



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 16 * № 2 * 1990

УДК 579.222'412.6.05

© 1990 г.

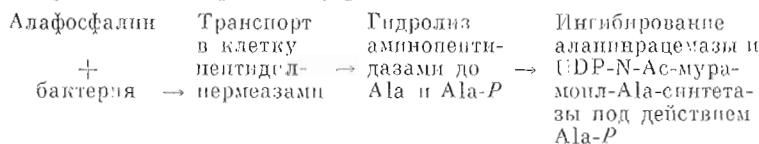
*P. M. Хомутов, Е. Н. Хурс, А. И. Бирюков,
Ю. Н. Жуков, В. Г. Джавахишвили*, Т. М. Воинова*,
Б. С. Ермолинский**

АЛАФОСФАЛИН (*L*-АЛАНИЛ-*L*-1-АМИНОЭТИЛФОСФОНОВАЯ КИСЛОТА) ИНГИБИРУЕТ CoASAc-ЗАВИСИМЫЕ ПУТИ БИОСИНТЕЗА МИКРОМИЦЕТОВ

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

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

Одна из наиболее известных и интересных примеров проявления биологической активности питательно изучающихся сейчас фосфоаналогов аминокислот — антибактериальное действие аминоацильных производных 1-аминоэтилфосфоновой кислоты (*Ala-P*), среди которых применение нашел алафосфалин (*L*-аланил-*L*-1-аминоэтилфосфоновая кислота). Подобно пептидилипину, 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 ингибирала ферменты биосинтеза пептидогликана [1]:



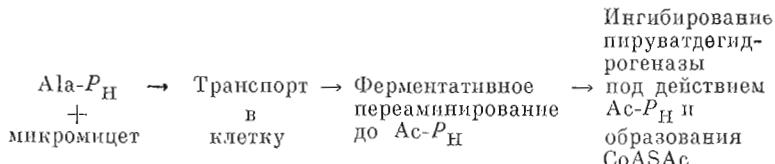
Следует заметить, что эта схема очевидным образом исключала действие алафосфалина на иные объекты, помимо бактериальных, поскольку до настоящего времени отсутствовали данные о влиянии алафосфалина на другие метаболические превращения в клетке, кроме вышеуказанных.

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

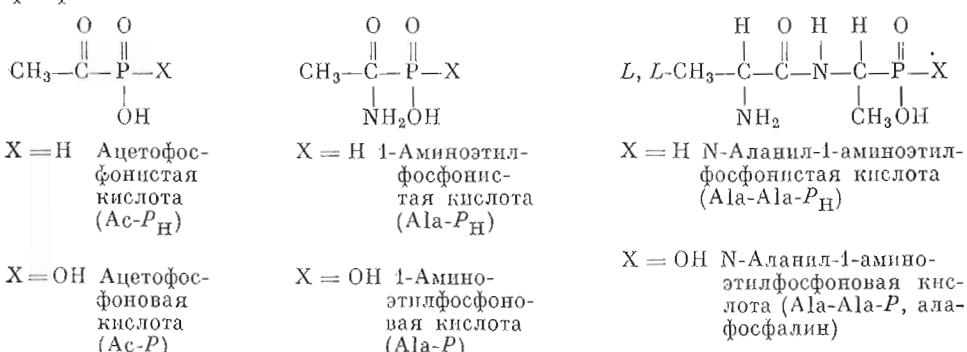
Недавно нами было показано, что *Ala-P_H* является новым сильным ингибитором меланиногенеза в фитопатогенном грибе *Pyricularia oryzae*, возбудителе основного заболевания риса, подавляя прорастание конидий и рост мицелия [3]. Дальнейшие исследования*, результаты которых сообщались в 1987 г. на Международном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

* Будут опубликованы отдельно.

** Для ингибирования биосинтеза, атоцианина под действием *Ala-P_H* 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 ингибиование 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 аминоацилирования 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 ингибиции 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. oxygae</i> МПК ^a , мкг/мл		Торможение роста <i>E. coli</i> МПК ^a , мкг/мл
	очищенный фермент	экстракт <i>E. coli</i>	рост мицелия	мелани- ногенез	
Ac- <i>P</i> _H	3·10 ⁻⁷ (0,05)	3·10 ⁻⁷ (0,07)	Не активно		Не активно
Ac- <i>P</i>	4·10 ⁻⁶ (0,5)	4·10 ⁻⁶ (0,6)	»	1/1000 ^{b, d}	» ^b [3]
Ala- <i>P</i> _H	Не активно	6·10 ⁻⁵ (6) ^{c*}	Не активно	0,1/10 ^b	Не активно
Ala- <i>P</i>	»	5·10 ⁻⁵ (6) ^{c*}	»	5/5 ^{b, e}	0,1 ^b [3]
Ala-Ala- <i>P</i> _H	»	5·10 ⁻⁵ (10) ^{c**}	»	1/1 ^b	0,1 ^b [3]
Алафосфалин	»	5·10 ⁻⁵ (10) ^{d***}	10/75 ^b	Активно ^f	0,5 ^b [1]

^a МПК — минимальная подавляющая концентрация.

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

^c На минимальной среде.

^d Преникубация 3 ч ^{*}, 5 ч ^{**}, 6 ч ^{***}.

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

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

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

вероятным, что первым этапом образования ингибиторов ферmenta 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 аминоаналогов в кетонингибиторы в клеточной системе аналогично тому, как в этой же системе аланин мог быть источником пирувата. Трансамилирование 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 antagonизм между фосфоаналогами и аминооксиацетатом, 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*_H), представителя биохимически неизученных α -кетофосфонистых кислот, на окислительное декарбоксилирование пирувата. Как явствует из таблицы, Ac-*P*_H — 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 аланинрацимазы ($K_i=10^{-5}$ 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.

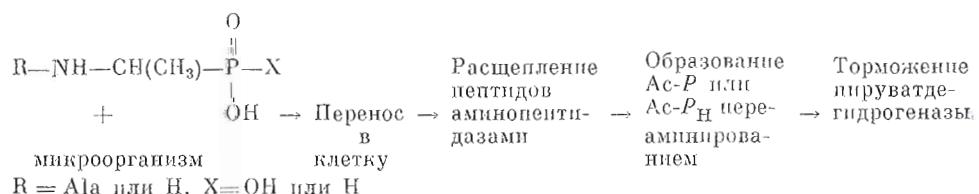
Из данных таблицы видна корреляция между подавлением дегидрогеназной активности и торможением роста *E. coli* под действием Ala-*P*_H и Ala-Ala-*P*_H, что позволяло и в этом случае рассматривать ингибирование

образования CoASAc как причину антибактериальной активности аналогов. Предположение об ингибировании дипептидом Ala-Ala- P_{H} и Ala- P_{H} биосинтеза белка на уровне активации аминокислот [2]казалось маловероятным, так как в наших экспериментах было показано слабое торможение изучаемыми фосфоаналогами аланил-тРНК-сингтетазы из *E. coli* (K_i для Ala- P_{H} $2,5 \cdot 10^{-3}$ М, для Ala- P $9 \cdot 10^{-3}$ М). Вместе с тем при рассмотрении причин антибактериальной активности фосфонистых аналогов следовало бы учитывать и ингибирование бактериальной рацемазы аланина под действием Ala- P_{H} ($K_i = 10^{-4}$ М [17]).

До сих пор рассматривались причины уже известной антибактериальной активности фосфопептидов и Ala- P_{H} , где принципиально новым было представление об ингибировании окислительного декарбоксилирования пирувата. Из обсуждаемых веществ только для Ala- P_{H} была известна фунгицидная активность. Поскольку все три соединения могли быть биохимическими предшественниками ингибиторов пируватдегидрогеназы, казалось вероятным, что фосфопептиды будут активными и против микромицетов*, хотя открытый оставался вопрос о специфичности грибных пермеаз и внутриклеточных протеиназ в отношении фосфопептидов.

Алафосфалин и Ala-Ala- P_{H} оказались активными против гриба *P. otuziae*, причем оба аналога вызывали обесцвечивание мицелия, что прямо указывало на блокирование зависящего от CoASAc пентапептидного пути биосинтеза меланина благодаря торможению образования CoASAc₅ и соответствовало рассмотренным ранее особенностям действия Ala- P_{H} . Фосфонистый дипептид был заметно активнее алафосфалина в подавлении меланиногенеза и роста мицелия и в отличие от последнего действовал на полной и минимальной средах. Разница в действии дипептидов могла быть связана как с различиями в проницаемости клетки для них, скростиах и степени внутриклеточных превращений, так и с различиями в ингибирующей активности Ac- P_{H} и Ac- P , конечных активных продуктов метаболизма пептидов. Наблюдались также различия и в активности фосфонистого дипептида и Ala- P_{H} , в особенности в отношении конидиогенеза. Следует отметить, что до сих пор не была известна зависимость этой стадии развития микромицета от CoASAc и что среди множества используемых в настоящее время фунгицидов лишь немногие способны влиять на конидиогенез, регулирование которого является одним из наиболее перспективных путей воздействия на фитопатогенные грибы.

Таким образом, при рассмотрении общей схемы антимикробного действия фосфоаналогов аланина и аланилпептидов следует учитывать как различия в активности в отношении грибов и бактерий, так и существенные изменения в действии аналогов аланина в составе фосфопептидов.



Один из выводов настоящего исследования состоит в том, что характерной особенностью фосфоаналогов аминокислот как биологически активных соединений является способность их быть метаболическими предшественниками соответствующих кетокислот — ингибиторов ферментов, а включение аналогов в пептиды может решать проблему транспорта в клетку и быть способом регулирования избирательности действия.

Авторы выражают благодарность Т. И. Осиповой и И. А. Гандуриной (ИМБ) за предоставление образцов фосфоаналогов дипептидов.

* Уместно отметить, что различная природа клеточных оболочек бактерий и грибов обычно подразумевает отсутствие фунгицидной активности у антибактериальных веществ, подавляющих биосинтез клеточной стенки.

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., Войнова 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., Жуков 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. Bisswander H. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 2. P. 815–822.
12. Струмилло 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. Xypc E. H., Ocipova T. I., 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. 45. № 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}.