



УДК 577.152.361*1'042

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ
ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ *E. COLI* ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
С ИОНАМИ МАГНИЯ, ЦИНКА, КАЛЬЦИЯ И ФТОРА***Курилова С. А., Богданова А. В., Назарова Т. П.,
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*

Изучено взаимодействие неорганической пирофосфатазы из *E. coli* с катионами-активаторами магнием и цинком и катионом-ингибитором кальцием. Установлено, что в каждой субъединице фермента существуют три центра связывания Mg^{2+} и Zn^{2+} , заполнение двух из них приводит к активации гидролиза субстрата, а насыщение третьего — к его ингибированию. Субъединица пирофосфатазы имеет два центра связывания ионов кальция, причем заполнение лишь одного из них ведет к ингибированию гидролиза субстрата. Ионы фтора вызывают обратимое подавление активности неорганической пирофосфатазы из *E. coli*; ингибирующий эффект вызван взаимодействием фторида с фермент-субстратным комплексом.

Основным субстратом неорганической пирофосфатазы из *E. coli* (КФ 3.6.1.1) является пирофосфат. Этот фермент металлозависим, проявляет активность лишь в присутствии катионов двухвалентных металлов — магния и цинка. Фермент состоит из шести субъединиц, каждая из которых имеет активный центр [1]. Изучение гидролиза пирофосфата в присутствии Mg^{2+} показало, что продуктивный комплекс включает в себя три иона магния, один из которых входит в состав субстрата. Ионы кальция эффективно ингибируют гидролиз пирофосфата магния, замещая два катиона-активатора в составе активного комплекса [1].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия неорганической пирофосфатазы из *E. coli* с ионами магния, цинка и кальция и их роли в регуляции активности этого фермента. Проанализированы причины подавления активности фермента под действием ионов фтора.

*Взаимодействие неорганической пирофосфатазы из *E. coli*
с ионами магния*

При изучении кинетики гидролиза пирофосфата неорганической пирофосфатазой из *E. coli* в присутствии ионов магния установлено, что каталитически активен только комплекс, в состав которого входят фермент, молекула пирофосфата магния и два иона магния. Причем катионы-активаторы могут присоединяться как к свободному ферменту, так и к его комплексу с пирофосфатом магния [1]. Как было показано ранее, из кинетических данных можно оценить лишь произведение констант, характеризующих связывание ионов магния с двумя центрами на ферменте

$(K'_A \cdot K''_A)$, которое при pH 9,1 равно $1,5 \cdot 10^{-8} M^2$, а при pH 7,5— $7 \cdot 10^{-8} M^2$ [1, 2]. Чтобы оценить связывание ионов Mg^{2+} с каждым из этих центров, необходимо использовать другие подходы.

Титрование неорганической пирофосфатазы из *E. coli* катионами магния приводит к появлению разностных УФ-спектров. Определение зависимости спектральных изменений от концентрации ионов магния позволило вычислить константу диссоциации комплекса фермента с Mg^{2+} (K''_A), которая составила $5 \cdot 10^{-5} M$ при pH 7,5. K''_A при pH 9,1 была определена ранее равной $3,9 \cdot 10^{-5} M$ [1], т. е. связывание ионов магния с этим центром

Характеристики взаимодействия неорганической пиррофосфатазы *E. coli* с ионами магния

pH	$K'_A \cdot 10^3, M$	$K''_A \cdot 10^3, M$	$K'''_A \cdot 10^2, M$
9,1	$\geq 0,38$	3,9 *	2,3 **
7,5	$\geq 1,4$	5,0	$\leq 1,3$

* По данным работы [1].

** По данным работы [4].

на ферменте со снижением pH изменяется незначительно. Если предположить, что присутствие субстрата тоже не очень сильно сказывается на связывании Mg^{2+} в этом центре, то, зная произведение констант, определенное из кинетических данных, можно оценить константу диссоциации комплекса ионов магния с другим центром: $\geq 3,8 \cdot 10^{-4}$ M при pH 9,1 и $\geq 1,4 \cdot 10^{-3}$ M при pH 7,5 (табл. 1). Следовательно, сродство этого центра к Mg^{2+} со снижением pH уменьшается более чем в 3 раза, и это может быть связано с тем, что в координационную сферу иона магния в этом центре входит остаток лизина, как было показано ранее для фермента из дрожжей [3].

Для характеристики взаимодействия неорганической пиррофосфатазы из *E. coli* с катионами магния использовали также метод протеолиза фермента субтилизином. Пиррофосфатазу подвергали действию субтилизина в присутствии различных концентраций ионов магния и в каждом случае определяли время инаktivации пиррофосфатазы на 50% ($\tau_{1/2}$). Оказалось, что увеличение концентрации ионов магния вплоть до 1,5 мМ не сказывается на инаktivации пиррофосфатазы под действием субтилизина, дальнейший же ее рост ведет к существенной защите фермента от протеолиза (рис. 1). Полученная зависимость носит сложный сигмоидный характер, что свидетельствует об участии в процессе более одного иона магния. Для определения числа ионов магния, участвующих в защите пиррофосфатазы от действия субтилизина, полученные данные были перестроены в координатах Хилла. Коэффициент Хилла, определенный как тангенс угла наклона полученной прямой, составляет 1,4 и указывает на участие в защите от протеолиза по крайней мере двух ионов магния. Действительно, данные по защитному эффекту ионов магния в координатах $1/\Delta k$ от $1/[Mg^{2+}]^2$ описываются прямой линией (рис. 1б), и по отрезку, отсекаемому на оси абсцисс, можно оценить произведение констант диссоциации комплексов ионов магния с ферментом ($1,82 \cdot 10^{-5} M^2$). Таким образом, в защите пиррофосфатазы из *E. coli* от протеолиза субтилизином так же, как и при гидролизе субстрата, участвуют два иона магния. Однако произведение констант диссоциации ионов магния, оказывающих защитное влияние на протеолиз, на три порядка выше, чем произведение констант, определенное при изучении кинетики гидролиза пиррофосфата магния. Такое несоответствие может быть связано либо со значительным увеличением сродства ионов Mg^{2+} к пиррофосфатазе в присутствии субстрата, либо с существованием на ферменте третьего центра связывания ионов магния, который насыщается лишь при высоких концентрациях лиганда и заполнение которого влияет на протеолиз фермента субтилизином. Предположение о существовании третьего центра связывания Mg^{2+} подтвердилось при анализе данных по гидролизу пиррофосфата магния, опубликованных ранее Джоссом [4], который показал, что при высоких концентрациях Mg^{2+} активность пиррофосфатазы из *E. coli* падает. Рассчитанная из данных работы [4] константа диссоциации комплекса Mg^{2+} с центром фермента, заполнение которого вызывает ингибирующий эффект, составляет $2,3 \cdot 10^{-2}$ M при pH 9,1 (табл. 1). На основании этих результатов и произведения констант, полученного из данных по протеолизу, удалось оценить константу диссоциации комплекса Mg^{2+} с ингибирующим центром (K_A''') при pH 7,5, которая приведена в табл. 1.

Таким образом, в молекуле пиррофосфатазы из *E. coli* существуют три

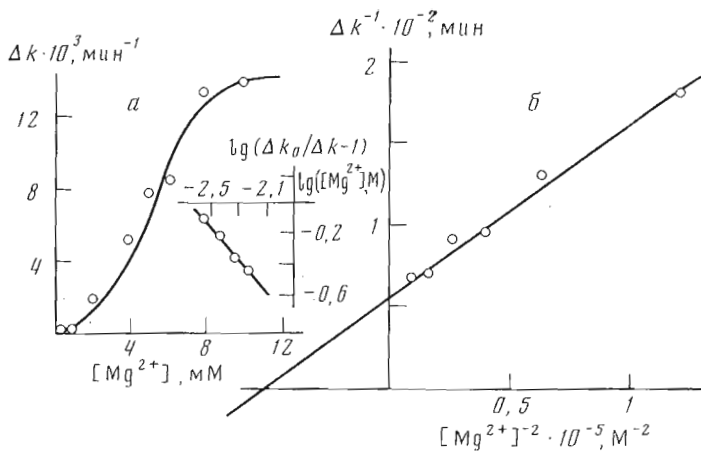


Рис. 1. Зависимость инактивации неорганической пирофосфатазы из *E. coli* субтилизином: а — от концентрации ионов магния (на вставке график Хилла для связывания ионов магния), б — от квадрата обратной концентрации ионов магния в растворе. Δk — разность констант инактивации пирофосфатазы в отсутствие и в присутствии ионов магния

центра связывания ионов магния. Насыщение двух из них ведет к активации молекулы фермента, а заполнение третьего вызывает ингибирование. Сравнение полученных результатов с данными для наиболее изученного фермента этого класса, неорганической пирофосфатазы пекарских дрожжей [5], свидетельствует об общности механизмов активации одного и другого ферментов ионами магния. Различия связаны лишь с заполнением третьего центра, имеющего самое низкое сродство к Mg^{2+} . Его насыщение в случае фермента из дрожжей никак не сказывается на активности, а в случае фермента из *E. coli* приводит к ингибированию.

Взаимодействие неорганической пирофосфатазы с катионами цинка

Изучение зависимости степени гидролиза пирофосфата цинка (ZnPP) от концентрации ионов цинка показало, что наряду с активацией наблюдается уменьшение пирофосфатазной активности (рис. 2). Таким образом, в пирофосфатазе из *E. coli* существует центр связывания ионов цинка, заполнение которого приводит к ингибированию гидролиза субстрата. Сродство к Zn^{2+} этого центра фермента очень велико, и константа диссоциации соответствующего комплекса равна приблизительно 10^{-5} М. Из рис. 2

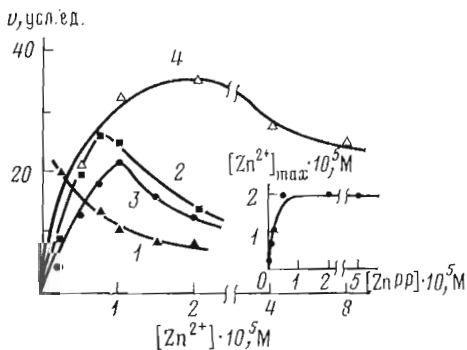


Рис. 2

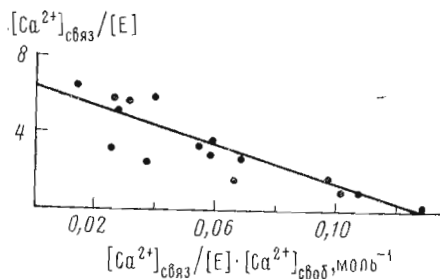


Рис. 3

Рис. 2. Активация катионами цинка гидролиза пирофосфата цинка при следующих концентрациях субстрата (мкМ): 1 (1), 1,5 (2), 2,5 (3), 50 (4). На вставке зависимость $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{max}}$ от концентрации ZnPP . $[\text{E}] = 10^{-7}$ М

Рис. 3. Определение константы связывания ионов кальция с ферментом методом равновесного диализа в координатах Скэтчарда

Равновесный диализ неорганической пирофосфатазы
E. coli с ионами кальция и цинка

Добавленный лиганд	Концентрация белка, мкМ	Концентрация добавленного иона металла, мМ	Содержание ионов металла, моль/моль субъединицы
Ca ²⁺	14,6–27,4	0,08	0,3±0,1
		0,15	0,6±0,1
		0,50	1,0±0,1
		0,80	1,2±0,1
		1,0	1,6±0,1
		1,5	2,0±0,2
Zn ²⁺	40,7	5,0	2,0±0,2
		1,0	2,7±0,1
		2,0	3,2±0,1

следует также, что концентрация ионов цинка, при которой наблюдается максимальная активность, $[Zn^{2+}]_{max}$, зависит от концентрации субстрата $ZnPP$. Возможно, это объясняется тем, что центры связывания Zn^{2+} , вызывающего ингибирование, и $ZnPP$ находятся близко друг к другу и взаимодействуют в процессе катализа. Так как из кинетических данных не удалось оценить количество ионов цинка, участвующих в активации фермента, методом равновесного диализа было измерено число ионов цинка, взаимодействующих с пирофосфатазой *E. coli* в отсутствие субстрата. Согласно табл. 2, в субъединице пирофосфатазы существуют три центра связывания ионов цинка. Можно предположить, что, как и в случае взаимодействия пирофосфатазы с ионами магния, заполнение ионами цинка одного из центров связывания вызывает ингибирование фермента, а насыщение двух других — активацию его. Такая же картина наблюдается для пирофосфатазы пекарских дрожжей [6].

Взаимодействие неорганической пирофосфатазы из *E. coli*
с ионами кальция

Для оценки числа мест связывания ионов кальция с ферментом был использован метод равновесного диализа с $^{45}CaCl_2$ в диапазоне концентраций 0,08–5 мМ $CaCl_2$ при pH 7,5. Из полученных данных (табл. 2) следует, что в изученных условиях с пирофосфатазой из *E. coli* связываются два иона кальция. Полученные результаты позволили определить также константу диссоциации для одного из центров связывания ионов кальция (K_1) — $6 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 3). Связывание ионов кальция с этим центром можно охарактеризовать также с помощью дифференциальных УФ-спектров, полученных при титровании фермента ионами Ca^{2+} . Из зависимости спектральных изменений от концентрации добавленных ионов кальция рассчитана константа диссоциации комплекса фермента с Ca^{2+} ($6,8 \cdot 10^{-5}$ М), которая хорошо согласуется с данными равновесного диализа (табл. 3). Характер дифференциальных спектров для ионов магния и

Таблица 3

Взаимодействие неорганической пирофосфатазы *E. coli*
с Ca^{2+} при pH 7,5

Добавленный лиганд	$K_1 \cdot 10^5$, М	$K_2 \cdot 10^3$, М	Метод определения
—	6,0		Равновесный диализ
—	6,8		УФ-спектроскопия
—		2,5	Устойчивость к протеолизу
CrPP		0,87	То же
CrPP, Mg ²⁺		0,6	Кинетические данные
CrPP, Zn ²⁺		0,56	То же

Рис. 4. Зависимость инактивации неорганической пирофосфатазы из *E. coli* субтилизином от концентрации ионов кальция

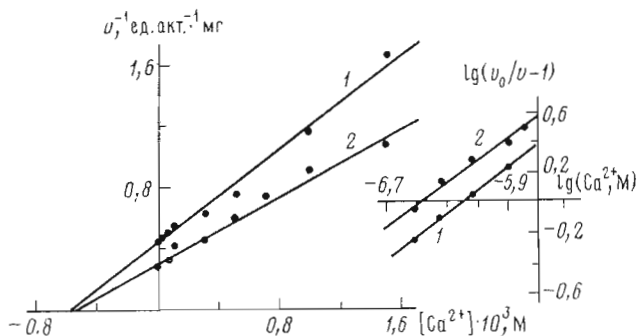
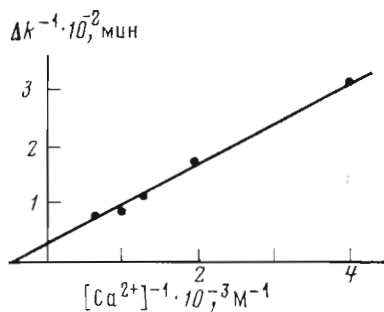


Рис. 5. Ингибирование гидролиза пирофосфата хрома (0,3 мМ) ионами кальция в присутствии 1,5 мМ $MgCl_2$ (1) и 20 мкМ $ZnCl_2$ (2). На вставке график Хилла

кальция совпадает, и это свидетельствует о возможном заполнении ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} одного и того же центра на ферменте.

Константу диссоциации комплекса ионов кальция со вторым центром (K_2) удалось определить из данных по защите фермента ионами кальция от протеолиза субтилизином (рис. 4). Она составила $2,5 \cdot 10^{-3}$ М. Согласно табл. 3, сродство пирофосфатазы к ионам кальция существенно увеличивается в присутствии субстрата, пирофосфата хрома, и при совместном присутствии этого субстрата с Mg^{2+} или Zn^{2+} .

Ингибирование гидролиза пирофосфата магния ионами кальция обусловлено тем, что Ca^{2+} конкурирует с Mg^{2+} в двух из трех возможных мест в фермент-субстратном комплексе [1], однако неясно, является ли ингибирование результатом заполнения двух центров связывания катиона-активатора на ферменте, или имеет место насыщение одного центра с одновременным замещением ионами кальция катиона, входящего в состав субстрата. Разграничить эти два процесса можно, изучив ингибирующее влияние ионов кальция на гидролиз пирофосфата хрома ($CrPP$) в присутствии Mg^{2+} и Zn^{2+} . Бидентатный комплекс пирофосфата с трехвалентным хромом в качестве субстрата неорганической пирофосфатазы из дрожжей впервые был использован Найтом с сотр. [7], а недавно было показано, что фермент из *E. coli* также гидролизует $CrPP$ [2]. В составе пирофосфата хрома Cr^{3+} связан настолько прочно, что не обменивается в процессе гидролиза на присутствующие в среде катионы других металлов, поэтому использование такого субстрата дает возможность дифференцировать центры связывания катионов металла-активатора. Данные по влиянию Ca^{2+} на гидролиз $CrPP$ (рис. 5) свидетельствуют, что с ростом концентрации ионов кальция активность фермента постепенно падает, константа ингибирования при этом составляет $(5,6-6) \cdot 10^{-4}$ М. Участие в процессе ингибирования гидролиза $CrPP$ только одного иона кальция подтверждается обработкой полученных данных в координатах Хилла, так как коэффициент Хилла составил 0,83 (рис. 5). В процессе ингибирования участвует, вероятно,

только центр с более низким сродством к Ca^{2+} , связывание лиганда с которым в присутствии субстрата существенно улучшается. Центр же с высоким сродством ($K_1 \sim 6 \cdot 10^{-5}$ М) в этих условиях тоже должен быть насыщен, однако его заполнение не сказывается на активности пирофосфатазы. Таким образом, отмеченное ранее ингибирование гидролиза пирофосфата магния двумя эквивалентами Ca^{2+} связано с тем, что второй катион кальция, участвующий в ингибировании, замещает ион магния в составе субстрата.

Сравнение результатов ингибирующего действия Ca^{2+} на гидролиз CgPP в присутствии Mg^{2+} и Zn^{2+} показывает, что ионы кальция оказывают в обоих случаях одинаковое действие. Следовательно, центры связывания Mg^{2+} и Zn^{2+} на ферменте, которые заполняет Ca^{2+} , приводя к ингибированию, вероятно, идентичны.

Ингибирование неорганической пирофосфатазы из *E. coli* ионами фтора

Известно, что ионы фтора являются ингибитором ряда пирофосфатаз, в том числе и фермента из *E. coli* [4]. Однако только для пирофосфатазы из пекарских дрожжей детально изучен механизм ингибирования. Фторид-ион ингибирует этот фермент в процессе ферментативной реакции, когда в реакционной среде присутствуют пирофосфат и ионы магния. Сначала ингибитор быстро и обратимо присоединяется к Mg^{2+} на ферменте, вызывая уменьшение каталитической активности в 10 раз, после чего происходит медленная изомеризация фермент-субстратного комплекса, приводящая к полной потере активности. Пирофосфатаза остается неактивной после удаления избытка реагентов [8].

Нами было установлено, что ингибирование пирофосфатазы из *E. coli* фторидом в присутствии Mg^{2+} и пирофосфата носит обратимый характер и фермент полностью восстанавливает активность при удалении избытка реагентов. Чтобы определить механизм ингибирования, была изучена зависимость скорости гидролиза от концентрации пирофосфата магния для нескольких концентраций фторид-иона. Получение семейства параллельных прямых (рис. 6) указывает на бесконкурентный тип ингибирования [9]. Константа ингибирования равна $9 \cdot 10^{-5}$ М. Фторид-ион, как и в случае фермента из дрожжей, присоединяется к фермент-субстратному комплексу. Однако в отличие от фермента из дрожжей для пирофосфатазы из *E. coli* либо не наблюдается изомеризации фермент-субстратного комплекса в неактивное соединение под действием фторида, либо имеет место быстрая реактивация.

Таким образом, в субъединице пирофосфатазы из *E. coli* существуют три центра связывания катионов магния и цинка и два центра, присоединяющих ионы кальция. Можно думать, что аналогично ферменту из дрожжей в пирофосфатазе из *E. coli* Mg^{2+} и Zn^{2+} присоединяются к одним и тем же центрам, а ингибирующее влияние Ca^{2+} связано с вытеснением катиона-активатора только из одного из этих центров, однако окончательный ответ на этот вопрос требует дальнейшего исследования.

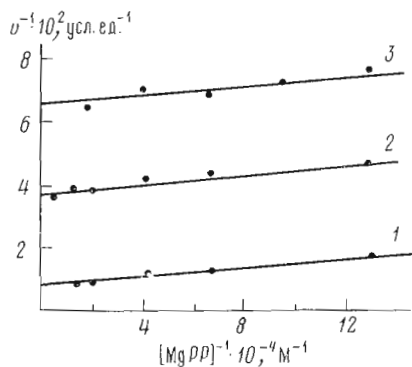


Рис. 6. Ингибирование фторидом гидролиза PP_i неорганической пирофосфатазой из *E. coli* в присутствии 2 мМ MgCl_2 . Концентрации NaF (мМ): 0 (1), 0,25 (2), 0,5 (3). $[E] = 10^{-8}$ М

Экспериментальная часть

В работе использовали трис, хлорид тетраметиламмония (Fluka, Швейцария), Нерес (Serva, ФРГ); пирофосфат натрия, субтилизин (Sigma, США);

Mes* (Reanal, Венгрия); хлориды магния, кальция и трехвалентного хрома квалификации х. ч., хлорид цинка марки ч. д. а., ^{45}Ca -меченый CaCl_2 без носителя (Amersham, Англия) с активностью 0,5–1,0 мКи/мл, «цинкон» (GFS, США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже х. ч. Для приготовления всех растворов использовали бидистиллированную воду. Концентрацию пирофосфата натрия определяли после исчерпывающего гидролиза алиquotы раствора пирофосфатазой из *E. coli* по количеству образовавшегося фосфата на автоматическом анализаторе фосфата [10].

Неорганическая пирофосфатаза из *E. coli*, выделенная из штамма *E. coli* MRE-600 по методу Джосса [11], имела удельную активность 600 МЕ/мг. Константы диссоциации комплексов Zn^{2+} с пирофосфатом, взятые из работы [6], составили для ZnPP $2,6 \cdot 10^{-5}$ М, для Zn_2PP — $1,58 \cdot 10^{-4}$ М.

Для измерения радиоактивности использовали сцинтилляционный счетчик ЛКВ (Швеция).

Пирофосфат хрома $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ синтезировали и очищали по методике, предложенной Мерритом [12].

Дифференциальные УФ-спектры неорганической пирофосфатазы E. coli с ионами магния и кальция снимали на спектрофотометре Cary-219 с использованием шкалы 0–0,02 ОЕ при 25° С. Алиquotы по 0,9 мл (7,4–8,7 · 10⁻⁷ М) фермента в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,5) помещали в две идентичные кварцевые кюветы (длина оптического пути 0,5 см). При титровании фермента ионами металлов к раствору образца добавляли по 2,5–10 мкл раствора хлорида металла, в контрольную кювету приливали такой же объем буфера. Изменение объема в конце титрования составило ~10%, максимальный эффект 15–16%.

Протеолиз неорганической пирофосфатазы из E. coli субтилизинном изучали в 0,1 М буфере Нерес-NaOH (рН 7,8; 37° С). К смеси фермента (0,04 мг/мл) и лиганда добавляли субтилизин (конечная концентрация 10 мг/мл). Через определенные промежутки времени отбирали алиquotы и определяли пирофосфатазную активность. Активность субтилизина проверяли по *n*-нитроанилиду карбобензокси-аланил-аланил-лейцина. Было показано, что присутствие максимальных концентраций исследуемых лигандов не влияло на активность субтилизина.

Кинетику ферментативного гидролиза пирофосфата в присутствии Zn²⁺ исследовали при 25° С в 0,1 М Mes-NaOH-буфере при рН 6,5, поскольку в этих условиях образуется минимальное количество гидроксокомплексов цинка. Концентрация фермента составляла 10⁻⁷ М, а концентрацию свободной формы ионов цинка рассчитывали с учетом образования комплексов ZnPP и Zn_2PP . Начальные скорости гидролиза пирофосфата цинка определяли на автоматическом анализаторе фосфата, работающем в непрерывном режиме с чувствительностью (1–5) · 10⁻⁵ М фосфата на полную шкалу самописца.

Равновесный диализ неорганической пирофосфатазы E. coli с ⁴⁵CaCl₂ и ZnCl₂ проводили в кювете для микродиализа объемом 100 мкл, разделенной на две равные части диализной мембраной, в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 7,5) в случае опытов с $^{45}\text{CaCl}_2$ и в 0,1 М Mes-NaOH (рН 6,5) в случае опытов с ZnCl_2 . Равные объемы растворов белка и лиганда помещали по разные стороны мембраны, ячейку плотно закрывали и оставляли на 16 ч при 4° С. (Предварительные опыты показали, что этого времени достаточно для установления равновесия, концентрация белка во время диализа практически не менялась.) Концентрацию $^{45}\text{CaCl}_2$ в обеих частях ячейки определяли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика, а концентрацию ионов цинка — с помощью реактива «цинкон» [13]: к 0,5 мл 2% фталатного буфера (рН 9,0) добавляли 15 мкл исследуемого раствора, содержащего (5–30) · 10⁻⁹ моль ZnCl_2 , (0,5–0,8) · 10⁻⁹ моль белка и 30 мкл 0,1% раствора «цинкона» в 0,02 н. NaOH. Поглощение изме-

* Сокращения: Mes — 4-морфолинэтансульфоновая кислота, «цинкон» — Na-соль 2-{[α-(2-гидрокси-5-сульфобензилазо)бензилиден]гидразино}бензойной кислоты.

рляи при 625 нм на спектрофотометре Specol-20 (ГДР). Концентрацию ионов цинка определяли по калибровочной прямой.

Изучение кинетики гидролиза пирофосфата хрома, катализируемого неорганической пирофосфатазой из *E. coli*, проводили в реакционной смеси, содержащей 1,5 мМ $MgCl_2$, 0–1,5 мМ $CaCl_2$, фермент в 0,1 М трис- HCl -буфере (рН 7,5, $I=0,1$) или 20 мкМ $ZnCl_2$, 0–1,5 мМ $CaCl_2$, фермент в 0,1 М буфере $Mes-NaOH$ (рН 6,5), которую инкубировали 10 мин при 25° С, и добавляли $CrPP$ до 300 мкМ. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, реакцию останавливали добавлением H_2SO_4 до 0,1 н. концентрации. Далее обработку смеси вели как описано в работе [2].

Кинетику гидролиза $MgPP$ в присутствии фторида изучали по начальной скорости гидролиза $MgPP$ на автоматическом анализаторе фосфата при 25° С. Ингибирование ферментативной активности проводили в среде следующего состава: 0,1 М аммедииол- HCl -буфер (рН 9,1), 8–200 мкМ PP_1 , 2,0 мМ $MgCl_2$, 0–0,5 мМ NaF .

ЛИТЕРАТУРА

1. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1032–1039.
2. Курилова С. А., Богданова А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 9, с. 1147–1152.
3. Куранова И. П., Терзьян С. С., Воронова А. А., Смирнова Е. А., Вайнштейн Б. К., Хёне В., Хансен Г. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1611–1619.
4. Josse J. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 1938–1947.
5. Вауков А. А., Там-Виллосладо J. J., Аваева С. М. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 2, p. 228–238.
6. Волк С. Е., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 1, с. 33–39.
7. Knight W. B., Fitts S. W., Dunaway-Mariano D. Biochemistry, 1981, v. 20, № 17, p. 4079–4086.
8. Смирнова И. Н., Байков А. А. Биохимия, 1983, т. 48, № 10, с. 1643–1653.
9. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982, т. 2, с. 493–495.
10. Вауков А. А., Аваева С. М. Eur. J. Biochem., 1973, v. 32, № 1, p. 132–142.
11. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 17, p. 4335–4345.
12. Merritt E. A., Sundaralingam M., Dunaway-Mariano D. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 12, p. 3565–3567.
13. Fries J., Getrost M. In: Organic reagents for trace analysis. Darmstadt: E. Merck, 1977, p. 412–413.

Поступила в редакцию
30.1.1984.

CHANGES IN THE *E. COLI* INORGANIC PYROPHOSPHATASE ACTIVITY ON INTERACTION WITH MAGNESIUM, ZINC, CALCIUM AND FLUORIDE IONS

KURILOVA S. A., BOGDANOVA A. V., NAZAROVA T. I., AVAIEVA S. M.

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

The interaction of *E. coli* inorganic pyrophosphatase with activator cations (magnesium and zinc) and an inhibitor cation (calcium) has been studied. Each subunit of the enzyme is found to possess three binding sites for Mg^{2+} and Zn^{2+} , occupying two of them results in activation of the substrate hydrolysis, while saturation of the third one entails the inhibition. A pyrophosphatase subunit has two binding sites for Ca^{2+} , occupation of only one of those giving rise to inhibition of the substrate hydrolysis. The fluoride ions cause reversible inhibition of the activity of *E. coli* inorganic pyrophosphatase. This effect is due to the fluoride interaction with the enzyme-substrate complex.