



УДК 547.915 : 576.852.1

БЕСФОСФОРНЫЕ ОРНИТИНОЛИПИДЫ — ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АНАЛОГИ МЕМБРАННОГО ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНА В АКТИНОМИЦЕТАХ

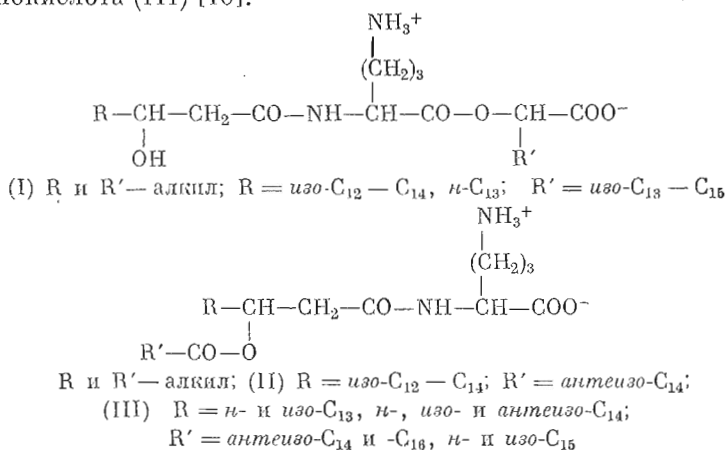
**Батраков С. Г., Конова И. В., Касымбекова С. К.,
Бергельсон Л. Д.**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;*

Институт микробиологии Академии наук СССР, Москва

Показано, что культура *Actinomyces olivaceus*, растущая на среде с недостаточным количеством фосфора, в отличие от культуры, растущей на полноценной среде, практически не продуцирует фосфатидилэтанолamina и содержит в качестве единственного амфотерного липида бесфосфорный орнитинолипид. Тем самым подтверждено высказанное ранее авторами предположение о взаимозаменяемости фосфатидилэтанолamina и орнитинолипидов в клеточных мембранах актиномицетов.

Высшие формы актиномицетов продуцируют в качестве основных полярных клеточных липидов два кислых фосфолипида, бис-фосфатидил-глицерин и фосфатидилинозитманнозид, и амфотерный фосфатидилэтанол-амин [4—6]. Однако обнаружены культуры, в липидах которых фосфатидилэтанолamin содержится лишь как минорный компонент или даже полностью отсутствует, а доминирующими амфотерными компонентами являются бесфосфорные орнитинолипиды (I) — (III). Липоаминокислота (I) найдена в *Actinomyces* [660-15 [7, 8], где на ее долю приходилось 30—35% суммы полярных липидов, а орнитинолипид (II) составлял ~50% суммарных полярных липидов клеток *Act. globisporus* 1141 [9]. В обеих названных культурах содержание фосфатидилэтанолamina не превышало 10%. Наконец, в мицелии *Act. aureoverticillus* 1306 фосфатидилэтанолamin совершенно отсутствовал, а единственным биполярным липидом была липоаминокислота (III) [10].



В предыдущих сообщениях [9, 10], посвященных орнитолипидам актиномицетов, мы высказали предположение, что биполярные бесфосфорные липоаминокислоты типа (I) — (III) синтезируются в качестве функциональных аналогов мембранного фосфатидилэтаноламина, когда микроорганизмы находятся в условиях фосфатного голодания. С целью проверки этого предположения мы изучили состав полярных липидов штамма *Act. olivaceus* (продуцента витамина B₁₂), растущего на полноценной синтетической среде А (см. «Экспериментальную часть») и на среде Б, дефицитной по фосфору. Ниже описываются результаты этого исследования.

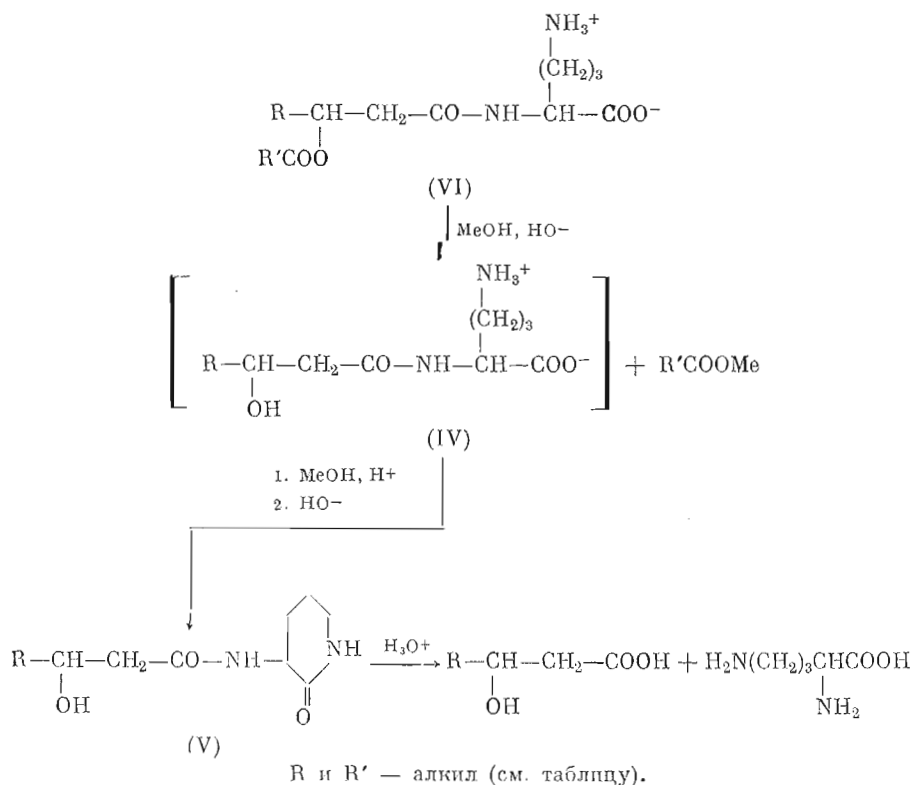
По липидному составу культура *Act. olivaceus*, выращенная на полноценной среде А, не отличалась от большинства исследованных актиномицетов (ср. [1—6]). Главными компонентами суммарных липидов были фосфолипиды (72% — здесь и далее от суммы липидов), среди которых доминировали бис-фосфатидилглицерин (26%), фосфатидилэтаноламин (37%) и фосфатидилинозитманнозид (9%); малополярные нейтральные липиды состояли в основном из триглицеридов (25%). Иным оказался липидный спектр мицелия, выращенного в фосфатдефицитных условиях. Содержание триглицеридов в этом случае превышало 80%, а среди фосфолипидов были обнаружены в заметных количествах только бис-фосфатидилглицерин и фосфатидилинозитманнозид (общее содержание 5,5%); фосфатидилэтаноламин присутствовал в виде следов. В то же время среди полярных липидов появился новый нингидринположительный компонент (4,5%), дающий отрицательный тест с реактивом на фосфолипиды [11] и мигрировавший при ТСХ на силикагеле в кислотных, нейтральных и основных системах растворителей довольно близко от фосфатидилэтаноламина. Указанное хроматографическое поведение липида говорило о его биполярном характере. С целью выделения и идентификации нового компонента суммарные липиды актиномицета подвергали ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе [12]. При этом рассматриваемый липид элюировался вместе с фосфатидилэтаноламином нейтральной системой растворителей (хлороформ — метанол, 7 : 3, ср. [12]), что подтверждало сходство ионных свойств обоих липидов. Бесфосфорный липид был освобожден от следов фосфатидилэтаноламина хроматографированием на силикагеле и получен в хроматографически индивидуальном состоянии.

ИК-спектр липида содержал полосы валентных колебаний связей N—H амино- и амидогрупп (3450, 3332, 3055 см⁻¹), сложнопольных колебаний ионизированной карбоксильной группы (1585 и 1415 см⁻¹), амидные полосы I и II (1632 и 1538 см⁻¹). Сходство этого ИК-спектра со спектрами орнитолипидов (II) и (III) [9, 10], а также одинаковая хроматографическая подвижность всех трех липидов позволили предположить, что они обладают сходной структурой. Это предположение подтвердилось в результате изучения продуктов деградации липида и анализа его масс-спектра.

В условиях мягкого щелочного метанолиза липид распадался на метиловые эфиры жирных кислот и липофильное нингидринположительное вещество (IV) (схема 1), которое после обработки раствором HCl в метаноле, а затем основанием давало лактам (V), идентичный по хроматографическому поведению и ИК-спектру аналогичным продуктам расщепления орнитолипидов (I) — (III) [7—10]. Кислотный гидролиз лактама (V) в жестких условиях привел к образованию жирных 3-оксикислот и единственного гидрофильного продукта, который при помощи ТСХ был идентифицирован как орнитин. Негидроксилированные жирные кислоты, образовавшиеся при щелочном метанолизе липида, и вышеуказанные 3-оксикислоты анализировали методом комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии; полученные данные представлены в таблице.

Приведенные результаты структурного анализа орнитолипида из *Act. olivaceus* дают возможность предложить для него строение (VI), аналогичное строению липоаминокислот (II) и (III). Отличие первого ве-

Схема 1

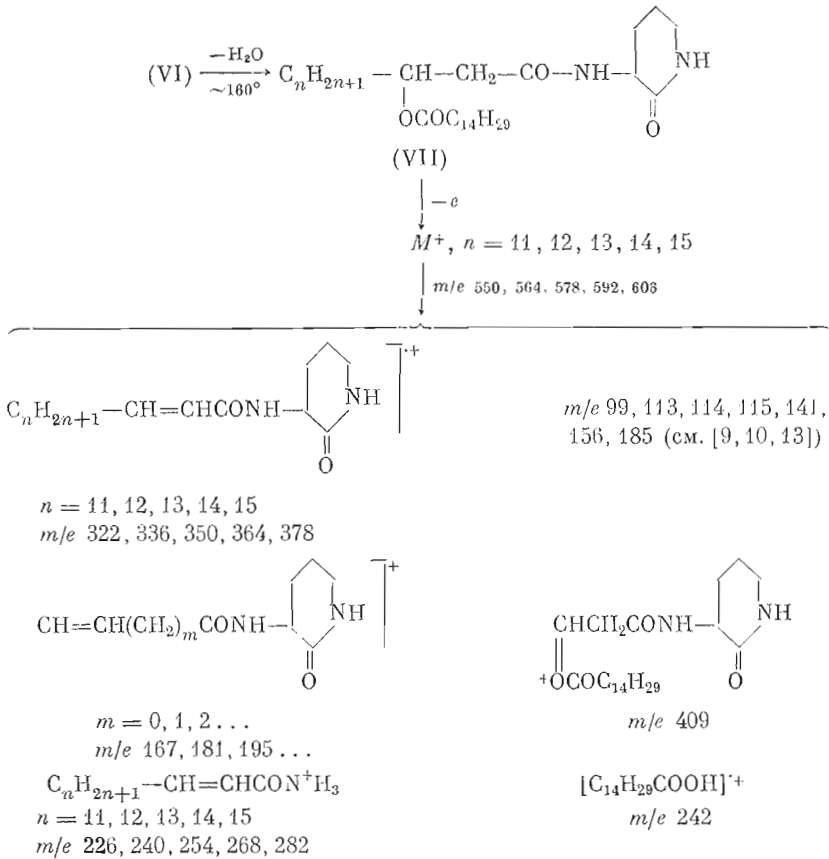


щества от двух последних наблюдается лишь в жирнокислотном составе. Окончательно структура липоаминокислоты (VI) была доказана при помощи масс-спектрометрии. В масс-спектре липида (VI) (см. рисунок) присутствовали все пики (при m/e 99, 113, 114, 115, 141, 156 и 185), характерные для липоаминокислот указанного типа [9, 10, 13]. В области наибольших массовых чисел спектра находились пики гомологичных молекулярных ионов с m/e 550, 564, 578, 592 и 606 продуктов термической циклизации липида по орнитинному остатку — лактамов (VII) [9, 10]. Сооставление перечисленных значений m/e с данными анализа жирнокислотного состава липида (см. таблицу) показывает, что эти пики отвечают лактамам (VII), содержащим жирноацильные остатки в комбинациях: $\text{C}_{15:0}$ — 3-окси- $\text{C}_{14:0}$ (m/e 550), $\text{C}_{15:0}$ — 3-окси- $\text{C}_{15:0}$ (564), $\text{C}_{15:0}$ — 3-окси- $\text{C}_{16:0}$ (578), $\text{C}_{15:0}$ — 3-окси- $\text{C}_{17:0}$ (592), $\text{C}_{15:0}$ — 3-окси- $\text{C}_{18:0}$ (606). Очевидно, что липоаминокислоты с указанными сочетаниями жирнокислотных остатков являются основными молекулярными видами орнитинолипидной фракции. Структуры остальных ионов масс-спектра, важных с точки зрения идентификации орнитинолипидов (VI), представлены на схеме 2 (ср. [10]).

Жирнокислотный состав орнитинолипидов (VI) из *Act. olivaceus*

Типы кислот	Содержание, %		Типы кислот	Содержание, %	
	негидроксилированные кислоты	3-оксикислоты		негидроксилированные кислоты	3-оксикислоты
<i>изо</i> - $\text{C}_{14:0}$	4	9	<i>н</i> - $\text{C}_{16:0}$	5	2
<i>н</i> - $\text{C}_{14:0}$	1	Следы	<i>н</i> - $\text{C}_{16:1}$	1	—
<i>изо</i> - $\text{C}_{15:0}$	—	1	<i>изо</i> - $\text{C}_{17:0}$	—	4
<i>анти</i> <i>изо</i> - $\text{C}_{15:0}$	81	14	<i>анти</i> <i>изо</i> - $\text{C}_{17:0}$	4	33
<i>изо</i> - $\text{C}_{16:0}$	4	35	<i>изо</i> - $\text{C}_{18:0}$	Следы	2

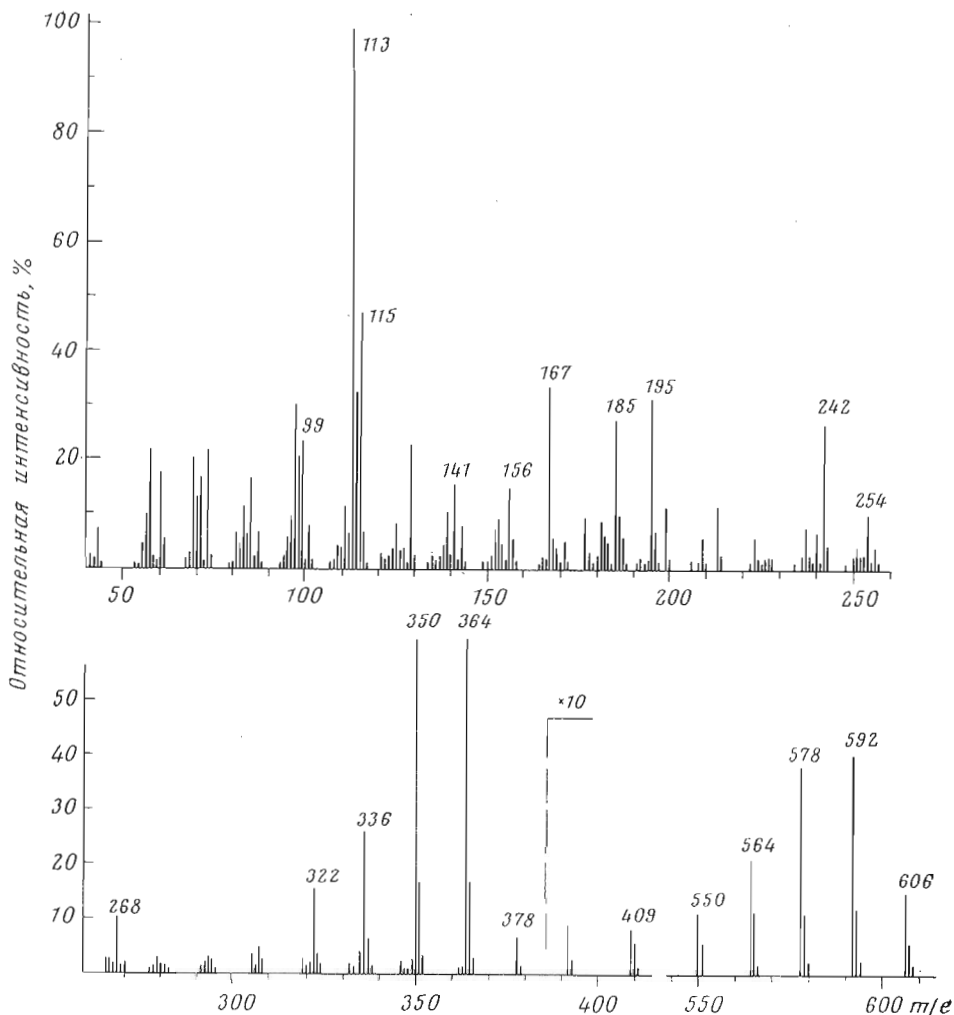
Схема 2



Описанные выше результаты сравнительного изучения липидов культуры *Act. olivaceus*, выращенной на полноценной и дефицитной по фосфату средах, подтверждают высказанное нами ранее предположение о взаимозаменяемости в клеточных мембранах актиномицетов амфотерных липидов — фосфатидилэтаноламина и бесфосфорных орнитолипидов [10]. К аналогичному выводу в отношении псевдомонад пришли недавно Миникин и сотр. [14]. Данные работы [14] и настоящего исследования подтверждают гипотезу Раузера и сотр. [15] о взаимозаменяемости в клеточных мембранах липидов, принадлежащих к различным химическим классам; необходимым условием такой замены должно быть сохранение общего заряда мембраны. Это условие в случае *Act. olivaceus* соблюдается: количественное отношение суммарных кислых липидов (бис-фосфатидилглицерина и фосфатидилинозитманнозида) к амфотерным липидам (фосфатидилэтаноламину или орнитолипиду) остается практически постоянным вне зависимости от изменений состава культуральной среды.

Экспериментальная часть

Для хроматографии на колонках применяли силикагель марки КСК (100—150 меш) Воскресенского химкомбината, обработанный ранее описанным способом [16]. ТСХ проводили на силикагеле той же марки микрометодом Светашева и Васьковского [17]. Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием следующими реагентами: 50% серной кислотой с последующим нагреванием пластинок (20—30 мин) при $\sim 200^\circ$, 0,3% раствором нингидрина в MeOH с последующим нагреванием (10—15 мин) при 100° , реагентом на фосфолипиды [11], антроновым ре-



Масс-спектр орнитинолипида (VI) из *Act. olivaceus*

агентом [18] и периодатом — реактивом Шиффа [19]. Для идентификации и количественного анализа глицеролипидов и жирных кислот использовались методы, описанные в сообщении [20].

ИК-спектры регистрировали на спектрографе UR-10 (Zeiss, ГДР) в таблетках с KBr. Масс-спектры получали на масс-спектрометре LKB-9000 (Швеция) при энергии ионизирующих электронов 29 эВ и ускоряющем напряжении 3,5 кВ; температура испарения для орнитинолипида $\sim 160^\circ$.

Культуру *Act. olivaceus* (из коллекции Института микробиологии АН СССР) поддерживали на картофельном агаре, откуда брали споры для получения посевного материала. В качестве последнего использовали 48-часовой вегетативный мицелий, выращенный на среде А, содержащей 2% глюкозы, 0,54% сукцината аммония, 0,5% NaCl, 0,1% $MgSO_4$, 0,12% K_2HPO_4 , 0,063% KH_2PO_4 , 0,001% $MnSO_4$, 0,001% $ZnSO_4$, 0,001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3% $CaCO_3$ и 0,001% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ [21]. Исследуемый мицелий выращивали в условиях погруженного культивирования в 3-литровых колбах, содержащих по 500 мл либо среды А, либо среды Б, содержащейся от среды А отсутствием фосфатов, при встряхивании на качалках (140—160 об/мин) при 26—28° в течение 72 ч. Посевной материал вносили в количестве 4—8% от объема среды.

Клетки отделяли центрифугированием, промывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Экстракцию суммы клеточных липидов, освобождение их от нелипидных примесей и высушивание осуществляли по ранее описанной методике [16]. Из культур, выращенных на средах А и Б, получили соответственно 4,5 и 5,3 % (от веса сухих клеток) суммарных липидов.

Выделение орнитолипида (VI). Раствор 1,31 г суммарных липидов «культуры Б» в 50 мл смеси CHCl_3 — MeOH (9 : 1) наносили на колонку с 50 г DEAE-целлюлозы (AsO^- -форма [12]). Элюирование проводили следующими системами растворителей (по 400 мл): 1) CHCl_3 — MeOH , 9 : 1; 2) CHCl_3 — MeOH , 7 : 3; 3) CHCl_3 — AsOH , 4 : 1; 4) MeOH ; 5) CHCl_3 — MeOH (2 : 1) + 10% NH_4OH . Соответственно получили 5 фракций: 1) триглицериды — 1,15 г (88%); 2) орнитолипид (VI) с примесью фосфатидилэтаноламина — 40,2 мг (4,5%); 3) свободные жирные кислоты — 6 мг (0,5%); 4) практически холостая фракция; 5) смесь бис-фосфатидилглицерина и фосфатидилинозитманнозида — 45,6 мг (5,5%).

Фракцию 2 наносили в 1 мл CHCl_3 на колонку с 20 г силикагеля, последовательно вымывали смесями CHCl_3 — MeOH (по 100 мл): 9 : 1, 5 : 1, 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1 и 1 : 1. Собирали элюаты по 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системах растворителей: CHCl_3 — MeOH — вода (65 : 25 : 4), CHCl_3 — MeOH — конц. NH_4OH (65 : 25 : 4) и CHCl_3 — ацетон — MeOH — AsOH — вода (20 : 20 : 10 : 2 : 1). Элюаты, полученные при вымывании смесью CHCl_3 — MeOH (1 : 1), содержали индивидуальный орнитолипид (VI), R_f в вышеперечисленных системах растворителей — 0,62; 0,50 и 0,71 соответственно.

Дегградация орнитолипида (VI). К раствору 12,7 мг липоаминокислоты (VI) в 0,5 мл смеси CHCl_3 — MeOH (1 : 1) добавляли 0,5 мл 0,3 М раствора KOH в MeOH , смесь оставляли на 2 ч при 25°, после чего разбавляли 2 мл MeOH и нейтрализовали дауэксом 50×8 (H^+ -форма). Растворители отгоняли, остаток обрабатывали при 25° 1 мл 3% раствора HCl в MeOH . Смесь оставляли при той же температуре на 12 ч, затем нейтрализовали дауэксом 1×8 (HO^- -форма), упаривали, остаток наносили в 1 мл CHCl_3 на колонку с 5 г силикагеля; 20 мл CHCl_3 вымывали метиловые эфиры жирных кислот, 20 мл смеси CHCl_3 — MeOH (20 : 1) элюировали лактам (V), R_f 0,25 (CHCl_3 — MeOH , 20 : 1), 0,20 (CHCl_3 — ацетон, 6 : 1).

Гидролиз лактама (V). Смесь 1,6 мг лактама (V) и 0,5 мл 6 н. соляной кислоты нагревали 36 ч при 105° в запаянной ампуле. По охлаждении смесь разбавляли 2 мл воды и экстрагировали CHCl_3 (2×3 мл). Экстракт промывали 1 мл воды, упаривали, остаток обрабатывали раствором CH_2N_2 в эфире. После упаривания раствора получили метиловые эфиры жирных 3-оксикислот, которые идентифицировали при помощи ТСХ в системе растворителей гексан — эфир (85 : 15) и в CH_2Cl_2 ; в качестве стандарта использовали метиловый эфир 3-оксистерариновой кислоты. Состав полученной фракции 3-оксикислот определяли методом ГЖХ-масс-спектрометрии в ранее описанных условиях [8]. Объединенную водную фазу гидролизата упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл воды, раствор упаривали, остаток идентифицировали как орнитин при помощи ТСХ на силуфол в системах фенол — вода (775 : 225) + 1% конц. NH_4OH и *n*-пропанол — конц. NH_4OH (7 : 3); в качестве стандартов использовали орнитин и лизин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kataoka T., Nojima S. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **144**, 681—683.
2. Lanéelle M.-A., Asselineau J., Castelnuovo G. (1968) *Ann. Inst. Pasteur*, **114**, 305—312.
3. Kimura A., Kawanami J., Otsuka H. (1967) *J. Biochem.*, **62**, 384—385.
4. Kimura A., Kawanami J., Otsuka H. (1967) *Agr. and Biol. Chem.*, **31**, 1434—1440.
5. Pommier M. T., Michel G. (1973) *Biochem. Syst.*, **1**, 3—12.

6. Батраков С. Г., Корвицкая Е. Я., Саркисян Ш. Т., Бергельсон Л. Д. (1977) Изв. АН СССР. Сер. биол., 226—234.
7. Батраков С. Г., Пилюпенко Т. В., Бергельсон Л. Д. (1974) Докл. АН СССР, **200**, 226—228.
8. Батраков С. Г., Пилюпенко Т. В., Бергельсон Л. Д. (1972) Химия природн. соед., 145—153.
9. Батраков С. Г., Шуб М. М., Розынов Б. В., Бергельсон Л. Д. (1974) Химия природн. соед., 3—10.
10. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Мартякова А. В., Бергельсон Л. Д. (1977) Биоорган. химия, **3**, 920—930.
11. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. (1968) J. Lipid Res., **9**, 396.
12. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. (1963) J. Amer. Oil Chem. Soc., **40**, 425—454.
13. Clarke D. R., Waight E. S. (1971) J. Chem. Soc. (C), 3743—3748.
14. Minnikin D. E., Abdolrahimzadeh H. (1974) FEBS Lett., **43**, 257—260.
15. Rouser G., Yamamoto A., Kritchevsky G. (1971) Arch. Intern. Med., **127**, 1105—1121.
16. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. (1974) Biochim. et biophys. acta, **337**, 29—40.
17. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) J. Chromatogr., **67**, 376—378.
18. Eichberg J. J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. (1964) Biochem. J., **92**, 91—100.
19. Shaw N. (1968) Biochim. et biophys. acta, **164**, 435—436.
20. Батраков С. Г., Паносян А. Г., Конова И. В., Бергельсон Л. Д. (1976) Изв. АН СССР. Сер. биол., 678—687.
21. Конова И. В., Кислова Л. М., Герасимова Н. М. (1974) Микробиология, **43**, 242—246.

Поступила в редакцию
13.I.1977

NON-PHOSPHATE ORNITHINOLIPIDS AS FUNCTIONAL ANALOGS OF MEMBRANE PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE IN ACTINOMYCETES

BATRAKOV S. G., KONOVA I. V., KASYMBEKOVA S. K.,
BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, and Institute
of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The *Actinomyces olivaceus* cells cultivated under phosphate deficient conditions, as distinguished from those grown on a normal medium, produce only traces of phosphatidyl ethanolamine and contain a phosphateless ornithine lipoamino-acid as the major zwitterionic lipid. This fact confirms the authors' earlier suggestion on interchangeability of phosphatidyl ethanolamine and ornithinolipids in the membranes of actinomycetes.