



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

TOM 19 * № 4 * 1993

УДК 577.114.5:543.422.23:579.87

© 1993 А. С. Шашков, В. А. Малышева
(В. А. Гнилозуб) *, И. Б. Наумова *, Г. М. Стрешинская *,
Л. И. Евтушенко **

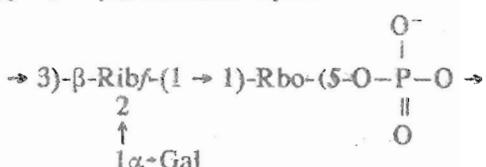
ПОЛИ(РИБОФУРАНОЗИЛРИБИТФОСФАТ) В СОСТАВЕ КЛЕТОЧНОЙ
СТЕНКИ *Agromyces cerinus* subsp. *nitratius*
ВКМ Ас-1351

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

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

^{**} Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Пущино.

Клеточная стенка *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* содержит рибиттейховую кислоту, структура которой была известна ранее в клетках прокариот. Повторяющаяся единица полимера имеет следующее предполагаемое строение:



Структура полимера установлена ЯМР-спектроскопией, мономерный состав подтвержден химическим анализом.

Ранее мы сообщали, что клеточные стенки недавно описанных видов рода *Aeromyces* [1] содержат тейхоевые кислоты [2]. Однако структура этих полимеров не исследовалась. В настоящей работе мы изучили строение тейхоевой кислоты клеточной стенки *Aeromyces cerinus* subsp. *nitratus* ВКМ Ac-1351.

Было известно, что клеточная стенка этого актиномицета интересна тем, что ее пептидогликан содержит диаминомасляную кислоту и в составе стенки найден моносахарид рибоза [1].

Клеточная стенка, полученная разрушением мицелия с помощью ультразвука с дальнейшим дифференциальным центрифугированием, содержала 1,3% фосфора. Среди продуктов ее кислотного гидролиза был идентифицирован рибитфосфат, что могло указывать на присутствие в составе клеточной стенки риббитхоеевой кислоты. Отсутствие дифосфата рибита в гидролизате свидетельствовало о том, что полимер не содержит поли(рибитфосфатной) цепи и, возможно, является поли(гликозилрибитфосфатом). Такие полимеры ранее в актиномицетах не были найдены. Представляло интерес изучить структуру выделенного полимера.

Полимер был получен из целых клеток обработкой 10% трихлоруксусной кислотой, осажден спиртом, очищен перерастворением в воде и далее ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl 650 M в градиенте концентрации NaCl. Полимер элюировался в 0,15 M NaCl.

Тейхосовая кислота была исследована ЯМР-спектроскопическим методом. Спектр ^{13}C -ЯМР содержал 16 линий, из которых две находились в области

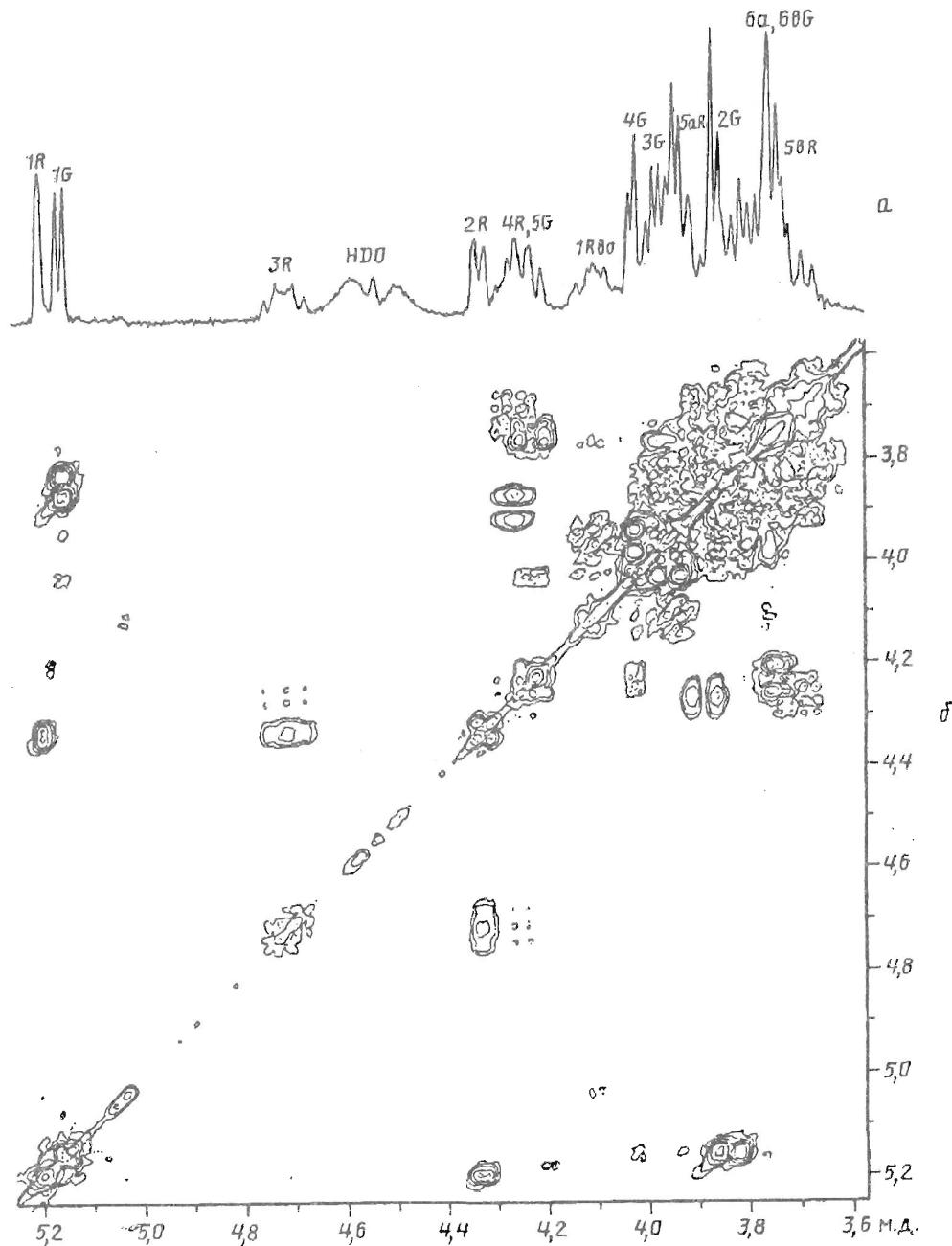


Рис. 1. Спектр ^1H -ЯМР (а) и двумерный COSY-спектр тейхоевой кислоты (б). Обозначения над пиками показывают номер протона в остатке β -рибофуранозы (R), α -галактопиранозы (G) и рибита (Rbo)

резонанса атомов углерода, связанных с двумя атомами кислорода (106,2 и 98,8 м. д.), и четыре, согласно АТР-спектру [3], принадлежали гидроксиметильным группам (62,4; 63,4 м. д.; сигналы незамещенных CH_2OH -групп; 68,1 м. д., уширенный сигнал, характерный для CH_2O -группы, несущей фосфатную группировку [4], и 70,2 м. д., сигнал, характерный для алкилированной гидроксимильтильной группы) (рис. 2, табл. 2).

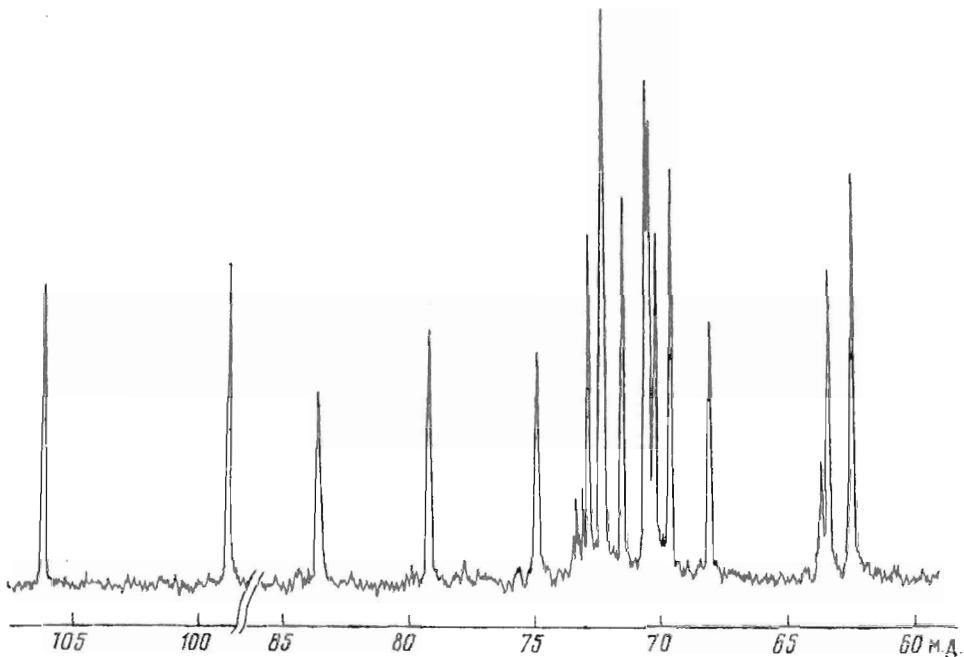
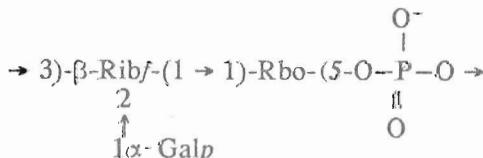


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР тейхоевой кислоты

В спектре ^1H -ЯМР (рис. 1, табл. 1) наблюдались два характерных сигнала в области резонанса протонов при аномерном центре. 2D-COSY-спектр (рис. 1) позволил определить положение сигналов углеводных остатков, после чего с помощью одномерной спектроскопии двойного резонанса в разностном варианте [5] были определены КССВ для всех протонов в двух остатках. Согласно величинам КССВ [6, 7], один из остатков был идентифицирован как α -галактопираноза, другой — как β -рибофураноза. Для сигнала H-3 последнего наблюдалось дополнительное расщепление, связанное с наличием КССВ с гетероядром. Съемка спектра ^{31}P подтвердила наличие фосфора в образце (сигнал +1,2 м. д., типичный для фосфодиэфирной связи [8]). Помимо сигналов сахарных остатков в спектре ^1H -ЯМР наблюдались сложные мультиплеты, принадлежащие, очевидно, протонам полиола (судя по числу «остаточных» сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР — пентита),

Съемка двумерного гетероядерного корреляционного спектра $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ COSY позволила однозначно отнести все сигналы ^{13}C сахарных остатков (табл. 2) и показать, что остаток галактозы является концевым (незамещенным), остаток рибофuranозы замещен в положении 3 фосфатной группировкой, а в положении 2 гликозилирован. Эффекты алкилирования в спектре ^{13}C -ЯМР наблюдались также для C-1 рибофuranозы и C-1 рибита. Для другой гидроксиметильной группы пентита в спектре ^{13}C -ЯМР наблюдался типичный эффект фосфорилирования (сдвиг сигнала в слабое поле на 4—5 м. д. и его уширение).

Таким образом, полимерная цепь, по данным ЯМР, выглядит следующим образом:



Эксперименты с ядерным эффектом Оверхаузера подтверждают предложенную структуру: предоблучение аномерного простона α -D-галактопиранозы вызывает

Таблица 1

Параметры спектра ^1H -ЯМР тейховой кислоты (D_2O , 60° С)

Остаток	δ , м. д.	Видимая мультиплетность	КССВ, Гц
α -Galp	H-1	5,16	д
	H-2	3,84	дд
	H-3	3,96	дд
	H-4	4,02	уд
	H-5	4,22	ут
	H-6a, 6b	3,75	д
β -Ribf	H-1	5,20	ус
	H-2	4,33	дд
	H-3	4,72	ддд
	H-4	4,26	ддд
	H-5a	3,89	дд
	H-5b	3,71	дд
Rbo	H-1a	4,10	м
	H-1b + H-2	3,9—4,0	
	H-3 *	3,75	
	H-4 **	3,97	м
	H-5a **	3,90	дд
	H-5b **	3,78	дд

* Отнесение сделано из гетероядерного спектра $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -COSY.

** Отнесение получено из разностного спектра ЯЭО для протонов.

Таблица 2

Химические сдвиги (δ , м. д.) ^{13}C -ЯМР тейховой кислоты (D_2O , 60° С)

Остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -Galp	98,8	69,6	70,6	70,45	72,35	62,4
β -Ribf	106,2	79,2 *	74,9 *	83,6 *	63,4	
Rbo	70,2	71,5	72,9	72,3 *	68,1 *	

* Уширенный сигнал за счет расщепления на ядрах ^{31}P .

ослабление сигнала H-2 собственного остатка и H-2 остатка рибофуранозы; предоблучение аномерного протона β -рибофуранозы приводит к появлению в разностном спектре ЯЭО [9] двух основных сигналов — H-2 этого остатка (дублетов, 4,33 м. д.) и H-4 остатка рибита (мультиплет, 3,97 м. д.), а также минорных по интенсивности пиков H-5a и H-5b рибита (дублеты дублетов, 3,90 и 3,78 м. д. соответственно) (см. табл. 1).

Данные ЯМР-спектроскопического бездеструктивного метода исследования были подтверждены анализом мономерного состава тейховой кислоты. В кислотном гидролизате препарата были идентифицированы рибоза и галактоза в эквимольном отношении и рибитфосфат.

Приведенная выше структура ранее в микроорганизмах не была найдена. Близкий по структуре полимер, содержащий поли(рибофуранозилрибитофосфатную) цепь, но без галактозильных заместителей, обнаружен в капсулном материале грамотрицательной бактерии *Haemophilus influenzae*, тип b [10, 11].

Экспериментальная часть

Штаммы выращивали 16 ч в аэробных условиях на пептонно-дрожжевой среде при 28° С. Биомассу собирали центрифугированием, обрабатывали спиртом и ацетоном и высушивали в потоке воздуха.

Клеточные стенки получены согласно [12]. Выделение тейхоевой кислоты, ее очистка, кислотный гидролиз, идентификация рибитофосфата и моносахаридов описаны в работе [13]. Спектры ^1H -ЯМР сняты на приборе WM-250 (Bruker) с рабочей частотой по протонам 250 МГц при 60° С с ацетоном в качестве внутреннего стандарта (δ 2,225 м. д.). Спектры ^{13}C -ЯМР получены на приборе AM-300 (Bruker) с рабочей частотой по углероду 75 МГц с ацетоном в качестве внутреннего стандарта (δ 31,45 м. д.). Для съемки гетероядерного спектра $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ использовали стандартную методику Bruker XHCORRD.

В настоящее время мы продолжаем исследовать структуру полимера химическими методами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zgurskaya H. I., Evtushenko L. I., Akimov V. N., Voyevoda H. V., Lysak L. V., Dobrovolskaya T. G., Kalakoutskii L. V. // Int. J. System. Bact. 1992. V. 42. In press.
2. Zgurskaya H., Gnilozub V., Evtushenko L., Kalakoutskii L. // Intern. Symp. on Biology Actinomycetes. ISBA, USA, 1991, P3—012.
3. Patt S. L., Shoolery J. N. // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. № 3. P. 535—538.
4. Шашков А. С., Стрешинская Г. М., Наумова И. Б. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 782—785.
5. Бенидзе М. М., Джикая О. Д., Пхеидзе Т. А., Кемертелидзе Э. И., Шашков А. С. // Химия природ. соединений. 1987. № 4. С. 537—542.
6. Altona C., Haasnoot C. A. G. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
7. Angyal S. J. // Carbohydr. Res. 1979. V. 77. P. 37—50.
8. Потехина Н. В., Наумова И. Б., Шашков А. С., Терехова Л. П. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 399—404.
9. Янушкене Н. А., Шашков А. С., Наумова И. Б., Стрешинская Г. М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1634—1640.
10. Crisel R. M., Baker R. S., Dorman D. E. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 13. P. 4926—4930.
11. Branefors-Helander P., Erbring C., Kenne L., Lindberg B. // Acta chem. scand. 1976. V. B 30. № 3. P. 276—277.
12. Наумова И. Б., Шашков А. С., Строганова М. П. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1529—1537.
13. Потехина Н. В., Наумова И. Б., Шашков А. С., Кузнецов В. Д. // Биохимия. 1992. Т. 57. № 8. С. 1197—1205.

Поступила в редакцию
16.X.1992

A. S. Shashkov, V. A. Malyshova (V. A. Gnilozub), I. B. Naumova*,
G. M. Streshinskaya*, L. I. Evtushenko ***

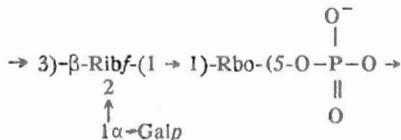
**POLY(RIBOFURANOSYL-RIBITOL PHOSPHATE) IN CELL WALL
OF *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* VKM Ac-1351**

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;

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

**** Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
Pushchino**

Cell wall of *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* contains ribitolteichoic acids, previously unknown in prokaryotic cells. The following structure of the repeating unit of the chain was proposed:



The structure of the polymer was elucidated by NMR spectroscopy and confirmed by chemical analysis.