., Ярцева И. В., Орлова И. М., Преображенская М. Н. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 539—545.
14. Neilands J. // Science. 1967. V. 156. № 3781. P. 1443—1447.
15. Le Rudulier D., Strom A., Dandekar A., Smith L., Valentine R. // Science. 1984. V. 224. № 4653. P. 1064—1068.
16. Umezawa H. // Ann. Rev. Microbiol. 1982. V. 36. P. 75—100.
17. Дамберг Б. Э. // Изв. АН ЛатвССР. 1982. № 8. С. 93—98.
18. Чибрикин В. М., Иванникова Л. Г., Соколов В. С. // Биофизика. 1986. Т. 31. № 2. С. 324—329.
19. Богословская О. А., Бурлакова Е. Б., Глуценко Н. Н., Конюхов В. Ф., Храпова Н. Г. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1984. № 10. С. 24—26.
20. Пулатова М. К., Авакян М. А., Шарыгин В. Л. // Биофизика. 1986. Т. 31. № 2. С. 340—341.

Поступила в редакцию

10.IV.1989

После доработки

10.X.1989

V. BINYUKOV, S. STEPANOV, G. TANTSYREV*, E. KHARATYAN,
A. SHASHKOV**, D. OSTROVSKY

**CHARACTERISTICS OF AN OLIGOSACCHARIDE ISOLATED FROM
MICROCOCOCCUS LYSODEIKTICUS (LUTEUS) AND APT TO
TRANSFORMATION INTO THE STATE OF LONG LIVING FREE RADICAL
AT A LOSS OF AN ELECTRON**

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

**Institute of Energetic Problems of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

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

A trisaccharide «lysodektose» yielding long living free radical at a loss of an electron, is isolated from *Micrococcus lysodeikticus (luteus)* cells. Based on the data of isotope substitution and NMR and ESR spectra, the compound is suggested to be 6-O-(2-deoxy-2-(N-methyl)hydroxylamino-β-D-glucopyranosyl)-α,α-trehalose, with the paramagnetic centre localized in the oxydized form of the molecule at the nitroxyl group-containing moiety. Its participation in the producent's antiradical protection and adaptation to the extreme factors of environment is postulated.