



УДК 547.455'913.3'118.07

СИНТЕЗ МОРАПРЕНИЛПИРОФОСФАТОВ β -D-ГАЛАКТОЗЫ,
 β -D-ГЛЮКОЗЫ И 4-ДЕЗОКСИ- α -D-КСИЛО-ГЕКСОЗЫМальцев С. Д., Юрченко Н. Н., Данилов Л. Л.,
Шубаев В. Н.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

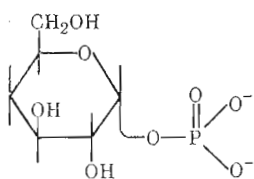
Морапренилпирофосфаты β -D-галактозы, β -D-глюкозы и 4-дезоксид- α -D-ксило-гексозы получены взаимодействием морапренилфосфонмидазолида и фосфатов соответствующих моносахаридов.

Важная роль полипренилпирофосфатсахаров в биосинтезе бактериальных полисахаридов хорошо известна [1]. При биосинтезе многих O-специфических и капсульных полисахаридов в роли моносахарида — инициатора роста цепи выступают остатки D-галактозы или D-глюкозы и, таким образом, полипренилпирофосфаты соответствующих α -моносахаридов являются первыми промежуточными соединениями при сборке повторяющихся звеньев полисахаридной цепи.

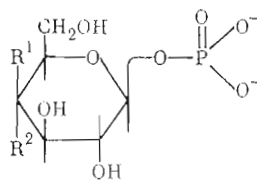
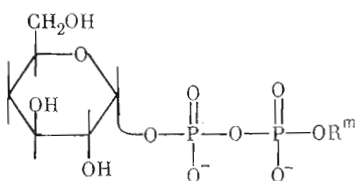
Разработанный нами недавно метод синтеза полипренилпирофосфатсахаров [2] открывает возможность расширения проводимых в нашей лаборатории исследований специфичности ферментов биосинтеза O-специфических полисахаридов сальмонелл (см. обзор [3]) и начала работы по выяснению значения функциональных групп в молекуле полипренилпирофосфатсахара — акцептора гликозильных остатков. В рамках этой программы исследования мы сообщили о синтезе морапренилпирофосфатных производных α -D-галактозы [2], α -D-глюкозы [2], α -D-галактозы [4], α -D-фруктозы [4] и α -D-маннозы [4], а также о первых результатах по взаимодействию этих соединений с ферментами биосинтеза O-антигена сальмонелл [5, 6].

Цель настоящего сообщения — описание синтеза трех новых соединений этого ряда (IV) — (VI) (схема). Одно из них, производное 4-дезоксид- α -D-ксило-гексозы (4-дезоксиглюкозы) (IV), представляет интерес в связи с тем, что рамнозилтрансфераза биосинтеза O-специфических полисахаридов сальмонелл способна различать морапренилпирофосфатные производные α -D-галактозы (V) и α -D-глюкозы (VI) [5], различающиеся лишь конфигурацией при C-4 моносахаридного остатка. Два других — производные β -D-галактозы и β -D-глюкозы — необходимы для выяснения того, существенна ли для исследуемых гликозилтрансфераз α -конфигурация при C-1 моносахаридного остатка акцептора.

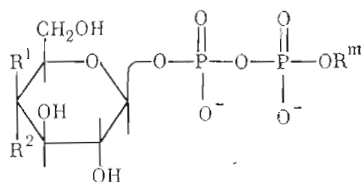
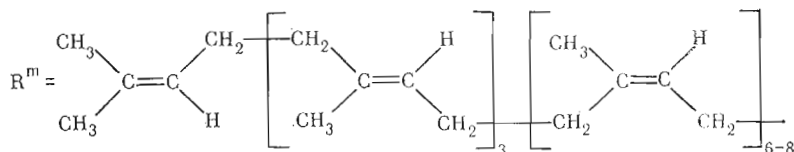
В качестве полипренилфосфата мы применяли синтетический фосфат морапрениола, способный эффективно заменять природный ундекапренилфосфат в ферментных системах сальмонелл [7]. Фосфат 4-дезоксид- α -D-ксило-гексозы [8] был синтезирован из ее полного ацетата сплавлением с безводной фосфорной кислотой [9]. Фосфаты β -D-глюкозы и β -D-галактозы получали реакцией соответствующих 1,2-алкилортоацетатов моносахаридов с безводной фосфорной кислотой в тетрагидрофуране [10, 11]. В применяемых нами условиях реакции (см. «Экспериментальную часть») мы не наблюдали образования фосфодиэфиров, отмеченного в работе [10]. После обработки 1 н. гидроокисью лития для удаления ацетильных групп и осаждения неорганического фосфата производные этих моносахаридов были очищены анонообменной хроматографией на даэксе 1×8 (HCO_3^-) в линейном градиенте ТЕАВ (0–0,3 М). Степень очистки и индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью электрофореза на бумаге. α -Конфигурация фосфата 4-дезоксид-D-ксило-гексозы была



(I)

(II), $R^1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$ (III) $R^2 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$ 

(IV)

(V), $R^1 = \text{OH}; R^2 = \text{H}$ (VI), $R^1 = \text{H}; R^2 = \text{OH}$ 

подтверждена ПМР-спектром, в котором присутствовал сигнал аномерного протона при 5,35 м. д. в виде двойного дублета с $J_{1,2}$ 3,4 и $J_{1,р}$ 6,9 Гц. На наличие дезоксиивена в этом соединении указывает определенная в условиях метода [12] константа скорости его кислотного гидролиза, $k_{\text{гидр}} 48 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, которая резко отличается от константы скорости для α -D-глюкозофосфата ($k_{\text{гидр}} 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$) и α -D-галактозофосфата ($k_{\text{гидр}} 9,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$) и несколько выше, чем для α -D-фукозилфосфата ($k_{\text{гидр}} 33,0 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), что соответствует имеющимся в литературе данным о влиянии положения дезоксиивена в молекулах гликозилфосфатов на скорость их кислотного гидролиза [13].

Морапренилпирофосфатсахара синтезировали в условиях, описанных в работе [14]. Реакционную смесь разделяли анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в линейном градиенте ацетата аммония в метаноле, контролируя элюцию с помощью ТСХ и путем определения во фракциях кислотолабильного фосфата ($P_{\text{кл}}$). Строение полученных соединений было подтверждено результатами их специфической деградации. При обработке 40% водным фенолом (70° С, 10 мин) были идентифицированы гликозилпирофосфаты (электрофорез на бумаге), что характерно для соединений с ненасыщенным α -изопреновым звеном [15]. При обработке водным аммиаком в смеси бензол — метанол наблюдалось образование циклофосфатов соответствующих моносахаридов и отщепление морапренилфосфата, что подтверждало наличие пирофосфатного мостика в молекулах этих соединений.

Экспериментальная часть

Аналитические методики описаны в работе [2]. Константу кислотного гидролиза определяли согласно методике [12]. Растворы уваривали в вакууме при температуре $\leq 30^\circ \text{C}$. ТСХ проводили на пластинках (6×2,5 см) с силикагелем (Kieselgel 60, Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 60 : 25 : 4, обнаруживая фосфорные эфиры с помощью реактива [16] с последующим прокаливанием, а непредельные соединения — парамидида. Электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-16 в 0,05 М ТЕАВ, обнаруживая фосфаты реагентом [17] и определяя подвижность фосфатных производных сахаров ($E_{\text{C}_{1\text{с}-1-\text{P}}}$) относительно α -D-глюкопиранозилфосфата. Спектр ПМР снимали на приборе BS 497 (Tesla, ЧССР) с рабо-

чей частотой 100 МГц в D₂O при 35° С. Электропроводность растворов измеряли с помощью кондуктометра CDM 3 (Radiometer, Дания). Морапрепилфосфатсахара хранили в виде метанольного раствора, содержащего ацетат аммония, при 0° С.

4-Дезокси-α-D-ксило-гексопиранозилфосфат (I). Полный ацетат 4-дезокси-*D*-ксило-гексопиранозы (85 мг, 255 мкмоль), полученный ацетилированием 4-дезокси-*D*-ксило-гексопиранозы смесью уксусного ангидрида и пиридина, растворяли в 3 мл абс. бензола и лиофильно высушивали. К остатку прибавляли 100 мг (1,03 ммоль) безводной кристаллической фосфорной кислоты (Merck, ФРГ) и нагревали 1,5 ч при 56–60° С в вакууме. После охлаждения прибавляли 10 мл 1 н. LiOH. Фильтрат обрабатывали в течение 3 ч избытком дауэкса 50W×8 (Pu⁺) до pH~8, разбавляли водой до 50 мл и наносили на колонку (2×8 см) с дауэксом 1×8 (HCO₃⁻). Элюцию проводили раствором ТЕАВ (0–0,3 М, по 150 мл, линейный градиент) со скоростью 60 мл/ч, собирая фракции по 10 мл. Разделение контролировали, определяя во фракциях кислотолabileный (*P*_{кл}) и неорганический (*P*_н) фосфат, и электрофоретически. Фракции, содержащие требуемое соединение (0,15–0,22 М концентрация соли), объединяли и удаляли ТЕАВ последовательной отгонкой воды и этанола. Выход соединения (I) (триэтиламмониевая соль) 142 мкмоль (55%), *E*_{G1c-1-P} 1,05, отношение *P*_{кл} и общего (*P*_{общ}) 1 : 1, *k*_{гидр} 48,0·10⁻⁴ с⁻¹.

β-D-Галактопиранозилфосфат (II). 3,4,6-три-*O*-Ацетил-1,2-*O*-трет-бутилортоацетил-*α*-*D*-галактопиранозу [18] (390 мг, 1,3 ммоль) лиофильно высушивали из бензольного раствора. К остатку прибавляли раствор безводной кристаллической фосфорной кислоты (203 мг, 2,1 ммоль) в 2 мл абс. тетрагидрофурана. Перемешивали до полного растворения ортоэфира и выдерживали 2 ч при 20° С. К раствору прибавляли 5 мл 1 н. LiOH и оставляли на 16 ч при 20° С. Осадок отфильтровывали и промывали 0,1 н. LiOH, фильтрат и промывные воды объединяли и перемешивали с избытком дауэкса 50W×8 (Pu⁺) до pH~8,0. Смолу отфильтровывали, промывали водой, объем раствора доводили водой до ~50 мл, наносили на колонку с дауэксом 1×4 (HCO₃⁻) (0,9×25 см) и элюировали раствором ТЕАВ (линейный градиент 0–0,3 М, по 250 мл) со скоростью 60 мл/ч, контролируя разделение аналогично предыдущему опыту. Фракции, содержащие соединение (II), объединяли и удаляли ТЕАВ. Выход триэтиламмониевой соли 242 мкмоль (20%), $[\alpha]_D^{20} +21,2^\circ$ (с 2,0; MeOH) (лит. [18] $[\alpha]_D^{20} +21,0^\circ$), *E*_{G1c-1-P} 1,0, *k*_{гидр} 12,6·10⁻⁴ с⁻¹ (лит. [12] *k*_{гидр} 12,3·10⁻⁴ с⁻¹).

β-D-Глюкопиранозилфосфат (III) получали аналогично соединению (II) из 150 мг (330 мкмоль) 3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-*O*-трет-бутилортоацетил-*α*-*D*-глюкопиранозы [10] и 60 мг (610 мкмоль) кристаллической фосфорной кислоты в 2,5 мл абс. тетрагидрофурана с выходом 18% (триэтиламмониевая соль), *E*_{G1c-1-P} 1,0, $[\alpha]_D^{20} +12,0^\circ$ (с 1,0; вода) (лит. [19] $[\alpha]_D^{20} +7,3^\circ$), *k*_{гидр} 7,8·10⁻⁴ с⁻¹ (лит. [12]; *k*_{гидр} 7,2·10⁻⁴ с⁻¹).

P¹-Морапрепил-P²-(4-дезокси-α-D-ксило-гексопиранозил)пирофосфат (IV). Морапрепилфосфат (2,0 мкмоль) [7] обессоливали на колонке (1×30 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), контролируя разделение по изменению электропроводности элюата и ТСХ. Фракции, содержащие фосфат морапренола, упаривали досуха, растворяли в 1,5 мл абс. бензола, лиофильно высушивали и превращали в имидазolid согласно методике [2]. Морапрепилфосфоимидазolid растворяли в 50 мкл смеси абс. тетрагидрофуран – абс. DMSO, 1 : 1, и к раствору прибавляли 5 мкмоль триэтиламмониевой соли 4-дезокси-*α*-*D*-ксило-гексопиранозилфосфата в 0,1 мл той же смеси растворителей. Через 30 ч при 32° С реакционную смесь разбавляли 20 мл смеси хлороформ – метанол, 2 : 1, и наносили на колонку (0,8×3,5 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc⁻, Whatman, Англия), уравновешенной той же смесью растворителей. Колонку промывали 30 мл смеси хлороформ – метанол (2 : 1), 30 мл метанола и элюировали раствором ацетата аммония в метаноле (линейный градиент 0–0,1 М по 45 мл, 30 мл/ч), собирая фракции объемом 2,5 мл. Выход соединения (IV) 1,03 мкмоль (52%), *R*₁ 0,20, *E*_{G1c-1-P} 0; *P*_{кл} – морапренол 2,1 : 1.

P^1 -Морапренил- P^2 -(β -D-галактопиранозил)пирофосфат (V) получали аналогично соединению (IV) из 3,0 мкмоль морапренилфосфата и 7,0 мкмоль триэтиламмониевой соли β -D-галактопиранозилфосфата в 0,15 мл смеси абс. тетрагидрофуран — абс. DMSO, 1 : 1. После ионообменной хроматографии на колонке (0,9×3 см) с DE-52 (OAc⁻) в линейном градиенте ацетата аммония в метаноле (0—0,1 М, по 50 мл, 36 мл/ч) получили 1,2 мкмоль (40,5%) соединения (V), R_f 0,20, $E_{G1C-1-P}$ 0, $R_{кл}$ — морапренил 1,98 : 1.

P^1 -Морапренил- P^2 -(β -D-глюкопиранозил)пирофосфат (VI) получали аналогично предыдущему опыту из 2 мкмоль морапренилфосфата и 4 мкмоль триэтиламмониевой соли β -D-глюкопиранозилфосфата в 0,11 мл смеси абс. тетрагидрофуран — абс. DMSO, 1 : 1. Целевой продукт выделяли ионообменной хроматографией на колонке (0,8×8 см) с DE-52 (OAc⁻), элюируя раствором ацетата аммония в метаноле (линейный градиент 0—0,12 М, по 50 мл, 36 мл/ч), выход 0,43 мкмоль (22%), R_f 0,20, $E_{G1C-1-P}$ 0, $R_{кл}$ — морапренил 1,90 : 1.

Фенольная деградация морапренилпирофосфатсахаров осуществлялась согласно методике [2] с идентификацией пирофосфатсахаров электрофорезом ($E_{G1C-1-P}$ 0,82 из соединения (IV) и 0,80 из соединений (V) и (VI)).

Деградация морапренилпирофосфатсахаров аммиаком выполнялась как указано в работе [2]. После упаривания смесей до объема 0,1 мл проводили экстракцию хлороформом (3×50 мкл). В органическом слое идентифицировали морапренилфосфат (ТСХ), в водном слое — циклофосфаты соответствующих сахаров ($E_{G1C-1-P}$ 0,70 из соединения (IV) и 0,63 из соединений (V) и (VI)).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибает В. Н. Успехи биол. химии, 1982, т. 23, с. 61—101.
2. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203—211.
3. Shibaev V. N. Pure and Appl. Chem., 1978, v. 50, № 11—12, p. 1421—1436.
4. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 1, с. 109—113.
5. Shibaev V. N., Danilov L. L., Druzhinina T. N., Gogilashvili L. M., Maltsev S. D., Kochetkov N. K. FEBS Lett., 1982, v. 139, № 2, p. 177—180.
6. Кочетков Н. К., Шибает В. Н., Дружинина Т. Н., Гоглашвили Л. М., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Мальцев С. Д., Уткина Н. С. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 6, с. 1393—1397.
7. Вергунова Г. И., Глухоед И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибает В. Н. Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1484—1492.
8. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибает В. П., Кусов Ю. Ю. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 2, с. 404—411.
9. Шибает В. Н., Кусов Ю. Ю., Кучар Ш., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1973, № 2, с. 430—434.
10. Salat M. A., Vehrman E. J. Carbohydr. Res., 1981, v. 90, № 1, p. 83—89.
11. Себякин Ю. Л., Волкова Л. В., Русанова Е. Е., Евстигнеева Р. П. Ж. орган. химии, 1979, т. 15, № 10, с. 2228—2229.
12. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибает В. П. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 5, с. 780—782.
13. Zátorský J., Zemek J., Kučar S., Soukupová V. Collect. Czech. Chem. Commun., 1977, v. 42, № 4, p. 1379—1384.
14. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1718—1722.
15. Garcia R. C., Recondo E., Dankert M. Eur. J. Biochem., 1974, v. 43, № 1, p. 93—105.
16. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
17. Hanes C. S., Isherwood F. A., Nature (London), 1949, v. 164, № 4183, p. 1107—1109.
18. Данилов Л. Л., Волкова Л. В., Бондаренко В. А., Евстигнеева Р. П. Биоорганическая химия, 1975, т. 1, № 7, с. 905—911.
19. MacDonald D. L. Carbohydr. Res., 1966, v. 3, № 1, p. 117—122.

Поступила в редакцию 14.II.1983

SYNTHESIS OF MORAPRENYL PYROPHOSPHATES OF β -D-GALACTOSE, β -D-GLUCOSE AND 4-DEOXY- α -D-XYLO-HEXOSE

MALTSEV S. D., YURCHENKO N. N., DANILOV L. L., SHIBAEV V. N.
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Moraprenyl pyrophosphates of β -D-galactose, β -D-glucose and 4-deoxy- α -D-xylo-hexose were obtained by the reaction of moraprenyl phosphoimidazolide with corresponding glycosyl phosphates.