



УДК 547.426.2'18'455.6.02 : 579.873

ТЕЙХОВАЯ КИСЛОТА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
ACTINOMADURA CARMINATA — ПРОДУЦЕНТА
АНТИБИОТИКА КАРМИНОМИЦИНА

Наумова И. Б., Дигимбай К., Потехина Н. В.,
Шашков А. С*, Терехова Л. П**, Преображенская Т. П**.

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;

**Институт по изысканию новых антибиотиков Академии медицинских наук СССР,
Москва

Клеточная стенка *Actinomadura carminata* — продуцента противоопухолевого антибиотика карминомицина — содержит тейховую кислоту поли(глицерофосфатной) природы. Полимер относится к 1,3-типу, состоит из ~8 глицерофосфатных единиц, две из которых имеют при С2 глицерина 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозильный заместитель, а одна — 3-О-метил- β -D-галактопиранозил-(1 → 3)-2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозильный. Строение полимера установлено с помощью химических методов и ¹³C-ЯМР-спектроскопией. Тейховая кислота составляет ~10% от сухого веса клеточной стенки. 3-О-Метилгалактоза в составе тейховой кислоты обнаружена впервые.

Клеточная стенка актиномицетов, принадлежащих к роду *Actinomadura*, изучена недостаточно. Исследован только пептидогликан некоторых видов, и установлено, что он относится к типу А1 γ [1]. В предыдущей работе мы показали, что 30 исследованных актиномицетов этого рода содержат тейховые кислоты, относящиеся к разным структурным типам [2].

В задачу настоящего исследования входило изучение структуры тейховой кислоты клеточной стенки *Actinomadura carminata* — продуцента противоопухолевого антибиотика карминомицина [3], так как, по предварительным данным, этот полимер содержал 3-О-метил-галактозу, ранее не обнаруженную в тейховых кислотах бактерий.

Клеточную стенку получали дифференциальным центрифугированием разрушенного ультразвуком мицелия, находящегося в начале логарифмической стадии роста. Она содержала 1,24% фосфора глицерофосфатной природы (в продуктах ее кислотного гидролизата обнаружены моно- и дифосфаты глицерина), что могло свидетельствовать о присутствии в ней тейховой кислоты (табл. 1).

Тейховая кислота выделена из клеточной стенки экстракцией раствором трихлоруксусной кислоты (препарат I). Однако выход полимера был небольшим, что затрудняло его анализ. В связи с этим были получены препараты тейховой кислоты из целого мицелия актиномицета двойной обработкой трихлоруксусной кислотой, что существенно увеличило выход полимера. Как видно из табл. 1, выделенные препараты тейховой кислоты (IIа и IIб) близки по составу, содержат значительное количество фосфора (до 10,5%), при кислотном гидролизе образуют моно- и дифосфаты глицерина и набор моносахаридов, среди которых преобладают глюкоза, 3-О-метилгалактоза и галактозамин. Продукты гидролиза идентифицированы с помощью ВХ и электрофореза. Для дальнейшего исследования препараты (IIа, б) были объединены.

Предстояло выяснить, какие из обнаруженных моносахаридов входят в состав тейховой кислоты, природу мономерных единиц полимера и тип фосфодиэфирных связей между ними.

Химическая характеристика клеточной стенки *A. carminata* и препаратов тейхоевых кислот, полученных из мицелия и стенки *

Препарат	Содержание, %				Продукты кислотного гидролиза (2 н. HCl, 3 ч, 100° С)	
	P _{общ}	P _{нк}	P _{лаб}	P _{тк}	моносахариды	фосфорные эфиры
Клеточная стенка	1,24	Нет		1,24	Gal, 3MeGal, Man, Glc (сл.)	GroP, GroP ₂
I	Не определено				GalN, 3MeGal, Glc, Man (сл.)	GroP, GroP ₂
IIa	10,00	0,10	0,50	9,40	GalN, 3MeGal, Glc, Man (сл.), Gal (сл.)	GroP, GroP ₂
IIб	10,50	0,15	0,50	9,85	GalN, 3MeGal, Glc, Man (сл.)	GroP, GroP ₂

* GroP — монофосфат глицерина, GroP₂ — дифосфат глицерина, GalN — галактозамин, 3 MeGal — 3-О-метилгалактоза, Glc — глюкоза, Man — манноза, Gal — галактоза, P_{общ} — общее содержание фосфора, P_{нк} — фосфор нуклеиновых кислот, P_{лаб} — фосфор, минерализуемый за 7 мин (1 н. HCl, 100° С), P_{тк} = P_{общ} - (P_{нк} + P_{лаб}) — фосфор тейхоевых кислот, сл — следовые количества.

Тейхоевая кислота была очищена ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (Cl-форма) в линейном градиенте NaCl. Основное количество фосфорных соединений элюировали 0,35—0,45 M NaCl в виде одной фракции, которую подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 и лиофилизировали. При кислотном гидролизе соединений, входящих в состав этой фракции, обнаружены фосфорные эфиры глицерина, галактозамин и 3-О-метилгалактоза. Глюкоза, исходно присутствующая в гидролизате препаратов (IIa, б), во фракции не найдена и, таким образом, не является компонентом тейхоевой кислоты. Согласно данным электрофореза, очищенный материал содержит две тейхоевые кислоты (А и В), которые имеют разную подвижность в электрическом поле ($E_{\text{ГР}}^{\text{ГР}}$ для кислоты А — 0,9, для кислоты В — 1,15). Параллельно было проведено электрофоретическое исследование тейхоевой кислоты, полученной из клеточной стенки (препарат I). Выяснено, что клеточная стенка содержит только тейхоевую кислоту А. Полимеры А и В выделены с помощью электрофореза в препаративном масштабе и исследованы отдельно по обычной схеме анализа тейхоевых кислот [4].

Кислотный гидролиз тейхоевой кислоты А (2 н. HCl, 3 ч, 100° С) привел к образованию моно- и дифосфатов глицерина, 3-О-метилгалактозы, галактозамин, глицерина и неорганического фосфора (P_i). Продукты гидролиза идентифицировали с помощью ВХ и электрофореза. Галактозамин был идентифицирован дополнительно окислением нингидрином в пиридине [5] с последующим определением образовавшейся ликозы с помощью ВХ.

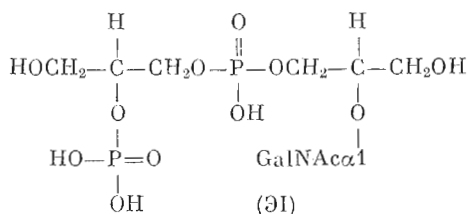
В щелочном гидролизате (1 н. NaOH, 3 ч, 100° С) с помощью ВХ и электрофореза обнаружены изомерные моно- и дифосфаты глицерина, два гликозида (Г I и Г II), глицерин, P_i, а также несколько фосфодиаэфиров глицерина, среди которых преобладали два (Э I и Э II).

Гликозид (Г I) имел положительный заряд и электрофоретическую подвижность $E_{\text{Г I}}$ 5,7, детектировался нингидрином, в продуктах его гидролиза (6 н. HCl, 4 ч, 100° С) обнаружены глицерин и галактозамин в мольном соотношении 1,00 : 0,87. При периодатном окислении не зафиксировано образование формальдегида, что указывало на расположение гликозидной связи при С2 глицерина и пиранозную форму моносахарида. На основании данных спектра ¹³C-ЯМР (см. ниже) об α-конфигурации гликозидного центра аминсахара нами сделан вывод, что гликозид (Г I) является 2-(2-амидо-2-дезоксид-α-D-галактопиранозил)глицерином.

Гликозид (Г II) был электрофоретически нейтрален, при хроматографировании в системе Б имел подвижность $R_{\text{Г II}}$ 0,82, не окрашивался нингидрином, в продуктах гидролиза (6 н. HCl, 4 ч, 100° С) обнаружены глицерин, галактозамин и 3-О-метилгалактоза в соотношении 1,00 : 0,90 :

1,06, при периодатном окислении формальдегид не обнаружен. Исходя из этих данных и учитывая данные спектроскопии ^{13}C -ЯМР о дисахариде (см. ниже), пиранозной форме моносахаридов в нем и конфигурации гликозидных центров, мы считаем, что (ГII) имеет строение 2-[3-О-метил- β -D-галактопиранозил-(1 \rightarrow 3)-2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозил]-глицерина.

Эфир (ЭI) имел электрофоретическую подвижность E_{GroP} 0,94, не окрашивался нингидрином. При кислотном гидролизе (2н. HCl, 3 ч, 100° C) он образовал моно- и дифосфаты глицерина, галактозамин, глицерин и P_i . Фосфомоноэстераза отщепляла 50% общего фосфора. Мольное соотношение компонентов P_i — GalN — Gro, 1,00 : 0,60 : 1,20. Результаты анализа строения эфира, присутствие гликозида (ГI) среди продуктов щелочного гидролиза полимера, а также данные о механизме гидролиза теихоевых кислот [6] позволяют приписать эфиру (ЭI) следующую формулу:



Эфир (ЭII) имел электрофоретическую подвижность E_{GroP} 0,78 и давал отрицательный ответ на нингидриновый тест; при кислотном гидролизе образовывал дифосфат глицерина, галактозамин, гликозид (ГI), 3-О-метилгалактозу и следовые количества монофосфата глицерина, глицерина и P_i . Нами не определено мольное соотношение компонентов в этом эфире, так как его не удалось очистить от небольшой примеси сопутствующего другого эфира ни БХ, ни электрофорезом. Небольшая электрофоретическая и хроматографическая подвижности эфира (ЭII) — R_{GroP_2} 0,32 (А), а также набор продуктов кислотного гидролиза свидетельствовали о его большой молекулярной массе. Исходя из этих данных, мы приходим к выводу, что эфир (ЭII) является также фосфодиэфиром глицерина, который содержит два гликозильных заместителя — N-ацилгалактозаминильный и 3-О-метилгалактозильный.

Отрицательная реакция с нингидрином гликозида (ГII) и эфиров (ЭI и ЭII) указывала на замещение аминогруппы галактозамина ацильным остатком. Отсутствие последнего в гликозиде (ГI) может быть объяснено частичным отщеплением этой группы при щелочном гидролизе, что наблюдалось нами и ранее [4].

Определение мольного отношения P — GalN — 3MeGal в полимере показало, что оно равно 1,00 : 0,38 : 0,13. Длина цепи определена с помощью фосфомоноэстеразы, найдено соотношение $P_{\text{общ}}$ — P_i 7,9 : 1,0, из чего следует, что цепь имеет ~ 8 глицерофосфатных звеньев.

Вопрос о типе фосфодиэфирной связи между ними решен на основании анализа строения эфиров (ЭI) и (ЭII). Присутствие в продуктах щелочного гидролиза полимера фосфодиэфиров глицерина с гликозильными заместителями говорило в пользу 1,3-поли(глицерофосфатной) цепи, что следует из механизма гидролиза теихоевых кислот аналогичной структуры [6].

Таким образом, данные анализа кислотной и щелочной дегградации теихоевой кислоты А свидетельствовали о том, что исследуемый полимер является 1,3-поли(глицерофосфатом), состоящим из 8 глицерофосфатных единиц и имеющим два гликозильных заместителя — N-ацилгалактозаминильный и 3-О-метилгалактозильный в соотношении 3 : 1. Идентификация среди продуктов щелочного гидролиза моно- и дифосфатов глицерина указывала на присутствие в цепи глицериновых единиц со свободными оксигруппами.

Не исключено наличие в клеточной стенке гетерогенных цепей, имеющих неодинаковое количество гликозильных заместителей.

Однако оставались невыясненными конфигурация гликозидных центров заместителей и положение 3-О-метилгалактозильного остатка.

Кислотный гидролиз тейхоевой кислоты *B* привел к образованию изомерных моно- и дифосфатов глицерина, глицерина и P_1 , а при щелочном его гидролизе в добавление к указанным соединениям обнаружен диглицеринтрифосфат, идентифицированный БХ в системе А и электрофоретически. Присутствие этого эфира в продуктах щелочной дегградации полимера, а также отсутствие моносахаридов в кислотном гидролизате свидетельствуют о том, что тейхоевая кислота *B* представляет собой незамещенный поли(глицерофосфат) 1,3-типа [7].

Как мы указывали выше, тейхоевая кислота *B* не была обнаружена в клеточной стенке и, вероятно, является поли(глицерофосфатной) цепью липотейхоевой кислоты, возможно, присутствующей в этом актиномицете. Дальнейшего исследования этого полимера мы не проводили.

Итак, результаты структурного анализа тейхоевых кислот *A* и *B* показали, что оба полимера имеют поли(глицерофосфатные) цепи 1,3-типа, причем тейхоевая кислота *B* не имеет заместителей. Это обстоятельство позволило нам использовать смесь тейхоевых кислот, очищенных на DEAE-целлюлозе, для ^{13}C -ЯМР-анализа полимера *A*, так как присутствие в препарате тейхоевой кислоты *B* не мешало интерпретации спектральных данных.

В спектре ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты в области 50—110 м.д. зафиксирован ряд сигналов, существенно различающихся по интегральной интенсивности и ширине линий (рис. 1). Наиболее интенсивные сигналы представлены двумя уширенными пиками с химическими сдвигами 67,5 и 70,8 м.д. и соотношением интегральных интенсивностей 2 : 1 соответственно. В спектре ^{13}C -ЯМР, снятом в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия углеродов с протонами (GD-спектр), первый сигнал имеет триплетное расщепление (CH_2 -группы), второй — дублетное (CH -группы). По положению в спектре, характеру расщепления и по характерному уширению за счет спин-спинового взаимодействия атомов углерода и фосфора эти два сигнала (67,5 и 70,8 м.д.), несомненно, относятся к углеродам метиленовых и метиновых групп в незамещенной 1,3-поли(глицерофосфатной) цепи [8].

В спектре имеются еще три уширенных сигнала значительно меньшей интенсивности с химическими сдвигами 76,9 м.д. (дублет в GD-спектре), 66,4 и 65,7 м.д. (триплеты в GD-спектре). Такие сигналы характерны для 1,3-поли(глицерофосфатной) цепи, замещенной по положениям С2 глицерина углеводными остатками [4]. α -Эффект гликозилирования обуславливает слабополюсный сдвиг сигнала С2 остатка глицерина, β -эффект — сильнополюсный сдвиг сигналов С1 и С3. Асимметрическое замещение НО-группы у С2 глицерина вызывает магнитную неэквивалентность атомов С1 и С3 у гликозилированных остатков глицерина. Спектр гликозилирующего сахарного остатка представлен в указанной выше области спектра шестью узкими сигналами, два из которых лежат в характеристических областях спектра: 98,4 м.д. (область резонанса аномерных атомов углерода пираноз) и 50,9 м.д. (область резонанса атомов углерода, связанных с азотом). В GD-спектре сигнал при 98,4 м.д. имеет дублетное расщепление с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{\text{C}_1-\text{H}_1}$ 171 Гц, что доказывает α -конфигурацию гликозидного центра пиранозы [9]. Наличие в сильно- и слабополюсной области спектра двух характерных сигналов при 23,4 и 177 м.д. (наряду с упомянутым выше сигналом при 50,9 м.д.) свидетельствует о том, что сахарный остаток представляет собой α -ацетамидопиранозу [10]. Сравнение данных спектра рассматриваемой пиранозы со спектром метил- α -D-2-ацетамидо-2-дезоксигалактопиранозиды [11] окончательно подтверждает приведенный выше моносахаридный состав.

Серия наименее интенсивных сигналов представлена в области 50—110 м.д. 13 сигналами примерно равной интенсивности. Один из них (105,7 м.д.) находится в области резонанса аномерных атомов углерода и в GD-спектре имеет КССВ $^1J_{\text{C}_1-\text{H}_1}$ 161 Гц. По величине КССВ этот сигнал

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты клеточной стенки *A. carniflata* и модельных соединений

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	3OMe	CH ₂ CO
Фрагменты молекулы								
$\left(\text{1Gro3P} \right)_m$	67,5	70,8	67,5					
$\left(\text{1Gro3P} \right)_n$	66,4	76,9	65,7					
$\begin{array}{c} \left(\text{1Gro3P} \right)_n \\ \\ \text{D-GalNAc}\alpha\text{P}\alpha\text{1} \end{array}$	98,4 *	50,9	68,9	69,8	72,3	62,4		23,7 177,0
$\left(\text{1Gro3P} \right)_i$	66,4	76,9	65,7					
$\begin{array}{c} \left(\text{1Gro3P} \right)_i \\ \\ \text{D-GalNAc}\beta\text{P}\alpha\text{1} \\ \\ \text{D-3MeGal}\beta\text{P}\beta\text{1} \end{array}$	98,2 * (98,3)	49,7 (49,9)	78,4 (79,1)	69,9 (69,6)	71,9 (72,0)	62,2 (62,4) ***		23,4 177,0
$\text{D-3MeGal}\beta\text{P}\beta\text{1}$	105,7 **	71,9	82,9	65,5	76,0	62,2	57,4	
Модельные соединения								
GalNAc α Me	99,4	51,1	69,1	69,8	71,6	62,4		
3MeGal β Me	105,1	71,0	83,3	65,5	76,2	62,3	57,4	

* КССВ $^{13}\text{C}_1\text{—H}_1$ 171 Гц. ** КССВ $^{13}\text{C}_1\text{—H}_1$ 161 Гц. *** В скобках приведен спектр замещенного остатка, рассчитанный исходя из спектра незамещенного, с учетом эффектов гликозилирования по HO-группе при C3 α -D-галактопиранозы β -D-галактопиранозой (эффекты получены из анализа данных работы [17]).

может принадлежать только пиранозе с экваториальным алкоксизаместителем при C1 [9], а по значению химического сдвига — только пиранозе с конфигурацией β -галактозы или β -глюкозы [12]. Второй характеристический сигнал этой серии находится при 57,4 м.д., он имеет квартетное расщепление в GD-спектре, т. е. принадлежит CH_3O -группе. Хотя сигналы этой группы в пиранозах занимают довольно узкую область спектра ^{13}C -ЯМР (57—63 м.д.) [13—15], их положение внутри указанной области зависит от взаимной ориентации замещенной и соседних HO-групп. Химический сдвиг ~ 57 м.д. указывает на экваториальное расположение CH_3O -группы, а одна из соседних гидроксигрупп является аксиальной в пиранозном цикле. Из двух рассматриваемых пираноз (β -глюко- и β -галактопираноза) только в последней возможна описанная ситуация, если O-метильная группа находится при C3. Таким образом, вторая пираноза является 3-O-метил- β -галактопиранозой. Привлечение спектра модельного соединения — метил-3-O-метил- β -D-галактопиранозида [16] позволяет найти все семь сигналов рассматриваемого остатка в спектре тейхоевой кислоты (табл. 2).

Тип связи остатка 3-O-метил- β -галактопиранозы становится очевидным при рассмотрении подспектра, образуемого шестью оставшимися сигналами малой интенсивности. Один из них находится в характеристической области резонанса атомов углерода, связанных с азотом (49,7 м.д.) и, очевидно, принадлежит остатку 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозы. Его смещение в сильное поле по сравнению с сигналом 50,9 м.д. как раз отвечает β -эффекту замещения по HO-группе при C3 галактопиранозы другой пиранозой с β -конфигурацией гликозидного центра и той же самой абсолютной конфигурацией, что и гликозилирующая пираноза [12]. Таким образом, часть остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -галактопиранозы замещена в тейхоевой кислоте остатками 3-O-метил- β -галактопиранозы и оставшиеся шесть сигналов относятся за счет резонанса этого замещенного остатка. Отнесение рассматриваемых сигналов (см. табл. 2)

полностью подтверждает тип замещения. Анализ интегральных интенсивностей сигналов в различных рассмотренных сериях позволяет оценить соотношение q , n и m как 1 : 2 : 9.

Таким образом, тейхоевая кислота A клеточной стенки *A. carminata* является 1,3-поли(глицерофосфатом), состоящим из 8 глицерофосфатных звеньев. Две глицерофосфатные единицы замещены по С2-ОН 2-ацетамидо-2-дезоксид- α - D -галактопиранозильным остатком, а одна — 3-О-метил- β - D -галактопиранозил-(1 \rightarrow 3)-2-ацетамидо-2-дезоксид- α - D -галактопиранозильным остатком. Пять глицерофосфатных единиц имеют свободные оксигруппы. Тейхоевая кислота установленной структуры обнаружена впервые в клеточных стенках грамположительных бактерий (рис. 2). Кроме того, клетки исследуемого актиномицета содержат свободный 1,3-поли(глицерофосфат) (полимер B), вероятно, являющийся продуктом деградации липотейхоевой кислоты.

Экспериментальная часть

Исследуемую культуру *A. carminata* ИНА 4281 [18] предварительно выращивали на овсяном скошенном агаре при 28° С и сохраняли при 20° С. Агаровые блоки с выросшей культурой вносили в колбы Эрленмейера объемом 500 мл, содержащие 150 мл среды Гаузе № 2. Колбы инкубировали на качалке (200 об/мин) при 28° С. Двухсуточную культуру использовали в качестве посевного материала для инокуляции аналогичных колб со средой того же состава. Культуру выращивали в тех же условиях в течение 1,5—2,5 сут. Чистоту культуры контролировали микроскопированием и высевом на агаризованные среды Гаузе № 1 и 2 [19]. Мицелий отделяли от среды центрифугированием при 3000 об/мин (15 мин), промывали 0,95% NaCl и делили на две части. Одну часть промывали спиртом, ацетоном и эфиром и использовали для выделения тейхоевой кислоты. Из второй части мицелия получали клеточные стенки путем разрушения его в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 (СССР) при 22 кГц 2—3 раза по 2 мин при 4° С. Все последующие операции проводили по методу, описанному в работе [4]. P_i , $P_{o'ш}$, $P_{нк}$, $P_{лаб}$ определяли как описано в работе [4]; глицерин — по методу Ханахана [20], галактозамин — по Гладышеву [21], сахара — с антроном.

БХ и электрофорез проводили на бумаге «Filtrak FN-13» (ГДР), промытой для препаративных целей 2 н. уксусной кислотой и дистиллированной водой. Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: пропиловый спирт — NH_4OH (ρ 0,88) — вода, 6 : 3 : 1 (А) для разделения фосфорных эфиров и их изомеров; пиридин — бензол — бутиловый спирт — вода, 3 : 1 : 5 : 3 (Б) для разделения гликозидов, глицерина, моносахаридов и галактозамина; пиридин — этилацетат — вода — уксусная кислота, 5 : 5 : 3 : 1 (В) для разделения аминсахаров.

Электрофорез фосфорных эфиров и тейхоевых кислот, а также галактозамина и гликозида (Г1) выполняли в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,5—5,6; 4 ч, 20 В/см) [4]. Тейхоевую кислоту и фосфорные эфиры обнаруживали реактивом Ишервуда; галактозамин и гликозид (Г1) — нингидрином; гликозиды и моносахариды — 5% $AgNO_3$ в NH_4OH ; моносахариды — анилинфталатом.

В работе использована щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1, Sigma, США). ^{13}C -ЯМР-спектры раствора тейхоевой кислоты в D_2O снимали при 40° С на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 75 МГц. Химические сдвиги измерены относительно CH_3OH (внутренний стандарт, 50,15 м.д. от Me_4Si) и пересчитаны относительно Me_4Si .

Выделение тейхоевой кислоты. К клеточной стенке или высушенному мицелию добавляли трихлоруксусную кислоту (20 : 1 объем/вес) и оставляли при постоянном перемешивании на 24 ч. Остатки стенок или мицелия удаляли, а к каждому супернатанту добавляли четыре объема 96% этанола и оставляли на холоде на 24 ч. Выпавшие осадки собирали центрифугированием, растворяли в холодной воде, диализовали против дис-

тиллированной воды и лиофильно высушивали. Получили: из 550 мг клеточной стенки 15 мг препарата I, из 50 г мицелия — 380 мг препарата IIa. К остаткам мицелия снова добавляли раствор трихлоруксусной кислоты, операцию повторяли как описан выше. Получили 60 мг препарата IIб. После анализа препараты IIa и IIб объединили.

Очистка тейхоевой кислоты. Раствор 100 мг тейхоевой кислоты (препарат II) в 1 мл 0,01 М трис-НСI-буфера (рН 7,1) помещали на DEAE-целлюлозу (Cl⁻-форма, колонка 16 × 570 мм). Колонку промывали буфером того же состава (300 мл) и материал хроматографировали в том же буфере в линейном градиенте NaCl (0 → 0,5 М, общий объем 700 мл) со скоростью 15 мл/ч, отбирая по 4 мл элюата. В аликвотах фракций определяли фосфор по методу [22] и сахар. Получили 56 мг очищенной тейхоевой кислоты, порцию которой (20 мг) разделили с помощью электрофореза на полимеры А (13 мг) и Б (4 мг).

Кислотный и щелочной гидролиз тейхоевой кислоты, а также определение длины цепи полимера ферментативным методом проводили как описано в работе [4].

Исследование продуктов щелочного гидролиза тейхоевой кислоты. Моно- и дифосфаты глицерина, а также диглицеринтрифосфат идентифицировали с помощью электрофореза и БХ в системе А сравнением со стандартными образцами.

Изучение гликозидов. Гликозид (GI) получили из щелочного гидролизата тейхоевой кислоты (препарат II) разделением его соединений электрофоретически ($E_{G_{10}} + 5,7$), а гликозид (GII) — разделением того же гидролизата БХ в системе Б ($R_{G_{10}} 0,82$). Гликозиды элюировали с бумаги водой и элюат упаривали досуха; ~ 0,5 мг гликозида гидролизовали (6 н. HCl, 6 ч, 100° С в запаянном капилляре). Образовавшиеся продукты исследовали БХ в системе Б и В. Для определения мольных соотношений соединений, входящих в гликозиды, их гидролизовали в тех же условиях, гидролизат упаривали, остаток растворяли в 2 мл воды и в аликвотах определяли мольное соотношение компонентов.

Изучение фосфодизфиров. Фосфорные эфиры, образовавшиеся при щелочной деградации тейхоевой кислоты, после разделения электрофоретически и затем БХ в системе А элюировали водой. Сухой остаток эфира гидролизовали (2 н. HCl, 3 ч, 100° С), гидролизат упаривали и образовавшиеся продукты исследовали с помощью БХ в системах А, Б, В и электрофоретически. Для энзиматического дефосфорилирования к сухому остатку эфира (ЭI) добавляли щелочную фосфатазу в аммоний-ацетатном буфере (рН 10,4) и выдерживали в термостате 2 ч при 37° С. В гидролизате определяли $P_{общ}$ и P_i . Для определения мольных соотношений компонентов сухой остаток эфира (ЭI) гидролизовали (6 н. HCl, 6 ч, 100° С), кислоту упаривали, нейтрализованный гидролизат обрабатывали щелочной фосфатазой, как описано выше, и в аликвотах гидролизата определяли P_i , глицерин и галактозамин.

ЛИТЕРАТУРА

1. The Biology of Actinomycetes/Eds Goodfellow M., Mordarski M., Williams S. T. London: Acad. Press, 1984.
2. Потемкина Н. В., Терехова Л. П., Преображенская Т. П., Наумова И. Б. Микробиология, 1985, т. 54, № 4, с. 545—548.
3. Противоопухолевый антибиотик карминомицин и его применение в клинике. Сб. научных трудов/Ред. Гаузе Г. Ф. М.: Онкологический научный центр АМН СССР, 1980.
4. Наумова И. Б., Шашков А. С., Скоблилова Н. К., Агре Н. С., Романов В. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 848—856.
5. Stoffyn P. J., Jeanloz R. W. Arch. Biochem. and Biophys., 1954, v. 52, № 2, p. 373—379.
6. Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Стрешинская Г. М., Панина Л. И. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 815—821.
7. Скоблилова Н. К., Агре Н. С., Шашков А. С., Наумова И. Б. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 857—862.
8. De Boer W. R., Wouters J. T. M., Anderson A. J., Archibald A. R. Eur. J. Biochem., 1978, v. 85, № 2, p. 433—436.

9. Bock K., Lundt I., Pedersen C. *Tetrahedron Lett.*, 1973, № 13, p. 1037—1040.
10. Шашков А. С., Чижов О. С. *Биоорганическая химия*, 1976, т. 2, № 4, с. 437—497.
11. Дерезицкая В. А., Шашков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. И. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 3, с. 410—421.
12. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. *Carbohydr. Res.*, 1984, v. 133, № 2, p. 173—185.
13. Abbas S. A., Haines A. H., Wells A. G. J. *Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1976, p. 1351—1357.
14. Шашков А. С., Гришковец В. И., Чирва В. Я. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 10, с. 1393—1399.
15. Шашков А. С., Гришковец В. И., Земляков А. Е., Чирва В. Я. *Биоорганическая химия*, 1984, т. 10, № 1, с. 88—92.
16. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. *Биоорганическая химия*, 1978, т. 4, № 1, с. 74—81.
17. Messer M., Trifonoff E., Stern W., Collins J. G., Bradbury J. H. *Carbohydr. Res.*, 1980, v. 83, № 2, p. 327—334.
18. Гаузе Г. Ф., Свешников М. А., Ухолова Р. С., Гаверилина Г. Е., Филичева В. А., Гладких Е. Г. *Антибиотики*, 1973, № 8, с. 675—678.
19. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешников М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. *Определитель актиномицетов. Роды Streptomyces, Streptovorticillium, Chaetia*. М.: Наука, 1983.
20. Napanan D. J., Olley J. N. *J. Biol. Chem.*, 1958, v. 231, № 2, p. 813—828.
21. Гладышев Б. Н. *Биохимия*, 1959, т. 24, № 2, с. 789—793.
22. Hess H. H., Derr J. E. *Anal. Biochem.*, 1975, v. 63, p. 607—613.

Поступила в редакцию
6.VIII.1985

CELL WALL TEICHOIC ACID OF *ACTINOMADURA CARMINATA* PRODUCING ANTIBIOTIC CARMINOMYCIN

NAUMOVA I. B., DIGUIMBAYE K., POTEKHINA N. V.,
SHASHKOV A. S.*, TEREKHOVA L. P.**, PREOBRAZHENSKAJA T. P.**

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; *N. D. Zelinsky
Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; **Institute of New Antibiotics, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow*

The cell walls of *Actinomadura carminata*, producing the antibiotic carminomycin, contain a poly(glycerol phosphate) teichoic acid. The polymer belongs to 1,3-type and consists of about 8 glycerol phosphate units. Two of them have 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl substituent and one — 3-O-methyl- β -D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl residue at C2 of glycerol. The structure of the polymer was established by chemical analysis and ^{13}C -NMR spectroscopy. The teichoic acid accounted for about 10% of the cell wall dry weight. 3-O-methylgalactose in the structure of the teichoic acid was found for the first time.