



УДК 547.426.2'455.623'233'118.02

ТЕЙХОВЕВАЯ КИСЛОТА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ  
АДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ВАРИАНТА 1-68 *STREPTOMYCES*  
*ROSEOFLOAVUS VAR. ROSEOFUNGINI* 1128

Скоблылова И. К., Агре Н. С.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР, Пуцино

Шашков А. С.

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

Паумова И. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Изучалась структура тейхоевой кислоты адифференцированного варианта 1-68 *Streptomyces roseoflavus var. roseofungini* 1128, отличающегося от исходного штамма рядом морфологических признаков. Полимер, локализованный в стенке, составляет около 9% ее сухого веса и является 1,3-поли(глицерофосфатом). Небольшое количество *L*-лизильных и *N*-ацетилглюкозаминильных заместителей в полимере (от 7 до 17% замещенных глицериновых единиц) отличает тейхоевую кислоту варианта от тейхоевой кислоты исходного штамма, у которой количество замещенных мономеров в цепи достигает 60%.

Полисахаридные полимеры клеточных стенок являются в некоторых случаях активными регуляторами биохимических процессов, происходящих в бактериальной клетке. Например, у стеночных тейхоевых кислот наиболее важные функции — это регуляция катионного обмена и работы автолитических ферментов, которые участвуют в осуществлении таких процессов в клетке, как рост, деление, разделение и др. [1]. В связи с этим одним из подходов к изучению функций тейхоевых кислот может быть исследование структуры этих полимеров в стенках вариантов микроорганизмов, которые отличаются от исходных штаммов различными аномалиями развития. Так, на мутантах ряда бактерий показано, что нарушение деления клеток может быть связано с изменениями в структуре стеночных тейхоевых и тейхуроновых кислот [2, 3].

Нами для исследования был взят адифференцированный вариант 1-68 *Streptomyces roseoflavus var. roseofungini* 1128, который в отличие от исходного штамма не образует воздушного мицелия и спор, субстратный мицелий варианта фрагментируется [4]. Электронно-микроскопическое изучение показало, что помимо повышенной тенденции к образованию поперечных перегородок гифы варианта 1-68 характеризуются утолщенной клеточной стенкой [5]. Структурное исследование тейхоевой кислоты клеточной стенки исходного штамма описано нами в предыдущей публикации [6].

Клеточную стенку получали из мицелия, взятого в середине логарифмической стадии роста. Анализ показал, что она содержит 1,2% фосфора, который принадлежит глицеринтейхоевой кислоте, так как в продуктах ее кислотного гидролиза были идентифицированы моно- и дифосфаты глицерина — основные продукты кислотного расщепления глицерофосфатного полимера.

Тейхоевая кислота была выделена из клеточной стенки с помощью 10% трихлоруксусной кислоты (24 ч, 4° С, препарат 1, табл. 1). При щелочном гидролизе полимер образовал в основном моно- и дифосфаты глицерина, глицерин, лизин и неорганический фосфат, идентифицированные с помощью электрофоретического изучения и БХ, как описано в работе [6]. Однако выход тейхоевой кислоты из стенки был незначителен и, кроме того, препарат содержал, как вытекало из анализа его кислотного гидролизата, примесь полисахарида, что затрудняло структурные исследования. В связи с этим тейхоевая кислота была выделена из целых клеток обработкой их 10% трихлоруксусной кислотой (4° С, 24 ч, препарат 2) и очищена хроматографией на DEAE-целлюлозе (СН<sub>3</sub>СОО<sup>-</sup>-форма) от примеси полисахарида, основным компонентом которого была глюкоза. Полученный препарат исследовали по обычной схеме анализа тейхоевых кислот [6].

Преобладающими продуктами кислотного гидролиза полимера были моно- и дифосфаты глицерина, глицерин, неорганический фосфат и лизин. При щелочном гидролизе полимер образовал те же продукты, что и тейхоевая кислота, выделенная из клеточной стенки. Эти данные свидетельствовали в пользу того, что очищенная тейхоевая кислота, выделенная из целых клеток, является компонентом стенки. Среди продуктов щелочного гидролиза был обнаружен также фосфодиэфир глицерина. Этот эфир имеет большую подвижность при электрофоретическом изучении в буфере Г ( $E_{\text{Гтор}}$  1,74) и небольшой  $R_f$  при БХ в системе А ( $R_{\text{Г10-2P}}$  0,22); изомеров не образует. Анализ эфира показал, что при действии фосфомоноэстеразы он отщепляет 63,3% общего фосфора, при кислотном гидролизе (2 н. НСl, 3 ч, 100° С) образует моно- и дифосфаты глицерина, глицерин и неорганический фосфат и что молярное соотношение компонентов в эфире —  $P_1 : \text{Grc}$  составляет 3,14 : 2,00. Эти данные свидетельствуют о том, что эфир представляет собой 2-фосфоглицерин(3)-фосфоглицерин-2-фосфат (диглицеринтрифосфат) — соединение, которое образуется при щелочной деградации незамещенной 1,3-поли(глицерофосфатной) цепи [7] и которое не может образоваться при гидролизе цепи 2,3-типа, что подробно обсуждено ранее [8].

Длина цепи полимера определена двумя методами: периодатным и ферментативным. Результаты свидетельствуют о том, что цепь имеет 14—15 глицерофосфатных единиц. Это близко к значениям, полученным для тейхоевой кислоты исходного штамма [6].

В щелочных гидролизатах некоторых препаратов тейхоевой кислоты, выделенных из разных партий мицелия, обнаружены в следовых количествах фосфодиэфиры глицерина, содержащие глюкозамин. Подвижности этих эфиров при электрофоретическом изучении в буфере А полностью совпадали с таковыми N-ацетилглюкозаминилтриглицеринтетрафосфата и N-ацетилглюкозаминилдиглицериндифосфата, структура которых изучена в работе [6]. Крайние значения молярного соотношения  $P_1 : \text{GlcN}$  были 11,4 : 1 и 47 : 1 в разных препаратах тейхоевой кислоты. Эти данные показывают, что глицерофосфатная цепь может иметь небольшое количество N-ацетилглюкозаминильных заместителей.

Во всех препаратах тейхоевой кислоты обнаружен лизин, соединенный с полимером сложноэфирной связью, что установлено посредством аммонолиза. Содержание аминокислоты невелико (см. табл. 1).

Кроме химического изучения полимера проводилось его <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопическое исследование. В спектре тейхоевой кислоты (препарат 2; см. рисунок и табл. 2) наиболее интенсивны два сигнала с соотношением интегральных интенсивностей 2 : 1 и характерным расщеплением: дублет с химическим сдвигом 67,5 м.д. и константой взаимодействия 5,5 Гц (<sup>2</sup>J<sub>1P-O-C</sub>) и триплет с химическим сдвигом 70,85 м.д. и константой расщепления 7,4 Гц (<sup>3</sup>J<sub>1P-O-C-H</sub>), относящиеся, несомненно, к атомам С1, С3 и С2 глицерина в незамещенной поли(глицерофосфатной) цепи [9]. Среди сигналов малой интенсивности нет характерных для лизина [6], что свидетельствует о малом содержании лизина в данном препарате (менее 3%, если исходить из анализа соотношений сигнал :

Характеристика препаратов тейхоевой кислоты, клеточной стенки и мембран адифференцированного варианта 1-68  
*Streptomyces roseoflavus var. roseofungini* 1128\*

Материал	P <sub>Общ</sub>	P <sub>НК</sub>	P <sub>Л</sub>	P <sub>ТК</sub>	Lys	GlcN	Сахара	P <sub>ТК</sub> :Lys	P <sub>ТК</sub> :GlcN
								моль/моль	
Препарат 1	6,50	0,22	0,00	6,28	2,20	1,10	3,95	13,4:1	33,0:1
Препарат 2									
до очистки	9,62	1,52	0,00	8,10	1,85	2,55	5,20	20,6:1	18,3:1
после очистки**	12,00	0,15	0,00	11,85	1,30	5,99	0,98	42,9:1	11,4:1
Клеточная стенка	1,28	0,13	0,00	1,15	0,89			6,1:1	
Мембраны	2,42	0,01	0,81						
Обезжиренные мембраны	1,77	0,00	1,43						

\* Содержание фосфора, лизина, глюкозамина и восстанавливающих сахаров приведено в % от веса воздушно-сухой навески.

\*\* Очищен хроматографией на DEAE-целлюлозе.

Таблица 2

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР тейхоевой кислоты (препарата 2) и метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид  
Растворы в D<sub>2</sub>O, 50° С, внутренний эталон — CH<sub>3</sub>OH — δ 50,15 м. д.

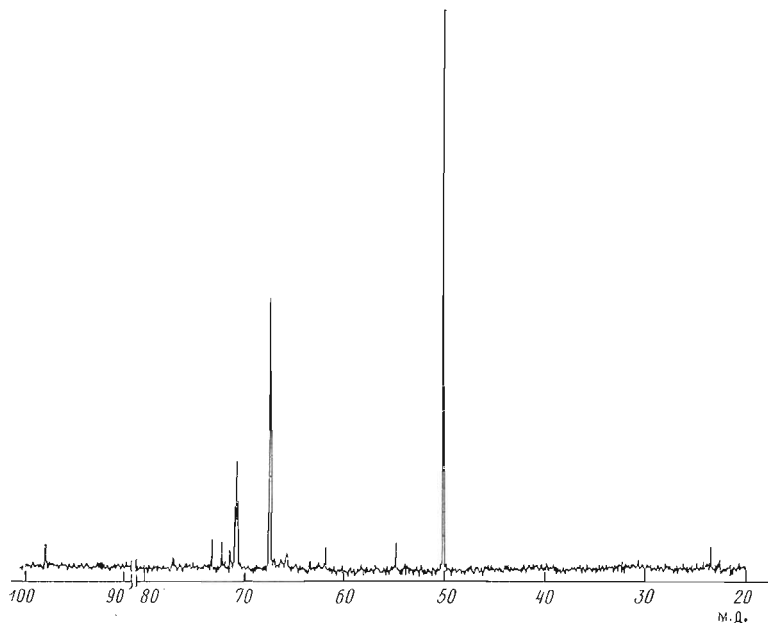
Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CO
Незамещенные остатки глицерина в тейхоевой кислоте	67,5 *	70,85 **	67,5 *					
Замещенные по C2 остатки глицерина в тейхоевой кислоте	66,4 ***	77,2 **	65,75 ***					
Остатки 2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозиды в тейхоевой кислоте	98,0	54,9	72,3	71,4	73,3	61,9		23,4; 175,5
Метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид	99,3	54,85	72,4	71,3	72,9	61,9	56,4	23,15; 175,6

\* Дублет <sup>2</sup>J<sub>ар-О-<sup>13</sup>C 5,5 Гц.</sub>

\*\* Триплет <sup>3</sup>J<sub>ар-О-<sup>13</sup>C 7,4 Гц.</sub>

\*\*\* Уширенные сигналы; отнесение к C1 и C3 условное.

: шум в приведенном спектре <sup>13</sup>C-ЯМР). С другой стороны, в серии сигналов малой интенсивности отчетливо видны некоторые характерные пики гликозамидида, например при 54,9 м.д. (атом углерода, связанный с азотом), 23,4 м.д. (CH<sub>3</sub> ацетиамидной группы) и 98,0 м.д. (аномерный атом углерода в пиранозидах). Сопоставление спектра тейхоевой кислоты со спектрами распространенных гликозамидидов [6, 10, 11] показало, что восемь сигналов малой интенсивности в спектре тейхоевой кислоты прекрасно совпадают по положению с восемью сигналами метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозидида. Гликозамидидные остатки в препарате тейхоевой кислоты, очевидно, являются заместителями при O2 некоторых остатков глицерина в поли(глицерофосфатной) цепи. Действительно, в спектре виден сигнал, характерный для замещенного по O2 остатка глицерина при 77,2 м.д. (расщепленный так же, как и C2 в незамещенных остатках глицерина, но смещенный в низкое поле за счет α-эффекта гликозилирования), и два уширенных сигнала при 66,4 и 65,75 м.д., относящиеся к атомам C1 и C3 в замещенных остатках глицерина (смещенные в высокое поле из-за β-эффекта гликозилирования по



Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР тейхоевой кислоты клеточной стенки варианта 1-68  
*Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128

C2; различие в химических сдвигах — результат присоединения заместителя с хиральным атомом углерода). Все сигналы кольцевых атомов углерода глюкозаминильного остатка, с одной стороны, и замещенных глицериновых остатков — с другой, имеют сопоставимые интегральные интенсивности, что дополнительно свидетельствует о замещении некоторых остатков глицерина в поли(глицерофосфатной) цепи  $\alpha$ -D-глюкозаминильными остатками. Соотношение интегральных интенсивностей сигналов от замещенных и незамещенных остатков глицерина позволяет определить степень замещения (около 10%).

Известно, что многие бактерии содержат в составе клеток кроме стечочных тейхоевых кислот также липотейхоевые кислоты, являющиеся компонентами мембраны. Липотейхоевые кислоты, как правило, имеют свободную или малозамещенную 1,3-поли(глицерофосфатную) цепь, ковалентно связанную с гликолипидом [12]. Поскольку нами изучался полимер, выделенный из целой клетки, естественно возникал вопрос, не принадлежит ли исследуемый поли(глицерофосфат) липотейхоевой кислоте, так как известно, что трихлоруксусная кислота, использованная нами для экстракции, расщепляет связь между гликолипидом и поли(глицерофосфатом) [12]. В связи с этим мы выделили мембранную фракцию стрептомицета, провели ее анализ и установили, что она не содержит поли(глицерофосфатной) цепи.

Сопоставление изложенных в работе данных с аналогичными результатами, полученными при изучении тейхоевой кислоты исходного штамма *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128 [6], показывает, что тейхоевая кислота варианта I-68 так же, как и тейхоевая кислота исходного штамма, имеет 1,3-поли(глицерофосфатную) цепь, близкую по длине. Однако в отличие от полимера исходного штамма тейхоевая кислота варианта содержит меньшее количество L-лизильных и N-ацетилглюкозаминильных заместителей: у тейхоевой кислоты исходного штамма 25–30% глицериновых единиц соединены  $\alpha$ -гликозидной связью с аминсахарным остатком и 20–30% — эфирной связью с L-лизином, а у тейхоевой кислоты варианта количество замещенных глицериновых единиц составляет 2–10 и 5–7% соответственно. Клеточные стенки изученных культур различаются также и по содержанию тейхоевых кислот, которое составляет у исходного штамма 50% от сухого веса стенки, а у варианта — только 9%.

Установленные различия в строении и содержании тейхоевых кислот стрептомицета и его варианта с характерными аномалиями морфогенеза могут указывать на возможную роль исследованных полимеров в регуляции биохимических процессов, связанных с дифференциацией клеток.

### Экспериментальная часть

Культуру покардиоподобного варианта I-68 *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128 получали в середине логарифмической фазы роста (18 ч), на среде с пептоном (100 мл) в 750-мл колбах. Посевным материалом служила 18–20-часовая культура, выращенная из спор на среде того же состава. Споровую культуру поддерживали на агаризованной среде Чапека с глицерином (1%). Мицелий отделяли от среды центрифугированием, промывали 0,95% NaCl и применяли для получения клеточных стенок или высушивали последовательным промыванием спиртом, ацетоном и эфиром. В работе использовали методы выделения клеточной стенки и методы анализа, описанные ранее [6]. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР измерен для 2% раствора тейхоевой кислоты (препарат 2) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $50^\circ\text{C}$  на приборе WM-250 (Bruker) с рабочей частотой по углероду 62,89 МГц. Для БХ использовали следующие системы растворителей: пропанол-1 – аммиак – вода, 6 : 3 : 1 (А), бутанол-1 –  $\text{AsOH}$  – вода, 4 : 1 : 5 (Б) и бутанол-1 – пиридин – бензол – вода, 5 : 3 : 1 : 3 (В); для электрофореза – пиридин – ацетатный буфер, рН 5,5–5,6 (Г) и 1 М  $\text{AsOH}$  (Д).

**Получение мембран.** Мицелий отделяли от среды центрифугированием, промывали 3 раза 0,02 М трис-глицериновым буфером, рН 7,6, содержащим 0,6 М сахарозу и 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Для получения протопластов мицелий смешивали с буфером того же состава (1 : 2, вес/объем), добавляли лизоцим (КФ 3.2.1.17, Олайпе, СССР; 20,0 мг/г сырого мицелия) и смесь выдерживали 1,5 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Протопласты отделяли центрифугированием при 8000 об/мин, прибавляли к ним гипотонический раствор (5 мл 0,02 М трис-глицеринового буфера на 1000 мл 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 : 5, вес/объем) и оставляли на 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Неразрушенные протопласты отделяли центрифугированием при 8000 об/мин, а фракцию мембран осаждали при 16 000 об/мин, многократно промывали гипотоническим раствором и лиофилизировали. Мембраны обезжиривали смесью хлороформ – метанол (1 : 2) 3 раза по 8 ч при перемешивании.

**Получение тейхоевой кислоты.** К клеточной стенке или высушенному мицелию прибавляли 10% трихлоруксусную кислоту (10 мл на 100 мг материала), перемешивали 24 ч при  $4^\circ\text{C}$ , остаток клеточной стенки или мицелия удаляли центрифугированием, а к каждому из супернатантов прибавляли по два объема 96% этанола. Образовавшиеся осадки собирали центрифугированием, растворяли в воде, диализовали и лиофильно сушили. Получили: из клеточной стенки препарат 1, из мицелия – препарат 2.

**Очистка тейхоевой кислоты (препарат 2).** 170 мг тейхоевой кислоты растворяли в 1 мл 0,02 М натрий-ацетатного буфера, рН 4,8, и помещали на ДЕАЕ-целлюлозу ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ -форма, колонка  $23 \times 430$  мм). Колонку промывали буфером того же состава (400 мл) и материал хроматографировали в том же буфере в линейном градиенте NaCl (200 мл буфера – 200 мл 0,7 М NaCl) со скоростью 0,25 мл/мин. Объем фракций 3 мл. В аликвотах фракций определяли  $R_{\text{общ}}$ ,  $R_{\text{нк}}$  и сахар. Фракции 65–115, содержащие  $R_{\text{нк}}$  и не содержащие сахара, объединяли, диализовали и лиофилизировали.

**Кислотный и щелочной гидролиз** тейхоевой кислоты проводили как в работе [6].

**Изучение диглицеринтрифосфата.** Фосфодиэфир, образовавшийся при щелочной деградации тейхоевой кислоты, после разделения методами электрофореза в буфере Г и БХ в системе А элюировали с бумаги водой и элюат упаривали. Для энзиматического дефосфорилирования к сухому остатку эфира добавляли щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1; Sigma)

в 1 М аммоний-ацетатном буфере, рН 10,4, и выдерживали в термостате 2 ч при 37°С. В продуктах гидролиза определяли  $P_{\text{общ}}$  и  $P_1$ . Кислотный гидролиз фосфорного эфира проводили 2 н. HCl (3 ч при 100°С) и образовавшиеся продукты либо исследовали БХ и электрофорезом (системы А, В и буфер 1'), либо обрабатывали щелочной фосфатазой и в аликвотах определяли глицерин и  $P_1$ .

*Определение длины цепи* проводили как описано в работе [6]. При периодатном окислении получили отношение  $P_1$ :формальдегид через 6 ч — 18,8:1, через 12 ч — 17,9:1, через 20 ч — 17,1:1, через 26 ч — 16,4:1, через 40 ч — 15,3:1 и через 60 ч — 15,4:1. При ферментативном гидролизе получили для препарата 2  $P_{\text{общ}}$ : $P_1$  через 20 мин — 15,2:1, через 60 мин — 15,3:1, через 2 ч — 15,2:1, для препарата 1 через 2 ч — 14,7:1.

Аммонолиз тейхоевой кислоты (препаратов 1 или 2) проводили как в работе [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Наумова И. Б. Биохимия, 1978, т. 43, № 2, с. 195–207.
2. Robson R. L., Baddiley J. J. Bacteriol., 1977, v. 129, № 2, p. 1045–1050.
3. Robson R. L., Baddiley J. J. Bacteriol., 1977, v. 129, № 2, p. 1051–1058.
4. Никитина Е. Т., Калакуцкий Л. В. Успехи микробиологии, 1976, сб. 11, с. 67–82.
5. Cherny N. E., Tikhonenko A. S., Nikitina E. T., Kalakoutskii L. V. Cytobios, 1972, v. 5, № 18, p. 101–110.
6. Наумова И. Б., Шашков А. С., Скоблилова Н. К., Агре Н. С., Романов В. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 848–856.
7. Kelemen M. V., Baddiley J. Biochem. J., 1961, v. 80, № 2, p. 246–254.
8. Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Стрешинская Г. М., Панина Л. И. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 815–821.
9. De Boer W. R., Kruyssen F. J., Wouters J. T. M., Kruk C. Eur. J. Biochem., 1976, v. 62, № 1, p. 1–6.
10. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1495–1505.
11. Деревицкая В. А., Шашков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 410–421.
12. Наумова И. Б. Успехи биол. химии, 1979, сб. 20, с. 128–151.

Поступила в редакцию  
2.XII.1981

#### THE CELL WALL TEICHOIC ACID FROM THE ADIFFERENTIATED VARIANT 1-68 OF *STREPTOMYCES ROSEOFILAVUS* VAR. *ROSEOFUNGINI* 1128

SKOBLILOVA N. K., AGRE N. S., SHASHKOV A. S., NAUMOVA I. B.

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

The structure of the teichoic acid of the adifferentiated variant 1-68 of *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* 1128 which is distinguished from the parent strain by some morphological features was studied. The polymer is 1,3-poly(glycerol phosphate) located in the cell wall and makes up some 9% of its dry weight. Small amount of *L*-lysyl and *N*-acetylglucosaminyl substituents (ranging from a few per cent of about 17 per cent of 2-O-substituted glycerol units) differs the teichoic acid of the variant 1-68 from the teichoic acid of the parent strain which may have up to 60 per cent substituted glycerol units. This distinction in the structure of parent and variant teichoic acids imply these cell-wall polymers in the biochemical processes related to the cell differentiation in streptomycete