



УДК 615.779.9

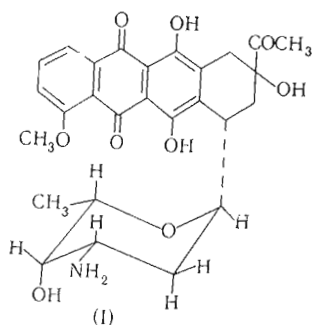
ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕЗА РУБОМИЦИНА

Параносенкова В. И., Карнов В. Л.

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР, Обнинск

Установлено, что экзогенная пропионовая кислота включается в агликон рубомицина; при этом ее 2-С- и 3-С-атомы образуют боковую цепь агликона. Метка из уксусной кислоты включается в ядро агликона рубомицина. Установлено, что донором метоксильной группы рубомицина служит метионин. Углеводная часть рубомицина — даунозамин (VIII), образующийся в присутствии равномерно меченой [^{14}C]глюкозы сохраняет равномерное распределение метки в гексозном скелете. В процессе превращения глюкозы в даунозамин не происходит расщепления ее углеродного скелета на более мелкие фрагменты подобно тому, как это происходит при образовании моносахаридных остатков антибиотиков — макролидов.

Антибиотик рубомицин (I) относится к группе антрациклиновых антибиотиков [1—3], интерес к которым, как к противораковым препаратам, в последнее время сильно возрос. Весьма примечательно, что небольшие различия в структуре антрациклиновых антибиотиков приводят к существенному изменению спектра их противоопухолевой активности [4, 5]. В связи с расширенным применением антибиотиков — антрациклинов в медицинской практике возрастает интерес и к механизму их биосинтеза.



Цель данной работы — установление предшественников углеродного скелета агликона и углеводной части молекулы рубомицина (I).

При выращивании продуцента рубомицина *Act. coeruleorubidus* на органической среде в присутствии натриевых солей уксусной кислоты и пропионовой кислоты, меченных в положениях 1-С или 2-С, образуется меченый рубомицин. При этом включение радиоактивных предшественников составляет 1% и примерно одинаково для всех изученных соединений (табл. 1). Однако при окислении хромовой кислотой по Куну — Роту [6]

Таблица 1

Включение в рубомицин меченых ацетатов и пропионатов

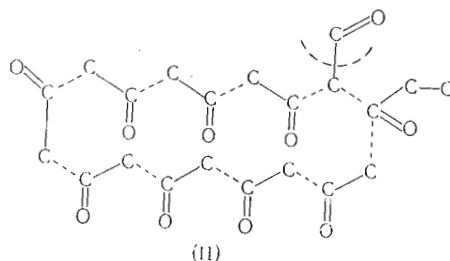
Меченый предшественник и его радиоактивность (млн. имп./мин)	Включение ^{14}C в рубомицин, %	Радиоактивность CH_2CO -группы по отношению к радиоактивности рубомицина, %
[1- ^{14}C]ацетат (20)	1,0—1,2	3,7
[2- ^{14}C]ацетат (20)	0,5—0,6	2,7
[1- ^{14}C]пропионат (40)	0,7—0,8	2,9
[2- ^{14}C]пропионат (40)	0,6—0,8	50—70

Таблица 2

Дегградация по Фаресу — Шмидту уксусной кислоты
 Кислота получена при окислении рубомицина,
 радиоактивным предшественником которого был
 [2- ^{14}C] пропионат, имп/мин

Исходная радиоактивность уксусной кислоты	Радиоактивность продуктов дегградации	
	метиламин (CH_3 -)	CO_2 (- COOH)
30 000	2 000	20 200
30 000	1 000	18 100
30 000	1 200	18 500

меченого рубомицина, предшественником которому служил [2- ^{14}C]пропионат натрия, было найдено, что образующаяся уксусная кислота содержит 50—70% радиоактивности антибиотика; дегградация этой уксусной кислоты азидом натрия по Фаресу — Шмидту [7] позволила установить, что 85—90% метки локализовано в карбоксильной группе (табл. 2). Следовательно, [2- ^{14}C]пропионовая кислота поставляет метку главным образом карбонильному углеродному атому боковой цепи агликона. Остальные меченые соединения, указанные выше, в том числе и пропионовая кислота, меченная в карбоксильной группе, поставляют углеродные атомы для циклической части агликона рубомицина. Из этих данных следует, что пропионат включается в антибиотик в виде интактной единицы и так, что его метильный и метиленовый углеродные атомы становятся соответственно метильным и карбонильным углеродными атомами ацетильной группы рубомицина, как это изображено на схеме образования агликона рубомицина (II). Учитывая общепринятую схему пропионат-ацетатной конденсации, реакцию образования агликона рубомицина можно записать следующим образом:



пропионил- $\text{CoA} + 9$ малонил- $\text{CoA} \rightarrow$ агликон рубомицина + 10CO_2 . При этом предполагается, что от последней конденсирующейся единицы встраи-

вається в цепь лишь метиленовый углеродный атом, т. е. происходит двойное декарбокислирование малоновой кислоты.

Интересно отметить, что образование ϵ -пирромицинона (агликон другого представителя антибиотиков-антрациклинов, у которого в отличие от рубомицина боковой цепью является этильная группа) происходит тоже из 1 пропионатной и 9 ацетатных единиц [8]. В связи с этим можно предположить, что первичный продукт конденсации (гипотетический поликетометилен) является общим для всех агликонов антрациклиновых антибиотиков.

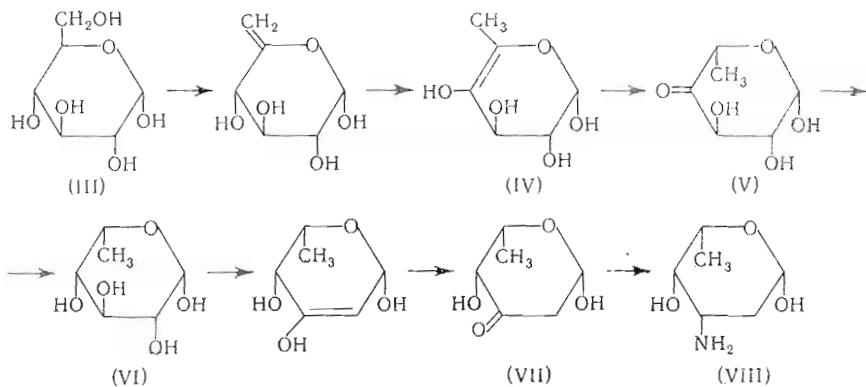
В агликоне рубомицина имеется одна метоксильная группа. По аналогии с образованием одноуглеродных фрагментов у других циклических структур природных соединений [9, 10] можно было предположить, что она образуется путем трансметилирования, в котором донором является S-аденозилметионин. В таком случае следовало ожидать, что при биосинтезе антибиотика в присутствии меченого в метильной группе метионина наибольшая радиоактивность будет локализована в метоксигруппе. Изучение распределения радиоактивности в рубомицине, полученном при ферментации в присутствии [^{14}C Н $_3$]метионина, показало, что 50—70% метки сосредоточено в метоксильной группе. Остальные 30—50% радиоактивности распределены между углеродными атомами циклической системы, вероятно, вследствие включения меченого метионина в эндогенный малонил-CoA (в углеводную часть молекулы метионин не включается). Примерно с такой же эффективностью в рубомицин включается метка и из [C^3H_3]метионина. Следовательно, метильная группа метионина целиком передается к предшественнику рубомицина или его агликона, т. е. имеет место трансметилирование.

Углеводная часть молекулы рубомицина представлена 2,6-дидезокси-3-аминогексозой [3]. Обычно предшественниками дезоксигексоз служат моносахариды [11, 12], причем во время превращения последних в дезоксисахара их углеродный скелет не подвергается расщеплению [13]. В данном случае также можно было ожидать превращения глюкозы (II) в даунозамин (VIII) при сохранении ее углеродного скелета. Если это предположение справедливо, то при образовании антибиотика в присутствии равномерно меченой [^{14}C]глюкозы остаток даунозамина должен быть также равномерно меченым. Наиболее удобно это проверить по радиоактивности атомов 5-С и 6-С, поскольку они легко отщепляются в виде уксусной кислоты после окисления даунозамина (VIII) по Куну — Роту. В случае равномерного распределения метки в аминсахаре в уксусную кислоту должно переходить 33,3% радиоактивности. Оказалось, что в пределах допустимой ошибки радиоактивность уксусной кислоты составила $\frac{1}{3}$ общей активности аминсахара (найденно 30—31%), причем оба атома углерода обладали примерно одинаковой радиоактивностью (47% — в метильной группе, соответствующей 6-С даунозамина, и 53% — в карбоксильной группе, соответствующей 5-С). Таким образом, распределение радиоактивности в даунозамине соответствует распределению радиоактивности в исходной глюкозе.

В пользу предположения о том, что глюкоза является непосредственным предшественником углеводной части молекулы рубомицина, свидетельствует также сравнение радиоактивности углеродных атомов агликона и аминсахара антибиотика, биосинтезированного в присутствии меченой глюкозы на фоне немеченого глицерина. В пересчете на один углеродный атом радиоактивность даунозамина оказалась в 2,5—2,7 раза выше, чем агликона. По-видимому, немеченные двух- и трехуглеродные соединения конкурируют с глюкозой в значительно меньшей степени при образовании даунозамина, чем в биосинтезе хромофора антибиотика, в результате чего наблюдается более сильное разбавление метки агликона. Кроме того, косвенным доказательством происхождения даунозамина из

глюкозы является отсутствие включения в него метки из метионина и натриевых солей уксусной и пропионовой кислот.

Таким образом, превращение *D*-глюкозы (III) в даунозамин (VIII) не затрагивает углеродного скелета глюкозы и должно включать образование дезоксизвеньев в положениях 2 и 6, обращение конфигурации центров 5-С и 3-С и замену 3-ОН на 3-NH₂. Первой стадией биогенеза даунозамина (VIII), по-видимому, является отщепление 6-ОН путем дегидратации



(ср. [12]) с последующей изомеризацией в енол (IV). Таутомерное превращение в кетон (V) делает возможным переход от *D*- к *L*-ряду. Восстановление карбонильной группы приводит к *L*-6-дезоксиглюкозе (VI), которая превращается в 2-деокси-3-кетопроизводное (VII). Заключительный переход от 3-оксипроизводного (VII) к даунозамину (VIII), очевидно, происходит путем трансаминирования подобно аминированию большинства кетосоединений [14, 15].

{ Экспериментальная часть

Продукт рубомицина *Act. coeruleorubidus* получен из Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР. В качестве посевного материала служила 48-часовая культура продуцента, выращенного на питательной среде следующего состава, %: соевая мука — 3, глюкоза — 3, CaCO₃ — 0,5, NaCl — 0,3, а также водопроводная вода, pH 7,4 [16]. Посевной мидий ресуспендировали в среду, где глюкоза была заменена эквивалентным количеством глицерина. Меченые предшественники ([1-¹⁴C]-, [2-¹⁴C] ацетаты, [1-¹⁴C]-, [2-¹⁴C]пропионаты, [¹⁴CH₃]- и [C³H₃] метионин) вносили после 48 ч ферментации. Выделение антибиотика проводили согласно ранее описанной методике [16]. Рубомицин С подвергали гидролизу 0,2 н. HCl в 60%-ном метаноле в течение 1 ч при 70°. Гидролизат встряхивали с хлороформом, в органический слой переходил агликон; для полного отделения агликона водный слой дополнительно нагревали в течение 30 мин при 70°. Окисление меченых агликона и аминсахара по Куну — Роту [6] проводили в 5 мл окислительной смеси в запаянной ампуле; для локализации метки в образовавшейся уксусной кислоте проводили ее деградацию по Фаресу — Шмидту [7] с улавливанием образовавшейся углекислоты моноэтаноламином. Радиоактивность в метоксильной группе определяли после расщепления ее йодистоводородной кислотой по методу Цейзеля [17] и улавливания йодистого метила спиртом.

Измерения радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Анситрон» (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Arcamone F., Franceschi O., Orezzi P., Cassinelli G. (1968) *Tetrahedron Lett.*, 30, 3349—3353.
2. Arcamone F., Cassinelli G., Orezzi P., Franceschi G., Moudelli R. (1968) *Tetrahedron Lett.*, 30, 3353—3357.
3. Iwamoto R., Lim P., Bhacca N. (1968) *Tetrahedron Lett.*, 36, 3891—3895.
4. Шорин В. А., Бажанов В. С., Авербух Л. А., Лепешкина Г. Н., Гринштейн А. М. (1973) *Антибиотики*, 8, 681—687.
5. Arena E., Alessandro N. D., Dusonchet L., Gebbia N., Gerbasi F., Palazzoadriano M., Raineri A., Rausa L., Tubaro E. (1971) *Arzneimittel-Forschung (Drug-Research)*, 21, 1258—1262.
6. Губен-Вейль. (1967) *Методы органической химии*, стр. 413, «Химия», М.
7. Аронов С. (1959) *Изотопные методы в биохимии*, стр. 249, «Иностранная литература», М.
8. Ollis W., Sutherland I., Codner R., Gordon Y., Muller G. (1967) *J. Proc. Chem. Soc.*, 347—352.
9. Валлей В. (1965) в кн. *Биогенез природных соединений* (под ред. Гинодмана Л. М.), стр. 695, «Мир», М.
10. Дейгли С., Никольсон Д. (1973) *Метаболические пути*, стр. 195, «Мир», М.
11. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А., Усов А. И., Чижов О. С., Шнбаев В. Н. (1967) *Химия углеводов*, стр. 252, «Химия», М.
12. Birch A., Holloway P., Richards R. (1962) *Biochim. et biophys. acta*, 57, 143—145.
13. Cudlin Y. (1966) *Folia Microbiol.*, 5, 11, 399—405.
14. Берифельд П. (1965) в кн. *Биогенез природных соединений* (под ред. Гинодмана Л. М.), стр. 229, «Мир», М.
15. Дейгли С., Никольсон Д. (1973) *Метаболические пути*, стр. 147, «Мир», М.
16. Манафова Н. А. (1966) *Антибиотики*, 11, 872—876.
17. Губен-Вейль. (1967) *Методы органической химии*, стр. 400, «Химия», М.

Поступила в редакцию
16.VI.1975

THE STUDY OF RUBOMYCIN BIOSYNTHESIS

PARANOSENKOVA V. I., KARPOV V. L.

*Department of Immunoradiology, Research Institute of
Medical Radiology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Obninsk*

It is shown that exogenous propionic acid is incorporated into the aglycon of rubomycin, the carbonyl C-atom being put into the main chain, while the rest of the propionate forming ramification. The label from acetic acid is incorporated only into the cyclic moiety of the aglycon. Scheme of the formation of the carbon skeleton of the rubomycin aglycon is formulated basing on some experimental data. Methionine is shown to be the donor of the methoxy group of rubomycin. The carbohydrate part of rubomycin daunosamine, forming in presence of uniformly labeled ^{14}C -glucose has similar label distribution in its hexose chain. If culture broth with ^{14}C -glucose contains glycerine, then specific activity of a carbon atom in daunosamine is much higher than in aglycon. It suggests that in the course of daunosamine formation from glucose no fragmentation of the latter occurs similarly to the monosaccharide moieties of macrolide antibiotics.