



УДК 577.114.5 : 543.422.25

© 1990 г.

А. С. Шапков, Е. М. Тульская, Г. М. Стрешинская*,
Л. П. Терехова**, О. А. Галатенко**, И. Б. Наумова**

**ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕЙХОЕВОЙ
КИСЛОТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
*NOCARDIOPSIS DASSONVILLEI***

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;

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

***Институт новых антибиотиков АМН СССР, Москва*

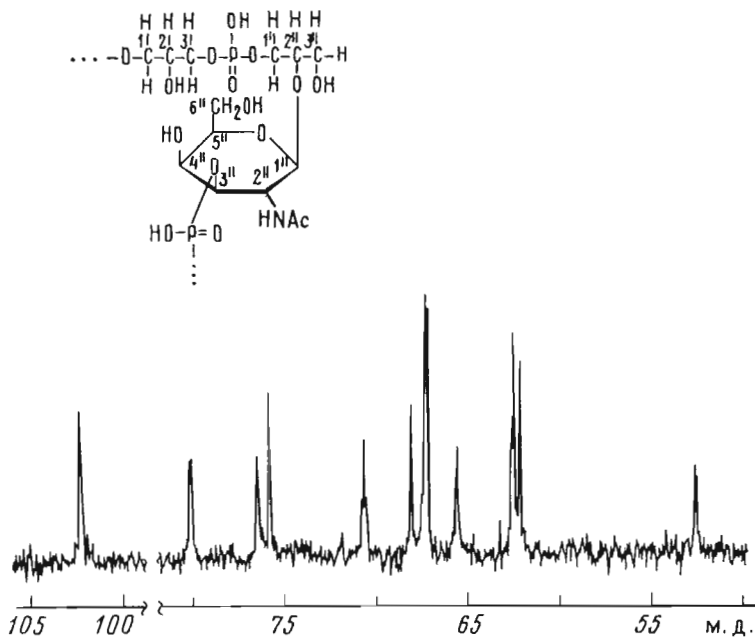
Род *Nocardiosis*, входящий в порядок *Actinomycetales*, выделен из рода *Actinomyces* на основании морфологических признаков и состава клеточных стенок [1]. Ранее было показано, что род гетерогенен и делится на три группы по строению клеточных стенок, фосфолипидов [2] и менахинонов [3]. К первой группе были отнесены штаммы, которые отличаются от остальных *Nocardiosis* присутствием в их клеточных стенках тейхоевых кислот [2]. Тейхоевые кислоты этого таксона актиномицетов ранее не исследовались.

В настоящей работе проведено изучение строения тейхоевой кислоты клеточной стенки типичного представителя первой группы *Nocardiosis* — *N. dassonvillei* IMRU 509 с помощью ЯМР.

Актиномицет выращивали в условиях, описанных в работе [2]. Тейхоевая кислота выделена из 42-часового мицелия с помощью 10% трихлоруксусной кислоты и очищена ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl 650 M [4]. Исследование качественного состава полимера показало, что в его структуру входит глицерин, фосфор и галактозамин. При кислотном гидролизе тейхоевая кислота образовала моно- и дифосфаты глицерина, неорганический фосфат, глицерин и галактозамин. Фосфорные эфиры глицерина и галактозамин идентифицированы как описано нами ранее [5]. В щелочном гидролизате полимера обнаружены моно- и дифосфаты глицерина, а также несколько фосфодиэфиров глицерина, содержащих галактозамин.

Образование при кислотной и щелочной деградации моно- и дифосфатов глицерина, а также щелочестабильных его фосфодиэфиров могло свидетельствовать о присутствии тейхоевой кислоты поли(глицерофосфатной) природы, часть глицериновых остатков которой замещено по С2 аминокислотой [5]. Однако подвижность одного из эфиров щелочного гидролизата в электрическом поле (ацетатно-пиридиновый буфер, рН 5,6—5,8) не соответствовала таковой обычных продуктов щелочной деградации частично замещенных 1,3-поли(глицерофосфатов) [5], что указывало на какие-то особенности в структуре изучаемой тейхоевой кислоты. Полимер ¹³С-ЯМР изучен с помощью ЯМР.

Спектр ¹³С-ЯМР оказался типичным для регулярного полимера, т. е. содержал линии единичной или кратной единице интегральной интенсивности (рисунок, табл. 1). Часть сигналов была уширена или расщеплена в дублеты или триплеты за счет взаимодействия с ядрами ³¹P. Общее число сигналов в спектре (с учетом кратной интенсивности некоторых из них) — 14. По сигналам в характеристических областях спектра в со-



^{13}C -ЯМР-спектр и фрагмент структуры тейхоевой кислоты из клеточной стенки *Nocardiosis dassonvillei*

ставе полимера идентифицируется ацетамидопираноза с β -конфигурацией гликозидной связи (пик в области резонанса аномерных атомов углерода с химическим сдвигом 102,15 м. д. и пик в области резонанса атомов углерода, связанных с азотом при 52,5 м. д., а также сигналы NHCOCH_3 при 176,1 и 23,7 м. д.). В спектре имеются также сигналы, типичные для 1,3-глицерофосфатных звеньев (67,3 м. д., CH_2 -группа, согласно АРТ-спектру [6], и 70,65 м. д., CH -группа [5], триплет с КССВ 8,5 Гц). Спектр ^{31}P -ЯМР обнаружил наличие в полимере двух неэквивалентных атомов фосфора с химическими сдвигами 1,33 и 0,2 м. д. Дополнительные сведения о структуре полимера дает анализ ^1H -ЯМР-спектра. В последнем имеется сигнал в области резонанса аномерных протонов при 4,66 м. д. с КССВ 7,8 Гц, типичной для сахаров с β -глюко- или β -галактопиранозной конфигурацией [7]. С помощью гомоядерного двойного резонанса удалось установить положение и характер расщепления сигналов протонов H_2 — H_4 пиранозного остатка (табл. 2). В частности, из этих данных следует, что сахарный остаток имеет галактопиранозную конфигурацию заместителей и фосфатную группу при С3 (слабопольное положение сигнала H_3 и дополнительное расщепление за счет взаимодействия с ^{31}P). В спектре имеется сигнал одной COCH_3 -группы, подтверждающий наличие ацетамидосахара в полимере.

Двумерный корреляционный $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -спектр позволил однозначно идентифицировать сигналы С1—С4 пиранозного остатка и подтвердить наличие атома азота именно при С2 пиранозы, а фосфатного остатка — при С3 (сильнопольный сдвиг С2 при 52,50 м. д. и наличие КССВ и слабопольный сдвиг С3 при 76,45 м. д. и уширение сигнала).

Таким образом, в составе повторяющегося звена полимера найдены 2-ацетамидо-2-деокси- β -D-галактопираноза с фосфатным остатком при С3 и незамещенный остаток глицерина с неэквивалентными фосфатными группами и идентифицированы все сигналы этих остатков в спектре ^{13}C -ЯМР. Оставшиеся три сигнала, несомненно, принадлежат еще одному остатку глицерина, алкилированному по С2 и фосфорилированному по С3. Об этом свидетельствует слабопольный сдвиг сигнала при 80,20 м. д. (CH -группа согласно АРТ-спектру) и его расщепление в дублет, а также уширение пика при 65,55 м. д. и отсутствие расщепления или уширения пика при 62,15 м. д. (CH_2 -группы). Окончательная структура повторяю-

Параметры спектра ^{13}C -ЯМР

| Атом | Химический сдвиг | Вид сигналов в спектре с подавлением протонов (J , Гц) * | АРТ ** |
|-----------------|------------------|---|-----------------|
| C1 | 67,30 | ус | CH ₂ |
| C2 | 70,65 | т (8,5) | CH |
| C3 | 67,30 | ус | CH ₂ |
| C1' | 62,45 | с | » |
| C2' | 80,20 | д (7,3) | CH |
| C3' | 65,55 | ус | CH ₂ |
| C1'' | 102,15 | с | CH |
| C2'' | 52,50 | д (7,3) | » |
| C3'' | 76,45 | ус | » |
| C4'' | 68,10 | с | » |
| C5'' | 75,80 | с | » |
| C6'' | 62,15 | с | CH ₂ |
| CO | 176,10 | с | C |
| CH ₃ | 23,7 | с | CH ₃ |

* Условные обозначения: с — синглет, ус — уширенный синглет, д — дублет, т — триплет.
 ** АРТ — тест на присоединенные протоны [6].

Таблица 2

Параметры спектра ^1H -ЯМР

| Протоны | Химический сдвиг протонов | Характер расщепления (J , Гц) ** |
|---------|---------------------------|-------------------------------------|
| H1'' | 4,66 | д ($J_{1,2}=7,8$) |
| H2'' | 4,01 | дд ($J_{2,3}=9,1$) |
| H3'' | 4,16 | ддд ($J_{3,4}=3,2$; $J_{H,P}=8$) |
| H4'' | 4,10 | ус |
| H5'' | 3,66 * | |
| H6'' | 3,75 * | |
| H1' | 3,64 *; 3,69 * | |
| H2' | 3,97 * | |
| H3' | 3,86 * | |
| H2 | 3,96 * | |

* Химический сдвиг определен из двумерного $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -спектра.

** Обозначения как в табл. 1.

щегося звена полимера, отвечающая известным закономерностям по влиянию фосфорилирования на химические сдвиги ^{13}C в глицериновых и углеводных остатках и на расщепление сигналов [5], а также по влиянию гликозилирования на химические сдвиги в полиольных остатках [5, 8] представлена на рис. 1. Тейхоевая кислота с предлагаемой структурой ранее в бактериальных организмах не была найдена.

Экспериментальная часть

Протонные спектры сняты на приборе WM-250 Bruker с рабочей частотой 250 МГц в растворе D₂O при 70° С. Химические сдвиги отсчитаны от сигнала ацетона как внутреннего эталона (2,23 м. д.). ^{13}C -ЯМР и двумерные спектры снимали на приборе AM-300 Bruker с рабочей частотой по углероду 75 МГц и протонам 300 МГц. Спектры снимали в растворах D₂O при 70° С. Эталонном служил также ацетон (δ ^{13}C 31,45 м. д.). При съемке двумерного корреляционного спектра $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ использовали стандартную программу фирмы Bruker из математического обеспечения к ЭВМ Aspect 3000. Для спектра использовалась матрица 2K × 128N во втором и первом измерениях соответственно. Спектральное окно во втором измерении (^{13}C) составляло 4065 Гц, в первом (^1H) — 200 Гц. Использовали следующие задержки: D1 (релаксационная) 1 с, D3 и

D_4 — 3,2 и 1,6 с (оптимально для КССВ 155 Гц). 90-градусные импульсы для протонов и углерода имели длительность 25,5 и 14 мкс соответственно. При фурье-преобразовании использовали в обоих измерениях синусоидальные функции с нулевым сдвигом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1976. V. 26. № 4. P. 487—493.
2. Стрешинская Г. М., Тульская Е. М., Терехова Л. П., Галатенко О. А., Наумова И. Б., Преображенская Т. П. // Докл. АН. 1989. Т. 309. № 2. С. 477—480.
3. Tartykova S. D., Terekhova L. P., Adanin V. M. // F. E. C. S. Fifth international conference on chemistry and biotechnology of biologically active natural products. 1989. Varna. Bulgaria. V. 4. P. 452—454.
4. Потехина Н. В., Наумова И. Б., Шашков А. С., Терехова Л. П. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 399—404.
5. Naumova I. B., Potekhina N. V., Duigimbayev C., Shashkov A. S., Terekhova L. P., Preobrazhenskaya T. P. // Arch. Microbiol. 1986. V. 146. № 2. P. 256—262.
6. Patt S. L., Shooley J. N. // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. № 3. P. 535—539.
7. Altona C., Hassnoot C. A. G. // Organ. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
8. Шашков А. С., Стрешинская Г. М., Наумова И. Б. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 782—785.

Поступило в редакцию
6.II.1990

A. S. SHASHKOV, E. M. TUL'SKAYA*, G. M. STRESHINSKAYA*, L. P. TEREKOVA**,
O. A. GALATENKO**, I. B. NAUMOVA*

NMR SPECTROSCOPIC STUDY OF THE CELL WALL TEICHOIC ACID FROM *NOCARDIOPSIS DASSONVILLEI* IMRU 509

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

** Department of Microbiology, M. V. Lomonosov Moscow State University;*

*** Institute for New Antibiotics, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR study of the cell wall teichoic acid from a typical species *Nocardioopsis* genus, *N. dassonvillei* IMRU 509, established that an unusual type of the polymer, its monomeric unit having the following structure:

