



УДК 579.222'112.6.05

© 1990 г.

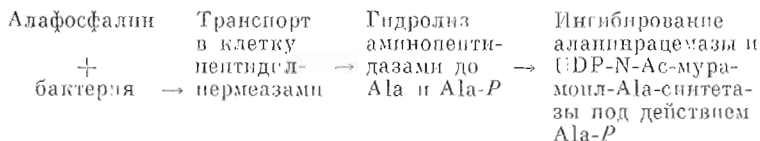
*Р. М. Холматов, Е. Н. Хурс, А. И. Бирюков,
Ю. Н. Жуков, В. Г. Джавахия*, Т. М. Воинова*,
Б. С. Ермолинский**

АЛАФОСФАЛИН (*L*-АЛАНИЛ-*L*-1-АМИНОЭТИЛФОСФОНОВАЯ КИСЛОТА) ИНГИБИРУЕТ $S_{60}ASAc$ -ЗАВИСИМЫЕ ПУТИ БИОСИНТЕЗА МИКРОМИЦЕТОВ

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР,
Москва;*

** Всесоюзный научно-исследовательский институт фитопатологии
Госагропрома СССР, Московская обл.*

Один из наиболее известных и интересных примеров проявления биологической активности интенсивно изучающихся сейчас фосфоаналогов аминокислот — антибактериальное действие аминокислотных производных 1-аминоэтилфосфоновой кислоты (*Ala-P*), среди которых применение нашёл алафосфалин (*L*-аланил-*L*-1-аминоэтилфосфоновая кислота). Подобно пенициллину, циклосерину и некоторым другим антибиотикам этот дипептид, являющийся субстратом бактериальных пептидилпермеаз, тормозил биосинтез бактериальной клеточной стенки, причем действующим началом служила возникавшая в результате внутриклеточного протеолиза *Ala-P*, которая и ингибировала ферменты биосинтеза пептидогликана [1]:



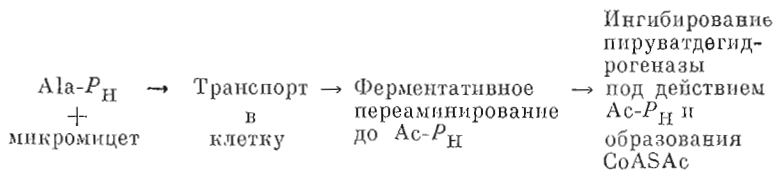
Следует заметить, что эта схема очевидным образом исключала действие алафосфалина на иные объекты, помимо бактериальных, поскольку до настоящего времени отсутствовали данные о влиянии алафосфалина на другие метаболические превращения в клетке, кроме вышеуказанных.

Родственный алафосфалину дипептид, *L*- α -аланил-*L*-1-аминоэтилфосфонистая кислота (*Ala-Ala-P_{II}*), также обладал антибактериальной активностью, что приписывалось ингибированию биосинтеза белка возникшей после внутриклеточного расщепления пептида 1-аминоэтилфосфонистой кислотой (*Ala-P_{II}*) [2]. В то же время сама *Ala-P* не влияла на рост бактерий в силу плохого проникновения в клетку, тогда как *Ala-P_{II}* действовала подобно дипептиду [2].

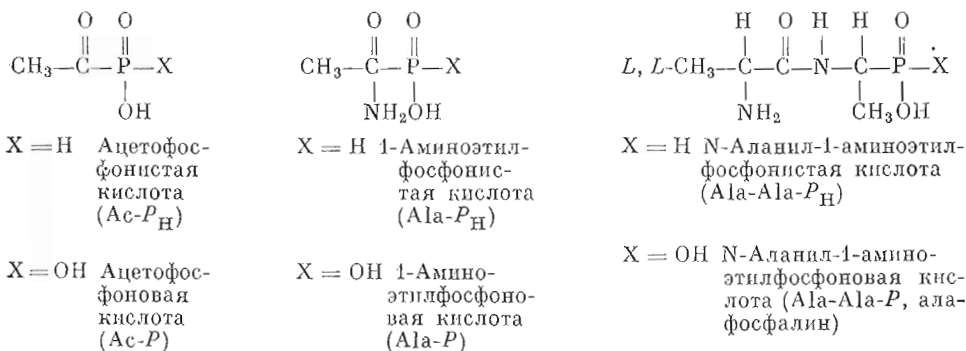
Недавно нами было показано, что *Ala-P_{II}* является новым сильным ингибитором меланиногенеза в фитопатогенном грибе *Pyricularia oryzae*, возбудителе основного заболевания риса, подавляя прорастание конидий и рост мицелия [3]. Дальнейшие исследования*, результаты которых сообщались в 1987 г. на Международном симпозиуме по пиридоксальемому катализу (Турку, Финляндия) и 9-м Совместном симпозиуме биохимических обществ ГДР — СССР (Иена, ГДР), позволили предложить схему действия *Ala-P_{II}*, включавшую внутриклеточное переаминирование алалога с образованием ацетофосфонистой кислоты (*Ac-P_{II}*), которая и ингибировала окислительное декарбоксилирование пирувата**:

* Будут опубликованы отдельно.

** Для ингибирования биосинтеза, антоцианина под действием *Ala-P_{II}* недавно был предложен сходный механизм [4].



Таким образом, биологическая активность фосфоаналогов аланина (как таковых или в составе пептидов) в отношении организмов разных типов (бактерий и грибов) описывалась принципиально различными и независимыми механизмами. В настоящей работе показано, что обладающие антибактериальной активностью алафосфалин и Ala-Ala- P_{H} тормозят меланиногенез и рост гриба *P. oryzae*, обсуждаются причины этого явления и делается заключение, что ингибирование образования CoASAc может быть общей причиной антибактериального и фунгицидного действия фосфоаналогов.



Использованные в работе вещества, формулы и названия которых приведены на схеме, получали: Ala- P и Ala- P_{H} — по методике работы [5], Ac- P и Ac- P_{H} — соответственно по работам [6] и [7]. Рацемический бензилоксикарбонил *D, L*-Ala-Ala- P_{H} синтезирован согласно сообщению [8], разделение изомеров осуществлялось кристаллизацией, последующим удалением защиты получали Ala-Ala- P_{H} [8], окисление которой по [6] приводило к алафосфалину.

Аланил-тРНК-синтетазу (КФ 6.1.1.7) из *Escherichia coli* выделяли согласно работе [9]. Определение активности фермента по реакции изотопного [^{32}P]PP $_i$ -АТР-обмена и аминокислотирования тРНК, а также исследование влияния на эти реакции фосфоаналогов аланина проводили аналогично описанному в сообщении [10]. Получение экстракта *E. coli* и выделение из него пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1, далее ПДГ) осуществляли согласно [11]. Активность ПДГ в экстракте *E. coli* и в очищенных препаратах регистрировали по изменению величины A_{340} за счет увеличения уровня NADH в реакционной среде, как указано в работе [12]. Степень ингибирования ПДГ в присутствии исследуемых соединений (10^{-6} – 10^{-3} М) в различных концентрациях определяли после внесения аликвоты ингибитора при насыщающей концентрации пирувата. Изучение влияния фосфоаналогов аланина и его дипептидов на активность ПДГ в экстракте *E. coli* осуществляли в присутствии α -кетоглутарата.

Выращивание гриба *P. oryzae* на твердых агаризованных средах, содержащих необходимые аминокислоты, или без них (полные и минимальные среды) и испытания веществ проводили как описано ранее [3].

Возможность воздействия алафосфалина на другие объекты, помимо бактерий, в значительной степени зависела от того, удастся ли обнаружить для дипептида иные проявления биохимической активности, кроме торможения специфических ферментов, участвующих в построении бактериальной стенки. В экспериментах с экстрактом *E. coli* было показано, что в присутствии алафосфалина наблюдалось значительное подавление окислительного декарбоксилирования пирувата (таблица). Сходным образом действовала и Ala-Ala- P_{H} , причем оба дипептида не ингибировали очищенную пируватдегидрогеназу из того же источника. Представлялось

Антимикробная и ингибирующая активность фосфоаналогов пирувата, аланина и аланилаланина

Эффектор	Ингибирование пируватдегидрогеназы, I_{50} , М (мкг эффектора/мл)		Действие на <i>P. ouyae</i> МПК ^а , мкг/мл		Торможение роста <i>E. coli</i> МПК ^а , мкг/мл
	очищенный фермент	экстракт <i>E. coli</i>	рост мицелия	меланиногенез	
Ac-P _И	$3 \cdot 10^{-7}$ (0,05)	$3 \cdot 10^{-7}$ (0,07)	Не активно		Не активно
Ac-P	$4 \cdot 10^{-6}$ (0,5)	$4 \cdot 10^{-6}$ (0,6)	»		»
Ala-P _И	Не активно	$6 \cdot 10^{-5}$ (6) ^{г*}	1/1000 ^{б,д} 0,1/10 ^б	Не активно	0,4 ^б [3]
Ala-P	»	$5 \cdot 10^{-5}$ (6) ^{г*}	Не активно		Не активно
Ala-Ala-P _И	»	$5 \cdot 10^{-5}$ (10) ^{г**}	5/5 ^{б,е} 1/1 ^б	Активно ^ж	0,1 ^б [3]
Алафосфалин	»	$5 \cdot 10^{-5}$ (10) ^{г***}	10/75 ^б Активно ^ж	Активно ^ж	0,5 ^б [1]

^а МПК — минимальная подавляющая концентрация.

^б Числитель и знаменатель — МПК на минимальной и полной средах соответственно.

^в На минимальной среде.

^г Прейнкубация 3 ч*, 5 ч**, 6 ч***.

^д Подавляет конидиогенез в концентрации 5/1000 (см. б).

^е Подавляет конидиогенез в концентрации 1,1/1,5 (см. б).

^ж Обесцвечивает при прорастании конидий на минимальной среде 50 мкг/мл.

вероятным, что первым этапом образования ингибиторов фермента из дипептидов был распад их до соответствующих аминокислот.

Фосфоаналоги аланина не влияли на активность изолированной пируватдегидрогеназы, но сильно тормозили окислительное декарбоксилирование пирувата в гомогенате при достаточных временах инкубации (таблица). Очевидным объяснением эффекта было ферментативное превращение аминокислот в кетонингибиторы в клеточной системе аналогично тому, как в этой же системе аланин мог быть источником пирувата. Трансаминирование представлялось наиболее вероятным путем возникновения фосфоаналогов пирувата, с учетом активности микробных трансаминаз, отсутствия субстратных свойств у Ala-P в аланиндегидрогеназной реакции [13], наличие таковых у фосфоаналогов аспартата и глутамата в аспартаттрансаминазной реакции [14] и антагонизм между фосфоаналогами и аминоксисацетатом, известным типовым ингибитором трансаминаз.

Конечным результатом превращений дипептидов являлось образование фосфоаналогов пирувата, из которых для ацетофосфоната (Ac-P) была известна способность торможения активности пируватдегидрогеназы [15]. Однако к началу наших исследований не было данных о влиянии ацетофосфонистой кислоты (Ac-P_И), представителя биохимически неизученных α-кетопосфонистых кислот, на окислительное декарбоксилирование пирувата. Как явствует из таблицы, Ac-P_И — один из самых эффективных ингибиторов пируватдегидрогеназы и соответствующей активности в экстракте *E. coli*.

Таким образом, алафосфалин оказался способным ингибировать окислительное декарбоксилирование пирувата в экстрактах *E. coli* и тем самым тормозить образование CoASAc. Соответствие между ингибирующей активностью Ala-P в отношении аланинрацемазы ($K_i=10^{-5}$ М [16]), Ac-P как ингибитора в отношении пируватдегидрогеназы ($K_i=10^{-6}$ М) и минимальной подавляющей концентрацией алафосфалина для *E. coli* позволяло считать, что в механизме антибактериального действия алафосфалина наряду с подавлением рацемизации аланина следует учитывать торможение превращения пирувата в CoASAc. Результатом последнего могло быть не только повышение уровня пирувата и соответствующих аминокислот, прежде всего аланина, но и торможение таких существенных для жизнедеятельности клетки и зависимых от CoASAc процессов, как функционирование цикла трикарбоновых кислот и биосинтез жирных кислот.

Из данных таблицы видна корреляция между подавлением дегидрогеназной активности и торможением роста *E. coli* под действием Ala-P_И и Ala-Ala-P_И, что позволяло и в этом случае рассматривать ингибирование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allen J. G., Atherton F. R., Hall M. J., Hassall C. H., Holmes S. W., Lambert R. W., Nisbet L. J., Ringrose P. S. // Nature. 1978. V. 272. P. 56-58.
2. Dingwall J. G. // Abst. 3rd International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products (Sofia, Bulgaria, 1985). V. 2. P. 87-103.
3. Хомутов Р. М., Хурс Е. Н., Джавахия В. Г., Воинова Т. М., Ермолинский Б. С. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1422-1424.
4. Laber B., Amrhein N. // Biochem. J. 1987. V. 248. P. 351-358.
5. Хомутов Р. М., Осипова Т. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 8. С. 1951-1952.
6. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Жукоев Ю. Н. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 6. С. 1391-1394.
7. Baillie A. C., Wright B. J., Wright K. Eur. Pat. Appl. 1980. № 9348.
8. Baylis E. K., Pickles W. Eur. Pat. Appl. 1979. № 2039.
9. Fromant M., Fayat G., Laufer P., Blandquet S. // Biochimie. 1981. V. 63. P. 541-553.
10. Biryukov A. I., Osipova T. I., Khomutov R. M. // FEBS Lett. 1978. V. 91. № 2. P. 246-248.
11. Bisswanger H. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 2. P. 815-822.
12. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Виноградов В. В. // Биохимия. 1980. Т. 45. № 8. С. 1365-1370.
13. Brand L. M., Lowenstein J. M. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 8. P. 1365-1370.
14. Хурс Е. Н., Осипова Т. И., Хомутов Р. М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 552-555.
15. Kluger R., Pike D. C. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 13. P. 4504-4506.
16. Atherton F. R., Hall M. J., Hassall C. N., Lambert R. W., Lloyd W. J., Ringrose P. S. // Antimicrob. Agents and Chemother. 1979. V. 15. № 5. P. 696-705.
17. Badet B., Walsh C. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 6. P. 1333-1341.

Поступило в редакцию
7.VII.1989
После доработки
27.IX.1989

R. M. KHOMUTOV, E. N. KHURS, A. I. BIRYUKOV, Yu. N. ZHUKOV,
V. G. DZHAVAHIA*, T. M. VOINOVA*, B. S. ERMOLINSKY*

ALAPHOSPHALIN (*L*-ALANYL-*L*-1-AMINOETHYLPHOSPHONIC ACID)
INHIBITS Ac-CoA-DEPENDENT PATHWAYS
OF MICROMYCETES BIOSYNTHESIS

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

* *All-Union Research Institute of Phytopathology, Moscow Region*

Dipeptide alaphosphalin (*L*-alanyl-*L*-1-aminoethylphosphonic acid, Ala-Ala-*P*) is known to act by interfering with the biosynthesis of bacterial cell walls similarly to penicilline, cycloserine and some other antibiotics. We found Ala-Ala-*P* and related compounds to affect other metabolically important processes both in bacteria and in other organisms. We suppose that they penetrate into cells by means of peptide permease system, then phospho-containing dipeptide is hydrolysed by aminopeptidase, yielding *L*-1-aminoethylphosphonic acid (Ala-*P*). The last compound is transaminated to give the phosphonate analogue of pyruvate (Ac-*P*), acetylphosphonate, which is a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase. The inhibition of the CoASAc synthesis may account for the antimicrobial action of Ala-Ala-*P*. Similar data were obtained with 1-aminoethylphosphonic acid (Ala-*P*_{II}) and dipeptide Ala-Ala-*P*_{II}.