



УДК 547.454'913.3'118+577.15.08

БИОСИНТЕЗ ПОЛИПРЕНИЛПИРОФOSФАТГЕКСОЗАМИНОВ
БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМОЙИЗ *STREPTOMYCES CHRYSOMALLUS* SP. 2Стрешинская Г. М., Дружинина Т. Н.*, Наумова И. Б.,
Шибяев В. Н.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;

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

Изучалась возможность образования полипренильных производных аминокислот в бесклеточной системе из *Streptomyces chrysomallus* sp. 2. Показано, что ферментная система мембран при наличии в инкубационной смеси UDP-[¹⁴C]GlcNAc или UDP-[¹⁴C]GalNAc синтезирует полипренилпирофосфатаминокислоты, производные N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина; в присутствии доноров обоих аминокислот наряду с вышеперечисленными липидпирофосфатаминокислотами образуется полипренилпирофосфатдисахарид, содержащий остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина. Обсуждается вопрос об участии этих соединений в биосинтезе «области связи» между тейхоевой кислотой и пептидогликаном в клеточной стенке *S. chrysomallus* sp. 2.

Основные полимеры клеточной стенки грамположительных бактерий — пептидогликан и тейхоевая кислота — связаны между собой ковалентно через уникальную олигосахаридную структуру «области связи» [1].

Моносахаридная последовательность «области связи» в настоящее время известна для очень немногих организмов — представителей бацилл, стафилококков и микрококков [2—6]. Исследования биосинтеза тейхоевых кислот и структуры «области связи» никогда не проводились на представителях порядка *Actinomycetales* и впервые предприняты нами на одном из микроорганизмов этой группы — *Streptomyces chrysomallus* sp. 2. — продуценте антибиотика аурантина.

Клеточная стенка *S. chrysomallus* sp. 2 была изучена нами ранее [7]. В ее состав входят пептидогликан и тейхоевая кислота поли(рибитфосфатной) природы с небольшим количеством β-глюкозильных заместителей и O-ацетильными группами. При исследовании комплекса тейхоевая кислота — олигомер «области связи», выделенного из клеточной стенки *S. chrysomallus* sp. 2, было показано, что в состав «области связи» входят глицерофосфатные единицы, а также ацетилированные гексозамины — глюкозамин, галактозамин, фукозамин и хиновозамин [8, 9].

Для изучения путей биосинтеза «области связи» в стрептомиците важно выяснить возможность образования полипренильных производных аминокислот *in vitro* в бесклеточной системе из *S. chrysomallus* sp. 2, что явилось целью настоящей работы. Роль липидных акцепторов — полипренилпирофосфатов в биосинтезе полимеров клеточной стенки подробно описана в обзорах [10, 11].

Идентификация соединения, синтезируемого
препаратом мембран *S. chrysomallus* sp. 2
в присутствии UDP-[¹⁴C]GlcNAc

Все до сих пор изученные олигосахариды «области связи» на восстанавливаемом конце цепи несут остаток N-ацетилглюкозамина, и первой стадией при их биосинтезе *in vitro* в бесклеточных системах из бактерий

Сокращения: PpePP — дифосфат бактериального полипренола, Mrg — C₅₅ — полипренол из листьев шелковицы.

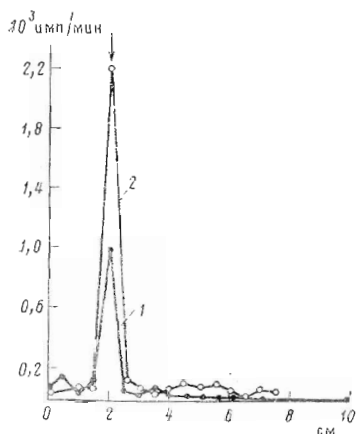


Рис. 1

Рис. 1. Распределение радиоактивности при ТСХ органических фаз, полученных при инкубировании мембран *S. chrysomallus* sp. 2 с UDP-[^{14}C]GlcNAc (1) и UDP-[^{14}C]GalNAc (2). Стрелка указывает место положения синтетического GlcNAc(α)PPMP

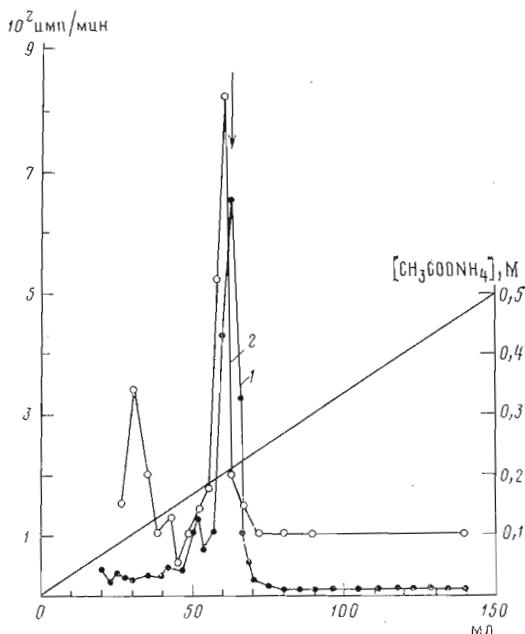


Рис. 2

Рис. 2. Распределение радиоактивности при хроматографии на DEAE-целлюлозе органических фаз, полученных при инкубировании мембран *S. chrysomallus* sp. 2 с UDP-[^{14}C]GlcNAc (1) и UDP-[^{14}C]GalNAc (2). Стрелка указывает объем выхода синтетического GlcNAc(α)PPMP

является образование липидсвязанного N-ацетилглюкозамина [6]. Предстояло решить вопрос о возможности образования подобного соединения препаратом мембран *S. chrysomallus* sp. 2 при наличии в инкубационной смеси донора N-ацетилглюкозамина. Для этой цели было проведено инкубирование мембран с UDP-[^{14}C]GlcNAc (табл. 1, опыт 1).

Обнаружено, что в результате инкубации образуется радиоактивное соединение, экстрагируемое смесью хлороформ-метанол. Это позволяло предположить образование липидпроизводного, содержащего остаток N-ацетил[^{14}C]глюкозамина.

В бактериальных полипренилфосфосахарах сахарные остатки могут быть связаны с полипренолом как монофосфатной, так и пирофосфатной связью [12, 13]. Поэтому было необходимо доказать тип связи между липидом и аминсахарным остатком, а также природу и количество этих остатков в синтезированном производном.

Липидное производное, синтезированное мембранным препаратом, при хроматографии на пластинке с силикагелем в системе А по подвижности полностью совпало с 1-морепренилпирофосфатом N-ацетилглюкозамина (рис. 1). Наличие пирофосфатной связи в липидном производном было также показано методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Около 80% радиоактивного вещества, включенного в органическую фазу, вышло с колонки одним пиком, по объему выхода совпадающим с синтетическим 1-морепренилпирофосфатом N-ацетилглюкозамина (рис. 2).

Природа сахарного компонента доказана хроматографией на анализаторе аминокислот углеводного фрагмента, полученного после жесткого кислотного гидролиза синтезированного соединения. Полное совпадение времени выхода с колонки стандартного образца [^{14}C]GlcN и опытного соединения подтвердило присутствие глюкозаминильного остатка в липидном производном, которое синтезируют мембраны *S. chrysomallus* sp. 2.

Количество глюкозаминильных остатков в исследуемом соединении

Включение [^{14}C]гексозаминов во фракцию полипренилфосфосахаров препаратом мембран *S. chrysomallus* sp. 2

| Номер серии * | Номер опыта | Нуклеозиддифосфатсахара инкубационной смеси | Радиоактивность органической фазы, дмп/(мин·мл) |
|---------------|-------------|--|---|
| 1 | 1 | UDP-[^{14}C]GlcNAc | 1000 |
| | 2 | UDP-[^{14}C]GalNAc | 1350 |
| 2 | 3 | UDP-[^{14}C]GalNAc | 1010 |
| | 4 | UDP-[^{14}C]GlcNAc, UDP-[^{14}C]GalNAc | 5200 |
| 3 | 5 | UDP-[^{14}C]GalNAc, UDP-GlcNAc | 1425 |
| | 6 | UDP-[^{14}C]GlcNAc | 2000 |
| | 7 | UDP-[^{14}C]GalNAc | 1000 |
| | 8 | GlcNAc(α)PPMpr, UDP-[^{14}C]GalNAc | 3300 |
| | 9 | GalNAc(α)PPMpr, UDP-[^{14}C]GlcNAc | 3000 |

* Опыты одной серии проводили одновременно, используя один препарат мембран.

было установлено методом хроматографии на бумаге продуктов его мягкого кислотного гидролиза. Выявление радиоактивности только в зоне расположения на хроматограмме N-ацетилглюкозамина показало, что синтезируемый липидпирофосфатсахар содержит один моносахаридный остаток.

Таким образом, ферментная система мембран *S. chrysomallus* sp. 2 обладает способностью к переносу с UDP-[^{14}C]GlcNAc аминсахарного остатка на эндогенный липид с образованием липидпирофосфат-N-ацетилглюкозамина (реакция *a* на схеме).

Идентификация соединения, синтезируемого препаратом мембран S. chrysomallus sp. 2 в присутствии UDP-[^{14}C]GalNAc

В составе олигомера «области связи» клеточной стенки изучаемого стрептомицета был обнаружен остаток N-ацетилгалактозамина [8, 9]. В связи с этим мы исследовали возможность включения этого аминсахара изучаемым препаратом мембран из стрептомицета в липидное производное.

Мембраны инкубировали с UDP-[^{14}C]GalNAc, реакцию останавливали добавлением смеси хлороформ — метанол и исследовали соединение, переходящее в органическую фазу, методом тонкослойной и ионообменной хроматографии, как описано выше (табл. 1, опыт 2). На пластинке с силикагелем обнаружено единственное радиоактивное пятно, соответствующее по подвижности синтетическому морапренилпирофосфатсахару (рис. 1). Установлено также, что ~70% метки, содержащейся в органической фазе, при хроматографии на DEAE-целлюлозе выходит в виде пика, идентичного по объему выхода синтетическому морапренилпирофосфатсахару (рис. 2). Результаты хроматографии давали основание считать, что ферментная система мембран *S. chrysomallus* sp. 2 образует липидное производное, в котором липид и аминсахар объединены через пирофосфатную связь. При хроматографии на бумаге углеводного фрагмента синтезированного соединения показано, что в его состав входит один остаток N-ацетилгалактозамина. Радиоактивности в области расположения на хроматограмме N-ацетилглюкозамина не обнаружено, и, следовательно, в условиях эксперимента реакции эпимеризации сахарного остатка не происходит.

Таким образом, ферментная система мембран *S. chrysomallus* sp. 2 обладает способностью *in vitro* синтезировать липидпирофосфат N-ацетилгалактозамина (реакция *b* на схеме). Ранее образование липидного производного с подобной структурой было обнаружено только в бесклеточной системе *Bacillus licheniformis* [14].

*Идентификация соединения, синтезируемого
препаратом мембран S. chrysomallus sp. 2
в присутствии UDP-[¹⁴C]GlcNAc и UDP-[¹⁴C]GalNAc*

В задачу настоящего эксперимента входило исследование возможности образования под действием ферментной системы мембран липидсвязанных производных при наличии в инкубационной смеси доноров обоих аминоксахаров — N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина.

Мембраны инкубировали с UDP-[¹⁴C]GlcNAc и UDP-[¹⁴C]GalNAc (табл. 1, опыт 4). Соединение, содержащее метку и переходящее в органическую фазу, после мягкого кислотного гидролиза хроматографировали на сефадексе G-15. Радиоактивные фракции, соответствующие одному пику, собирали, концентрировали и проводили жесткий кислотный гидролиз. При хроматографии на анализаторе аминокислот против стандартных образцов [¹⁴C]GlcN и [¹⁴C]GalN обнаружены оба аминоксахара.

Для решения вопроса о том, входят ли исследуемые аминоксахара в состав липидпроизводного олигосахарида или имеет место одновременное образование двух моносахаридных производных, был проведен анализ методом хроматографии на бумаге в системе Б углеводных фрагментов, полученных при инкубировании мембран с UDP-[¹⁴C]GalNAc и UDP-GlcNAc (табл. 1, опыт 5). Около 50% радиоактивности обнаружено в зоне, соответствующей по подвижности хитобиозе, что указывало на образование липидного производного, содержащего оба аминоксахара (табл. 2).

В связи с тем что в предыдущих экспериментах была показана возможность образования препаратами мембран липидпирофосфатмоносахаридов с участием как N-ацетилглюкозамина, так и N-ацетилгалактозамина, оставалось неясным, какое из этих соединений служит акцептором при образовании дисахаридного производного.

Для решения этого вопроса были проведены эксперименты с синтетическими морапренилпирофосфатпроизводными GlcNAc(α)PPMpr и GalNAc(α)PPMpr в качестве акцепторов; источниками второго аминоксахарного остатка были UDP-[¹⁴C]GalNAc и UDP-[¹⁴C]GlcNAc соответственно, поскольку известно, что мембраны как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий могут использовать морапренилфосфатпроизводные в биосинтезе липидных предшественников [6, 15].

Углеводные фрагменты, полученные после мягкого кислотного гидролиза липидпроизводных, синтезированных ферментной системой мембран, исследовали методом хроматографии на бумаге. Наличие радиоактивности как в области хитобиозы, так и в области соответствующего аминоксахара было обнаружено в обоих вариантах опыта (табл. 2), причем метка в области дисахарида преобладала.

Эксперименты, проведенные с экзогенными морапренилпирофосфатпроизводными, позволяют предположить, что препарат мембран *S. chrysomallus* sp. 2 содержит две независимые ферментные системы биосинтеза:

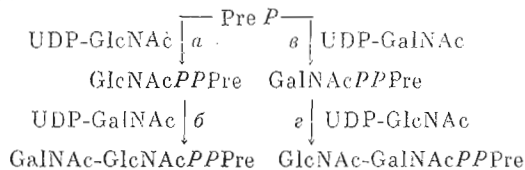
Таблица 2

**Образование дисахаридных производных полипренилпирофосфата
препаратом мембран *S. chrysomallus* sp. 2.
БХ после мягкого кислотного гидролиза**

| Нуклеозиддифосфатсахара инкубационной смеси | Радиоактивность в зоне хитобиозы, % * |
|---|---------------------------------------|
| UDP-[¹⁴ C]GlcNAc | 0 |
| UDP-[¹⁴ C]GalNAc | 0 |
| UDP-[¹⁴ C]GalNAc, UDP-GlcNAc | 51 |
| GlcNAc(α)PPMpr, UDP-[¹⁴ C]GalNAc | 77 |
| GalNAc(α)PPMpr, UDP-[¹⁴ C]GlcNAc | 60 |

* % от суммы радиоактивности в зонах хитобиозы и аминоксахара.

дисахаридпроизводных:



Кроме того, описанный эксперимент подтвердил, что ферментная система мембран изучаемого стрептомицета может использовать для сборки дисахарида наряду с эндогенными и экзогенными липидными акцепторами.

Образования липидпирофосфатдисахаридных производных, содержащих остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина, ранее в микроорганизмах обнаружено не было. Остатки этих аминсахаров наряду с остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилхинозозамина найдены нами в составе «области связи» между тейхоевой кислотой и пептидогликаном в клеточной стенке *S. chrysomallus* sp. 2 [8, 9]. Полученные в данной работе результаты позволяют предположить, что выявленные реакции — первые стадии в биосинтезе «области связи».

Одновременное образование липидпроизводных дисахаридов с различной последовательностью тексозаминов служит указанием на возможность существования в клеточной стенке *S. chrysomallus* sp. 2 двух «областей связи» различного строения.

Экспериментальная часть

В работе использовали 24-часовую культуру клеток *S. chrysomallus* (логарифмическая стадия роста), выращенную на синтетической среде в колбах на качалке, как описано ранее [7]. К промытым клеткам добавляли 50 мМ трис HCl-буфер, pH 7,8, с 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ EDTA (буфер А) до получения густой суспензии, которую помещали в медную баню и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (УЗДН-1) при 22 кГц 5–7 раз по 10–15 с так, чтобы температура гомогената не превышала 5–8°С. Гомогенат центрифугировали при 8000 об/мин (2×10 мин) для осаждения неразрушенных клеток и клеточной стенки. Надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч при 35 000 об/мин, осадок (фракцию мембран) разбавляли буфером А и помещали в небольшие конические пробирки с крышками, которые хранили в жидком азоте до использования.

Использовали нуклеотидсахара: UDP-[¹⁴C]GlcNAc (аммониевая соль, 247 мКи/ммоль, Amersham, Англия), разбавляли нерадиоактивным нуклеотидсахаром до удельной радиоактивности 10 мКи/ммоль; UDP-[¹⁴C]GalNAc (аммониевая соль, 54 мКи/ммоль, Amersham, Англия), [¹⁴C]GlcNAc (Amersham, Англия); морепренилфосфаты GlcNAc(α)PPMg и GalNAc(α)PPMg были синтезированы по методу [16] и любезно предоставлены Л. Л. Давиловым.

Аналитические методы. Белок определяли по Лоури [17], фосфор — с малахитовым зеленым по методу [18]. ТСХ проводили на пластинках (6×9 см) с силикагелем (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4, для ВХ использовали бумагу марки FN-13 (ГДР) и систему пиридин — бутанол — бензол — вода, 3 : 5 : 1 : 3. Сахара проявляли 5% AgNO₃. Для выявления зон радиоактивности пластинку или бумагу разрезали на полоски 0,5×1 или 1×1 см соответственно и определяли радиоактивность в толщельном сцинтиляторе на жидкостно-сцинтиляционном счетчике Delta-300, модель 6891 (Голландия). Радиоактивность в водных растворах измеряли в диоксидном сцинтиляторе на том же счетчике. При работе с органическими растворителями аликвоты испаряли под лампой и после добавления воды определяли радиоактивность.

Эксперименты по биосинтезу полипренилпирофосфатсахаров. При работе с морепренилпирофосфатаминосакхарами аликвоту раствора, содержащего 50 нмоль 1-морепренилпирофосфата N-ацетилглюкозамина или 1-морепренилпирофосфата N-ацетилгалактозамина, упаривали в токе воздуха, добавляли 10 мкл метанола и 15 мкл 0,5% водного твина-85, энергично перемешивали для растворения липида, затем в ту же пробирку вносили 100 мкл препарата мембран (100 мкг белка) в буфере А, перемешивали и быстро замораживали в смеси твердой углекислоты с ацетоном, после размораживания процедуру повторяли еще 3 раза. Далее в реакционную смесь вводили 10 мкл 0,25 М MgCl₂, 10 мкл UDP-[¹⁴C]GlcNAc или 5 мкл UDP-[¹⁴C]GalNAc, объем инкубационной смеси доводили до 150 мкл буфером А. В экспериментах без добавления

экзогенного липидного акцентора инкубационная смесь содержала: 10 мкл 0,25 М $MgCl_2$, нуклеотидсахара в различных комбинациях в соответствии с конкретным опытом — (10 мкл $UDP-[^{14}C]GlcNAc$, 10 мкл $UDP-GlcNAc$ или 5 мкл $UDP-[^{14}C]GalNAc$) и 100 мкл мембран, объем реакционной смеси доводили буфером А до 150 мкл. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали 1 ч при 28° С. Реакцию останавливали добавлением 2 мл смеси хлороформ — метанол, 2:1. Нуклеотидсахара экстрагировали по Фолчу как описано [15]. Органическую фазу концентрировали в вакууме и использовали для анализов.

Сухой остаток растворяли в метаноле и исследовали его методами ТСХ и ИОХ. ИОХ проводили на DEAE-целлюлозе (DE-52, Англия) в CH_3COO^- -форме, колонка 19×1,45 см. Контрольным соединением служил синтетический морапренилпирофосфат N-ацетилглюкозамина. Липидпроизводное растворяли в 2 мл метанола, добавляли контрольное соединение и хроматографировали в линейном градиенте метанол — 0,5 М CH_3COONH_4 в метаноле (по 75 мл). Скорость элюции 0,6 мл/мин, объем фракций 5 мл. Из каждой фракции отбирали аликвоты для анализа радиоактивности и определения фосфора.

Другую часть сухого остатка подвергали слабому кислотному гидролизу (0,1 н. HCl в 50% пропаноле, 100° С, 30 мин), гидролизат обрабатывали хлороформом, концентрировали водный слой в вакууме и анализировали методами ВХ и гель-хроматографии на сефадексе G-15 (колонка 33×1,8 см, элюент — вода, скорость элюции 0,3 мл/мин, объем фракций 2 мл; во фракциях определяли радиоактивность).

Материал, содержащий метку, полученный после гель-хроматографии, гидролизали кислотой (4 н. HCl, 100° С 4 ч), кислоту отгоняли в вакууме и исследовали на анализаторе аминокислот марки BC-200 (ФРГ), смола Chromex-8, колонка 20×0,9 см, температура 60° С, скорость элюции 80–85 мл/ч, элюент — 0,35 М натрий-цитратно-солянокислый буфер, рН 5,28. Фракции (1 мл) собирали во флаконы для счета, упаривали под лампой и определяли радиоактивность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ward J. B. *Microbiol. Rev.*, 1981, v. 45, № 2, p. 211–243.
2. Kojima M., Araki Y., Ito E. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 15, p. 9043–9045.
3. Kaya Sh., Yokoyama K., Araki Y. *J. Bacteriol.*, 1984, v. 158, № 3, p. 990–996.
4. Kaya Sh., Araki Y., Ito E. *Eur. J. Biochem.*, 1985, v. 146, № 3, p. 517–522.
5. Kojima M., Araki Y., Ito E. *Eur. J. Biochem.*, 1985, v. 148, № 1, p. 29–34.
6. Harrington Ch. R., Baddiley J. *Eur. J. Biochem.*, 1985, v. 153, № 3, p. 639–645.
7. Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Панина Л. И. *Микробиология*, 1979, т. 48, № 5, с. 814–819.
8. Стрешинская Г. М., Дружинина Т. Н., Наумова И. Б., Шибачев В. П. В кн.: Результаты и перспективы научных исследований микробных полисахаридов. Тез. докл. II Всесоюз. конф. «Результаты и перспективы научных исследований микробных полисахаридов». Л.: Ленинградский хим.-фармацевт. ин-т, 1984, с. 21–22.
9. Streshinskaya G. M., Naumova I. B. 6th Intern. Symp. Biol. Actinomycetes, 1985, p. 168 Debrecen. Hungary. Abstracts.
10. Шибачев В. Н. *Успехи биол. химии*, 1982, т. 23, с. 61–101.
11. Reusch V. *CRC Critical Rev. Microbiol.*, 1984, v. 11, № 2, p. 129–156.
12. Yamatori Sh., Murazumi N., Araki Y., Ito E. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 18, p. 6516–6522.
13. McArthur H. A. I., Baddiley J. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1981, v. 12, № 3, p. 217–221.
14. Ward J. B., Curtis C. A. M. *Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 122, № 1, p. 125–132.
15. Шибачев В. Н., Кузов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин И. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 1, с. 47–56.
16. Данилов Л. Л., Мольцев С. Д., Шибачев В. П. *Биоорган. химия*, 1986, т. 12, № 7, с. 931–939.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
18. Hess H. H., Derr J. E. *Anal. Biochem.*, 1975, v. 63, № 2, p. 607–613.

Поступила в редакцию
14.IV.1986

BIOSYNTHESIS OF POLYPRENYL PYROPHOSPHATE HEXOSAMINES IN THE
CELL FREE SYSTEM OF *STREPTOMYCES CHRYSOMALLUS* SP. 2

STRESHINSKAYA G. M., DRUZHININA T. N.*, NAUMOVA I. B., SHIBAEV V. N.*

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

The membrane preparation from *Streptomyces chrysomallus* sp.2 was shown to catalyze formation of polyprenyl pyrophosphate N-acetylhexosamines after incubation with UDP-[¹⁴C]GlcNAc or UDP-[¹⁴C]GalNAc. In the presence of both sugar nucleotides, polyprenyl pyrophosphate disaccharides are synthesized, containing N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine residues. Possible role of these derivatives in biosynthesis of the linkage unit which attaches teichoic acid to peptidoglycan in the cell wall of *S. chrysomallus* sp.2 are discussed.