

Г. М. СТРЕШИНСКАЯ, И. Б. НАУМОВА

О ЛОКАЛИЗАЦИИ ФОСФОМАННАНА В КЛЕТКЕ
CANDIDA INTERMEDIA Н-30

(Представлено академиком А. С. Спириным 10 V 1973)

В клетках *C. intermedia* Н-30 обнаружен фосформаннан, содержащий 1,6-фосфодиэфирные связи, с молярным отношением маннозы к фосфору, равным 5:1*. Представляло интерес установить локализацию этого фосфорсодержащего полимера в клетке в связи с выяснением его функциональной роли, так как было отмечено различие в количественном содержании полимера в дрожжах, выращенных на среде с углеводородами ($C_{16}-C_{23}$) или глюкозой в качестве источника углерода. Кроме того, ранее нами было показано, что клетки *C. intermedia* содержат глицеринтейхоевую кислоту⁽¹⁾. В настоящее время известно, что тейхоевые кислоты расположены в клеточной стенке многих грам-положительных бактерий и актиномицетов (стеночные тейхоевые кислоты) или находятся в связи с цитоплазматической мембраной (мембранные тейхоевые кислоты). Поэтому второй задачей настоящего исследования было установление локализации тейхоевой кислоты в дрожжевой клетке.

Для решения поставленных задач была получена клеточная оболочка (клеточная стенка вместе с элементами цитоплазматической мембраны) двух вариантов культуры *C. intermedia*: парафинового (дрожжи выращены на среде с углеводородами) и глюкозного (дрожжи выращены на среде с глюкозой). Условия роста дрожжей описаны ранее⁽²⁾.

Получение клеточной оболочки. Клетки логарифмической фазы роста собирали центрифугированием, отмывали от среды и разрушали в дезинтеграторе со стеклянными шариками по методу, описанному в⁽³⁾. Проверку чистоты выделенных оболочек проводили с помощью фазово-контрастного микроскопирования. Присутствие фрагментов цитоплазматической мембраны в оболочке устанавливали по специфическому окрашиванию фосфолипидов нильским голубым⁽⁴⁾ и по результатам химического анализа. Клеточная стенка была получена обработкой оболочки 2% дезоксихолатом натрия, рН 7,45, 10–15°, 18 час.⁽⁵⁾.

Выделение полимера. Фосфоманнан экстрагировали трихлоруксусной кислотой (ТХУ) 6 час. при 0° и перемешивании. К экстракту, отделенному от клеток центрифугированием и профильтрованному через Целит 512, добавляли 2 объема 96° этанола. Образовавшийся осадок собирали центрифугированием, сушили спиртом, эфиром и досушивали в вакуум-эксикаторе.

Аналитические методы. Фосфор определяли по Грину⁽⁶⁾, нуклеиновые кислоты — по Спирину⁽⁷⁾, белок — по Лоури⁽⁸⁾, липиды — весовым методом после экстракции оболочек смесью хлороформ: метанол (1:1) дважды по 12 час. Фосфор полифосфатов ($P_{\text{лаб}}$) — после гидролиза 1 N HCl, 7 мин. Фосфор фосфолипидов ($P_{\text{флип}}$) — после сжигания липидной фракции с $HClO_4$. Фосфор фосфоманнана ($P_{\text{ман}}$) находили по разности: $P_{\text{ман}} = P_{\text{общ}} - (P_{\text{лаб}} + P_{\text{нк}} + P_{\text{флип}})$.

Кислотный гидролиз. 2–3 мг полимера или оболочки гидролизировали 1 N HCl, 3 час., 100°. Продукты, образовавшиеся при гидролизе, хро-

* Неопубликованные данные.

матографировали в системах: 1) пиридин : бензол : бутанол : вода (3 : 1 : 5 : 3), 2) пропанол : аммиак ($d=0,88$) : вода (6 : 3 : 1) и подвергали электрофорезу в ацетатно-пиридиновом буфере pH 5,5, 20 в/см, 5 час.

В полученных оболочках парафинового и глюкозного вариантов *C. intermedia* были определены различные формы фосфора, белок и липиды. Химический анализ оболочек приведен в табл. 1.

Таблица 1

Количественное содержание некоторых компонентов в оболочках *C. intermedia* (в % от сухой навески)

Источник углерода в среде	P _{общ}	P _{нк}	P _{лаб}	P _{флип}	P _{ман}	Белок	Липиды
Парафин	0,76	0,13	0,11	0,07	0,45	16,35	9,78
Глюкоза	0,43	0,25	0,04	0,04	0,10	—	5,59

Как видно из табл. 1, оболочки содержали значительное количество фосфора ненуклеиновой и нефосфолипидной природы. В продуктах кислотного гидролиза оболочек был идентифицирован маннозо-6-фосфат, что указывало на присутствие в изучаемых препаратах фосфоманнана и глицерофосфата фосфолипидной природы. Наличие глицерофосфата не свидетельствует о присутствии в оболочках глицеринтейхоевой кислоты, так как второго характерного продукта кислотного гидролиза этого полимера — дифосфата глицерина (¹) — не было найдено. Обнаружение глицерофосфата фосфолипидной природы в продуктах кислотного гидролиза оболочек обоих вариантов явилось еще одним подтверждением присутствия в них элементов цитоплазматической мембраны.

Для установления локализации полимера в клеточной оболочке была получена клеточная стенка путем обработки оболочек дрожжей парафинового варианта дезоксихолатом натрия. Результаты химического анализа стенки приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количественное содержание различных форм фосфора и белка в 100 мг оболочки и в полученной из нее клеточной стенке парафинового варианта

Препарат	P _{общ}	P _{лаб}	P _{нк}	P _{флип}	P _{ман}	Белок
Оболочка, мг	0,76	0,11	0,13	0,07	0,45	16,35
Стенка, мг	0,43	—	0,07	—	0,36	2,52
» », % от сухого веса	0,75	—	0,12	—	0,63	4,42

При рассмотрении табл. 2 видно, что удаление фрагментов цитоплазматической мембраны привело к значительной потере клеточной оболочкой белка и нуклеиновых кислот. В стенках не были обнаружены фосфолипиды, что явилось еще одним подтверждением отсутствия в ней элементов цитоплазматической мембраны. Фосфор же маннозофосфатной природы остался без значительных изменений.

Обработав полученную клеточную стенку 5% ТХУ и осадив экстрагированные соединения 2 объемами этанола, получили препарат фосфоманнана, при кислотном гидролизе которого были идентифицированы манноза, маннозо-6-фосфат и P_{орто} — характерные продукты кислотного гидролиза полимеров такого типа. Шестичасовая экстракция ТХУ не привела к полному выделению полимера из клеточной стенки, что указывает на существование прочной связи между маннозофосфатным полимером и остальными компонентами клеточной стенки.

Из табл. 1 четко видно количественное различие в содержании фосфора фосфоманнанов в оболочках двух вариантов культуры *S. intermedia*. Клеточные оболочки парафинового варианта содержали больше фосфоманнана, чем клеточные оболочки глюкозного варианта. Этот факт представляется интересным в связи с данными нидерландских исследователей о том, что протопласты дрожжей не окисляют парафины с длиной цепи выше C_{15} , т. е. присутствие клеточной стенки обязательно для усвоения углеводов⁽⁹⁾. Возможно, усиленный синтез фосфоманнанов, локализованных в клеточной стенке дрожжевой клетки, растущей на парафинах, необходим для обеспечения подходящего катионного окружения для интенсивной работы ферментов, окисляющих углеводороды, так как известно, что некоторые фосфорсодержащие полимеры клеточной стенки микроорганизмов ответственны за связывание ионов двухвалентных металлов⁽¹⁰⁾.

Таким образом, установлено, что фосфоманнан в клетках *S. intermedia* локализуется в клеточной стенке и количество его меняется в зависимости от источника углерода в среде.

Тейхоевая кислота не обнаружена в исследованных препаратах клеточной оболочки, что является интересным в связи с ее возможно новой, неизвестной физиологической функцией, которую она выполняет в дрожжевой клетке.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
28 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Б. Наумова, Г. М. Стрешинская, ДАН, 210, 720 (1973). ² И. Б. Наумова, Г. М. Стрешинская, А. Д. Гололобов, ДАН, 182, 465 (1968). ³ T. Nurminen, E. Ouga, H. Suomalainen, Biochem. J., 116, 61 (1970). ⁴ Э. Пирс, Гистохимия теоретическая и прикладная, 1962. ⁵ N. de Terra, E. L. Tatum, Am. J. Bot., 50, 669 (1963). ⁶ M. Weil-Malherbe, R. Green, Biochem. J., 49, 286 (1951). ⁷ А. С. Спирин, Биохимия, 23, 656 (1958). ⁸ Н. О. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ⁹ P. Bos, J. C. Bruin, Third Intern. Sympos. on Yeast Protopl., Spain, 1972. ¹⁰ S. Heptinstall, A. R. Archibald, J. Baddiley, Nature, 225, 519 (1970).