



УДК 577.152.361*1'14

**ВЗАИМОСВЯЗЬ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ
И ПРИРОДЫ ИОНА МЕТАЛЛА-АКТИВАТОРА***Мельник М.С., Назарова Т.И., Аваева С.М.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского,
Москва*

Органический и неорганический субстраты конкурируют за связывание с ферментом, но по-разному укладываются в активном центре пиррофосфатазы. Различия в укладке являются причиной отсутствия гидролиза органического субстрата ферментом, активированным ионами магния. Модифицированное гидроксиламином по активному центру производное пиррофосфатазы перестает гидролизовать пиррофосфат магния, но активно по отношению к пиррофосфату цинка. Гидроксиламин модифицирует белковый лиганд иона металла в центре высокого сродства; в результате этот центр теряет способность связывать ионы магния, а сродство к ионам цинка только незначительно ухудшается. Образование продуктивного комплекса происходит таким образом, что ион металла в составе субстрата связывается в том центре, который в отсутствие субстрата является центром высокого сродства к иону металла. Предложена схема расположения органического и неорганического субстратов в активном центре пиррофосфатазы.

Неорганическая пиррофосфатаза (КФ 3.6.1.1) катализирует гидролиз пиррофосфата, триполифосфата, а также их эфиров, например ADP, ATP и O-пиррофосфозаноламина [1, 2]. Это металлозависимый фермент, проявляющий активность лишь в присутствии катионов двухвалентных металлов, таких, как Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} [3].

По современным представлениям, активный центр пиррофосфатазы может связывать три иона металла (Me) и молекулу полифосфата [4, 5]. Два катиона присоединяются к ферменту независимо от присутствия субстрата, и их сродство различается приблизительно в 10 раз. Третий же привносится в виде комплекса с полифосфатом, который и рассматривается как истинный субстрат пиррофосфатазы. Кроме активного центра фермент содержит так называемый регуляторный центр, способный связывать полифосфаты, фосфорилирование этого центра под действием ATP приводит к активации пиррофосфатазы [6].

Пиррофосфат гидролизуется ферментом в присутствии любого из указанных выше катионов, однако органические субстраты расщепляются лишь в присутствии катионов *d*-элементов и не гидролизуются в присутствии ионов магния. Задачей настоящей работы явилось изучение причины такого изменения субстратной специфичности пиррофосфатазы. При этом можно было высказать два предположения: во-первых, органический и неорганический субстраты могут гидролизироваться в различных активных центрах фермента; во-вторых, при совпадении центров гидролиза субстратов возможны различия в их укладке либо за счет различия в заряде (так как комплекс катиона-активатора с неорганическим субстратом несет два заряда ($MePP^{2-}$), а с органическим — только один ($MePPR^-$) [3]), либо из-за присутствия в органической части молекулы объемных заместителей с дополнительными функциональными группами (последнюю причину можно, вероятно, исключить, поскольку, как было установлено ранее [7], кинетические параметры гидролиза метилпиррофосфата и субстратов, содержащих более сложные органические радикалы, практически не различаются). Вместе с тем в работе [8] нами было получено указание на то, что органический и неорганический субстраты гидролизуются

ются в одном и том же активном центре пиррофосфатазы, поскольку оказалось, что они конкурируют за место связывания на ферменте. В настоящей работе показано: 1) нативная пиррофосфатаза и фермент, модифицированный гидроксиламином по регуляторному центру [9], в одинаковой степени гидролизуют метилпиррофосфат, т. е. регуляторный центр пиррофосфатазы не участвует в гидролизе органического субстрата; 2) стабилизированный фторидом фермент-субстратный комплекс, в котором активный центр пиррофосфатазы блокирован пиррофосфатом [10], не способен гидролизовать ни неорганический, ни органический субстраты; 3) О-фосфоэтанолламин, являющийся конкурентным ингибитором гидролиза пиррофосфата магния [11], ингибирует ферментативное расщепление метилпиррофосфата цинка также по конкурентному типу.

Из совокупности приведенных результатов следует, что различия в гидролизе органического и неорганического субстратов могут быть связаны только с обусловленной изменением зарядов разницей в укладке этих субстратов в активном центре фермента. Действительно, фосфосерин ингибирует ферментативный гидролиз пиррофосфата магния по некокурентному типу, а гидролиз метилпиррофосфата цинка — по смешанному (рис. 1). Полученный результат определенно свидетельствует о существовании различной укладки органического и неорганического субстратов в активном центре пиррофосфатазы. Некоторые доказательства в пользу этого положения были получены и ранее. Так, в работе [8] было показано, что введение метильного радикала в молекулу пиррофосфата уменьшает сродство фермента к комплексу иона металла с субстратом в 100 раз в присутствии ионов цинка и в 300 раз в присутствии ионов магния (константы Михаэлиса для пиррофосфата цинка ($ZnPP$) и метилпиррофосфата цинка (CH_3PPZn) составляют 1,5 и 146 мкМ, а для пиррофосфата магния ($MgPP$) и комплекса метилпиррофосфата с Mg^{2+} (CH_3PPMg) — 8 и 2400 мкМ соответственно). Можно полагать, что, с одной стороны, центры связывания ферментом иона металла, входящего в состав субстрата, в случае органического и неорганического субстратов различны, с другой — ион металла органического субстрата связывается в центре, сродство которого к иону щелочноземельного магния существенно ниже, чем к иону *d*-элемента цинка. Низкое сродство к ферменту иона магния в составе органического субстрата, вероятно, одна из причин низкого сродства органического субстрата к пиррофосфатазе, активированной Mg^{2+} .

Еще одним свидетельством в пользу иной укладки органического субстрата по сравнению с неорганическим является проведенное ранее исследование по влиянию ионов магния на гидролиз метилпиррофосфата цинка [8]. Замедление гидролиза органического субстрата ферментом вызывается связыванием только одного иона магния с центром низкого сродства ($K_d \sim 1,7 \cdot 10^{-4}$ М). Следовательно, центр высокого сродства ($K_d \sim 2 \cdot 10^{-5}$ М) либо вообще отсутствует в продуктивном комплексе с органическим субстратом, либо тоже заполнен при изучаемых концентрациях ионов магния, но не влияет на гидролиз органического субстрата. Таким образом, центры связывания на ферменте иона металла, входящего в состав органического и неорганического субстратов, должны быть различными.

Замедление гидролиза метилпиррофосфата цинка при связывании иона магния в центре низкого сродства говорит о том, что природа иона металла в этом центре существенна для ферментативного гидролиза органического субстрата. По современным представлениям, роль иона металла, присоединяющегося в центре низкого сродства, сводится к фиксации молекулы воды в положении, удобном для нуклеофильной атаки, и облегчению перемещения протона к расположенному рядом карбоксилат-иону [4]. Изменение укладки органического субстрата по сравнению с неорганическим, возможно, нарушает такую активацию молекулы воды, например, за счет разрыва водородной связи с карбоксилат-ионом. При этом роль иона металла в генерации нуклеофила резко возрастает. Поскольку ион цинка способен генерировать более сильный нуклеофил, чем ион магния, представляется весьма вероятным, что связывание Mg^{2+} в центре

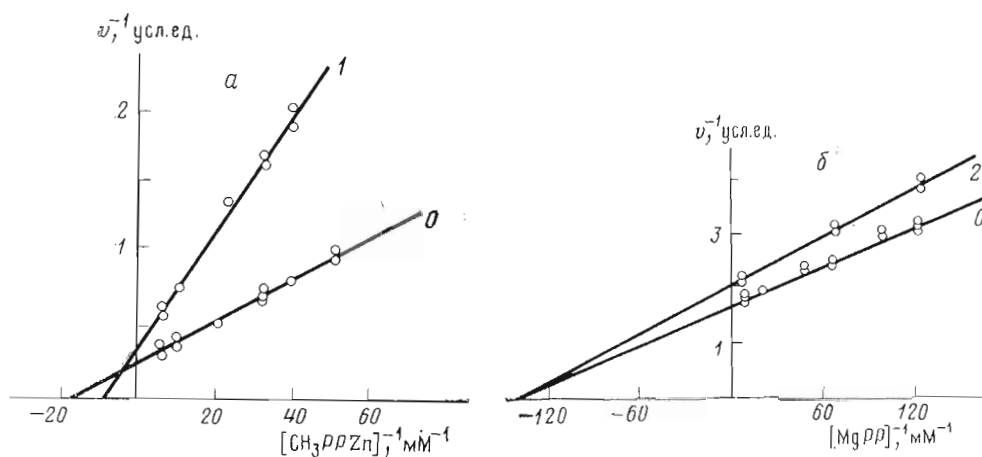


Рис. 1. Ингибирование фосфосерином ферментативного гидролиза метилпирофосфата цинка (а) и пирофосфата магния (б). Цифры у прямых соответствуют концентрации ингибитора в мМ. $[E] \cdot 10^{-7}$ (а) или 10^{-8} М (б)

низкого сродства вызовет замедление гидролиза метилпирофосфата цинка. Нуклеофильность Mg^{2+} растет с увеличением рН, и, если предложенная укладка органического субстрата верна, можно думать, что при этом Mg^{2+} может приобрести способность активировать гидролиз органического субстрата. Действительно, при рН 9,1 метилпирофосфат расщепляется пирофосфатазой в присутствии Mg^{2+} . Скорость гидролиза невелика — 1,5% от скорости гидролиза CH_3PPZn .

Причиной различий в укладке органического субстрата по сравнению с неорганическим является изменение величины его заряда, что должно приводить к нарушению взаимодействия метилпирофосфата с гуанидиногруппой Arg^{77} и тем самым обуславливать более низкое сродство органического субстрата к пирофосфатазе и уменьшение числа контактов субстрата с активным центром фермента. В результате укладка органического субстрата происходит таким образом, что ион металла в его составе связывается в центре, сродство которого к щелочноземельному иону магния существенно ниже, чем к иону d -элемента цинка. Действительно, согласно данным рентгеноструктурного анализа, один из центров связывания ионов металла содержит в своем окружении только остатки Gln, Lys и Arg [4]. Сродство Mg^{2+} к такому центру существенно ниже, чем сродство ионов d -элементов Zn^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} . Связывание ионов d -элементов в составе органического субстрата в центре, не содержащем отрицательно заряженных лигандов, должно приводить к увеличению электрофильности атакуемого нуклеофилом атома фосфора и, следовательно, к более эффективному гидролизу органического субстрата.

Изменение субстратной специфичности при изменении сродства ионов магния и цинка к одному и тому же центру продемонстрировано с помощью модификации активного центра пирофосфатазы гидроксиламином. Ранее было установлено, что это соединение взаимодействует с остатком дикарбоновой кислоты, активированной в присутствии ионов магния, и вызывает ингибирование гидролиза пирофосфата магния [12]. Как следует из рис. 2, модифицированный фермент сохраняет активность по пирофосфату цинка (через 4 ч модификации активность по гидролизу $MgPP$ падает на 75%, а по гидролизу $ZnPP$ — только на 25%).

Для выяснения природы данного эффекта были проведены спектральные и кинетические исследования модифицированной гидроксиламином пирофосфатазы, сохранившей 25% активности по отношению к $MgPP$. При этом было учтено то обстоятельство, что заполнение на ферменте центра высокого сродства к ионам магния приводит к тушению флуоресценции, а насыщение центра низкого сродства — к появлению разностных УФ-спектров [13, 14]. Добавление ионов магния к модифицированному гидроксиламином белку вызывало появление дифференциальных

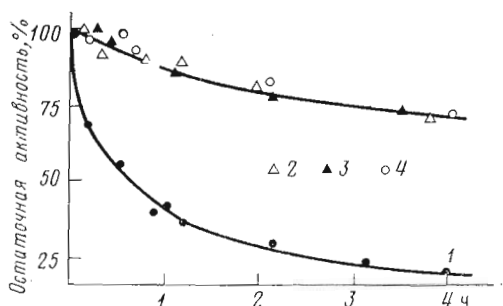


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности пирофосфатазы в гидролизе 1,7 мМ MgPP (1) и 30 мкМ ZnPP в присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ (2), $2 \cdot 10^{-5}$ (3) и $1 \cdot 10^{-4}$ М (4) Zn^{2+} от времени модификации 0,1 М гидроксиламином

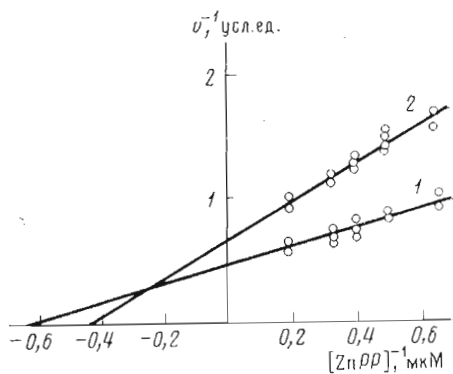


Рис. 3

Рис. 3. Определение константы Михаэлиса для нативного (1) и модифицированного гидроксиламином (2) фермента. $[Zn^{2+}]$ 0,5 мМ, $[E]$ 10^{-8} М

УФ-спектров, т. е. взаимодействие ионов магния с центром низкого сродства в результате модификации не изменилось. В то же время тушение флуоресценции в присутствии ионов магния, отражающее их взаимодействие с центром высокого сродства, существенно уменьшилось: $0,6 \pm 0,1\%$ для модифицированного фермента и $2,5 \pm 0,5\%$ для нативного. Таким образом, гидроксиламин модифицирует центр, обладающий высоким сродством к иону металла. Вместе с тем связывание в центре высокого сродства иона цинка в отличие от Mg^{2+} после модификации только несколько ухудшается. Действительно, титрование ионами цинка модифицированного фермента, не проявляющего активности по MgPP, ведет, как и в случае нативной пирофосфатазы, к появлению дифференциальных УФ-спектров, причем K_d комплекса Zn^{2+} с нативным белком составляет $\leq 2 \cdot 10^{-5}$ М, а с модифицированным — около $4 \cdot 10^{-5}$ М. Можно полагать, что образующаяся в результате взаимодействия карбоксильной группы белка с гидроксиламином гидроксамовая кислота не способна связывать Mg^{2+} , но может взаимодействовать с ионом *d*-элемента цинка.

Как указывалось выше, в фермент-субстратном комплексе пирофосфатазы содержатся три иона металла, два из которых активируют фермент, а один входит в состав субстрата. Поэтому необходимо было выяснить, какой центр модифицируется гидроксиламином: центр связывания свободного иона металла или находящегося в составе субстрата. Если верно первое предположение, то снижение концентрации свободных ионов цинка до величины, существенно меньшей K_d комплекса Zn^{2+} с ферментом, должно приводить к уменьшению ферментативной активности. Концентрацию ионов цинка снижали от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ М и не обнаружили изменения остаточной активности фермента после модификации (рис. 2). Следовательно, гидроксиламин не модифицирует остаток аминокислоты в центре, в котором связывается свободный ион металла при образовании фермент-субстратного комплекса. Вместе с тем константа Михаэлиса для ZnPP возрастает в 1,5 раза для модифицированного белка (K_m 2,2 мкМ) по сравнению с нативным (K_m 1,5 мкМ) (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что гидроксиламин модифицирует в белке остаток дикарбоновой кислоты, связывающий ион цинка из ZnPP.

Итак, при связывании в активном центре пирофосфатазы неорганический субстрат располагается таким образом, что ион металла, входящий в его состав, занимает центр, который в отсутствие субстрата является центром высокого сродства к иону металла. Поскольку комплекс иона металла с пирофосфатом связывается ферментом ($K_d \sim 10^{-6}$ М) прочнее, чем ион металла в центре высокого сродства ($K_d \sim 2 \cdot 10^{-5}$ М), при образовании продуктивного комплекса ион металла, входящий в состав неорганическо-

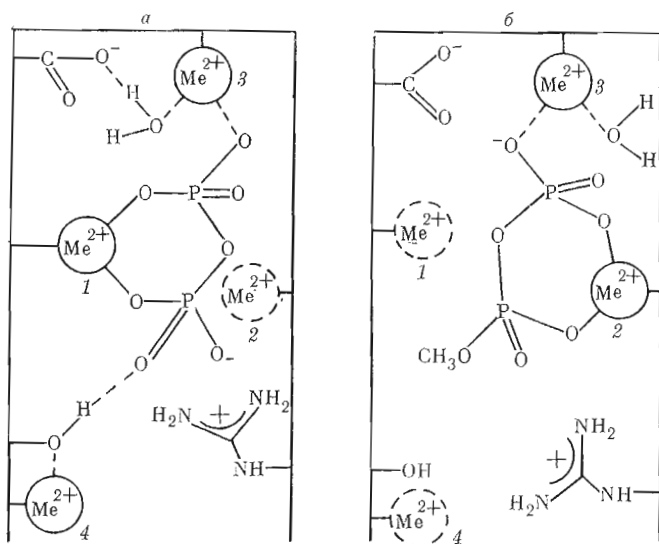


Рис. 4. Схематическое изображение укладки неорганического (а) и органического (б) субстратов в активном центре пирофосфатазы: 1 — центр высокого сродства к иону металла в отсутствие субстрата, а также центр связывания иона металла в составе неорганического субстрата; 2 — центр связывания иона металла в составе органического субстрата; 3 — центр низкого сродства к иону металла в отсутствие субстрата; 4 — центр связывания иона металла, который формируется при связывании субстрата

го субстрата, вероятно, вытесняет ион металла из его центра связывания на белке.

Таким образом, наиболее вероятными причинами изменения субстратной специфичности неорганической пирофосфатазы при замене металла-активатора являются различная укладка органического и неорганического субстратов в активном центре фермента (рис. 4) и различие в способности ионов магния и цинка генерировать необходимый для реакции нуклеофил. При гидролизе пирофосфата субстрат располагается в активном центре таким образом, что ион металла в его составе занимает центр 1 (рис. 4а), который является центром высокого сродства к иону металла в отсутствие субстрата. Такое расположение неорганического субстрата, вероятно, объясняется взаимодействием отрицательно заряженной фосфатной группы с гуанидиногруппой остатка Arg⁷⁷, образованием водородной связи с донором протона остатком Tyr (или Lys) и экранированием ионом металла, расположенным в центре низкого сродства (центр 3), отрицательного заряда субстрата. Все это приводит к эффективному связыванию неорганического субстрата с ферментом ($K_a \sim 10^{-6}$ М).

С другой стороны, органический субстрат, лишенный одного отрицательного заряда и утративший контакт с катионным центром белка (Arg, Lys), имеет более низкое сродство к пирофосфатазе ($K_a \sim 10^{-4}$ М). В результате органический субстрат укладывается в активном центре таким образом, что ион металла в его составе связывается в центре, имеющем гораздо более низкое сродство к иону щелочноземельного магния по сравнению с ионом *d*-элемента цинка (центр 2, рис. 4б).

Вопрос о причинах изменения субстратной специфичности пирофосфатазы был рассмотрен недавно Найтом с сотр. [15]. На основании изучения гидролиза би- и тридентатных комплексов триполифосфата с Co^{2+} в присутствии Mg^{2+} и Zn^{2+} авторы предположили, что различия в субстратной специфичности фермента, активированного Mg^{2+} или Zn^{2+} , обусловлены либо свойствами катионов-активаторов, либо потерей ионами магния способности связываться с одним из центров на ферменте.

В работе использовали трис(оксиметил)аминометан (трис), 2-(N-морфолино)этансульфокислоту (Mes), 2-амино-2-метилпропандиол-1,3, пиррофосфат натрия, O-фосфоэтаноламин, фосфосерин (Sigma, США), хлориды магния и цинка квалификации х. ч. Солянокислый гидроксилламин использовали после трехкратной перекристаллизации из этилового спирта. Для приготовления всех растворов использовали деионизованную воду. В работе применяли титрованные растворы $MgCl_2$, $ZnCl_2$ и свежеприготовленный раствор гидроксилламина, оттитрованный NaOH до pH 6,5. Концентрацию пиррофосфата натрия определяли после исчерпывающего гидролиза аликвоты раствора пиррофосфатазой из дрожжей по количеству образовавшегося фосфата на автоматическом анализаторе фосфата [5].

Неорганическая пиррофосфатаза, выделенная из пекарских дрожжей, имела удельную активность 700 МЕ/мг белка [16]; ферментативную активность определяли на автоматическом анализаторе фосфата [5]. Производное фермента, модифицированное гидроксилламином по регуляторным центрам обеих субъединиц, получали согласно [9], а фермент-субстратное соединение, стабилизированное фторидом, — по методике [10].

Метилпиррофосфат натрия синтезировали по методике, описанной в работе [17], и очищали как указано в [7].

Константы диссоциации комплексов Mg^{2+} с пиррофосфатом рассчитаны в соответствии с [18], K_d комплексов Zn^{2+} с пиррофосфатом и метилпиррофосфатом взяты из работ [19] и [7] соответственно.

Ингибирование пиррофосфатазы гидроксилламином. 10 мкг (0,15 нмоль) фермента инкубировали в 1 мл 0,1 М Mes-NaOH-буфера, pH 6,5, с 10 мкМ $MgCl_2$ и 0,1 М гидроксилламином. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и измеряли активность фермента при 25°С по пиррофосфату магния или цинка (см. ниже). Скорость образования ортофосфата измеряли на автоматическом анализаторе фосфата, работающем в непрерывном режиме с чувствительностью $(1-5) \cdot 10^{-5}$ М фосфата на полную шкалу самописца [5]. Активность по пиррофосфату магния определяли в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,2, содержащем 1,7 мМ пиррофосфат натрия и 1,7 мМ хлорид магния. Смесь для определения активности по пиррофосфату цинка в 0,1 М Mes-NaOH-буфере, pH 6,5, содержала 30 мкМ пиррофосфат цинка и 5–100 мкМ Zn^{2+} .

Спектры флуоресценции фермента в присутствии ионов магния измеряли на спектрофотометре Hitachi MPF-4 (Япония). Длина волны возбуждения 280 нм, длина волны пропускания 325 нм. Вся шкала самописца составляла 20% от интенсивности флуоресценции при 325 нм. За тушением флуоресценции в присутствии ионов магния наблюдали, добавляя по 1 мкл 30 мМ $MgCl_2$ к 1,3 мл 1 мкМ раствора нативного или ингибированного гидроксилламином фермента в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 7,2.

Дифференциальные УФ-спектры фермента с ионами магния или цинка измеряли на спектрофотометре Cary 219 (США) с использованием шкалы 0–0,1 ОЕ при 25°С. Аликвоты по 2,5 мл 5 мкМ раствора нативного или ингибированного гидроксилламином фермента помещали в две идентичные кварцевые кюветы (длина оптического пути 1 см) и выстраивали базовую линию в интервале длин волн 260–320 нм. Порциями по 10–20 мкл в одну кювету добавляли растворы солей цинка или магния, в контрольный раствор вводили равный объем буфера. Изменение объема в конце титрования составляло не более 4%. Разностные УФ-спектры фермента с ионами магния измеряли в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 7,2, содержащем 0,1 М NaCl, а с ионами цинка — в 0,1 М Mes-NaOH-буфере, pH 6,5, с 0,1 М NaCl.

Гидролиз субстратов неорганической пиррофосфатазой дрожжей и ее производными. Сравнительное изучение гидролиза CH_2PPZn пиррофосфатазой и ее производным с модифицированными гидроксилламином регуляторными центрами обеих субъединиц проводили в 0,05 М Mes-NaOH-буфере, pH 6,5. Концентрация фермента в различных опытах составляла 10^{-8} – 10^{-7} М, а свободной формы ионов цинка — 0,1 мМ. Скорость фер-

ментативного гидролиза определяли на автоматическом анализаторе фосфата [5].

При ингибировании гидролиза субстратов О-фосфоэтанололамином и фосфосерином реакционные смеси содержали 0,5–2 мМ ингибитор.

Активность фермент-субстратного соединения, стабилизированного фторидом, измеряли по пирофосфату магния в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,2, содержащем 1,7 мМ MgCl₂ и 1,7 мМ пирофосфат натрия, или по пирофосфату цинка в 0,05 М Mes-NaOH-буфере, рН 6,5, с 0,1 мМ ZnCl₂ и 0,1 мМ пирофосфатом натрия, или по метилпирофосфату цинка в 0,05 М Mes-NaOH-буфере, рН 6,5, с 0,15 мМ Zn²⁺ и 0,1 мМ метилпирофосфатом цинка.

Гидролиз метилпирофосфата при рН 9,1 изучали в 0,1 М 2-амино-2-метилпропандиол-1,3-NaOH-буфере в присутствии 1 мМ ZnCl₂ или MgCl₂. Концентрация фермента составляла 10⁻⁷ М, метилпирофосфата – 1,5 мМ. Через определенные промежутки времени отбирали аликваты и измеряли количество образовавшегося фосфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shlesinger M. G., Coon M. G. *Biochim. et biophys. acta*, 1960, v. 41, № 1, p. 30–36.
2. Кузнецов А. В., Аваева С. М., Байков А. А., Скляпкина В. А. *Биоорганич. химия*, 1977, т. 3, № 7, с. 950–957.
3. Cooperman B. S. In: *Methods in enzymology*/Ed. Pestka S. N. Y.—L.: Acad. Press, 1982; v. 87, p. 526–548.
4. Куранова И. П., Терзян С. С., Воронова А. А., Смирнова Е. А., Вайнштейн В. К., Хёне В., Хансен Г. *Биоорганич. химия*, 1983, т. 9, № 12, с. 1611–1619.
5. Вауков А. А., Аваева С. М. *Eur. J. Biochem.*, 1973, v. 32, № 1, p. 136–142.
6. Бакулева Н. П., Костенко Е. Б., Байков А. А., Аваева С. М. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 5, с. 832–840.
7. Мельник М. С., Назарова Т. И., Аваева С. М. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 2, с. 323–328.
8. Мельник М. С., Назарова Т. И., Аваева С. М. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 6, с. 1039–1045.
9. Водовозова Е. Л., Воробьева Н. Н., Комиссаров А. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. *Биоорганич. химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 187–190.
10. Вауков А. А., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Awaeva S. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 481, № 1, p. 184–194.
11. Кузнецов А. В., Скляпкина В. А., Аваева С. М. *Биоорганич. химия*, 1979, т. 5, № 9, с. 1396–1403.
12. Аваева С. М., Воробьева Н. Н., Мельник М. С., Назарова Т. И. *Биоорганич. химия*, 1979, т. 5, № 10, с. 1510–1578.
13. Вауков А. А., Tam-Viloslado J. I., Awaeva S. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 569, № 1, p. 228–238.
14. Braga E. A., Awaeva S. M. *FEBS Lett.*, 1972, v. 27, № 2, p. 251–255.
15. Knight W. B., Ting S.-J., Chuang S., Dunaway-Mariano D., Naromy T., Sundaralingam M. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1983, v. 227, № 1, p. 302–309.
16. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. *Биохимия*, 1973, т. 38, № 1, с. 344–350.
17. Schülke U. Z. *Angew. und allg. Chem.*, 1968, B. 361, № 5–6, S. 225–334.
18. Шафранский Ю. А., Байков А. А., Андрукович П. Ф., Аваева С. М. *Биохимия*, 1977, т. 42, № 7, с. 1244–1251.
19. Волк С. Е., Байков А. А., Аваева С. М. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 1, с. 33–39.

Поступила в редакцию
21.III.1984

INTERRELATION BETWEEN THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE AND THE NATURE OF ACTIVATOR METAL ION

MEL'NIK M. S., NAZAROVA T. I., AWAIEVA S. M.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Organic and inorganic substrates are competitive in their enzyme-binding capacity, but fit differently into the pyrophosphatase active site. This difference accounts for the fact that the Mg²⁺-activated enzyme does not hydrolyze the organic substrate. The enzyme modified at the active site by hydroxylamine fails to hydrolyze magnesium pyrophosphate but is still active towards zinc pyrophosphate. Hydroxylamine modifies the protein ligand of the metal ion in the high affinity center, the latter loses the capacity to bind Mg²⁺ while the affinity for Zn²⁺ decreases insignificantly. The productive complex is formed in such a way that the metal ion within the substrate is bound in a center which, in the absence of the substrate, becomes a high affinity center for the metal ion. A scheme for disposition of both organic and inorganic substrates in the pyrophosphatase active site is proposed on the basis of the obtained results.