



УДК 577.115.5 + 593.96-147.62.088

© 1991 г.

Н. В. Чекарева, Г. П. Смирнова, Н. К. Кочетков

ГАНГЛИОЗИДЫ ГОЛОТУРИИ *CUCUMARIA JAPONICA* SEMPER

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

Из голотурии *Cucumaria japonica* с помощью ионообменной хроматографии на колонках с DEAE- и TEAE-целлюлозой и препаративной ТСХ на силикагеле выделены два ганглиозида, главный и минорный, структура которых определена с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного расщепления нейраминидазой, окисления хромовым ангидридом и смесью NaIO_4 — KMnO_4 . Показано, что главный ганглиозид имеет структуру N-гликолилнейраминозил-(α -2-6)-глюкопиранозил-(β 1-1)-церамида, а минорный является дисиалозил (α)-глюкозил-(β 1-1)-церамидом. Структура главного ганглиозида подтверждена ^{13}C -ЯМР-спектроскопией.

Ранее мы показали, что ганглиозиды, входящие как специфические компоненты в состав клеточных мембран позвоночных, присутствуют в тканях одного типа беспозвоночных — иглокожих [1]. Были определены структуры ганглиозидов ряда иглокожих, относящихся к трем классам: морским ежам, морским звездам и офиурам. Оказалось, что ганглиозиды морских ежей имеют общий для этого класса иглокожих тип структуры углеводных цепей, не встречающийся в ганглиозидах позвоночных. Они содержат только глюкозу и сиаловую кислоту, присоединенную к глюкозе α -2-6-связью; сиаловая кислота может содержать сульфатную группу в положении 8 [1]. Такой же тип структуры обнаружен в ганглиозидах офиур [2, 3]. Напротив, ганглиозиды морских звезд отличаются большей сложностью и разнообразием углеводных цепей и не имеют общего для всего класса типа структуры [1]. Ганглиозиды двух других классов иглокожих — голотурий и морских лилий, до сих пор изучены не были. В настоящей работе приведены данные по выделению и установлению структуры ганглиозидов первого представителя класса голотурий — кукумарии *Cucumaria japonica*.

Ганглиозиды *C. japonica* выделяли по той же общей схеме, что и ганглиозиды других видов иглокожих. Сначала обработкой обезвоженных внутренних тканей смесями хлороформа и метанола (2 : 1 и 1 : 1) экстрагировали все липиды, из которых затем выделяли полярные липиды, растворимые в воде, диализом хлороформ-метанольного экстракта против дистиллированной воды, последующим отделением водного слоя, образовавшегося внутри диализного мешка, его упариванием и лиофилизацией. Полученный препарат полярных липидов, по данным ТСХ, содержал два сиалогликолипида, главный и минорный, нейтральные гликолипиды, некоторое количество фосфолипидов, пигментов, а также, возможно, терпеновых гликозидов. Сиалогликолипиды были выделены из этой смеси с помощью ионообменной хроматографии на колонках с DEAE- и TEAE-целлюлозой. С DEAE-целлюлозы главный сиалогликолипид элюировался 0,025 М раствором ацетата аммония в метаноле как моносиалоганглиозид, а минорный — 0,1 М раствором этой соли и, следовательно, обладал более сильными кислотными свойствами. К сожалению, полученные препараты сиалогликолипидов включали в себя примеси других соединений, в том числе содержащих углеводы, поэтому для получения ганглиозидов в ин-

Использованы стандартные сокращения; Gc — гликолил, Cer — керамид, TEAE — триэтиламиноэтил.

дивидуальном состоянии потребовалась дополнительная очистка минорного ганглиозида на колонке с ТЕАЕ-целлюлозой, а главного ганглиозида — препаративной ТСХ на силикагеле. Надо отметить, что содержание сиалогликолипидов в кукумарии ниже, чем в иглокожих большинства других изученных видов. Здесь ганглиозиды составляют всего ~0,5% от суммы полярных липидов, в то время как в морских звездах их содержится 6% [4], офиурах — 2,5% [2], а в гонадах морских ежей, которые наиболее богаты ганглиозидами, — до 20% [5].

Выделенные из кукумарии соединения содержали сиаловые кислоты и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [6] и орциновым [7] реактивами соответственно) и не содержали фосфатной группы (отрицательная реакция с молибденовым реактивом [8]) и свободной аминогруппы (отсутствие окраски с нингидрином). В ИК-спектрах этих ганглиозидов имелись интенсивные полосы поглощения амидной группы (1640 и 1550 см^{-1}), спиртовых гидроксильных (1040 и 1080 см^{-1}), ассоциированных гидроксильных (3300 и 3450 см^{-1}), ионизированной карбоксильной группы (1405 см^{-1}) и валентных колебаний С—Н-связей алифатической цепи (2860 и 2930 см^{-1}). Спектры не содержали дополнительных полос поглощения, относящихся, например, к О-ацильной или сульфатной группе. На основании процедуры выделения и ИК-спектроскопии можно было предположить, что главный ганглиозид является моносиалогликолипидом, а минорный — дисиалогликолипидом.

Структуру олигосахаридных цепей ганглиозидов исследовали с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, ферментативного расщепления нейраминидазой и окисления хромовым ангидридом.

В продуктах полного кислотного гидролиза обоих ганглиозидов в качестве единственного нейтрального моносахарида обнаружена глюкоза, а при их частичном гидролизе отщепляются сиаловые кислоты и образуются нейтральные моноглюкозилцерамиды. Количественные определения показали, что главный ганглиозид содержит по одному остатку глюкозы и сиаловой кислоты, а минорный — один остаток глюкозы и два остатка сиаловой кислоты. По данным ТСХ, сиаловая кислота главного ганглиозида является N-гликолоилнейраминовою кислотой, а минорного — смесью N-ацетил- и N-гликолоилнейраминовых кислот в соотношении 1 : 2.

Место замещения остатка глюкозы в главном ганглиозиде определяли с помощью метилирования. В масс-спектре полностью метилированного производного ганглиозида имелся пик иона с m/z 406, соответствующий концевой N-гликолоилнейраминовою кислоте, пик иона с m/z 374 (406 — $\text{СН}_3\text{ОН}$), а также пик иона с m/z 683, соответствующий фрагменту, содержащему N-гликолоилнейраминовою кислоту, глюкозу и С1 — С2-участок сфингозинового основания. Присутствие этих пиков в спектре подтверждает, что олигосахаридная цепь главного ганглиозида представляет собой дисахарид N-гликолоилнейраминозилглюкозу, связанный с первичным гидроксильном сфингозинового основания. После метанолиза метилированного ганглиозида с помощью ГЖХ были обнаружены метилгликозиды 2,3,4-три-О-метилглюкозы. Следовательно, остаток глюкозы в ганглиозиде замещен сиаловой кислотой по О6. Такой же тип связи сиаловых кислот характерен для ганглиозидов морских ежей [1] и обнаружен в ганглиозидах офиур [2, 3], но не встречается в сиалогликоконъюгатах из других животных. Из-за недостатка материала положение связи между моносахаридами в минорном ганглиозиде не определяли.

Для выяснения конфигурации глюкозидной связи в ганглиозидах глюकोзилцерамиды, полученные после частичного кислотного гидролиза ганглиозидов, ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом. В обоих случаях глюкоза разрушилась практически полностью. Следовательно, она соединена с церамидом β -глюкозидной связью. Конфигурацию кетозидных связей сиаловых кислот в ганглиозидах определяли с помощью нейраминидазы из *Vibrio cholerae*. В обоих случаях сиаловые кислоты отщепились полностью. Следовательно, они соединены α -кетозидными связями.

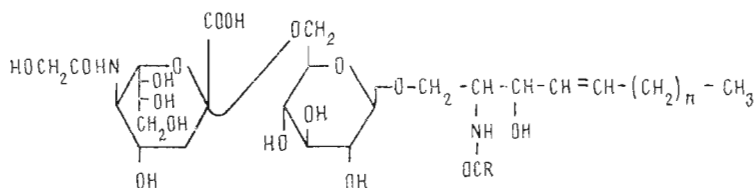
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что главный ганглиозид представляет собой N-гликолоилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-1)-церамид, а минорный — дисиалозил(α)-глюкозил-(β 1-1)-церамид.

Данные по структуре олигосахаридной цепи главного ганглиозида подтверждены ^{13}C -ЯМР-спектроскопией. Из спектра следует: 1) гексоза представлена β -глюкопиранозой (химический сдвиг сигнала C1 — 103,5 м. д.); 2) глюкоза замещена остатком сиаловой кислоты по положению 6 (сигнал C6 67,5 м. д. смещен в низкое поле за счет α -эффекта гликозилирования, а сигнал C5 74,9 м. д. — в высокое поле за счет β -эффекта по сравнению с соответствующими сигналами в спектре глюкозилцерамида); 3) сиаловая кислота представлена N-гликолоилнейраминовой кислотой (химический сдвиг 61,3 м. д. соответствует сигналу углеродного атома CH_2OH -группы остатка гликолевой кислоты); 4) кетозидная связь сиаловой кислоты имеет α -конфигурацию (химический сдвиг C6 остатка сиаловой кислоты имеет значение 73,5 м. д., что близко по значению к химическому сдвигу сигнала C6 α -метилгликозида N-ацетилнейраминовой кислоты (74,0 м. д.), а не ее β -аномера (71,2 м. д.)) [9].

Строение липидной части ганглиозидов определено с помощью кислотного метанолиза. В продуктах метанолиза обоих ганглиозидов с помощью ТСХ обнаружены метиловые эфиры высших жирных незамещенных и α -гидроксикислот и сфингозиновые основания. Соотношение незамещенных и α -гидроксикислот в главном ганглиозиде составляет 1 : 1, а в минорном 9 : 1. Метиловые эфиры каждого типа кислот были выделены препаративной ТСХ, и их состав определен с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Как видно из табл. 1, среди незамещенных кислот в главном ганглиозиде преобладают кислоты $\text{C}_{15:0}$, $\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:1}$ и $\text{C}_{18:0}$, а в минорном ~90% составляют пальмитиновая и стеариновая кислоты. α -Гидроксикислоты главного ганглиозида представлены только α -гидроксистеариновой кислотой, для минорного ганглиозида состав гидроксикислот не определен из-за недостатка материала.

Сфингозиновым основанием главного ганглиозида, по данным ТСХ, является сфингозин. Состав сфингозинов определен с помощью хроматомасс-спектрометрического анализа высших жирных кислот, образующихся при окислении сфингозинов смесью NaIO_4 — KMnO_4 [10]. Как видно из табл. 2, ганглиозид содержит набор сфингозинов от C_{16} до C_{20} , среди которых более половины составляет C_{17} -сфингозин. Интересно, что в большинстве исследованных ганглиозидов морских ежей и морских звезд сфингозиновым основанием является триоксиаминоспирт (фитосфингозин); только в ганглиозиде морского ежа *Anthocidaris crassispina* [11], морской звезды *Asterias rubens* [12] и офиур [2, 3] обнаружены сфингозины. Из-за недостатка материала сфингозиновое основание минорного ганглиозида не исследовали.

На основании полученных данных для главного ганглиозида голотурии *C. japonica* предложена структура



$n = 10-14$, R — остаток высшей жирной кислоты.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что ганглиозиды голотурии *C. japonica* по строению олигосахаридных цепей сходны с ганглиозидами морских ежей [1] и офиур [2, 3] и отличаются от ганглиозидов морских звезд [1]. Интересно выяснить, является ли такой тип структуры олигосахаридных цепей общим для ганглиозидов всего класса голотурий. В *C. japonica* мы не обнаружили сульфатированных ганглиозидов, обычных составляющих ганглиозидов офиур и большинства исследованных видов

Таблица 1

Состав незамещенных высших жирных кислот ганглиозидов *C. japonica* (% от суммы)

Кислоты	Глав-ный	Минор-ный	Кислоты	Глав-ный	Минор-ный
C _{14:0}	6,3	—	C _{18:0}	14,2	28,6
C _{15:0}	17,0	—	C _{20:0}	6,0	3,2
C _{16:1}	7,1	—	C _{21:0}	4,1	—
C _{16:0}	21,2	60,8	C _{22:0}	5,5	4,4
C _{17:0}	1,8	—	C _{23:0}	3,7	—
C _{18:1}	13,1	—	C _{24:0}	—	3,0

Таблица 2

Состав сфингозинов главного ганглиозида *C. japonica*

Сфингозины	% от суммы
C ₁₆	9,4
C ₁₇	53,0
C ₁₈	19,0
C ₁₉	8,2
C ₂₀	10,4

морских ежей. Сейчас, разумеется, нельзя сказать, является ли *C. japonica* в этом отношении исключением, или отсутствие сульфатированных ганглиозидов представляет собой отличительную особенность ганглиозидов голотурий по сравнению с ганглиозидами офиур и морских ежей. Для этого нужны дальнейшие исследования.

Экспериментальная часть

Голотурии *C. japonica* собраны в заливе Посыет Японского моря в августе-сентябре. Липидный экстракт внутренностей животных и сырой препарат ганглиозидов получали по ранее описанной методике [5].

Использовали N-ацетилнейраминную кислоту (Koch-Light), N-гликолоилнейраминную кислоту (Sigma), нейраминидазу *V. cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem), DEAE-целлюлозу DE-23 (Whatman), TEAE-целлюлозу (Serva). Хлороформ перегоняли перед использованием.

Колоночная хроматография ганглиозидов на DEAE-целлюлозе (CH₃COO⁻). Колонку (3,0 × 38 см) промывали последовательно 13,5 л смеси CHCl₃ — CH₃OH (2 : 1), 6,9 л CH₃OH и далее растворами CH₃COONH₄ в CH₃OH (ступенчатый градиент: 1250 мл — 0,025 М, 1000 мл — 0,1 М и 2000 мл — 0,25 М); объем фракций 50 мл. По 0,5 мл каждой фракции упаривали и анализировали ТСХ на силикагеле. Фракции, элюированные солью одной концентрации и содержащие ганглиозиды одинаковой подвижности при ТСХ, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизировали. Полученный препарат главного ганглиозида дополнительно очищали препаративной ТСХ, а минорного — на колонке с TEAE-целлюлозой.

Колоночная хроматография препарата минорного ганглиозида на TEAE-целлюлозе (CH₃COO⁻). Колонку (2,0 × 16 см) промывали последовательно 300 мл смеси CHCl₃ — CH₃OH (2 : 1), 800 мл CH₃OH, 1400 мл, 0,025 М CH₃COONH₄ в CH₃OH и 400 мл 0,1 М CH₃COONH₄ в CH₃OH; объем фракций 20 мл. По 0,2 мл каждой фракции упаривали и анализировали ТСХ. Фракции, содержащие минорный ганглиозид, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизировали.

Из 10,6 г препарата полярных гликолипидов *C. japonica* (одна загрузка) получили 42,5 мкмоль главного ганглиозида и 2,8 мкмоль минорного ганглиозида (считая на сиаловую кислоту).

ИК-спектры снимали в таблетках с KBr.

ГЖХ выполняли на приборе фирмы Pye Unicam, серия 104 (Англия), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с фазой ECNSS-M на газхроме Q при 180° С, частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 155° С, метиловые эфиры незамещенных и α-гидроксизамещенных (в виде О-ацетатов) высших жирных кислот — на колонке с 3% OV-I на диатомите С при 160—280° С (3°/мин).

Масс-спектр метилированного ганглиозида снимали на приборе Varian MAT CN-6 (США) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре нагрева образца 280° С.

Аналитические методы: сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [6, 13], гексозы — в виде ацетатов гекситов с помощью ГЖХ. В качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

Анализ с помощью ТСХ, хроматомасс-спектрометрии, ^{13}C -ЯМР, а также полный кислотный гидролиз, метанолиз, окисление хромовым ангидридом и обработку нейраминидазой проводили как описано в предыдущем сообщении [3].

Частичный кислотный гидролиз ганглиозидов проводили 0,05 М H_2SO_4 при 80°C в течение 1,5 ч. Реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды при 20°C . Недиализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ТСХ. Внешний водный слой упарили до 5 мл, пропустили через колонку с дауэксом 2×8 (CH_3COO^-), сиаловые кислоты элюировали 1 М Na-ацетатным буфером, pH 4,6 [13], и элюат деионизировали смолой IR-120 (H^+). Сиаловые кислоты определяли количественно по методу [6] и анализировали ТСХ.

Метилирование ганглиозидов проводили по методу Хакомори [14]. Полученные производные экстрагировали CHCl_3 , диализовали против воды, очищали препаративной ТСХ и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Далее метилированные производные подвергли метанолизу 0,5 М HCl в CH_3OH при 80°C в течение 16 ч. Метилловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном. Частично метилированные метилглюкозиды анализировали ГЖХ.

Окисление сфингозинового основания главного ганглиозида проводили по методу [10]. Его продукты окисления подвергли полному кислотному метанолизу и получившиеся метилловые эфиры высших жирных кислот после экстракции гексаном анализировали методом хроматомасс-спектрометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochetkov N. K., Smirnova G. P. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1981. V. 44. P. 387—438.
2. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1986. Т. 2.6. № 4. С. 507—513.
3. Чекарева Н. В., Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 3. С. 387—397.
4. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 712. № 3. P. 650—658.
5. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 326. № 1. P. 74—83.
6. Svennerholm L. // Biochim. et biophys. acta. 1957. V. 24. № 3. P. 604—611.
7. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. // Comp. Biochem. and Physiol. 1970. V. 34. № 4. P. 163—177.
8. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. // J. Lipid Res. 1968. V. 9. № 3. P. 396.
9. Jennings H. J., Bhattacharjee A. K. // Carbohydr. Res. 1977. № 1. P. 105—112.
10. Weiss B. // Lipid chromatographic analysis. V. 2 / Ed. Marinetti G. V. New York, Basel: Marcel Dekker, 1976. P. 701—712.
11. Hoshi M., Nagai J. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 388. P. 152—162.
12. Смирнова Г. П., Глухoded И. С., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 636—641.
13. Miettinen T., Takki-Luukainen I. T. // Acta chem. scand. 1959. V. 13. № 4. P. 856—858.
14. Hakomori S.-I. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.

Поступила в редакцию
27.V.1990

N. V. CHEKAREVA, G. P. SMIRNOVA, N. K. KOCHETKOV

GANGLIOSIDES OF THE HOLOTHURIA *CUCUMARIA JAPONICA* SEMPER

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

Two gangliosides were isolated from the holothuria *Cucumaria japonica* by DEAE- and TEAE-cellulose column chromatography and preparative TLC on silica gel. On the basis of total and partial acid hydrolysis, methanolysis, methylation analysis, enzymatic cleavage with neuraminidase, chromium trioxide oxidation and NaIO_4 — KMnO_4 oxidation the major and minor gangliosides were identified as N-glycolylneuraminosyl-($\alpha 2$ —6)-glucopyranosyl-($\beta 1$ —1)-ceramide and disialosyl(α)-glucosyl-($\beta 1$ —1)-ceramide, respectively. The composition of the lipid moiety of the main ganglioside was determined.