



УДК 577.153.35.04

РЕАКЦИЯ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ АКТИВНОГО ЦЕНТРА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ С ГИДРОКСИЛАМИНОМ И БОРГИДРИДОМ НАТРИЯ

*Аваева С. М., Воробьева Н. Н., Мельник М. С.,
Назарова Т. И.*

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозер-
ского, МГУ*

Изучена реакционная способность карбоксильной группы активного центра неорганической пирофосфатазы в реакциях с гидроксиламином и боргидридом натрия в зависимости от рН и концентраций пирофосфата натрия, ионов магния и кальция.

Опыты с гидроксиламином показали, что карбоксильная группа активного центра активирована — по-видимому, за счет внутрибелкового контакта по крайней мере с одной группой, депротонирование которой при рН выше 7,5 приводит к прекращению реакции с ингибитором. Присутствие ионов магния или кальция вызывает резкое усиление активации карбоксильной группы активного центра пирофосфатазы при взаимодействии с гидроксиламином. Эти результаты нашли подтверждение в опытах по восстановлению фермента боргидридом натрия. Высказано предположение, что насыщение ионами металла центра одной субъединицы, обладающего высоким сродством к ионам металлов, увеличивает скорость реакции фермента с гидроксиламином, а заполнение центра второй субъединицы уменьшает ее.

В настоящее время установлено, что в активный центр неорганической пирофосфатазы дрожжей входит карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты, обладающего высокой реакционной способностью. Так, неорганическая пирофосфатаза в мягких условиях реагирует с неорганическим фосфатом, что приводит к фосфорилированному ферменту. При восстановлении его боргидридом натрия из остатка аспарагиновой кислоты образуются гомосерин и его лактон [1, 2]. Инактивация фермента под действием гидроксилamina связана с образованием гидроксамата. С карбоксильной группой аспарагиновой кислоты реагируют также N- и O-алкильные производные гидроксилamina, метиловый эфир глицина, эфиры фосфорной кислоты [2—5].

Существование карбоксильной группы с высокой реакционной способностью в активном центре типично для целого ряда ферментов, в частности для АТР-аз, однако вопрос о путях ее активации остается открытым. В связи с этим представляется целесообразным изучение влияния различных факторов на реакционную способность этого остатка. В настоящей работе изучено поведение активированной карбоксильной группы в реакциях с гидроксиламином и боргидридом натрия в зависимости от рН, концентрации пирофосфата натрия и ионов двухвалентных металлов.

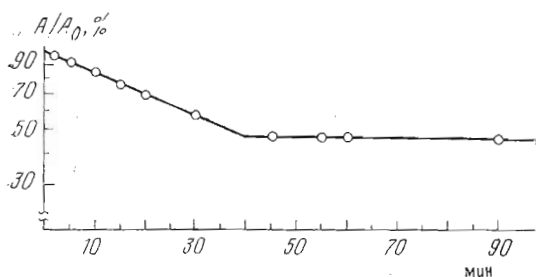


Рис. 1

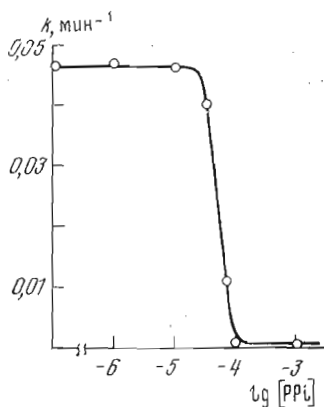


Рис. 2

Рис. 1. Остаточная активность неорганической пирофосфатазы (логарифмическая шкала), освобожденной от ионов металлов, при инкубации в гидроксиламине (0,1 М, рН 7,2)

Рис. 2. Зависимость константы скорости ингибирования пирофосфатазы, освобожденной от ионов металлов, гидроксиламином (0,1 М) от концентрации пирофосфата натрия

Неорганическая пирофосфатаза — металлозависимый фермент, проявляющий ферментативную активность только в присутствии ионов двухвалентных металлов, наиболее эффективными из которых являются ионы магния. Ионы кальция — сильнейший ингибитор фермента, несмотря на то что они конкурируют с ионами магния за места связывания с ферментом и вызывают сходные конформационные изменения пирофосфатазы [6].

Хотя известно, что присутствие ионов магния необходимо для функционирования неорганической пирофосфатазы, до настоящего времени вопрос о роли этих катионов в активации карбоксильной группы активного центра оставался открытым; не было, в частности, ясно, идут ли реакции с нуклеофильными агентами в их отсутствие. Поэтому прежде всего было изучено взаимодействие с гидроксиламином фермента, освобожденного от ионов магния [7] (0,1 М гидроксиламин, рН 7,2; 2 ч). При этом наблюдалось падение активности фермента во времени, причем инактивация была необратимой. Линейный характер зависимости логарифма остаточной активности от времени свидетельствует о псевдопервом порядке реакции. Существенно, что ферментативная активность под действием гидроксиламина падает на 50–60% и дальнейшей инактивации не наблюдается (рис. 1).

Реакцию с гидроксиламином проводили также в присутствии различных концентраций пирофосфата натрия (от 1 до 100 мкМ). Пирофосфат оказывает защитный эффект, причем уже при 100 мкМ концентрации реакция практически не идет (рис. 2).

Вопрос о том, связывает ли фермент пирофосфат в отсутствие ионов двухвалентных металлов, до сих пор оставался дискуссионным [8–10]. Результаты опытов с гидроксиламином свидетельствуют в пользу того, что пирофосфатаза действительно связывает пирофосфат в отсутствие ионов металлов с константой диссоциации 50 мкМ. Эта величина близка к численным значениям констант диссоциации комплекса фермента с пирофосфатом, полученным при изучении тепловой инактивации фермента ($K_D \sim 15\text{--}50$ мкМ) [10] и методом равновесного диализа ($K_D \sim 200$ мкМ) [8].

Защита от инактивации фермента пирофосфатом является еще одним подтверждением того, что гидроксиламин взаимодействует с активным центром пирофосфатазы [2, 4].

pH	k , мин ⁻¹	$[\text{NH}_2\text{OH}]^+$, М *	k , мин ⁻¹ М ⁻¹	pH	k , мин ⁻¹	$[\text{NH}_2\text{OH}]^+$, М *	k , мин ⁻¹ М ⁻¹
5,1	0,0017	0,029	0,058	7,2	0,0477	0,1	0,477
5,35	0,0102	0,0414	0,246	7,5	0,0462	0,1	0,462
5,6	0,030	0,0468	0,641	8,0	0,0282	0,1	0,282
6,0	0,042	0,671	0,626	8,4	0,0112	0,1	0,112
6,5	0,0477	0,0891	0,535	9,1	0	0,1	—
7,2	0,0484	0,1	0,484				

* При расчете концентраций гидроксиламмониевого иона было использовано значение рК 5,84 при 30° С [13].

Численное значение константы скорости взаимодействия фермента с гидроксиламином оказалось довольно высоким и составило 0,046 мин⁻¹. Как показали исследования Дженкса, карбоксилат-ион способен реагировать с гидроксиламином, но равновесие наступает настолько медленно, что реально измерить константу скорости можно лишь в присутствии катализатора [11]. Константа скорости реакции гидроксилamina с уксусной кислотой в сильнокислой среде, когда карбоксильная группа находится в недиссоциированной форме, на два порядка ниже, чем с неорганической пирофосфатазой. Это сопоставление приводит к заключению, что карбоксильная группа активного центра пирофосфатазы активирована уже в отсутствие ионов магния. Наиболее логично предположение, что активация достигается за счет взаимодействия с другими функциональными группами белковой молекулы.

Далее было изучено влияние рН на реакционную способность пирофосфатазы при взаимодействии ее с гидроксиламином.

Фермент, освобожденный от ионов магния, выдерживали с 0,1 М гидроксиламином при фиксированных значениях рН 5,1—9,1 при 30° С в течение 2 ч и следили за ферментативной активностью. Известно, что реагирующей формой гидроксилamina является гидроксиламмониевый ион [12]. Поэтому при расчете констант скоростей ингибирования второго порядка использовались концентрации этого иона, рассчитанные для каждого значения рН (таблица).

В интервале рН 5,6—7,5 реакция с гидроксиламином протекает с довольно высокой и почти постоянной скоростью, при этом глубина инактивации, так же как и при рН 7,2, не превышает 60%. Переход в щелочную область (при рН выше 7,5) или в кислую (ниже рН 5,6) вызывает резкое падение скорости ингибирования, а при рН 5,1 и 9,1 она становится близкой к нулю (таблица).

Интерпретация полученной рН-зависимости не дает возможности сделать однозначные выводы. Такой вид зависимости, когда скорость реакции растет от рН 5,1 до 5,5 и затем в широком интервале рН остается постоянной, свидетельствует о том, что карбоксильная группа активного центра реагирует с гидроксиламином, находясь в непротонированной форме. Уменьшение скорости в щелочной области (рН 7,5—9,1) выявляет наличие еще одной важной для реакции группы, функционирующей в протонированном состоянии, роль которой, по-видимому, заключается в уменьшении электронной плотности на углеродном атоме карбоксильной группы активного центра.

Следующая серия опытов была посвящена выяснению влияния ионов двухвалентных металлов на реакцию с гидроксиламином.

Реакцию гидроксилamina с ферментом проводили в присутствии ионов магния в интервале концентраций 0,56—110 мкМ или ионов кальция в интервале концентраций 3,33—110 мкМ при рН 7,2 и 30° С. В этих условиях инактивация в отличие от опытов, проводимых в отсутствие

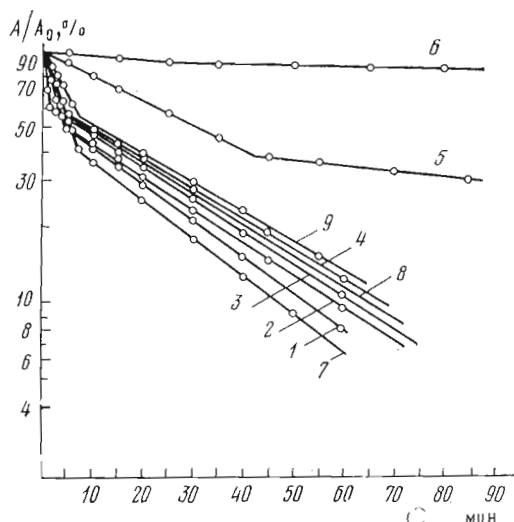


Рис. 3. Ингибирование неорганической пирофосфатазы 0,1 М гидроксиламином в присутствии ионов магния в концентрации 5 (1), 27 (2), 10 (3), 50 (4), 200 мкМ (5) и ионов кальция в концентрации 5 (7), 20 (8), 3,33 мкМ (9). Шкала логарифмическая

ионов металлов, была практически полной и также носила необратимый характер.

Зависимости логарифма остаточной активности от времени для ряда фиксированных концентраций ионов магния и кальция (рис. 3) представляют собой кривые, состоящие из двух прямолинейных участков с перегибом, соответствующим приблизительно 50% инактивации. Для этих участков, условно обозначенных как первая и вторая ступень реакции, были рассчитаны константы скорости первого порядка.

Скорость первой ступени реакции растет по мере увеличения концентрации ионов магния или кальция вплоть до 10 мкМ. Дальнейшее увеличение концентрации этих ионов вызывает резкое уменьшение скорости реакции и при 100 мкМ концентрации — практически полную защиту от ингибирования (рис. 4, 1).

Скорость второй ступени реакции значительно ниже, и константа ее скорости практически не зависит от концентрации ионов металла, если последняя не превышает 30–50 мкМ. Дальнейшее увеличение концентрации ионов металлов вызывает полное торможение реакции (рис. 4, 2).

Ранее было установлено, что неорганическая пирофосфатаза (фермент, состоящий из двух химически идентичных субъединиц) проявляет ферментативную активность после насыщения ионами магния двух центров (на молекулу фермента) с высоким сродством к металлу ($K_D \sim 20$ мкМ) и двух центров (на молекулу фермента) с меньшим сродством к металлу ($K_D \sim 0,2$ мМ) [7]. Известно, что эти же центры фермента связывают ионы кальция с константами диссоциации соответственно 6,8 мкМ и 0,4 мМ [14, 15].

Вероятнее всего, насыщением центров с меньшим сродством к ионам магния или кальция объясняется отсутствие ингибирования при высоких концентрациях ионов этих металлов. Аналогичное явление наблюдалось и в других реакциях модификации пирофосфатазы [2, 10].

Из анализа зависимости констант скоростей первой ступени реакции от концентрации ионов магния или кальция (рис. 4, 1) видно, что на скорость ингибирования наибольшее влияние оказывают их концентрации, численно близкие константам диссоциации комплексов фермента с ионами магния или кальция по центрам с высоким сродством к металлу.

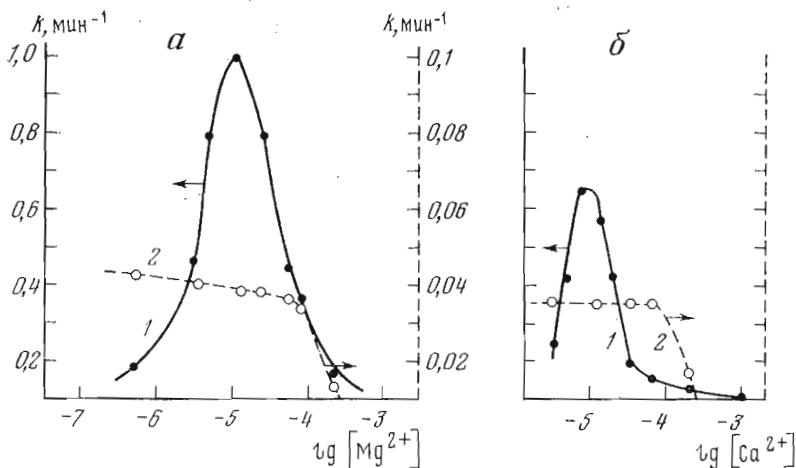


Рис. 4. Влияние ионов магния (а) и кальция (б) на константы скорости ингибирования первого порядка для быстрой (1) и медленной (2) ступени реакции

Колоколообразный характер зависимости приводит к выводу, что существуют два таких центра связывания ионов металла, последовательное насыщение которых оказывает противоположный эффект на скорость ингибирования. Резкое изменение скорости ингибирования в узком интервале концентраций ионов металлов свидетельствует о том, что эти константы связывания металла очень близки по численному значению и, по-видимому, принадлежат к двум разным субъединицам, оказывающим взаимное влияние друг на друга. Взаимное влияние субъединиц первоначально было обнаружено при изучении реакций неорганической пирофосфатазы с аффинными ингибиторами [5]. В ходе этих исследований установлено, что ингибирование одной субъединицы влияет на характер взаимодействия с ингибитором другой субъединицы. Подобное явление, очевидно, имеет место при инактивации неорганической пирофосфатазы гидроксил-аминном как в присутствии, так и в отсутствие ионов металлов.

На основании вышеизложенного можно предложить объяснение полученным экспериментальным фактам.

Так, в опытах, где отсутствовали ионы металла, действие ингибитора (в интервале рН 6,5–8,4) вызывает лишь 50%-ную потерю ферментативной активности. Вероятнее всего, в этих условиях модификация гидроксил-амином одной субъединицы приводит к изменению конформации другой и делает ее неуязвимой для ингибитора.

Насыщение ионами магния или кальция центра с высоким сродством, принадлежащего одной субъединице (условно обозначенной как субъединица 1), вызывает изменение конформации другой субъединицы (субъединица 2). В этом случае с гидроксил-амином реагируют обе субъединицы, но скорости этих реакций различны: изменение конформации свободной от металла субъединицы 2 приводит к дополнительной активации карбоксильной группы активного центра и, как следствие, к ускорению реакции ее с гидроксил-амином. Тогда инактивации субъединицы 2 соответствуют константы скоростей первой ступени реакции (рис. 4, 1), а инактивации другой субъединицы 1 — константы скоростей второй ступени реакции (рис. 4, 2).

По мере насыщения ионами металла центра с высоким сродством субъединицы 2 замедляется скорость ее реакции с гидроксил-амином. И наконец, связывание ферментом ионов металла по центру с меньшим сродством вызывает такую конформационную перестройку, что он становится недоступным для ингибитора.

Таким образом, удалось наблюдать сложный характер влияния ионов магния и кальция на реакционную способность неорганической пирофосфатазы при ее взаимодействии с гидроксиламином. Насыщение центров фермента с наибольшим сродством к этим ионам приводит к многочисленным последствиям, одним из которых является усиление активации карбоксильной группы активного центра.

Вторым реагентом, который использовали для изучения свойств пирофосфатазы, был боргидрид натрия.

Дегани и Бойер [16], используя для восстановления ацилфосфатной связи в АТР-азах меченый боргидрид натрия, показали, что восстановление приводит к расщеплению ацилфосфатной связи с одновременным превращением карбоксильной группы в спиртовую. В кислотном гидролизате восстановленного белка появляются меченый гомосерин и его лактон, если акцептором фосфата была карбоксильная группа аспарагиновой кислоты, или α -амино- δ -оксивалериановая кислота, если акцептором фосфата была карбоксильная группа глутаминовой кислоты.

Так как в результате изучения реакции неорганической пирофосфатазы с гидроксиламином было сделано предположение о том, что карбоксильная группа активного центра активирована, по-видимому, за счет внутренних контактов с другими аминокислотными остатками, представлялось реальным восстановление ее боргидридом натрия без предварительного фосфорилирования.

В целях сохранения нативной структуры фермента восстановление следовало проводить в водной среде при слабощелочном pH и высокой концентрации боргидрида натрия, так как он значительно разрушается в этих условиях.

Действию меченного тритием боргидрида натрия подвергали два образца фермента. В первом случае белок предварительно выдерживали с ионами магния (10 мкМ) в трис-HCl-буфере при pH 7,5, т. е. в условиях, когда карбоксильная группа активного центра проявляет максимальную активность в реакции с гидроксиламином, затем проводили восстановление большим избытком бортриида натрия в течение 1 ч при 30° С. Гидролизат меченого белка исследовали на аминокислотном анализаторе [17]. В результате было показано присутствие в гидролизате радиоактивного гомосерина (рис. 5, 1).

Во втором случае белок предварительно выдерживали с 1 мМ Mg^{2+} в трис-HCl-буфере при pH 7,5 и затем восстанавливали его в тех же условиях. Как указывалось выше, ионы магния в такой концентрации защищают фермент от инактивации гидроксиламином, так же как и в других реакциях ингибирования. Аминокислотный анализ показал полное отсутствие радиоактивного гомосерина в этом гидролизате белка (рис. 5, 2).

Таким образом, при взаимодействии с обоими нуклеофильными реагентами проявилась высокая реакционная способность карбоксильной группы активного центра пирофосфатазы, которая, как следует из полученных результатов, обусловлена особенностями третичной структуры. Связывание ферментом ионов двухвалентных металлов приводит к дальнейшему повышению ее реакционной способности.

Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу (КФ 3.6.1.1) выделяли из маточных пекарских дрожжей по видоизмененной методике Купермана [18]. Удельная активность фермента составила 660–680 МЕ/мг.

Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 280 нм [19].

Ферментативную активность определяли при 25 и 30° С по скорости расщепления пирофосфата натрия до ортофосфата при pH 7,2 в 0,05 М трис-HCl-буфере, содержащем 1,7 мМ $MgSO_4$ и 1,7 мМ пирофосфат на-

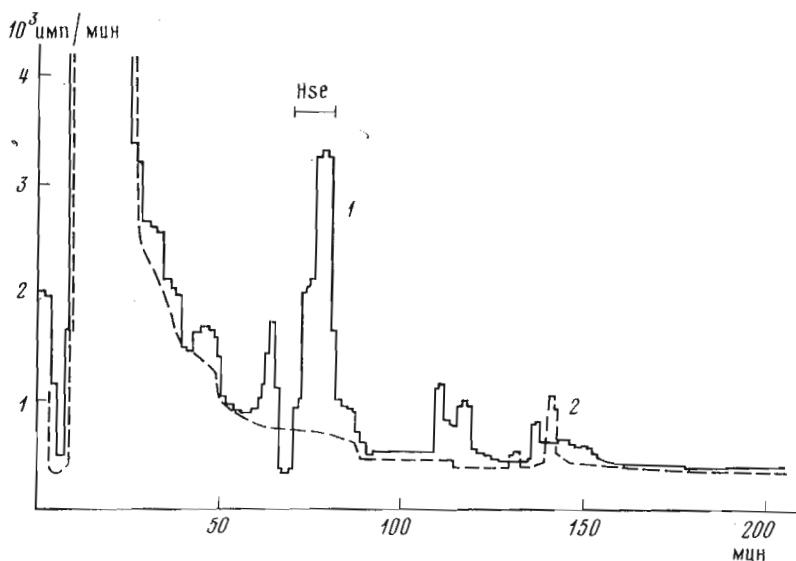


Рис. 5. Разделение на аминокислотном анализаторе кислотного гидролизата пирофосфатазы, восстановленной NaB^3H_4 в присутствии 10 (1) и 1 мМ (2) MgCl_2 . Отмечено время выхода гомосерина

трия. Количество неорганического фосфата определяли по методу Грина [20].

В работе использовали солянокислый гидроксилламин марки ч.д.з., дважды перекристаллизованный из водного спирта; гомосерин (Reanal); α -амино- δ -оксивалериановая кислота была получена по методу Свалоу [21] и очищена электрофоретически; меченный тритием боргидрид натрия отечественного производства с активностью 200—300 мКи/ммоль.

Для определения радиоактивности [^3H] соединений к 0,01—0,5 мл водного раствора добавляли 10 мл диоксанового сцинтиллятора ЖС-8 отечественного производства и просчитывали 2 мин на жидкостных сцинтилляционных счетчиках фирмы Mark I, II, III.

Приготовление раствора фермента, не содержащего ионов магния и кальция. Суспензию белка, осажденного сульфатом аммония, центрифугировали при 8000 об/мин в течение 40—60 мин. Полученный осадок растворяли в минимальном количестве 0,05 М трис-НСI-буфера, pH 7,2. Раствор наносили на колонку с сефадексом G-50 (средний) размером 1×15 см и проводили элюцию бидистиллированной водой или 0,05 М трис-НСI-буфером, приготовленным на бидистиллированной воде. Фракции, содержащие белок, определяли спектрофотометрически. Наличие ионов магния и кальция в белке проверяли на атомно-адсорбционном спектрофотометре фирмы Hitachi.

Ингибирование фермента 0,1 М гидроксилламином. Общая методика. Фермент (0,4 мкМ), освобожденный от ионов магния и кальция, инкубировали в 0,05 М трис-НСI-буфере (pH 7,2) с 0,1 М гидроксилламином при 30° С в течение 1—2 ч, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты для определения ферментативной активности. В контрольном опыте вместо гидроксилламина добавляли хлорид натрия в той же концентрации. Использовался свежеприготовленный раствор хлоргидрата гидроксилламина, доведенный добавлением щелочи до нужного значения pH.

При изучении влияния пирофосфата натрия на реакцию с гидроксилламином реакционная смесь помимо фермента и гидроксилламина в указанных концентрациях содержала 1 мкМ—1 мМ пирофосфат натрия, pH 7,2.

При исследовании влияния ионов магния или кальция на ингибирование гидроксилламином фермент (0,45 мкМ) предварительно выдерживали

15 мин при 20° С в растворе MgCl₂ (0,56 мкМ — 1,1 мМ) или CaCl₂ (3,33 мкМ — 1,1 мМ), затем 5 мин при 30° С и начинали реакцию добавлением гидроксилamina (см. рис. 4).

При исследовании необратимого характера ингибирования пирофосфатазы 0,1 М гидроксилaminом реакцию проводили как в отсутствие, так и в присутствии ионов магния или кальция в течение 1—2 ч по методикам, описанным выше. Из реакционной смеси отбирали по 8—11 мкл, вносили в 5 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 7,2), содержащего 2,04 мМ MgSO₄ или 2,04 мМ пирофосфат натрия, и оставляли на 2 ч при 20° С. Затем термостатировали 15 мин при 25° С, добавляли 1 мл 10 мМ пирофосфата натрия или 1 мл 10 мМ MgSO₄ соответственно и определяли ферментативную активность. В контрольном опыте разбавляли нативный фермент. Восстановления активности ингибированного фермента не наблюдалось.

Исследование зависимости ингибирования пирофосфатазы, освобожденной от ионов магния и кальция, 0,1 М гидроксилaminом от рН проводили по общей методике в 0,05 М буфере MES (морфолинэтансульфокислота), рН 5,1—7,2, и 0,05 М буфере трис-НСl, рН 7,2—9,1 (результаты представлены в таблице и на рис. 2).

Для расчета констант скоростей реакции строили график зависимости логарифма остаточной активности от времени, графически вычитали прямую с меньшим наклоном из прямой с большим наклоном, затем определяли константы скорости первого порядка для каждой ступени реакции как $k=0,693/t_{1/2}$.

Восстановление пирофосфатазы меченым триглицеридом боргидридом натрия. К 60 мкМ раствору фермента в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 10 мкМ или 1 мМ MgCl₂ и 2% *n*-октиловый спирт, добавляли 7,6 мг сухого бортриглицерида натрия с уд. акт. 200—300 мКи/ммоль. Реакционную смесь (общий объем 0,5 мл) выдерживали 1 ч при 30° С, останавливали реакцию добавлением 4 мкл концентрированной соляной кислоты и через 20 мин наносили на колонку (1,2×50 см) с сефадексом G-25 (средний), проводили элюцию и во фракциях определяли белок и его радиоактивность. Меченый белок гидролизovali 6 н. НСl при 107° С в течение 1 сут.

К сухому гидролизату добавляли 0,2 н. NaOH до рН 13—14 и нагревали в течение 1 ч при 60° С, затем исследовали на аминокислотном анализаторе, добавив предварительно немеченый гомосерин [17].

Аминокислотный анализ проводили на колонке (0,9×50 см) анализатора фирмы Hitachi с катионообменниками 2612. Элюат собирали фракциями по 1 мл, в которых определяли радиоактивность и проводили реакцию с пингидридом [22].

ЛИТЕРАТУРА

1. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Avaeva S. M. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 481, 184—194.
2. Avaeva S. M., Bakuleva N. P., Baratova L. A., Nazarova T. I., Fink N. Ju. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 482, 173—184.
3. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. (1977) *Биоорг. химия*, 3, 943—949.
4. Финк Н. Ю., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1975) *Химия природн. соедин.*, 2, 235—240.
5. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 984—986.
6. Braga E., Avaeva S. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 49, 528—535.
7. Baykov A. A., Tam-Viljoslado H. H., Duzenko V. S., Panchenko L. A., Avaeva S. M. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, in press.
8. Rapoport T. A., Höhne W. E., Heitmann P., Rapoport S. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 33, 341—347.
9. Ridlington J. W., Butler L. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7303—7307.
10. Шафранский Ю. А., Аваева С. М. (1975) *Биохимия*, 38, 1248—1254.
11. Jencks W. P., Caplow H., Gilchrist M., Kallen R. G. (1963) *Biochemistry*, 2, 1313—1318.
12. Jencks W. P. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 4585—4588.
13. Robinson R. A., Bower V. E. (1961) *J. Phys. Chem.*, 65, 1279—1281.
14. Шафранский Ю. А., Аваева С. М. (1975) *Биохимия*, 40, 638—639.

15. Baykov A. A., Avaeva S. M. (1974) Eur. J. Biochem., **47**, 57-66.
16. Degani C., Boyer P. D. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 8222-8226.
17. Nishigaki I., Chen F. T., Hokin L. E. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 4911-4916.
18. Брара Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) Биохимия, **38**, 344-350.
19. Kunitz M. (1961) Arch. Biochem. and Biophys., **92**, 270-272.
20. Weil-Malherbe H., Green R. (1951) Biochem. J., **49**, 286-292.
21. Swallow D. L., Abraham E. P. (1959) Biochem. J., **72**, 326-333.
22. Moore S., Stein W. (1954) J. Biol. Chem., **211**, 907-913.

Поступила в редакцию
22.III.1979

**THE REACTION BETWEEN ASPARTIC ACID OF THE ACTIVE SITE OF
INORGANIC YEAST PYROPHOSPHATASE WITH HYDROXYLAMINE
AND SODIUM BOROHYDRIDE**

AVAIEVA S. M., VOROBEVA N. N., MEL'NIK M. S., NAZAROVA T. I.

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

The reactivity of the carboxyl group of inorganic pyrophosphatase active site in the reactions with hydroxylamine and sodium borohydride has been studied at various pH, sodium pyrophosphate, magnesium and calcium ion concentrations. The experiments with hydroxylamine showed that the carboxyl group seems to be activated due to the intraprotein contact with at least one group whose deprotonation at $\text{pH} > 7.5$ abolishes the reaction with the inhibitor. The presence of magnesium and calcium ions sharply enhances the activation of the carboxyl group of the pyrophosphatase active site on interaction with hydroxylamine. These results were substantiated by the enzyme reduction with sodium borohydride. It is supposed that the binding of metal ions with one subunit, having high affinity for them, increases the rate of the enzyme reaction with hydroxylamine, whereas further binding of metal ions to the site on the other subunit decreases the reaction rate.
