



УДК 577.852.1 + 577.11

## О КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ *ACTINOMYCES RIMOSUS* ЛСТ-118

Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Стрешинская Г. М.,  
Панина Л. И.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Исследована структура тейхоевой кислоты клеточной стенки *Act. rimosus* ЛСТ-118 — продуцента антибиотика окситетрациклина. Показано, что главная цепь построена из 10 глицериновых структурных единиц, связанных фосфодиэфирными связями по типу 1,3. К полимеру сложноэфирной связью присоединены три О-ацетильные группы. Установлено, что на каждые 20 остатков муравовых кислот гликопептида приходится одна цепь тейхоевой кислоты. В клеточной стенке обнаружены О-ацетильные группы (2,3% от сухого веса), которые являются компонентами как тейхоевой кислоты, так и других полимеров стенки. Количество аминокислот в стенке вычислено на основании содержания N-ацетильных групп.

Структура клеточных стенок актиномицетов мало исследована. Полагают, что в ее состав входит гликопептид и полисахариды, среди которых обнаружены тейхоевые кислоты [1] и фосфорилированный маннан [2].

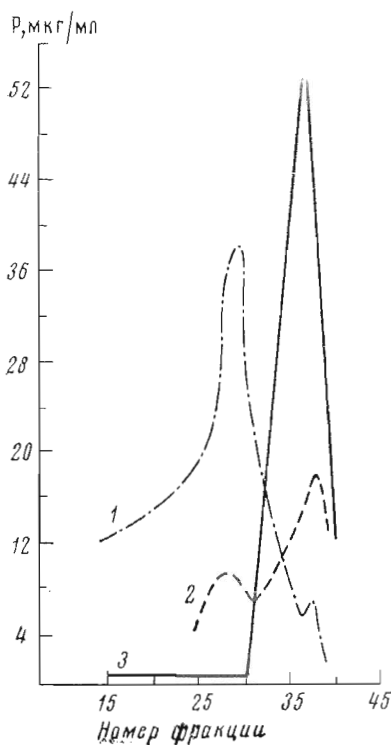
Ранее сообщалось, что клеточная стенка *Act. rimosus* содержит глицеринтейхоевую кислоту [3]. В настоящей работе описано выделение этого полимера и приводятся результаты изучения его структуры. Кроме того, определено молярное соотношение аминокислот, входящих в состав полимеров клеточной стенки.

Установление структуры тейхоевой кислоты проводили на препарате, выделенном из всей мицелиальной массы *Act. rimosus*. Для получения препарата тейхоевой кислоты, не содержащего нуклеиновых кислот, полифосфатов и полисахаридов другой природы, была предпринята дополнительная очистка препарата. Многократная экстракция дистиллированной водой препарата помогла освободить тейхоевую кислоту от половины нуклеиновых кислот и небольшой части полифосфатов (табл. 1). Частично очищенный таким способом полимер хроматографировали на колонке с сефадексом G-75. Как видно на рисунке, с помощью этого метода получили тейхоевую кислоту, не содержащую нуклеиновых кислот и значи-

Таблица 1

Содержание фосфора (мг) в 1 г препарата тейхоевой кислоты и в водном растворе, полученном из него многократной экстракцией

Формы фосфора	В препарате, мг	В водном растворе, мг	Формы фосфора	В препарате, мг	В водном растворе, мг
Общий	47,50	32,50	Полифосфаты	5,63	5,00
Нуклеиновых кислот	25,63	12,50	Тейхоевой кислоты	16,25	15,00



Фракционирование тейхоевой кислоты, полинуклеотидов и полифосфатов на колонке (50 × 1,2 см) с сефадексом G-75. 1 — тейхоевые кислоты, 2 — полифосфаты, 3 — полинуклеотиды. Элюент — вода, объем фракции — 2,5 мл, скорость элюции 0,4 мл/мин. Анализ фракций по формам фосфора (см. «Экспериментальную часть»)

рица, имеющих в своем составе сахарные компоненты [6]. Гидролиз же полимера со структурой типа 1,3 без гликозильных заместителей протекает с образованием только одного фосфодиэфира глицерина: гидролиз в обоих направлениях вдоль цепи полимера при расщеплении в точках А и В приводит к образованию диглицеринтрифосфата (I) в дополнение к изомерам глицерофосфата (II) и глицеродифосфата (III) (см. схему 1).

При изучении продуктов щелочного гидролиза тейхоевой кислоты были идентифицированы глицерин, изомеры глицерофосфата и глицеродифосфата (II и III), а также диглицеринтрифосфат (I) (табл. 2), для установления строения которого использовали сочетание ферментативного и кислотного гидролизом (схема 2). Таким образом, обнаружение диглицеринтрифосфата в продуктах щелочного гидролиза тейхоевой кислоты убедительно свидетельствовало в пользу структуры типа 1,3. Длина цепи полимера определялась по соотношению общего фосфора полимера и конечного моноэфирного фосфора. Показано, что цепь состоит из 10 глицерофосфатных единиц.

При предварительном изучении полимера в его составе была выявлена галактоза [7]. Однако тщательное исследование образующихся при щелочном гидролизе продуктов не привело к идентификации фосфорного эфира, содержащего этот моносахарид. Галактоза обнаружена нами в составе других полисахаридных фракций стенки.

Ранее было показано, что тейхоевая кислота *Act. rimosus* содержит

тельной части полифосфатов (фракции 25—32). Объединенные и лиофильно высушенные фракции 25—32 подвергали очистке от полисахаридов и остатков полифосфатов с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге.

В очищенном препарате тейхоевой кислоты определяли количественное соотношение компонентов. Показано, что молярное отношение глицерина и фосфора равно 1:1, что с учетом наличия в продуктах кислотного и щелочного гидролизом полимеров изомеров глицерофосфата и дифосфата глицерина свидетельствовало о том, что полимер является истинной тейхоевой кислотой, где главная цепь построена из глицериновых структурных единиц, связанных фосфодиэфирными связями. Предстояло решить, за счет каких гидроксильных групп глицерина происходит их объединение фосфодиэфирными связями в цепь. Для выяснения этого вопроса были исследованы фосфорные эфиры, образующиеся при щелочном гидролизе полимера. Щелочной гидролиз глицеринтейхоевых кислот с 1,2- и 1,3-связями протекает по-разному [4]. Гидролиз полимера со структурой типа 1,2 происходит ступенчато с образованием моноэфиров глицерина [5]. При гидролизе тейхоевой кислоты со структурой типа 1,3 образуются диэфиры глицерина. Если полимер имеет гликозильные заместители, то при щелочном гидролизе образуется несколько фосфорных диэфиров глицерина.

Гидролиз же сахарных компонентов [6]. Гидролиз же полимера со структурой типа 1,3 без гликозильных заместителей протекает с образованием только одного фосфодиэфира глицерина: гидролиз в обоих направлениях вдоль цепи полимера при расщеплении в точках А и В приводит к образованию диглицеринтрифосфата (I) в дополнение к изомерам глицерофосфата (II) и глицеродифосфата (III) (см. схему 1).

При изучении продуктов щелочного гидролиза тейхоевой кислоты были идентифицированы глицерин, изомеры глицерофосфата и глицеродифосфата (II и III), а также диглицеринтрифосфат (I) (табл. 2), для установления строения которого использовали сочетание ферментативного и кислотного гидролизом (схема 2). Таким образом, обнаружение диглицеринтрифосфата в продуктах щелочного гидролиза тейхоевой кислоты убедительно свидетельствовало в пользу структуры типа 1,3. Длина цепи полимера определялась по соотношению общего фосфора полимера и конечного моноэфирного фосфора. Показано, что цепь состоит из 10 глицерофосфатных единиц.

При предварительном изучении полимера в его составе была выявлена галактоза [7]. Однако тщательное исследование образующихся при щелочном гидролизе продуктов не привело к идентификации фосфорного эфира, содержащего этот моносахарид. Галактоза обнаружена нами в составе других полисахаридных фракций стенки.

Ранее было показано, что тейхоевая кислота *Act. rimosus* содержит

Результаты анализа фосфорных эфиров, образовавшихся при щелочном гидролизе тейхоевой кислоты\*

Фосфорные эфиры	$E_{G_{ro}}$ , см	$R_{\beta G_{ro} P}$	Фосфор, минерализуемый ФМЭ, % от $P_{общ}$	Продукты кислотного гидролиза	Продукты ферментативного гидролиза	$G_{ro}/P$ , моль/моль
Глицерофосфат $\alpha$	9,5	0,90	100	—	$G_{ro}, P_i$	1,04 : 1
Глицерофосфат $\beta$	9,5	1,00	100	—	»	1,01 : 1
Дифосфаты глицерина $\alpha$ }	15,0	0,30	100	—	»	1,0 : 1,95
Дифосфаты глицерина $\beta$ }	15,0	0,33	100	—	»	1,0 : 1,98
Диглицеринтрифосфат	6,8	0,21	63,5	$G_{ro} P_1,$ $G_{ro} P_2$	$G_{ro2} P, P_i$	1,0 : 0,64

\*  $G_{ro}$  — глицерин. Хроматографии в системе А.

в своем составе уксусную кислоту, соединенную с полимером сложноэфирной связью [7]. В настоящей работе с помощью газохроматографического метода установлено, что молярное соотношение фосфора полимера и О-ацетильных групп равно 3,3:1, т. е. каждая цепь тейхоевой кислоты из 10 глицерофосфатных единиц несет 3 остатка уксусной кислоты. Не исключено, что полимер *in vivo* имеет большее количество этих групп, однако при выделении, включающем экстракцию 10%-ной трихлоруксусной кислотой, часть О-ацетильных остатков теряется. Для подтверждения этого предположения О-ацетильные группы определялись непосредственно в клеточной стенке. Как выяснилось, наибольшее их количество в стенке (2,3% от сухого веса) сохраняется при ультразвуковом разрушении мицелия в течение 2—3 мин с последующей быстрой отмывкой фосфатным буфером (рН 7,2) и дистиллированной водой. Длительное механическое разрушение мицелия приводит к быстрому деацетилированию. Молярное соотношение фосфора тейхоевой кислоты и О-ацетильных групп в стенке оказалось равным 1:4, т. е. стенка содержит много больше остатков уксусной кислоты, чем может принять на себя вся тейхоевая кислота, состоящая из 10 глицерофосфатных единиц и имеющая 10 свободных гидроксильных групп. Следовательно, и другие полимерные компоненты стенки *Act. rimosus* и, по всей вероятности, гликопептид (как известно для некоторых бактериальных гликопептидов [8]) содержат О-ацетильные группы.

Таким образом, установлено, что тейхоевая кислота клеточной стенки *Act. rimosus* является полимером глицерофосфата, в котором 10 глицеринных единиц объединены фосфодиэфирными связями типа 1,3. Сложноэфирной связью к полимеру присоединяются 3 или более О-ацетильных групп.

Известно, что тейхоевые кислоты клеточной стенки обычно соединены с гликопептидом [9]. Для *Staph. lactis* предположена взаимная организация этих двух полимеров в стенке [10]. Было интересно выяснить, каково соотношение между гликаном и тейхоевой кислотой в актиномицете и отличается ли клеточная стенка актиномицета от бактериальной стенки по этим показателям. Наличие гликопептида было показано идентификацией в продуктах кислотного гидролиза клеточной стенки мурамовой кислоты и глюкозамина. В составе стенки также обнаружили галактозамин. Количество аминокислот определяли после гидролиза стенки 6 н.НСІ при 100°. Сравнением результатов, полученных при гидролизе в течение 3, 6, 10, 14 и 18 ч, установлено, что максимальное количество аминокислот (мурамовая кислота — 31,07, глюкозамин — 61,51 и галактозамин — 18,08 мкмоль/100 мг клеточной стенки) определяется при 14-часовом гид-





ролизе. Соотношение же между мурамовой кислотой, глюкозамином и галактозамином оставалось во всех случаях близким и в среднем соответствовало 1:1,98:0,58. Учитывая известную лабильность аминсахаров в кислых условиях [11], количественную оценку содержания этих соединений в стенке актиномицета следует считать приблизительной.

Как правило, природные аминсахара, за небольшим исключением [12], N-ацетилированы, и количество N-ацетильных групп соответствует общему количеству аминсахаров.

Основываясь на таком предположении и зная молярное соотношение мурамовой кислоты, глюкозамина, галактозамина и общее содержание N-ацетильных групп, мы рассчитали содержание этих соединений в 100 мг клеточной стенки. Количество тейхоевой кислоты было рассчитано исходя из содержания фосфора и известных данных о строении этого полимера. Получены следующие результаты (мкмоль/100 мг стенки): мурамовая кислота — 43,53; глюкозамин — 86,19; галактозамин — 25,25; тейхоевая кислота — 2,16. Таким образом, приблизительно на каждые 20 остатков мурамовых кислот в гликопептиде приходится одна цепь тейхоевой кислоты, состоящая из 10 глицерофосфатных единиц. Эти данные близки к результатам, полученным для клеточной стенки *Staph. lactis* [10], для которой рассчитанное соотношение общего количества мурамовых кислот к тейхоевым кислотам равно 18,5:1.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что клеточная стенка *Act. rimosus* ИСТ-118, по-видимому, построена аналогично бактериальной клеточной стенке. Общий тип структуры тейхоевой кислоты сходен со структурами, обнаруженными у бактерий [9], но принципиально отличается от них присутствием в полимере O-ацетильных групп вместо O-D-аланильных [9]. Особенность клеточной стенки изучаемого актиномицета — большое количество O-ацетильных групп, которые являются компонентами не только тейхоевой кислоты, но и других полимеров стенки.

### Экспериментальная часть

*Act. rimosus* ИСТ-118 выращивали в течение 24 ч, как описано в работе [3]. Клеточную стенку получали с помощью разрушения сырого мицелия ультразвуком [3]. Тейхоевую кислоту экстрагировали из высушенного мицелия 10%-ной трихлоруксусной кислотой (4°, 24 ч) [3].

Формы фосфора устанавливали по методу, описанному в работе [3], глицерин — по способу, охарактеризованному в работе [6]. Общее количество ацетильных групп определяли после гидролиза 4 н. HCl (100°, 8 ч), а количество O-ацетильных — после гидролиза 0,1 н. HCl (100°, 1 ч) с помощью газохроматографического метода [13]; содержание N-ацетильных групп рассчитывается по разности между общим количеством ацетильных групп и количеством O-ацетильных.

Продукты кислотного, щелочного и ферментативного гидролизом тейхоевой кислоты и стенки хроматографировали в следующих системах растворителей: пропанол — NH<sub>3</sub> (d 0,88) — H<sub>2</sub>O, 6:3:1 (А); бутанол — пиридин — бензол — H<sub>2</sub>O, 5:3:1:3 (В).

Электрофорез проводили в ацетатно-пиридиновом буфере (рН 5,5), 20 В/см, 5 ч [3]. В случае очистки полимера пользовались высоковольтным электрофорезом с системой охлаждения, 300 В/см, 1 ч. Для препаративных целей хроматографическую бумагу промывали 2 н. CH<sub>3</sub>COOH, отмывали до нейтральной реакции дистиллированной, а затем бидистиллированной водой. Фосфорные эфиры обнаруживали реактивом Ишервуда, аминсахара — нингидрином и 5% AgNO<sub>3</sub>, моносахариды — апилифталатом.

*Определение аминсахаров.* Навески клеточной стенки (5—7 мг) гидролизуют 6н. HCl, 100°, 3, 6, 10, 14 и 18 ч. Гидролизат упаривали до слабокислой реакции, половину его использовали для хроматографирования в системе В, другую — доводили до объема 3—4 мл и в аликвотах

определяли мурамовую кислоту, глюкозамин и галактозамин [14], который был идентифицирован по образовавшейся после его окисления пингидрином ликсозе.

*Кислотный и щелочной гидролиз* тейхоевой кислоты проводили как описано в работе [3].

*Определение длины цепи тейхоевой кислоты.* Длину цепи тейхоевой кислоты определяли ферментативным методом [6]. Получены следующие результаты  $P_{\text{общ}}/P_i$ : через 6 ч — 16,9:1; через 18 ч — 10,2:1; через 24 ч — 10,3:1.

*Изучение диглицеринтрифосфата.* Продукты щелочного гидролиза тейхоевой кислоты хроматографировали в системе А при многократном пропускании растворителя. Эфир элюировали с хроматограммы водой и дополнительно очищали с помощью электрофореза, снова элюировали и раствор высушивали досуха.

*Энзиматическое дефосфорилирование.* К сухому остатку эфира добавляли фосфомоноэстеразу (ФМЭ), ацетатно-аммонийный буфер (рН 5,5) и выдерживали ночь при 37°. Продукты гидролиза хроматографировали в системе А.

*Кислотный гидролиз.* Сухой остаток эфира гидролизовали 1 н. HCl, 3 ч, 100°. Продукты гидролиза подвергали электрофорезу и хроматографии в системе А.

*Определение молярных отношений.* Сухой остаток эфира гидролизовали 1 н. HCl, как указано выше, гидролизат упаривали в вакууме на чашечке из фторопласта до нейтральной реакции и подвергали действию ФМЭ по вышеописанному методу. В аликвотах определяли глицерин и фосфор.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Наумова И. Б. (1975) в сб. Биология лучистых грибов (под ред. Имшенецкого А. А. и Красильникова Н. А.), с. 116—129, «Наука», М.
2. Nakamura T., Tamura G., Arima K. (1967) 7th international congress of biochemistry, Tokyo, Abstracts IV, General sessions A-F, 704.
3. Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Мамченкова Ж. И. (1974) Антибиотики, № 6, 530—534.
4. Kelemen M. V., Baddiley J. (1961) Biochem. J., 80, 246—254.
5. Зарецкая М. Ш., Наумова И. Б., Шабарова З. А. (1971) Биохимия, 36, 97—107.
6. Наумова И. Б., Дмитриева Н. Ф. (1974) Биохимия, 39, 201—209.
7. Наумова И. Б., Зарецкая М. Ш. (1964) Докл. АН СССР, 157, 207—210.
8. Colette J., Ghuyen J. M. (1970) Biochemistry, 9, 2935—2943.
9. Наумова И. Б. (1973) Успехи соврем. биол., 75, 357—378.
10. Archibald A. R., Baddiley J., Heckels J. E. (1973) Nature New Biology, 241, 29—31.
11. Гладышев Б. Н. (1956) Биохимия, 21, 227—230.
12. Johnson K. G., McDonald I. J. (1974) Can. J. Microbiol., 20, 905—913.
13. Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Панина Л. И. (1975) Биохимия, 40, 211—212.
14. Stewart-Tull D. E. S. (1968) Biochem. J., 109, 13—18.

Поступила в редакцию  
17.X.1975

#### ON THE CELL WALL OF *ACTINOMYCES RIMOSUS* LCT-118

DMITRIEVA N. F., NAUMOVA I. B., STRESHINSKAYA G. M.,  
PANINA L. I.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The structure of teichoic acid from the cell wall of *Act. rimosus* LCT-118 producing the antibiotic oxytetracycline is studied. The polymer consists of 10 glycerol units linked in phosphodiester bonds of 1,3-type. Three O-acetyl groups are attached to the polymer through ester linkages. It is established that one chain of teichoic acid corresponds to 20 units of muramic acid of glycopeptide. The cell wall contains 2.3% (of dry weight) O-acetyl groups which are bound with teichoic acids and some other compounds. The estimation of aminosugars content is based on the estimation of N-acetyl groups.