



УДК 547.458.02: 543.422.23

СТРУКТУРА ТЕЙХОЕВЫХ КИСЛОТ ИЗ МОРСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Bacillus subtilis И *B. licheniformis*

© 1998 г. Н. А. Командрова[#], Р. П. Горшкова, В. В. Исаков, С. В. Томшич, Л. С. Шевченко,
Л. А. Романенко, О. И. Недашковская

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 10.06.97 г. Принята к печати 10.12.97 г.

Выделены и охарактеризованы тейхоевые кислоты из клеточных стенок морских бацилл *Bacillus subtilis* КММ 234 (Р-1) и *B. licheniformis* КММ 454 (1-1Г-2). Установлено, что тейхоевые кислоты обеих бацилл имеют идентичное строение и содержат остатки глюкозы, рибита и фосфорной кислоты. На основании данных ¹³С- и ³¹Р-ЯМР-спектроскопии тейхоевых кислот и продуктов их дефосфорилирования установлена структура биополимера: поли[→5)-4-О-β-D-глюкопиранозилрибит-(1-фосфо)-].

Ключевые слова: *Bacillus*, тейхоевые кислоты, ЯМР-спектроскопия, морские микроорганизмы.

Исследованные ранее штаммы некоторых представителей рода *Bacillus* показали большое разнообразие в строении их тейхоевых кислот. Так, в клетках *B. subtilis* var. *niger* WM найдена тейхоевая кислота, являющаяся 2,3-поли(глицерофосфатом), в котором остаток глицерина по положению 1 гликозилирован остатком β-D-глюкозы [1]. Тейхоевая кислота *B. subtilis* W23 (QR M12) представляет собой 1,5-поли(рибитфосфат), а в *B. subtilis* W23 остаток рибита в 1,5-поли(рибитфосфате) β-D-глюкозилирован по О4 [2].

Аналогичная рибиттейхоевая кислота найдена в клеточной стенке *Streptomyces azureus* RIA 1009 [3]. При исследовании клеточной стенки *B. licheniformis* ATCC 9945 [4] обнаружены тейхоевые кислоты, имеющие строение [→6)-α-D-Glcp-(1→1)-L-Gro-(3-PO₂⁻)_n и [→6)-β-D-Galp-(1→1)-L-Gro-(3-PO₂⁻)_n. Совсем недавно из *B. licheniformis* [5] выделены три тейхоевые кислоты, которые представляют собой [→3)-α-D-Galp-(1→1)-L-Gro-(3-PO₂⁻)_n и [→3)-β-D-Glcp-(1→2)-α-D-Galp-(1→1)-L-Gro-(3-PO₂⁻)_n.

Настоящая работа продолжает структурные исследования тейхоевых кислот из морских грамположительных микроорганизмов из коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОУ ДВО РАН [6] и посвящена изучению строения тейхое-

вых кислот из грамположительных бацилл *B. subtilis* КММ 234 (Р-1) (ТК-1) и *B. licheniformis* КММ 454 (1-1Г-2) (ТК-2), выделенных из двух разных источников Карибского моря.

Наращивание исследуемых культур проводили как описано ранее [6]. Независимое исследование тейхоевых кислот ТК-1 и ТК-2 показало, что оба образца имеют идентичную структуру.

Тейхоевые кислоты обоих штаммов выделяли из клеток микроорганизмов как описано [6]. После экстракции 10% трихлоруксусной кислотой биополимеры разделяли хроматографией на DEAE-Toyopearl 650M; при этом трис-НСl-буфером элюируется нейтральный полисахарид, а трис-NaCl – тейхоевая кислота. Тейхоевые кислоты при дальнейшей очистке гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 выходили второй фракцией. Они обладают серологической активностью, давая одну полосу преципитации с гомологичной антисывороткой, и перекрестно реагируют при двойной диффузии в агаре. Величина оптического вращения обеих тейхоевых кислот $[\alpha]_D^{20} -10^\circ$ (с 0,5, H₂O).

В продуктах кислотного гидролиза методами хроматографии на бумаге и газожидкостной хроматографии были идентифицированы остатки глюкозы, рибита и ангидрорибита. Неорганический фосфат обнаружен с помощью электрофореза на бумаге. Глюкоза была выделена в индивидуальном состоянии препаративной хроматографией на бумаге и на основании величины удельного оптического вращения отнесена к D-ряду. Содер-

[#] Автор для переписки.

жание фосфора в образце ТК-1 9.2%, а в ТК-2 – 10.4%.

В спектрах ^{31}P -ЯМР тейхоевых кислот обоих штаммов наблюдается сигнал при 1.4 м.д., который указывает на присутствие в структуре дезамещенного фосфата [7].

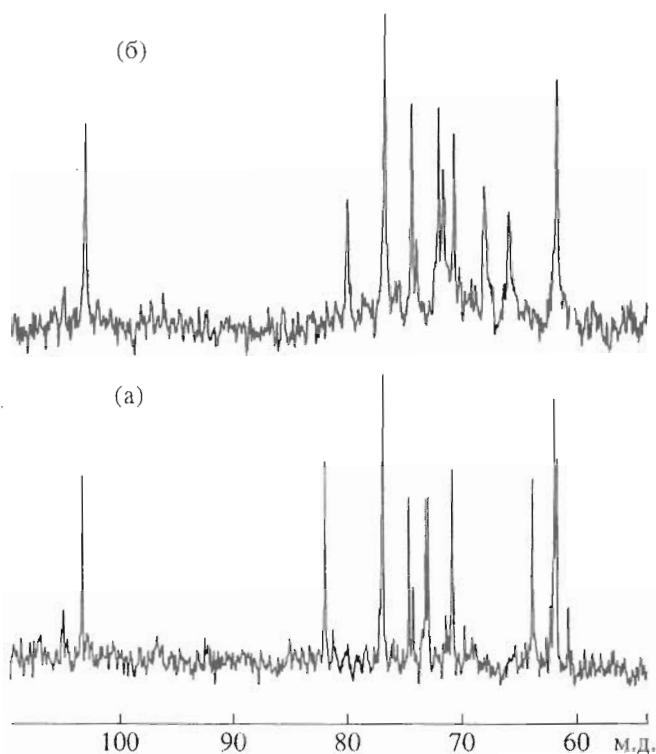
Для обеих тейхоевых кислот были сняты спектры ^{13}C -ЯМР, которые оказались полностью идентичными. При обработке тейхоевых кислот 40% водной HF (условия дефосфорилирования) с последующей гель-фильтрацией на TSK-40 выделены олигомерные продукты, имеющие идентичные спектры ^{13}C -ЯМР и близкие значения величин оптического вращения, $[\alpha]_D^{20} -5.8^\circ$ (c 1.6, вода) для ТК-1 и $[\alpha]_D^{20} -6.3^\circ$ (c 0.4, вода) для ТК-2.

Дополнительные детали строения ТК-1 и ТК-2 получены на основании данных ^{13}C -ЯМР-спектроскопии исходных биополимеров и продуктов их дефосфорилирования.

Впервые аналогичный спектр рибиттейхоевой кислоты из *Streptomyces azureus* RIA 1009 был получен и интерпретирован А.С. Шашковым и сотр. [3].

В спектрах ^{13}C -ЯМР исследуемых нами тейхоевых кислот (рисунок) наблюдается 10 сигналов углеродных атомов, один из которых (76.9 м.д.) имеет двойную интегральную интенсивность, т.е. общее число С-атомов в повторяющемся звене равно 11. В области резонанса аномерных атомов углерода наблюдается один сигнал при 103.2 м.д., указывающий на присутствие в повторяющемся звене молекул тейхоевых кислот только одного моносахаридного остатка. В дополнение к этому сигналу в спектрах также наблюдаются пять узких линий, совпадающих по величинам химических сдвигов с соответствующими сигналами спектра β -метилглюкопиранозида [8] (таблица). Пять оставшихся сигналов подтверждают наличие рибита.

Сопоставление ^{13}C -ЯМР-спектров исходных полимеров и продуктов их дефосфорилирования показывает, что сигналы β -D-глюкопиранозильного остатка в обоих образцах имеют совпадающие химические сдвиги (таблица). Отсюда следу-



Спектры ^{13}C -ЯМР исходных тейхоевых кислот *B. subtilis* КММ 234 и *B. licheniformis* КММ 454 (а) и их дефосфорилированных производных (б).

ет, что остаток глюкопиранозы не участвует в образовании фосфодиэфирной связи.

Сопоставление сигналов рибитной цепи в спектрах исходных тейхоевых кислот и продуктов их дефосфорилирования показывает, что уширенные сигналы при 68.2 и 66.1 м.д. в исходных полимерах сдвигаются в спектрах олигосахаридов в область относительно сильного магнитного поля на 4 м.д. (α -эффект от образования фосфодиэфирной связи). Это указывает на замещение рибита остатками фосфорной кислоты по С1- и С5-положениям. Различные значения величин химических сдвигов всех пяти сигналов рибитного остатка в спектре исключает его замещение по О3 остатком глюкопиранозы, приводящее к симметричной структуре. Кроме того, сдвиг сигнала

Химические сдвиги ^{13}C -ЯМР (б) тейхоевых кислот *B. subtilis* КММ 234 и *B. licheniformis* КММ 454, их дефосфорилированных производных и модельных соединений

Соединение	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C1	C2	C3	C4	C5
β -Метилглюкопиранозид	104.3	74.2	76.9	70.8	76.9	61.0					
Рибит							63.7	73.4	73.4	73.4	63.7
Тейхоевая кислота*	103.2	74.4	76.9	70.8	76.9	61.9	68.2	71.7	72.1	80.2	66.1
Дефосфорилированный олигомер*	103.4	74.5	76.9	70.8	76.9	61.9	63.9	73.1	72.9	82.0	62.0

* Спектры идентичны для двух образцов.

при 80.2 м.д. в спектрах исходных полимеров на 1.8 м.д. в относительно слабое магнитное поле в спектрах дефосфорилированных образцов соответствует β -эффекту фосфодиэфирной связи [1, 9–11]. Из вышесказанного следует, что рибит замещен глюкопиранозильным остатком по О4. К сожалению, вопрос о конфигурации гликозилированного рибита, как и во многих других работах, остается открытым.

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что теихоевые кислоты обоих штаммов представляют собой полирибит, в котором фосфодиэфирная связь объединяет гидроксилы при С1- и С5-атомах соседних рибитных единиц, гликозилированных β -D-глюкопиранозильным остатком по О4.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микроорганизмы. Культуры *B. subtilis* КММ 234 (Р-1) и *B. licheniformis* КММ 454 (1-1Г-2) получены из коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН. Бацилла штамма КММ 234 (Р-1) выделена из кишечника рыбы-фугу семейства Tetraodontidae в районе острова Пинас в Карибском море, бацилла штамма КММ 454 (1-1Г-2) – из пробы грунта в том же районе во время экспедиционного рейса НИС “Академик Опарин” в 1986 г. Бациллы идентифицированы как *B. subtilis* и *B. licheniformis* на основании морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков [12], а также по их жирнокислотному составу [13].

Выделение полимеров из клеточной стенки, их дефосфорилирование и полный анализ химическими и физико-химическими методами осуществляли как описано в работе [6].

Аналитическую хроматографию и электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-12 в системе растворителей *n*-бутанол – пиридин – вода (6:4:3) и 0.2 М пиридин-ацетатном буфере (рН 5.5–5.6) соответственно. Восстанавливающие

сахара на бумаге обнаруживали щелочным раствором азотнокислого серебра, неорганический фосфор – молибденовокислым аммонием.

Количественное содержание фосфора определяли по методике [14].

Идентификация D-глюкозы. Полимер (20 мг) гидролизовали 2 н. HCl (2 мл, 100°C, 3 ч), гидролизат упаривали. Препаративной БХ выделили 2 мг D-глюкозы, $[\alpha]_D^{20} +46^\circ$ (с 0.2, вода).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Boer W.R., Kruyssen F.J., Wouters J.T.M., Kruk C. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. P. 1–6.
2. Tarelli E., Coley J. // Carbohydr. Res. 1979. V. 75. P. 31–37.
3. Шашиков А.С., Стрешишинская Г.М., Наумова И.Б. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. С. 782–785.
4. Burger M.M., Glaser L. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 494–506.
5. Schiper D. // Carbohydr. Res. 1995. V. 279. P. 75–82.
6. Горшкова Р.П., Исаков В.В., Командрова Н.А., Иванова Е.П., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 413–417.
7. Egan W., Shneerson R., Werner K. E., Lon G. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2898–2910.
8. Gorin P.A.J., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. P. 1212–1223.
9. De Boer W.R., Wouters J.T.M., Anderson A.J., Archibald A.R. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 85. P. 433–436.
10. Colson P., Slessor K.N., Jennings H.J., Smith I.C.P. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. P. 1030–1037.
11. Шашиков А.С., Чижов О.С. // Биоорганическая химия. 1976. Т. 2. С. 437–497.
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. V. 2. Baltimore–London: Williams & Wilkins, 1986. P. 1104–1139.
13. Иванова Е.П., Михайлов В.В., Андреев Л.В. // Микробиол. журн. 1992. Т. 54. С. 27–32.
14. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 1756–1760.

The Structure of Teichoic Acids from Marine Microorganisms *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*

N. A. Komandrova[#], R. P. Gorshkova, V. V. Isakov, S. V. Tomshich, L. S. Shevchenko, L. A. Romanenko, and O. I. Nedashkovskaya

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

Teichoic acids from the cell walls of marine bacilli *Bacillus subtilis* CMM (Collection of Marine Microorganisms) 234 (R-1) and *B. licheniformis* CMM 454 (1-1Г-2) were isolated and characterized. These teichoic acids were found to have identical structures and are composed of the glucose, ribitol, and phosphoric acid residues. On the basis of ¹³C NMR and ³¹P NMR spectra of the teichoic acids and the products of their dephosphorylation, we established the following structure for the biopolymer: poly[→5)-4-O-β-D-glucopyranosylribitol-(1-phospho)].

Key words: *Bacillus*, teichoic acids, NMR spectroscopy, marine microorganisms

[#] To whom correspondence should be addressed.