



УДК 577.114.5+579.234

ПОЛИ (ГАЛАКТОЗИЛГЛИЦЕРОФОСФАТ) С МАННОЗИЛЬНЫМИ
БОКОВЫМИ ЕДИНИЦАМИ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
ACTINOPLANES PHILIPPINENSIS ВКМ Ас-647

Янушкевич Н. А., Шашков А. С.*, Наумова И. Б.,
Стрешинская Г. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет;

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

В клеточную стенку *Actinoplanes philippinensis* ВКМ Ас-647 входят несколько углеводсодержащих анионных полимеров. Основной полимер стенки имеет поли(гликозилглицерофосфатную) природу. Он состоит из углеводных звеньев — α -D-маннопиранозил-(1→4)- β -D-галактопиранозил-(1→1)-глицериновых фрагментов, соединенных фосфоэфирными связями через гидроксильные группы при С3 глицерина и С6 галактозы. Встречаются цепи и без маннозильных заместителей. Структура тейхоевой кислоты установлена химическими методами и с помощью ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Тейхоевая кислота с маннозильными остатками в клеточной стенке бактерий найдена впервые. Фосфорилированный маннан содержит в своем составе кроме маннозы 2-О-метилманнозу. Основная цепь полимера имеет α -1,2-, α -1,3- и α -1,6-типы замещения, что установлено ^{13}C -ЯМР-спектроскопией.

Тейхоевые кислоты клеточных стенок актиномицетов характеризуются большим структурным разнообразием, которое заключается в типе фосфоэфирной связи между мономерными единицами, в количестве и качестве гликозильных и ацильных заместителей [1]. От структурных особенностей этих полимеров зависит их способность регулировать те или иные биохимические процессы в бактериальной клетке [2].

Виды семейства *Actinoplanaceae* отличаются от других актиномицетов рядом морфологических особенностей, они интересны и своей способностью к продуцированию различных физиологически активных соединений [3]. В связи с этим было целесообразно изучить полимеры клеточных стенок актиноплаз, так как отмечена связь между особенностями структуры анионсодержащих полимеров стенки и морфологическими особенностями клетки [4]. Знания о строении поверхностных районов клетки важны также для понимания их функций в биосинтетической активности бактерий.

Ранее строение кислых углеводсодержащих полимеров клеточных стенок этого таксона не исследовалось, но было установлено, что типичный представитель семейства — *A. philippinensis* содержит тейхоевую кислоту с необычной структурой [5]. Целью настоящей работы было детальное исследование этой структуры.

Тейхоевая кислота была выделена из клеточной стенки с помощью 10% трихлоруксусной кислоты, осаждена этанолом, перерастворена в воде, диализована и очищена ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl 650 M в градиенте концентрации NaCl. Получены две фракции, содержащие фосфор и сахар. Фракция 1, элюированная с колонки 0,13 M NaCl, при кислотном гидролизе образовала глицерофосфат, галактозу, маннозу и неидентифицируемую гексозу (*x*-гексозу), которая по хроматографическим характеристикам была близка к рамнозе, а фракция 2, элюированная с колонки 0,18 M NaCl, — маннозу, неорганический фосфат и *x*-гексозу. Эти данные могли свидетельствовать о том, что фракция 1 содержит тейхоевую кислоту, а фракция 2 — фосфорилированный полисахарид.

Предварительный анализ продуктов щелочного гидролиза фракции 1 показывал, что *x*-гексоза не входит в структуру тейхоевой кислоты, так как образовавшийся фосфорный эфир не содержал этого моносахарида. Обе фракции далее были подвергнуты высокоэффективной жидкостной хроматографии. В результате из фракции 1 был получен препарат, обогащенный тейхоевой кислотой, но содержащий небольшое количество полисахарида в качестве примеси, и из фракции 2 — препарат полисахарида, свободный от тейхоевой кислоты. Анализ продуктов кислотного гидролиза дополнительно очищенного препарата тейхоевой кислоты с помощью электрофореза в пиридин-ацетатном буфере подтвердил, что *x*-гексоза не входит в структуру тейхоевой кислоты.

Тейхоевая кислота. Известно, что основной задачей при установлении структуры тейхоевой кислоты химическими методами является изучение строения фосфорных эфиров, образующихся при щелочной и кислотной деградации полимера [4]. Присутствие в препарате небольших количеств полисахарида не мешало этим исследованиям, фосфорные эфиры были очищены электрофоретически и БХ.

То, что полимер при кислотном гидролизе образовал только монофосфаты глицерина (а не и его дифосфаты), могло указывать на поли(гликозилглицерофосфатную) природу тейхоевой кислоты. Такие полимеры при щелочном гидролизе должны давать фосфомоноэфиры гликозилглицерина [6].

При щелочной деградации тейхоевой кислоты образовался один эфир, который имел подвижность при электрофорезе $E_{G_{Co} P}$ 0,37 и при хроматографировании в системе Б (см. «Экспер. часть») давал два изомера ($R_{G_{Co} P_2}$ 0,26 и 0,35), при их кислотном гидролизе идентифицированы одинаковые продукты — глицерофосфат, галактоза и манноза в эквимольных количествах, а при ферментативном гидролизе щелочной фосфатазой — гликозид (I).

Гликозид (I) при хроматографическом разделении в системе А имел $R_{G_{Co}}$ 0,17, окрашивался $AgNO_3$ и не давал окраски с анилинфталатом. При кислотном гидролизе образовал галактозу, маннозу и глицерин в эквимольных количествах. После периодатного окисления гликозида [6] вычислено молярное соотношение формальдегид — сахар, равное 1 : 2. α -Маннозидаза отщепляла от гликозида маннозу с образованием галактозилглицерина (гликозида (II), $R_{G_{Co}}$ 0,45 в системе А). Полученные результаты указывали на то, что манноза и галактоза образуют дисахарид в гликозиде и что в образовании гликозидной связи с первичным гидроксилом глицерина принимает участие галактозилный остаток, а манноза занимает крайнее положение и имеет α -D-конфигурацию. Гликозид (I) был получен с помощью препаративной БХ, и изучены его 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры.

В 1H -ЯМР-спектре гликозида (I) в D_2O в области резонанса аномерных протонов имелось два дублета с КССВ 1,6 и 7,7 Гц. Серией экспериментов с селективным гомоядерным двойным резонансом (разностный вариант методики) удалось получить химические сдвиги H_1 — H_4 каж-

Таблица 1

Характеристика спектра 1H -ЯМР гликозида (I)

Протон	Химический сдвиг, м. д.	Расщепление	КССВ, Гц	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Расщепление	КССВ, Гц
Galp				Manp			
H1	4,45	д	$J_{1,2}=7,8$	H1	4,84	д	$J_{1,2}=1,8$
H2	3,55	дд	$J_{2,3}=10,0$	H2	4,03	дд	$J_{2,3}=3,5$
H3	3,73	дд	$J_{3,4}=3,4$	H3	3,88	дд	$J_{3,4}=9,6$
H4	4,05	уд	$J_{4,5}\sim 1,0$	H4	3,71	т	$J_{4,5}=9,6$

Примечание: д — дублет, дд — дублет дублетов, уд — уширенный дублет, т — триплет.

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР гликозида (I) и тейхоевой кислоты клеточной стенки *A. philippinensis* ВКМ Ас-647

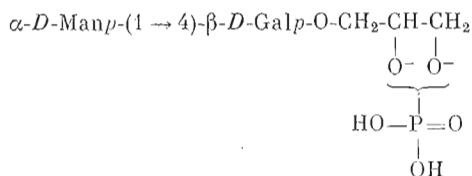
Соединение	C1	C2	C3	C1'	C2'	C3'	C4'
Гликозид (I)	71,85	72,05	63,45	104,2	71,5	73,3	78,55
Тейхоевая кислота	71,3	70,15	67,6	104,15	71,3	73,0	78,55

Соединение	C5''	C6''	C1''	C2''	C3''	C4''	C5''	C6''
Гликозид (I)	76,1	61,8	102,8	71,25	71,5	67,6	74,2	61,5
Тейхоевая кислота	73,8	63,9	102,8	71,3	71,8	68,0	74,1	61,75

дого остатка и определить КССВ $^3J_{\text{H-C}}$, подтверждающие α -манно- и β -галакто-пиранозную конфигурацию сахаров (табл. 1). Предварительное насыщение резонанса Н1 маннозного остатка привело к усилению сигнала Н2 того же остатка (ядерный эффект Оверхаузера 4% в разностной методике) и Н4 остатка галактозы (ЯЭО 5%), что доказывает замещение второго остатка первым по гидроксилу у С4.

В спектре ^{13}C -ЯМР гликозида (I) имеется 15 сигналов, четыре из которых, согласно АРТ*-спектру [7], принадлежат углеродам метиленовых групп, остальные — углеродам метиновых групп (табл. 2). Три сигнала от атомов углерода, несущих по два протона, находятся в области резонанса незамещенных гидроксиметильных групп и один (71,85 м. д.) — в области замещенных.

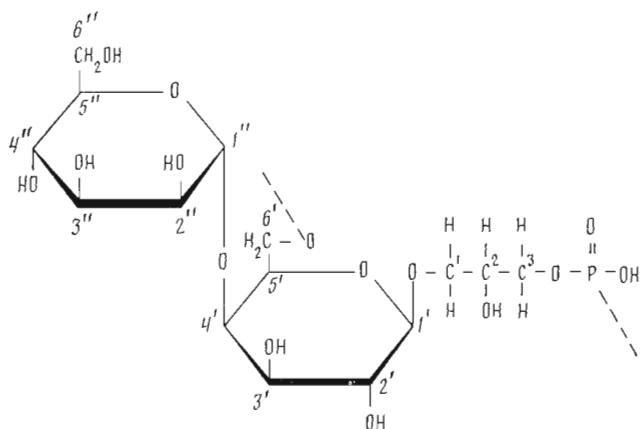
Сопоставляя данные ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров гликозида (I) и учитывая результаты химических исследований его, приходим к выводу, что он является O - α -D-маннопиранозил-(1→4)- β -D-галактопиранозил-(1→1)-глицеринном, а фосфорные эфиры этого гликозида — его изомерными монофосфатами, в которых фосфатная группа локализована при С3 или С2 глицерина:



После того как была установлена структура мономерного звена полимера, оставалось локализовать фосфодиэфирную связь между мономерными звеньями. В ее образовании с равной вероятностью мог принимать участие как галактозильный, так и маннозильный остаток. Вопрос был решен с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР. Был снят спектр ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты с небольшой примесью полисахарида. В спектре сигналы тейхоевой кислоты значительно интенсивнее и могут быть выделены по этому признаку (табл. 2). Область $76 \pm 1,5$ м. д. свободна от сигналов. Таким образом, пик от С5 галактозного остатка в тейхоевой кислоте оказывается смещенным по сравнению с таковым в спектре гликозида (I). Причиной смещения может быть только β -эффект фосфорилирования по С6 остатка галактозы (так как С4 в нем уже замещен). В спектре действительно обнаруживается интенсивный уширенный сигнал с химическим сдвигом 73,8 м. д., смещенный по сравнению с С5 в спектре гликозида (I) на 2,3 м. д. в сильное поле, т. е. на обычную для такого типа замещения величину, отвечающую β -эффекту фосфорилирования [6]. Спектр АРТ выявил сигналы атомов углерода CH_2 -групп, среди которых два интенсив-

* Attached proton test.

ных уширенных сигнала при 67,6 и 63,9 м. д. С3 остатка глицерина и С6 остатка галактозы соответственно, замещенных остатком фосфорной кислоты [6]. Незначительное смещение самого слабого сигнала из сигналов СН₂-групп (71,3 м. д. в тейхоевой кислоте и 71,85 м. д. в гликозиде (I)), отнесенного за счет резонанса С1 глицерина, также свидетельствует о фосфорилировании глицеринового остатка по С3, а не по С2. Таким образом, тейхоевая кислота клеточной стенки *A. philippinensis* является поли(галактозилглицерофосфатом), в котором α-D-маннопиранозил-(1→4)-β-D-галактопиранозил-(1→1)-глицериновые фрагменты соединены фосфодиэфирными связями через гидроксильные группы при С3 глицерина и С6 галактозы. Ранее тейхоевая кислота такой структуры в бактериях не была найдена.

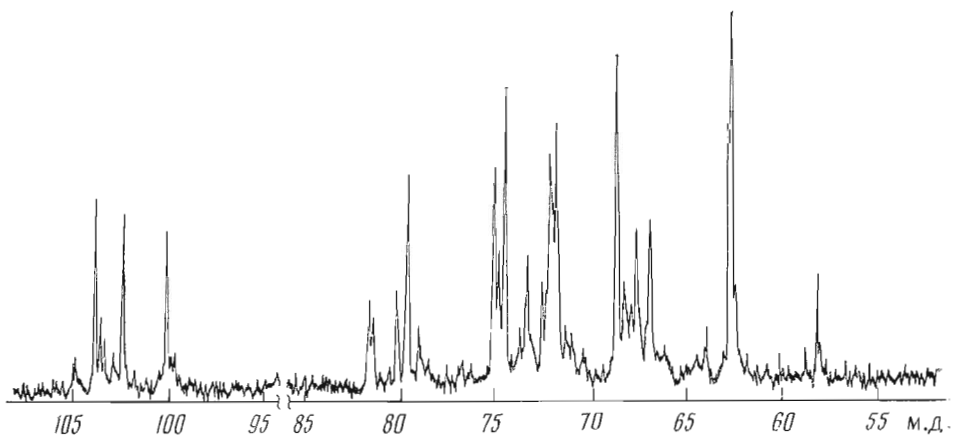


В некоторых препаратах тейхоевых кислот, осажденных из экстрактов более чем двумя объемами этанола, обнаружены цепи тейхоевой кислоты, не содержащие маннозильного остатка и являющиеся незамещенными поли(галактозилглицерофосфатами). Этот полимер был изучен химическими методами по аналогичной схеме. При кислотной деградации он образовал монофосфаты глицерина и галактозу, а при щелочной — изомеры монофосфата галактозилглицерина, которые при дефосфорилировании фосфатазой дали гликозид, идентичный гликозиду (II) — продукту ферментативной деградации гликозида (I) основной тейхоевой кислоты. Содержание этого полимера в клеточной стенке значительно меньше, чем тейхоевой кислоты с маннозильными остатками. Возможно, что эти «недостроенные» цепи тейхоевой кислоты — результат ферментативных ошибок при биосинтезе полимера, но, вероятнее всего, существует целесообразность присутствия в стенке таких недогликозилированных цепей.

Одновременное присутствие в клеточной стенке различающихся по строению цепей тейхоевых кислот было отмечено нами ранее и для других актиномицетов [8—10]. Вероятно, это связано с выполнением ими различных физиологических функций в клетке и в свою очередь различной локализацией в гифах мицелия актиномицета.

Полисахарид. Полисахарид при кислотном гидролизе образовал маннозу, x-гексозу и неорганический фосфат. Общее содержание фосфора в полисахариде было 4,4%. Неидентифицированная хроматографически гексоза была накоплена методом препаративной хроматографии и определена с помощью ¹³C-ЯМР-спектроскопии как 2-O-метилманноза (ср. ее спектр ¹³C-ЯМР в «Экспериментальной части») и данные работы [11]).

¹³C-ЯМР-спектр полисахарида имел сложный вид из-за большого числа сигналов с различной интегральной интенсивностью (рисунок). Такой спектр характерен для нерегулярного полимера и не поддается непосредственной полной интерпретации. Нерегулярность структуры полимера в данном случае, по-видимому, связана с нестехиометрическим метилированием одного из остатков маннозы в положении 2 (в спектре имеется сигнал при 58,0 м. д., соответствующий метильной группе в этом положении).



¹³C-ЯМР-спектр полисахарида клеточной стенки *A. philippinensis* ВКМ Ас-647

нии [12]). Другой причиной нерегулярности может быть нестехиометрическое фосфорилирование.

В аномерной области спектра можно выделить три основных сигнала, что свидетельствует о том, что главная часть полисахарида построена из трисахаридных повторяющихся звеньев, а минорные сигналы спектра возникают за счет метилированных и фосфорилированных звеньев полисахарида. На основании КССВ ¹³C_{с1-п1} аномерных атомов (~170 Гц) все три основных маннозных остатка имеют α-конфигурацию.

АРТ-спектр позволил выделить сигналы СН₂-групп (С6 остатков маннозы), один из которых находился в области резонанса замещенных по гидроксилу атомов (67,5 м. д.). Таким образом, один из остатков маннозы замещен по положению С6. Анализ химических сдвигов трех основных сигналов в аномерной области подтверждает замещение по С6 (сигнал 100,1 м. д.) и показывает замещение по С3 (103,8 м. д.) и С2 (102,3 м. д.). В области резонанса замещенных кольцевых атомов углерода этим типам замещения отвечают сигналы 79,45 м. д. (замещенные С3 маннозы) и набор сигналов при 81,3–81,5 м. д. (замещенные С2 маннозы). Область резонанса замещенных С4 маннозы свободна от сигналов.

Итак, основная цепь полисахарида имеет следующие типы замещения: α-1,2, α-1,3 и α-1,6. Дальнейшие структурные исследования этого полисахарида не проводились из-за небольшого количества материала, имеющегося в нашем распоряжении.

Таким образом, проведенное исследование клеточной стенки *A. philippinensis* выявило присутствие в ней нескольких анионных углеводсодержащих полимеров — поли(галактозилглицерофосфатов) с маннозильными единицами в виде боковых ответвлений и без них, а также фосфорилированного маннана, содержащего, кроме маннозы, 2-О-метилманнозу. Ранее 2-О-метилманноза была найдена в липополисахаридах фотосинтезирующих бактерий [13] и экзополисахаридах [14].

Экспериментальная часть

Исследуемую культуру *Actinoplanes philippinensis* ВКМ Ас-647 предварительно выращивали на пептонно-дрожжевой среде с агаром (ПДС) [15] при 28° С и хранили при 4° С. Агаровые блоки с выросшей культурой вносили в колбы Эрленмейера объемом 500 мл, содержащие 150 мл ПДС, и инкубировали на роторной качалке (200 об/мин) при 28° С. Двухсуточную культуру использовали в качестве посевного материала. Для накопления мицеллярной массы актиномицет выращивали в тех же условиях в течение 1 сут. Чистоту культуры контролировали микроскопированием и высевом на агаризованную ПДС. Мицелий отделяли от среды центрифугированием, промывали 0,95% NaCl.

Формы фосфора, глицерин, формальдегид и сахар определяли как описано ранее [6, 16]. ВХ и электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN13

системе А. Гликозиды элюировали водой. В аликвотах водного раствора определяли количество глицерина и сахара. Раствор упаривали досуха. ~1 мг гликозида гидролизovali 2 н. HCl 3 ч при 100°С в запаянном капилляре. Образовавшиеся продукты исследовали БХ в системе А.

К ~0,5 мг гликозида (I) добавляли 200 мкл 0,1 М CH₃COONa (pH 5,0), 20 мкл 3 мМ ZnCl₂, 10 мкл суспензии α-маннозидазы и выдерживали 40 ч при 37°С. Продукты гидролиза изучали БХ в системе А.

Авторы благодарят Ю. А. Книреля за помощь при обсуждении данных анализа полисахарида и Е. В. Виноградова (ИОХ АН СССР) за совместное выполнение эксперимента по очистке теихоевой кислоты и полисахарида с помощью ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naumova I. B. // Microbiol. Sci. 1988. V. 5. № 9. P. 275–279.
2. Наумова И. Б. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 2. С. 195–207.
3. Palleroni N. J. // Actinomycetes. 1982–1983. V. 17. № 4. P. 46–65.
4. Naumova I. B., Agre N. S., Skoblilova N. K., Shashkov A. S. // Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes/Ed. Ortiz-Ortiz L. N. Y.: Acad. Press, 1984. P. 229–238.
5. Егущенко Л. П., Янушкене Н. А., Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Агре Н. С. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 1. С. 237–239.
6. Наумова И. Б., Шашков А. С., Строганова М. П. // Биооргани. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1529–1537.
7. Patt S. L., Shooley I. N. // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. № 3. P. 535–538.
8. Наумова И. Б., Садиков Б. М., Стрешинская Г. М., Полин А. П. // Антибиот. и мед. биотехн. 1987. Т. 32. № 2. С. 107–111.
9. Тульская Е. М., Вылегжанина Е. С., Стрешинская Г. М., Шашков А. С., Наумова И. Б. // Биохимия. 1989. Т. 54. № 4. С. 531–536.
10. Стрешинская Г. М., Наумова И. Б. VI Съезд Всесоюз. микробиол. о-ва. Т. 1. Прогресс в познании микробного мира. Рига, 1980. С. 69.
11. Corin P. A. J., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 5. P. 1212–1223.
12. Наумова И. Б., Дигимбай К., Потехина П. В., Шашков А. С., Терехова Л. П., Преображенская Т. П. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 670–678.
13. Kenne L., Lindberg B. // The polysaccharides/Ed Aspinall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 287.
14. Kanamaru K., Iwamuro Y., Mikami Y., Obi Y., Kasaki T. // Agric. Biol. Chem. 1982. V. 46. № 10. P. 2419–2424.
15. Naumova I. B., Kuznetsov V. D., Kudrina K. S., Bezzubenkova A. P. // Arch. Microbiol. 1980. V. 126. № 1. P. 71–75.
16. Наумова И. Б., Шашков А. С., Скоблilова Н. К., Агре Н. С., Романов В. В. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 848–856.
17. Hess H. H., Derr J. E. // Anal. Biochem. 1975. V. 63. № 2. P. 607–613.

Поступила в редакцию
10.IV.1989

POLY (GALACTOSYLGLYCEROL PHOSPHATE) TEICHOIC ACID WITH MANNOSYL SIDE RESIDUES FROM THE CELL WALL OF *ACTINOPLANES PHILIPPINENSIS* VKM Ac-647

YANUSCHKENE N. A., SHASHKOV A. S.*, NAUMOVA I. B., STRESHINSKAYA G. M.

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

The *Actinoplanes philippinensis* cell wall has several anionic carbohydrate-containing polymers. The major polymer is of poly(glycosylglycerol phosphate) type, its monomeric unit being O-α-D-mannopyranosyl-(1→4)-β-D-galactopyranosyl-(1→1)-glycerol monophosphate. The phosphodiester linkages connect the C3 of glycerol units and the C6 of galactosyl ones, and the mannosyl residues form side branches of the teichoic acid's main chain.

Chains without mannosyl residues were found in addition to the major teichoic acid.

The structure of the polymers was established by chemical analysis, and ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. It is for the first time that a teichoic acid with mannosyl residues was found in bacterial cell walls. The phosphorylated mannan contains, in addition to mannose, 2-O-methylmannose. The main chain has α-1,2, α-1,3 and α-1,6 types of substitution, which was established by ¹³C NMR spectroscopy.