



УДК 547.238+577.121.3

**АМИНООКСИАНАЛОГ ПУТРЕСЦИНА ИНГИБИРУЕТ  
ПОЛИКЕТИДНЫЙ ПУТЬ БИОСИНТЕЗА ПРИРОДНЫХ  
СОЕДИНЕНИЙ****Хомутов А. Р., Джавахия В. Г.\*, Воинова Т. М.\*,  
Ермолинский Б. С.\*, Хомутов Р. М.\*\****Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,  
Москва;**\* Всесоюзный научно-исследовательский институт фитопатологии  
Госагропрома СССР, Московская обл.;**\*\* Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Академии  
наук СССР, Москва*

В процессах роста и деления клеток важная роль отводится полиаминам (спермин, спермидин и их предшественник путресцин), которые рассматриваются как универсальные низкомолекулярные регуляторы [1, 2]. Соответственно известны ингибиторы их биосинтеза ( $\alpha, \alpha$ -дифторметилорнитин (DFMO) [3], метилглиоксаль-бисгуанилгидразон (MGBG) [4]), которые влияют на уровень полиаминов и клеточный рост. Эти исследования ведутся преимущественно на животных системах, однако недавно было обнаружено, что DMFO тормозит рост фитопатогенного гриба *Uromyces phaseoli*, причем его действие снимается путресцином и спермидином. Возможность направленного воздействия на целостную систему хозяин — патоген объяснялась различиями в путях образования путресцина у грибов и растений [5, 6].

Недавно нами было показано, что полифункциональные гидроксилламины являются перспективным источником специфических ингибиторов карбонилзависимых ферментов обмена аминокислот [7]. Так, 1-аминоокси-3-аминопропан (АРА) и 5'-дезоксаденозил-5'-метилтиоэтилгидроксиламин (АМА) сильно и избирательно тормозили активность соответственно орнитиндекарбоксилазы [8] и декарбоксилазы S-аденозилметионина [9, 10], а также были весьма активны и на клеточном уровне [11, 12].

В этой работе сообщается о биологической активности этих ингибиторов по отношению к фитопатогенному грибу *Pyricularia oryzae* Sav.\* и выявляются качественные отличия их действия от действия известных ингибиторов биосинтеза полиаминов — DFMO и MGBG.

Методики культивирования *P. oryzae*, выделение и идентификация метаболитов описаны ранее [13]. Оценку действия веществ на прорастание конидий и рост мицелия и пигментацию гриба производили аналогично описанному в работе [14]. Использовали приготовленную на дистиллированной воде минимальную питательную среду состава:  $\text{NaNO}_3$  (30 мМ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мМ),  $\text{MgSO}_4$  (2 мМ), биотин (5 мкг/л), тиамин (0,2 мкг/л), сахара (0,5%) и агар «Difco» (1,5%). Полная среда дополнительно содержала набор аминокислот и азотистых оснований.

DFMO был любезно предоставлен Т. Элоранта (ун-т г. Куопио, Финляндия), АРА и АМА синтезированы согласно [15, 16], дихлоргидрат путресцина и MGBG — препараты фирмы Sigma.

Все исследованные соединения (таблица) тормозили рост мицелия и прорастание конидий в интервале концентраций 0,2–2,0 мМ. Действие DFMO и АРА снимали добавлением в среду 1,25 мМ путресцина, что сви-

\* Гриб является возбудителем пирикулярриоза, одного из наиболее вредоносных заболеваний риса.

Влияние ингибиторов биосинтеза полиаминов на прорастание конидий, рост и пигментацию мицелия *P. oryzae* Cav.

Вещество	Питательная среда	Концентрация вещества		Подавление прорастания конидий, %	Подавление роста мицелия, %	
		мг/мл	мМ			
АРА	Полная	200	1,23	0	20	
		300	1,84	0	39	
		400	2,45	0 *	54 *	
	Минимальная	50	0,31	0	62	
		100	0,62	0 *	77 *	
		150	0,80	23 *	84 *	
АМА	Полная	300	0,54	0	0	
		400	0,71	30	10	
		500	0,89	36	20	
	Минимальная	200	0,36	10	32	
		250	0,45	100	100	
		300	0,54	100	100	
DFMO	Полная	200	1,10	0	25	
		300	1,64	0	36	
	Минимальная	25	0,14	25	40	
		50	0,23	100	100	
	MGBG	Полная	500	3,70	40	15
		Минимальная	200	1,10	90	

\* Мицелий бесцветный (в норме серый).

детельствовало о том, что их влияние на рост *P. oryzae* связано с нарушением именно биосинтеза путресцина. Как следовало ожидать, в случае АМА добавление путресцина не восстанавливало роста, так как ингибирование декарбоксилазы S-аденозилметионина приводит к снижению уровня спермидина и спермина. Таким образом, новые ингибиторы биосинтеза полиаминов АРА и АМА оказались, как и DFMO в случае гриба *U. phaseoli*, сильными ингибиторами роста *P. oryzae*.

DFMO не является аналогом полиаминов, тогда как АРА представляет собой аминоксиданалог путресцина, чем, по-видимому, и были обусловлены принципиальные различия в действии этих соединений. При концентрации АРА порядка 0,6 мМ, т. е. заметно влияющих на рост мицелия, на минимальной среде наблюдалось изменение окраски колоний, которые становились бесцветными при повышении концентрации ингибитора, когда как DFMO не действовал на пигментацию гриба. Следовательно, АРА можно было рассматривать наряду с трициклазолом [17] и  $\alpha$ -аминоэтилфосфонистой кислотой (АЕРА) [18] как новый реагент, воздействующий на существенный для жизнедеятельности микроорганизмов процесс меланиногенеза.

В ходе исследований по установлению возможных точек воздействия АРА было выяснено, что в присутствии АРА гриб не продуцирует фитотоксический гептакетид пирикулол и пентакетидные ароматические предшественники меланина \*\*. Добавление в среду основного предшественника меланина, сциталона, приводило к восстановлению окраски гриба. По аналогии с АЕРА можно было заключить, что АРА действует на ранние этапы меланиногенеза, т. е. пируват-дегидрогеназный комплекс, образование малонил-CoA или мультиферментный комплекс, продуцирующий ароматические поликетидные предшественники меланина. Поскольку АРА не ингибировал превращение пирувата в CoASAc, а гидроксиламины не явля-

\*\* Основные этапы биосинтеза меланина приведены в [18] и подробно обсуждаются в [17].

ются типовыми ингибиторами CoASAc карбоксилазы, вероятной мишенью его действия оставался мультиферментный комплекс. Следует отметить, что известный фунгицид трициклазол воздействует только на превращение уже готовых ароматических предшественников меланина, а биотрансформация второго эффективного ингибитора меланиногенеза, АРА, приводит к торможению пируват-дегидрогеназного комплекса \*, тогда как избирательных ингибиторов, действующих на процесс поликонденсации ацетил- и малонил-CoA, до сих пор известно не было.

Хотя вопрос о природе ингибирования мультиферментного комплекса АРА подлежит более детальному исследованию, необходимо отметить, что окраска гриба восстанавливалась добавлением путресцина. Кроме того, действие АРА усиливалось в присутствии DFMO, который, как известно, снижает внутриклеточную концентрацию путресцина. Таким образом, оправданным представлялся вывод об участии последнего на ранних этапах меланиногенеза. Среди известных биологических функций спермина, спермидина и их предшественника путресцина до сих пор не отмечалась необходимость их в биосинтетических процессах, связанных с утилизацией CoASAc, что не только открывает новые возможности для направленного воздействия на процессы меланиногенеза в микромицетах, но может иметь и более общее значение.

Авторы благодарят А. И. Бирюкова (ИМБ АН СССР), любезно предоставившего данные о влиянии АРА на активность пируват-дегидрогеназного комплекса из *E. coli*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janne J., Pösö H., Raina A. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 473. № 3/4. P. 241–293.
2. Pegg A. E. // Cancer Res. 1988. V. 48. № 2. P. 759–774.
3. Metcalf B. W., Bey P., Danzin C., Jung M. J., Casara P., Vevert J. P. // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 8. P. 2551–2553.
4. Jänne J., Alhonen-Hongisto L., Nikkila P., Elo H. // Advances in Enzyme Regulation V. 24/Ed. Weber G. Oxford: Pergamon Press, 1986. P. 125–139.
5. Tiburcio A. F., Kaur-Sawhney R., Ingersoll R. B., Galston A. W. // Plant Physiol. 1985. V. 78. № 3. P. 323–326.
6. Rajam M. V., Weinstein L. H., Galston A. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 20. P. 6874–6878.
7. Khomutov A. R., Gabibov A. G., Khurs E. N., Tolosa E. A., Shuster A. M., Goryachenkova E. V., Khomutov R. M. // Biochemistry of Vitamin B<sub>6</sub>/Eds Korpela T., Christen P. Basel: Birkhäuser Verlag, 1987. P. 317–320.
8. Хомутов Р. М., Денисова Г. Ф., Хомутов А. Р., Белостоцкая К. М., Шлосман Р. Б., Артамонова Е. Ю. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1574–1576.
9. Хомутов Р. М., Завалова Л. Л., Сырку В. И., Артамонова Е. Ю., Хомутов А. Р. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 130–131.
10. Артамонова Е. Ю., Завалова Л. Л., Хомутов Р. М., Хомутов А. Р. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 206–212.
11. Kramer D. L., Khomutov R. M., Bukin Yu. V., Khomutov A. R., Porter C. W. // Biochem. J. In press.
12. Pyyönen T., Alakuijala L., Andersson L., Khomutov A. R., Khomutov R. M., Floranta T. O. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 23. P. 11138–11144.
13. Воинова Т. М., Вавилова Н. А., Трехова В. А., Деблова З. Н., Джавахия В. Г., Дьяков Ю. Т. // Биол. науки. 1984. № 1. С. 78–82.
14. Джавахия В. Г., Яковлев А. Г., Каграманов В. Н. // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14. № 6. С. 507–509.
15. Хомутов А. Р., Хомутов Р. М. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 5. С. 627–633.
16. Хомутов А. Р., Хомутов Р. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1662–1674.
17. Yamaguchi I. // J. Pest. Sci. 1982. V. 7. № 2. P. 307–316.
18. Хомутов Р. М., Хурс Е. Н., Джавахия В. Г., Воинова Т. М., Ермолинский Б. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1422–1424.

Поступило в редакцию  
2.XI.1988

\* Эти данные были представлены в пленарных докладах на Международном симпозиуме «Химические и биологические аспекты пиридоксалевого катализа» (Турку, Финляндия, 1987 г.) и на IX объединенном симпозиуме биохимических обществ СССР и ГДР «Проблемы современной биохимии и биотехнологии» (Иена, ГДР, 1987 г.).

AMINOXY ANALOGUE OF PUTRESCINE INHIBITS POLYKETIDE  
BIOSYNTHETIC PATHWAY OF NATURAL PRODUCTS

KHOMUTOV A. R., DZAVAKHIA V. G.\*, VOINOVA T. M.\*, ERMOLINSKY B. S.\*,  
KHOMUTOV R. M.\*\*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow;*

*\* All-Union Research Institute of Phytopathology, Gosagroprom  
of the USSR, Moscow Region;*

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

Inhibitors of polyamine biosynthesis, viz.  $\alpha$ -,  $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO), 1-aminoxy-3-aminopropane (APA), 5'-deoxyadenosyl-5'-methylthioethylhydroxylamine (AMA) and methylglyoxal-bis-guanylhydrazone (MGBG), were tested on phytopathogenic fungus *Pyricularia oryzae* Cav. and turned out to inhibit efficiently micelium growth and conidiogenesis. Putrescine cancelled the growth inhibition caused by DFMO and APA but not by AMA and MGBG. At the same time only APA bleached colonies blocking biosynthesis of all aromatic precursors of melanine; the effect can be reversed by putrescine. Participation of polyamines in the pentaketide biosynthetic pathways and use of polyamine reactive analogues to study their metabolic functions are discussed.