



УДК 547.953:582.26

ИНОЗИТСОДЕРЖАЩИЙ СФИНГОЛИПИД ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Gracilaria verrucosa*

© 2004 г. С. В. Хотимченко[#], В. Е. ВасьяковскийИнститут биологии моря Дальневосточного отделения РАН,
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Поступила в редакцию 25.11.2002 г. Принята к печати 04.02.2003 г.

Необычный полярный липид выделен из красной водоросли *Gracilaria verrucosa*. Методами ГЖХ и ГЖХ-МС продуктов его кислотного метанолиза показано, что структурными компонентами липида являются инозит, сфингозиновые основания, жирные кислоты и фосфат. Сведения о составе, наряду с данными, полученными при изучении хроматографического поведения, химических свойств, а также масс-спектров липида, позволили предложить для него структуру инозитфосфоцерамида. Подобные липиды были ранее найдены только в грибах и некоторых простейших.

Ключевые слова: водоросли, *Gracilaria verrucosa*; инозитфосфоцерамид; сфинголипиды; сфингозиновые основания; жирные кислоты.

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании распространения полярных липидов в красных, бурых и зеленых водорослях Японского моря мы обнаружили в красных водорослях фосфолипид, который не был похож ни на один из хорошо известных растительных липидов [1]. Он оказался устойчив к щелочному омылению, что свидетельствовало о возможной его принадлежности к сфинголипидам. Этот необычный липид мы обнаружили в 44 исследованных видах красных водорослей, принадлежащих к семи порядкам и собранных в разных районах Мирового океана: кроме Японского моря, также в Желтом море [2] и в Тихом океане у берегов Калифорнии [3]. Количественный анализ неомыляемого липида в 20 видах красных водорослей из 10 семейств показал, что его содержание варьирует у разных видов и зависит, в некоторой степени, от сезона сбора водорослей [4]. Больше всего этого липида в смеси фосфолипидов водоросли (15.7%) оказалось в *Gracilaria verrucosa*. Поскольку ни бурые, ни зеленые водоросли, ни морские травы не содержат такого неомыляемого липида [1, 2], присутствие его в красных водорослях может иметь для этих растений таксономическое значение. Поэтому мы выделили необычный фосфолипид из *G. verrucosa* и охарактеризовали его.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При микротонкослойной хроматографии липидного экстракта *G. verrucosa* в системах растворителей, применяемых для разделения полярных липидов водорослей [5], мы наблюдали пятно вещества с хроматографической подвижностью меньшей, чем у фосфатидилинозита, и отличающейся от подвижности всех обычных глико- и фосфолипидов, найденных в водорослях [1]. Это вещество окрашивалось молибдатным и малахитовым зеленым реагентами [6, 7], что характерно для соединений, содержащих фосфор. Судя по отсутствию реакции с антроном, в нем не было остатков моносахаридов. Вещество оказалось устойчивым к щелочному омылению, и это позволило нам предположить, что оно не содержит сложноэфирных связей и не является глицеролипидом.

Суммарный липидный препарат, полученный из водоросли, состоял главным образом из глицерогликолипидов (60–70%) с примесью ряда глицерофосфолипидов, что затрудняло непосредственное выделение неомыляемого липида методом колоночной хроматографии. Поэтому мы воспользовались приемом, хорошо известным для выделения неомыляемых липидов, который заключается в предварительном омылении общего липидного экстракта, приводящем к распаду глицеролипидов. После такой обработки липидов *G. verrucosa* неомыляемое соединение выделили колоночной хроматографией на силикагеле и подвергли его кислотному метанолизу. Среди образовавшихся продуктов мы идентифицировали метиловые эфиры жирных кислот и таким обра-

Сокращения: IPC – инозитфосфоцерамид; DMA – диметилацетат.

[#] Автор для переписки (эл. почта: skhotim@hotmail.com; тел.: (4232) 310-937; факс: (4232) 310-900).

зом показали, что неизвестное вещество из градилярии действительно является липидом.

Методами ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии мы идентифицировали среди жирных кислот, входящих в состав этого липида, насыщенные и мононенасыщенные кислоты: пальмитиновую (51.7%), стеариновую (23.2%), миристиновую (9.8%), олеиновую (9.8%) и пальмитолеиновую (5.5% суммы жирных кислот). По сравнению с составом жирных кислот общих липидов *G. verrucosa*, для которой характерно высокое содержание арахидоновой кислоты (более 50% суммы жирных кислот) [8], необычный липид не содержал ни арахидоновой кислоты, ни других полиненасыщенных жирных кислот.

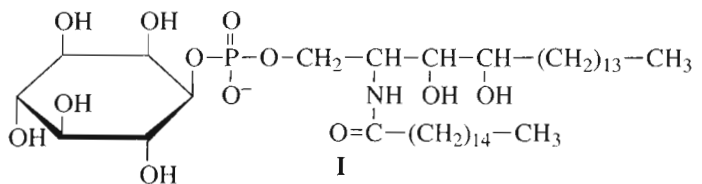
Кислотный метанолиз неизвестного липида также привел к образованию нескольких соединений, которые в процессе выделения и при ТСХ вели себя как сфингозиновые основания и давали окрашивание с нингидрином, причем главная зона совпадала по подвижности с заведомым фитосфингозином. Для определения состава сфингозиновых оснований их окислили периодатом, образовавшиеся альдегиды превратили в диметилацетали и анализировали методом ГЖХ. Преобладающим компонентом оказался диметилацеталь альдегида $C_{15:0}$ (58.8%), в меньших количествах присутствовали производные альдегидов $C_{15:1}$ (8.9%), $C_{16:1}$ (20.1%), а также $C_{14:1}$ (7.6%) и $C_{17:0}$ (4.6%). Эти результаты позволили предположить, что главным сфингозиновым основанием в составе липида является C_{18} -фитосфингозин.

После ацетилирования полярных продуктов кислотного метанолиза неизвестного липида было найдено соединение, идентичное заведомому ацетату *мио*-инозита по поведению при ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии. Мы не нашли в ги-

дроллизате ни моносахаридов, ни глицерина. В водной фракции кроме инозита была обнаружена фосфорная кислота.

Таким образом, в результате кислотного метанолиза необычного липида из красной водоросли *G. verrucosa* образовались инозит, сфингозиновые основания, метиловые эфиры жирных кислот и фосфат. По хроматографическому поведению, реакциям со специфическими реагентами для обнаружения липидов и продуктам кислотного метанолиза неизвестный липид из водорослей очень похож на инозитфосфоцерамид, найденный ранее в дрожжах [9].

MALDI-масс-спектрометрический анализ ионного липида с регистрацией отрицательных ионов показал несколько пиков в области молекулярных ионов. Это означало, что выделенный липидный препарат включает несколько молекулярных видов. Главным из них соответствовали пики ионов при m/z 796 и 824. На основании этого можно предположить, что главное соединение имеет M_r 797, брутто-формулу $C_{40}H_{80}NO_{12}P$ и, следовательно, содержит по одному остатку инозита, фосфорной кислоты, жирной кислоты и сфингозинового основания. Принимая во внимание, что доминирующими компонентами жирных кислот и сфингозиновых оснований этого липида являются пальмитиновая кислота и C_{18} -фитосфингозин, можно предположить, что именно они образуют главный молекулярный вид инозитсодержащего липида (I). Соединение с M_r 825, вероятно, содержит стеариновую кислоту вместо пальмитиновой. По аналогии с другими известными инозитсодержащими сфингофосфолипидами можно предположить, что фосфорная кислота ацилирует остаток инозита в положение 1, а инозитфосфат присоединен в положение C1 церамида.



Впервые инозитфосфоцерамиды были идентифицированы в дрожжах почти 30 лет назад [9]. Позже эти соединения, различающиеся по составу жирных кислот и сфингозиновых оснований, были найдены в патогенных грибах [10], некоторых простейших [11], но не у животных. Высшие наземные растения синтезируют инозитсодержащие сфингофосфолипиды более сложной структуры, в которых к инозиту присоединены несколько звеньев моносахаридов. Они были названы фитогликолипидами или позже более точно гликофосфосфинголипидами [12].

Сфинголипиды – обязательные компоненты всех эукариот, некоторых прокариот и вирусов [13]. Однако о сфинголипидах водорослей известно очень мало. В красных водорослях *Chondrus crispus* и *Polysiphonia lanosa* хроматографически обнаружены два неизвестных липида, которые, по мнению авторов, вероятно, являются цереброзидами [14]. Еще в одном виде водорослей, *Coralina pilulifera*, доказано присутствие цереброзида, который авторы назвали “коралипидом” [15]. Другие производные сфингозиновых оснований, не содержащие фосфора и сахаров, найдены в во-

дорослях рода *Halymenia* [16, 17] и *Amansia glomerata* [18]. Биологическое значение сфингозиновых соединений в морских красных водорослях неизвестно. Показано, что церамид из зеленой водоросли *Ulva fasciata* обладает антивирусной активностью [19]. Возможно, что инозитфосфоцерамиды красных водорослей также представляют интерес как биологически активные вещества.

О значении инозитфосфоцерамидов в разных организмах, их субклеточном распределении, биосинтезе и биологической активности известно очень мало. Такая информация получена практически только для инозитфосфоцерамидов из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: показано, что эти липиды являются компонентами мембран [20] и необходимы для роста дрожжей, их жизнеспособности и устойчивости к стрессу [21, 22]. Возможно, что и в водорослях инозитфосфоцерамид локализован в мембранах. Некоторые исследователи считают, что инозитсодержащие липиды выполняют сходные функции в разных организмах [23]. Помимо вклада в общие мембранные свойства, такие, как вязкость и заряд, инозитфосфоцерамиды могут обеспечивать уникальные функции: участвовать в регуляции ферментативной активности, специфически связывать функциональные белки на поверхности мембран и таким образом выполнять роль мембранных “якорей” некоторых белков [24, 25]. Есть данные, что инозитфосфоцерамиды защищают ткани некоторых высших растений от некротических повреждений, вызванных патогеном *Phytophthora capsici* [10, 26].

Присутствие инозитфосфоцерамидов в красных макроводорослях, которые широко распространены в морях и доступны в больших количествах, позволяет рассматривать эти растения как альтернативные и перспективные источники для углубленного исследования внутриклеточного распределения, биосинтеза, биологической роли, а также биологической активности этих липидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали в качестве стандартов *D*-эритросфингозин, *DL*-эритродигидросфингозин, фитосфингозин (ICN Biomedicals), *мио*-инозит и сахара (Sigma, США). Для колоночной хроматографии применяли силикагель (100–160 мкм; Woelm, Германия).

Газожидкостную хроматографию проводили на хроматографе GC-9A (Shimadzu, Япония) с использованием пламенно-ионизационного детектора, капиллярной колонки (Supelcowax 10 M, 30 м × 0.25 мм, Supelco, SA, США) и компьютерной обработки данных (Chromatorac CR-3A, Shimadzu, Япония). Температура колонки 210°C для анализа метиловых эфиров жирных кислот и

диметилацеталей, 220°C для анализа ацетилированных производных инозита и моносахаридов. Температура детектора 240°C, поток газа-носителя (гелия) 40 мл/мин. Жирные кислоты и диметилацетали идентифицировали сравнением с известными образцами времени удерживания и значений “углеродных чисел” [27]. Индивидуальные ацетаты полиолов идентифицировали сравнением подвижности (*R_f*) со стандартами, которые получали из *мио*-инозита и сахаров.

ГЖХ-МС выполняли на приборе Hewlett-Packard, модель 5890, соединенным с масс-спектрометром Hewlett-Packard 5973 (США) с капиллярной колонкой HP5-MS в токе гелия. Анализ проводили при программировании температуры от 150 до 230°C со скоростью 3°/мин. Температура детектора – 250°C. Энергия ионизирующих электронов 70 эВ, спектры регистрировали в диапазоне 50–550 атомных единиц массы с частотой 2.94 скана в 1 с. Идентификацию соединений проводили с помощью компьютерной библиотеки масс-спектров (NIST 98 MS Data Library).

Масс-спектр регистрировали на времяпролетном масс-спектрометре с матрично-связанной лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF) BIFLEX-III (Bruker, Германия). В качестве матрицы использовали α-циано-4-гидроксикоричную кислоту в ацетонитриле (10 мг/мл). Образцы (0.1–1.0 мг/мл в смеси хлороформ–метанол 1 : 1, по объему) добавляли к матрице. Спектры получены при регистрации отрицательных ионов в режиме отражения.

Сбор *G. verrucosa* и выделение липидов. Водоросли собирали в заливе Петра Великого Японского моря в июле–октябре. Их доставляли в лабораторию в свежем виде и содержали в аквариумах при комнатной температуре или замораживали и хранили при температуре –40°C. Очищенные от эпифитов водоросли измельчали и липиды извлекали последовательной многократной экстракцией смесью хлороформ–метанол (1 : 2, по объему) [28].

Тонкослойная хроматография. Разделение липидов на индивидуальные классы проводили методом микротонкослойной хроматографии на пластинках (6 × 6 см) с закрепленным слоем силиказоля [29] в системах растворителей для разделения полярных липидов растений: хлороформ–ацетон–метанол–CH₃COOH–H₂O (100 : 40 : 20 : 20 : 8) – 1-е направление, ацетон–бензол–CH₃COOH–H₂O (200 : 30 : 3 : 10) – 2-е направление [5]. Липиды обнаруживали следующими реагентами: 10% серной кислотой в метаноле с последующим сжиганием – все липиды, молибдатным – фосфолипиды [6], малахитовым зеленым – фосфорсодержащие липиды [7], антроновым – гликолипиды [30]. Сфингозиновые основания разделяли в системе растворителей хлороформ–метанол–2 M NH₄OH (40 : 10 : 1, по объему) и обнаруживали нингидрином [31].

Выделение инозитсодержащего неомыляемого липида. Общий экстракт липидов (100 мг) после упаривания органического слоя подвергали метанолизу 0.2 М раствором NaOH в метаноле (5 мл) в течение 1 ч при 70°C для расщепления глицеролипидов [32]. Реакционную смесь охлаждали, добавляли воду (2.5 мл) и экстрагировали гексаном образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот. Гексановую фракцию отбрасывали. Неомыляемые липиды извлекали из водно-метанольной фракции хлороформом, и инозитсодержащий фосфоцерамид выделяли из этой смеси липидов хроматографией на колонках с силикагелем, используя градиент концентрации метанола в хлороформе от 0 до 50%. Инозитфосфоцерамид элюировали смесью хлороформ-метанол (1 : 1, по объему). Растворители упаривали, выход 1.9 мг.

Кислотный метанолиз инозитфосфоцерамида и анализ образующихся продуктов. К инозитфосфоцерамиду добавляли свежеприготовленную смесь конц. HCl-метанол-вода (3 : 29 : 4, по объему) и нагревали при 78°C в течение 18 ч [33]. После охлаждения к реакционной смеси добавляли воду и экстрагировали гексаном метиловые эфиры жирных кислот, которые затем анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-МС. Водно-метанольный слой подщелачивали 4 М КОН до pH 9.6 и экстрагировали серным эфиром сфингозиновые основания. Затем водно-метанольную фракцию гидролизата упаривали до половины объема, обрабатывали NaBH₄ (4 ч, комн. температура) и после стандартной процедуры, включающей удаление борной кислоты и ацелирование смесью уксусного ангидрида с пиридином (1 : 1) при комнатной температуре 18 ч [34], полученный гексаацетат полиола анализировали методом ГЖХ и ГЖХ-МС.

Сфингозиновые основания окисляли 0.2 М периодатом [31], образовавшиеся альдегиды превращали в диметилацетали нагреванием с 5% HCl в метаноле при 75°C [32] и полученные диметилацетали анализировали ГЖХ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 98-04-49552).

Авторы выражают благодарность сотрудникам Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН к. х. н. Н.А. Командровой за помощь в проведении ГЖХ-МС и П.С. Дмитренику за снятие масс-спектра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khotimchenko S.V., Klochkova N.G., Vaskovsky V.E. // *Biochem. System. Ecol.* 1990. V. 18. P. 93–101.
2. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V., Xia B., Li Hefang. // *Phytochemistry*. 1996. V. 42. P. 1347–1356.
3. Khotimchenko S.V., Vaskovsky V.E., Titlyanova T.V. // *Bot. Marina*. 2002. V. 45. P. 17–22.
4. Хотимченко С.В., Куликова И.В., Васьковский В.Е. // *Биология моря*. 2000. Т. 26. С. 286–288.
5. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V. // *J. High Resol. Chromatogr.* 1982. V. 5. P. 635–636.
6. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 114. P. 129–141.
7. Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 115. P. 246–249.
8. Khotimchenko S.V., Vaskovsky V.E., Przhemenetskaya V.F. // *Phytochemistry*. 1991. V. 30. P. 207–209.
9. Smith S.W., Lester R.L. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 3395–3405.
10. Lhomme O., Bruneteau M., Costello C.E., Mas C.E., Molot P.-M., Dell A., Tiller P.R., Michel G. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 191. P. 203–209.
11. Singh B.N., Costello C.E., Beach D.H., Holz G.G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 157. P. 1239–1246.
12. Laine R.A., Hsieh T.C.Y. // *Methods in Enzymology*. 1987. V. 138. P. 186–195.
13. Vesper H., Schmelz E.-M., Nikolova-Karakashian M.N., Dellehay D.L., Lynch D.V., Merrill A.H. // *J. Nutr.* 1999. V. 129. P. 1239–1250.
14. Pettitt T.R., Jones A.L., Harwood J.L. // *Phytochemistry*. 1989. V. 28. P. 399–405.
15. Ishida R., Shirahama H., Matsumoto T. // *Chem. Lett.* 1993. № 1. P. 9–12.
16. Bano S., Uddin S., Ahmad V.U. // *Planta Med.* 1990. V. 56. P. 233–234.
17. Rao C.B., Satyanarayana Ch. // *Ind. J. Chem.* 1994. V. 33B. P. 97–98.
18. Cardellina J.H., Moore R.E. // *Phytochemistry*. 1978. V. 17. P. 554–555.
19. Sharma M., Garg H.S., Chandra K. // *Bot. Marina*. 1996. V. 39. P. 213–215.
20. Patton J.L., Lester R.L. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 3101–3108.
21. Duckson R.C., Wells G.B., Schmidt A., Lester R.A. // *Mol. Cell. Biol.* 1990. V. 10. P. 2176–2181.
22. Hanson B.A. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 159. P. 837–842.
23. Hetherington A.M., Drobak B.K. // *Prog. Lipid Res.* 1992. V. 31. P. 53–63.
24. Lester R.L., Dickson R.C. // *Adv. Lipid Res.* 1993. V. 26. P. 253–274.
25. Conzelman A., Puoti A., Lester R.L., Desponds C. // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 457–466.
26. Pivot V., Bruneteau M., Mas P., Bompeix G., Michel G. // *Lipids*. 1994. V. 29. P. 21–25.
27. Christie W.W. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 447. P. 305–314.
28. Bligh E.G., Dyer W.J. // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. P. 911–917.
29. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Литвинова Л.С., Ефимова И.И., Хотимченко С.В., Васьковский В.Е., Дикарев В.П. // *Биоорг. химия*. 1984. Т. 10. С. 244–250.
30. van Gent C.M., Roseleur O.J., van der Bijl P. // *J. Chromatogr.* 1973. V. 85. P. 174–176.

31. *Kates M.* Techniques of Lipidology. Amsterdam–New York–Oxford: Elsevier, 1986.
32. *Christie W.W.* Lipid Analysis. Oxford: Pergamon Press, 1982. P. 51–52.
33. *Gaver R.C., Sweeley C.C.* // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1965. V. 42. P. 294–298.
34. *Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A.* // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1604.

An Inositol-Containing Sphingolipid from the Red Alga *Gracilaria verrucosa*

S. V. Khotimchenko*# and V. E. Vas'kovsky

Phone: +7 (4232) 310-937; fax: +7 (4232) 310-900; e-mail: skhotim@hotmail.com

Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences,

ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

An unusual polar lipid was isolated from the red alga *Gracilaria verrucosa*. Inositol, sphingosine bases, fatty acids, and phosphate were identified by GC and GC-MS analysis among the products of its acid methanolysis. On the basis of the lipid composition, chromatographic behavior, chemical properties, and mass spectra, the inositolphosphoceramide structure was proposed for this lipid. Similar lipids were previously found only in fungi and some protozoa. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: algae, *Gracilaria verrucosa*, inositolphosphoceramide, sphingolipids, sphingosine bases, fatty acids