



УДК 577.155.02

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСЩЕПЛЕНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБСТРАТОВ НУКЛЕАЗОЙ S_1 Сенченко В. Н., Яковлев Г. И., Болбановская Е. Ю.,
Смирнов И. В., Карнейский М. Я.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Методами стационарной кинетики измерены кинетические параметры $k_{кат}$ и K_m реакций гидролиза АрА и дефосфорилирования 3'-АМР нуклеазой S_1 в диапазоне рН 3–8. Обнаружено, что зависимость отношения $k_{кат}/K_m$ от рН идентична для обеих реакций и определяется ионогенными группами, рК которых для свободного фермента равны 4,2 и 6,0. Активной форме фермента соответствует состояние, когда группа с рК 4,2 депротонирована, а группа с рК 6,0 протонирована. Показано, что субстрат нуклеотидазной реакции является конкурентным ингибитором нуклеазной реакции. Исследована кинетика диссоциации комплекса ион цинка — нуклеаза S_1 . Диссоциация комплекса металл — фермент приводила к полной потере активности нуклеазы S_1 в отношении ДНК, РНК, динуклеозидфосфатов и мононуклеотидов. Реассоциация инактивированного фермента с ионами цинка приводила к полному восстановлению активности. Сделан вывод о том, что нуклеазная и нуклеотидазная реакции протекают в одном и том же активном центре фермента.

В последние годы широкое применение для структурно-функциональных исследований нуклеиновых кислот получила нуклеаза S_1 из *Aspergillus oryzae* [1–3]. Этот фермент обладает ярко выраженной специфичностью к одноцепочечным участкам нуклеиновых кислот, причем продуктами реакции являются 5'-фосфорилированные моно- и олигонуклеотиды [4]. Если изучению специфичности фермента по отношению к нуклеиновым кислотам уделялось заметное внимание, то исследование действия фермента на низкомолекулярные субстраты практически только начато. Было показано, что минимальным субстратом нуклеазы S_1 в нуклеазной реакции является динуклеозидмонофосфат, а также обнаружено, что нуклеаза S_1 способна дефосфорилировать 3'-нуклеотиды [5, 6].

Настоящая работа посвящена изучению каталитической активности нуклеазы S_1 в нуклеазной и нуклеотидазной реакциях в широком диапазоне рН методами стационарной кинетики и кинетики диссоциации комплекса цинк — нуклеаза S_1 .

В качестве субстрата в нуклеазной реакции использовали аденилил-(3'–5')аденозин (АрА). Результаты спектрофотометрического титрования динуклеозидмонофосфата показывают (рис. 1), что в исследуемом диапазоне рН величина молярного коэффициента поглощения ϵ_{280} изменяется незначительно. Изменение интенсивности поглощения в области 280 нм при гидролизе субстрата обусловлено уменьшением межплоскостного взаимодействия оснований, происходящего в результате перехода от внутримолекулярного взаимодействия к межмолекулярному. Поскольку последний тип взаимодействия зависит от концентрации молекул, было изучено влия-

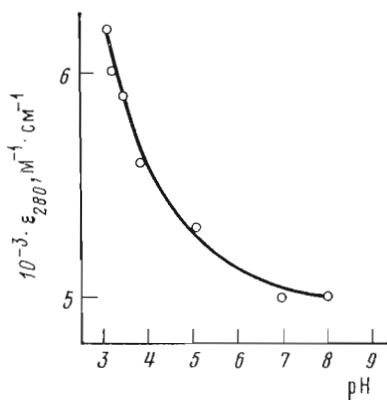


Рис. 1

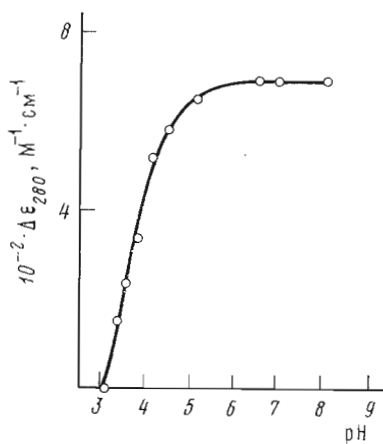


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость коэффициента молярного поглощения АрА от рН

Рис. 2. Зависимость разностного коэффициента молярного поглощения АрА от рН

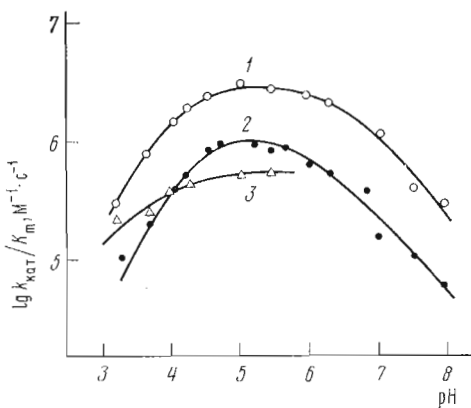


Рис. 3. Зависимость логарифма отношения $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН для реакций гидролиза 3'-AMP (1), АрА (2), 3'-UMP (3). Кривым соответствуют значения рК, представленные в таблице

ние концентрации на экспериментальное значение $\Delta \epsilon_{280}$. Оказалось, что изменение поглощения практически не зависит от концентрации динуклеозидмонофосфата в используемом интервале концентраций ($<10^{-3}$ М). Вместе с тем величина $\Delta \epsilon_{280}$ является функцией рН (рис. 2), что обусловлено диссоциацией протонированного аденинового основания в изучаемом диапазоне рН. Найденные значения ϵ_{280} и $\Delta \epsilon_{280}$ использовали при анализе рН-зависимостей кинетических параметров гидролиза аденилил(3'-5')-аденозина. Исследование каталитической активности нуклеазы S_1 в нуклеотидазной реакции проведено на мононуклеозид-3'-фосфатах: 3'-AMP и 3'-UMP.

В экспериментах использовали два типа буферных растворов — натрий-цитратный (рН 3—4) и натрий, трис-ацетатный (рН 4—8). Было найдено, что при рН 4,0 кинетические параметры гидролиза субстратов нуклеазы S_1 не зависели от типа буферного раствора. Кроме того, было показано, что фермент не инактивируется при крайних значениях рН, используемых в наших экспериментах.

Известно, что рН-зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ определяется ионизацией свободного фермента и субстрата, а рН-зависимость $k_{\text{кат}}$ — ионизацией фермент-

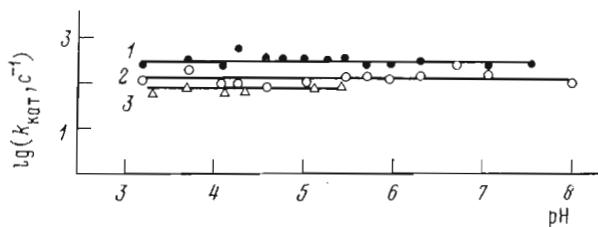


Рис. 4. Зависимость логарифма $k_{кат}$ от pH для реакций гидролиза АрА (1), 3'-АМР (2), 3'-УМР (3)

субстратного комплекса [7, 8]. Методами стационарной кинетики измерены зависимости значений $k_{кат}$ и $k_{кат}/K_m$ реакции гидролиза АрА, 3'-АМР и 3'-УМР от pH (рис. 3, 4). Установлено, что оба типа зависимостей для АрА и 3'-АМР сходны между собой (рис. 3).

Колоколообразная форма зависимости $k_{кат}/K_m$ от pH свидетельствует об участии кислых и основных групп в образовании фермент-субстратного комплекса и/или катализе. Однако при анализе такого рода кривых удается выявить в каждой ветви не более двух групп, влияющих на кинетические параметры реакции. В связи с этим анализ полученных нами данных мы проводили, предполагая, что активна только одна ионная форма фермента (см. схему) и все промежуточные соединения с точки зрения переноса

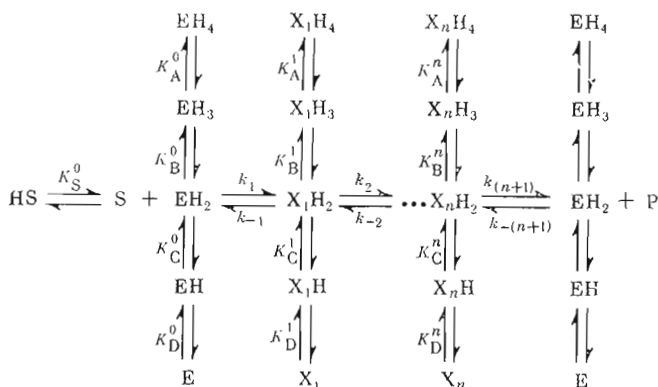


Схема ферментативной реакции, когда активна только одна ионная форма фермента

протона находятся в равновесии, т. е. перенос протонов не является скоростьлимитирующим для наблюдаемой реакции. Поскольку адениновый остаток субстратов АрА и 3'-АМР ионизуется в кислой области pH ($pK \sim 3.7$), в предложенной схеме учтена ионизация субстрата. В этом случае

$$\frac{k_{кат}}{K_m} = \frac{\bar{k}_{кат} / \bar{K}_m}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_A^0 K_B^0} + \frac{[\text{H}^+]}{K_B^0} + \frac{K_C^0}{[\text{H}^+]} + \frac{K_C^0 K_D^0}{[\text{H}^+]^2}\right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_S^0}\right)}, \quad (1)$$

$$k_{кат} = \frac{\bar{k}_{кат}}{1 + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_A^* K_B^*} + \frac{[\text{H}^+]}{K_B^*} + \frac{K_C^*}{[\text{H}^+]} + \frac{K_C^* K_D^*}{[\text{H}^+]^2}}, \quad (2)$$

где $\bar{k}_{кат}$ и \bar{K}_m — кажущаяся константа скорости реакции и константа Михаэлиса, не зависящие от pH; K_A^0 , K_B^0 , K_C^0 и K_D^0 — макроскопические константы ионной диссоциации, характеризующие группы свободного фер-

Кинетические параметры, характеризующие рН-зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ нуклеазы S_1 в нуклеазной и нуклеотидазной реакциях

Параметры	АрА	3'-АМР	3'-УМР
$\bar{k}_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	290±30	135±5	92±5
$\bar{K}_m \cdot 10^5, \text{М}$	31±3	4,4±0,3	19±2
$(\bar{k}_{\text{кат}}/\bar{K}_m) \cdot 10^{-5}, \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$	9,4±0,1	31±1	4,8±0,2
pK_A^0	—	—	—
pK_B^0	4,0±0,1	4,3±0,1	4,1±0,2
pK_C^0	6,0±0,1	6,0±0,1	—
pK_D^0	—	—	—
pK_S^0	4,1±0,1	3,7±0,1	—

мента, участвующие в связывании субстрата и/или катализе; K_A^* , K_B^* , K_C^* и K_D^* — кажущиеся константы ионной диссоциации фермент-субстратного комплекса; K_S^0 — макроскопическая константа ионной диссоциации свободного субстрата.

Случай, когда зависимость кинетических параметров ферментативной реакции от рН описывается меньшим числом ионных равновесий, можно получить, принимая $K_A^0(K_A^*) = \infty$, $K_D^0(K_D^*) = 0$ и $K_S^0 = \infty$ соответственно.

Анализ зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН для реакций гидролиза АрА и 3'-АМР, выполненный в соответствии с уравнением (1), показал, что они определяются тремя ионогенными группами, две из которых принадлежат ферменту, а одна — субстрату (таблица). Найденные значения констант ионизации групп фермента очень близки для обоих субстратов. Чтобы проверить, принадлежит ли одна из групп, определяющих «кислую» ветвь зависимости $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН, субстрату, была изучена рН-зависимость реакции гидролиза 3'-УМР.

Анализ кинетических параметров реакции гидролиза 3'-УМР — субстрата, не имеющего титрующихся групп в кислой области рН, — показал, что зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ в области рН 3,2—5,5 характеризуется единственной группой с рК 4,1±0,2. Из этого можно заключить, что ионизация основания 3'-АМР и АрА на 3'-конце фосфодиэфирной связи приводит к потере их способности образовывать продуктивный фермент-субстратный комплекс. Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что обе реакции, катализируемые нуклеазой S_1 , протекают в одном и том же участке активного центра. Дальнейшее подтверждение справедливости сделанного вывода было получено при анализе ингибирования расщепления АрА субстратом нуклеотидазной реакции 3'-АМР. Из рис. 5 видно, что 3'-АМР — конкурентный ингибитор этой реакции, причем константа ингибирования практически равна ранее найденному значению константы Михаэлиса в реакции гидролиза 3'-АМР нуклеазой S_1 ($K_i = (3,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \text{М}$, $K_m = (4,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{М}$).

Следует отметить, что значения K_m в реакции гидролиза 3'-АМР и, вероятно, АрА — истинные константы диссоциации фермент-субстратных комплексов. Это позволяет считать, что одной из функций ионогенных групп фермента, найденных при анализе зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН, является связывание субстрата. Как в нуклеазной, так и в нуклеотидазной реакциях это одни и те же группы с рК ~ 4,2 и 6,0. Как было показано выше, рН-оптимум действия нуклеазы (~5,0) достигается при депротонировании группы с рК ~ 4,2, когда группа с рК 6,0 находится в протонированном состоянии. По-видимому, первая — это карбоксильная группа остатка

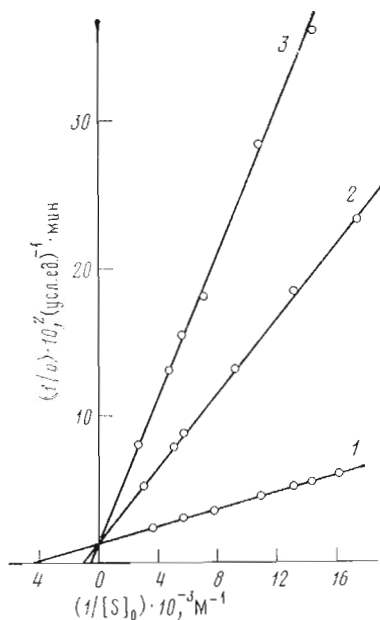


Рис. 5

Рис. 5. Конкурентное ингибирование 3'-AMP реакции гидролиза АрА, катализируемого нуклеазой S_1 . Концентрации 3'-AMP: 0 (1), 91 мкМ (2), 16 мМ (3)

Рис. 6. Зависимость активности нуклеазы S_1 при pH 4,6 от времени инкубирования с EDTA по отношению к ДНК (1), РНК (2), СрА (3) и 3'-UMP (4)

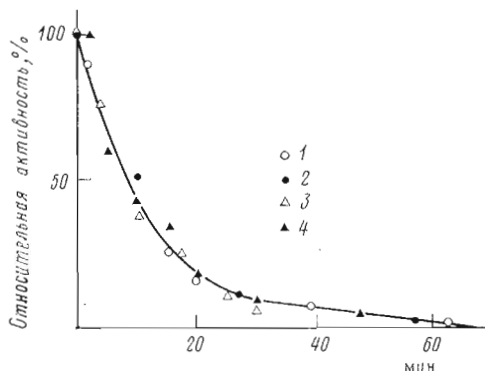


Рис. 6

дикарбоновой кислоты, а вторая скорее всего относится к имидазольному кольцу гистидинового остатка.

Независимость $k_{\text{кат}}$ от pH, наблюдавшаяся для всех трех субстратов (рис. 4), приводит к следующим заключениям. Во-первых, константы ионизации продуктивных фермент-субстратных комплексов нуклеазы S_1 с субстратами могут иметь значения вне изученного диапазона pH, т. е. $pK < 3,2$ или $pK > 8$. Во-вторых, возможно, что стадией, лимитирующей скорость ферментативной реакции, является либо превращение субстрата в продукт, либо диссоциация комплекса фермент — продукт, не зависящие от pH. Поскольку один из продуктов в реакциях гидролиза АрА, 3'-AMP и 3'-UMP — нуклеозид (аденозин или уридин), то, учитывая значительный вклад в связывание субстратов с ферментом нуклеозидного фрагмента, можно предположить, что независимой от pH скоростью лимитирующей стадией является диссоциация комплекса фермент — нуклеозид.

Ранее было отмечено, что расщепление нуклеиновых кислот нуклеазой S_1 требует присутствия в реакционной смеси ионов цинка [9]. Мы исследовали влияние хелатирующего агента на активность нуклеазы S_1 . Добавление EDTA к растворам субстратов не изменяло скоростей нуклеазной и нуклеотидазной реакций. Это позволяет заключить, что для проявления ферментативной активности не требуются свободные ионы цинка в растворе. Однако при предварительной инкубации фермента с EDTA в концентрации, превышающей содержание ионов цинка в растворе нуклеазы S_1 , наблюдалась зависящая от времени инактивация фермента, приводящая к полной потере активности (рис. 6). Зависимость остаточной активности от времени была одинаковой при использовании в качестве субстратов ДНК, РНК, СрА, 3'-UMP. Добавление ионов цинка к инактивированному ферменту в концентрации, превышающей концентрацию EDTA, вызывало практически полное восстановление активности нуклеазы S_1 по отношению ко всем исследуемым субстратам.

Кривая на рис. 6 соответствует экспоненте $\exp(-k_{\text{дисс}}t)$, для которой $k_{\text{дисс}} = 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Полагая, что константа скорости связывания ионов цинка с апонуклеазой S_1 близка к типичным значениям константы скорости связывания низкомолекулярных лигандов, определяемой скоростью их

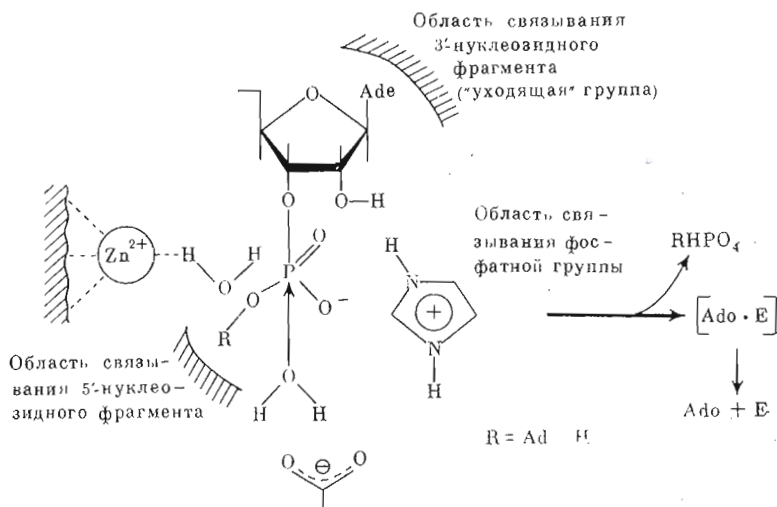


Рис. 7. Схематическое изображение активного центра нуклеазы S_1

диффузии, т. е. равна $10^7-10^8 \text{ с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ [10], можно оценить, что константа диссоциации ионов цинка с нуклеазой S_1 ($K_{\text{дисс}}$) составляет $10^{-10}-10^{-11} \text{ М}$. С другой стороны, для достижения полной инактивации нуклеазы S_1 в условиях $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{EDTA}]=1:100$ значение $K_{\text{дисс}}$ комплекса цинк-нуклеаза S_1 должно превышать константу «нестойкости» комплекса цинка с EDTA, которая при pH 4,6 составляет $\sim 10^{-11} \text{ М}$ [11]. Таким образом, $K_{\text{дисс}}$, по-видимому, не менее 10^{-10} М . Это значение близко по величине к величине константы диссоциации Zn^{2+} в четырехкоординированном состоянии в активном центре карбоксипептидазы А ($K_{\text{дисс}} 10^{-9}-10^{-10} \text{ М}$ [12]), где один из лигандов иона цинка — молекула воды. Оцененная величина константы диссоциации ионов цинка с нуклеазой S_1 позволяет предположить, что одним из лигандов иона металла является также молекула воды. Таким образом, можно полагать, что нуклеаза S_1 — металлофермент, в котором ион цинка располагается в области активного центра. По всей видимости, роль цинка заключается в фиксировании каталитически активной конформации фермента. Однако полученные данные пока еще не позволяют однозначно ответить на вопрос о функциональной роли ионов цинка.

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что обе реакции, катализируемые нуклеазой S_1 (дефосфорилирование нуклеозид-3'-фосфатов и гидролиз межнуклеотидной фосфодиэфирной связи), протекают в одном и том же активном центре и, по-видимому, по сходному механизму (рис. 7). Это означает, что участвующая в реакции активированная молекула воды и реагирующий фрагмент молекулы субстрата при образовании продуктивного фермент-субстратного комплекса должны жестко и топохимически однозначно фиксироваться в активном центре фермента. Можно полагать, что такая фиксация реагирующих молекул или их фрагментов относительно каталитических групп активного центра обуславливает абсолютную специфичность фермента в отношении выбора расщепляемой фосфодиэфирной связи и объясняет способность нуклеазы S_1 дефосфорилировать нуклеозид-3'-фосфаты и устойчивость к действию фермента нуклеозид-5'-фосфатов.

Экспериментальная часть

Нуклеазу S_1 выделяли по описанной ранее методике [13]. Раствор хлористого цинка готовили путем растворения спектрально чистой окиси цинка отечественного производства в концентрированной HCl (ос.ч.).

Буферные растворы готовили на дважды дистиллированной деионизованной воде с удельным сопротивлением не менее 5 МгОм/см. В диапазоне рН 4,0—8,0 использовали растворы, содержащие 0,05 М трис-ацетат, 0,05 М ацетат натрия, 0,1 М NaCl и 0,1 мМ ZnCl₂. Требуемые значения рН устанавливали добавлением ледяной уксусной кислоты. В диапазоне рН 3—4 использовали буферный раствор с заменой системы трис-ацетат натрия — уксусная кислота на систему цитрат натрия — лимонная кислота. Измерения рН проводили на рН-метре РНМ-64 (Radiometer, Дания) с точностью 0,01 при 25° С.

Концентрации АрА, 3'-АМР и 3'-УМР определяли спектрофотометрически при рН 7,0, используя значения для молярных коэффициентов поглощения $\epsilon_{257} 27,8 \cdot 10^3$ [14], $\epsilon_{259} 15,4 \cdot 10^3$, $\epsilon_{262} 10,0 \cdot 10^3$ М⁻¹ см⁻¹ соответственно [15]. Значения разностных молярных коэффициентов поглощения $\Delta\epsilon_{280}$ для АрА в диапазоне рН 3—8 были найдены из разностных спектров АрА и продуктов исчерпывающего гидролиза АрА нуклеазой S₁. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре «Cary-118» (Varian, США) при (25±0,1)° С. Начальную скорость гидролиза АрА нуклеазой S₁ измеряли в соответствии с изменением D₂₈₀. Общий диапазон концентраций АрА и фермента составлял 6,0·10⁻⁵—3,2·10⁻³ и 4,0·10⁻⁹—3,0·10⁻³ М соответственно.

Начальную скорость гидролиза 3'-нуклеотидов измеряли с помощью метода, основанного на определении неорганического фосфата в растворе [16]. Реакционная смесь (0,6 мл), содержащая 3'-нуклеотид и фермент в буферном растворе, рН 3—8, инкубировалась при (37±0,1)° С от 5 до 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 1,4 мл свежеприготовленного раствора, содержащего 1,4% аскорбиновой кислоты, 0,85 н. H₂SO₄, 0,36% молибдата аммония. При этом образующийся фосфорномолибденовый комплекс восстанавливался в соединение, окрашенное в синий цвет и имеющее спектр поглощения в диапазоне 700—900 нм. Для развития окраски смесь инкубировали 20 мин при 45° С, а затем измеряли D₇₈₀ на спектрофотометре «Beckman-24» (США). Концентрацию неорганического фосфата, образующегося в процессе реакции гидролиза 3'-АМР или 3'-УМР нуклеазой S₁, находили из калибровочного графика зависимости D₇₈₀ от количества фосфата, образованного при исчерпывающем гидролизе 3'-нуклеотидов известных концентраций.

Для проверки возможной инактивации фермента в крайних значениях рН фермент выдерживали 1 ч при рН 3,0 и 8,0, затем измеряли его активность при рН 5,0 и сравнивали с активностью исходного препарата.

Анализ кинетических данных по методу наименьших квадратов с учетом статистических весов был выполнен с использованием настольной ЭВМ HP 9830A (США). Анализ кривых рН-зависимостей кинетических параметров проводили по методу координатного спуска. В качестве критерия соответствия выбранной схемы для исследуемых зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН использовали нормированную сумму квадратичных отклонений

$$S = \sqrt{\sum \omega_i S_i^2 / \sum \omega_i (N - n)},$$

где ω_i — статистический вес для i -го экспериментального значения $\lg k_{\text{кат}}/K_m$, $\omega_i = 1/d_i^2$; d_i^2 — оценка дисперсии величины $\lg k_{\text{кат}}/K_m$; S_i — отклонение экспериментального значения $\lg k_{\text{кат}}/K_m$ от теоретической кривой; N — суммарное число экспериментальных точек, n — число варьируемых параметров.

В экспериментах с EDTA для удаления посторонних ионов двухвалентных металлов используемые буферные растворы дополнительно очищали дитизиновым методом [17]. Препарат нуклеазы S₁ предварительно диализовали против очищенного буферного раствора: 0,05 М ацетат натрия, 0,05 М трис-ацетат, 0,1 М NaCl, 0,1 мМ ZnCl₂, рН 5,0, а растворы субстратов — против того же буфера, не содержащего ZnCl₂. Начальные скорости

гидролиза СрА и 3'-UMP измеряли как описано выше. Начальные скорости гидролиза денатурированной ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (ГДР) при 260 нм согласно работе [18]. При этом концентрация ДНК и РНК составляла 40 мкг/мл. Все измерения проводили при $(25,0 \pm 0,1)^\circ \text{C}$. При предварительной инкубации с EDTA концентрация фермента составляла 0,3 мкМ, ZnCl_2 10 мкМ, EDTA 1 мМ. После полной инактивации нуклеазы S_1 в присутствии EDTA проверяли восстановление ее активностей добавлением ZnCl_2 в реакционную или непосредственно в инкубационную смеси в концентрациях, превышающих концентрацию EDTA в 10 раз.

Авторы выражают благодарность В. И. Флорентьеву за любезно представленные динуклеозидмонофосфаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peterson J. L., McConkey J. Non-histone chromosomal proteins from Hela cells.— J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 2, p. 548–554.
2. Manale A., Guthrie C., Colby D. S_1 nuclease as a probe for the conformation of a dimetic tRNA.— Biochemistry, 1979, v. 18, № 1, p. 77–83.
3. Lilley D. M. J. The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 11, p. 6468–6472.
4. Ando T. A nuclease specific for heat-denatures DNA isolated from a product of *Aspergillus oryzae*.— Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 114, № 1, p. 158–168.
5. Сенченко В. Н., Колбаиовская Е. Ю., Яковлев Г. И., Карнейский М. Я. Каталитическая активность и субстратная специфичность нуклеазы S_1 в нуклеотидазной реакции.— Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 3, с. 746–750.
6. Oleson A. E., Sasakuma M. S_1 nuclease of *Aspergillus oryzae*: a glycoprotein with an associated nucleotidase activity.— Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 204, № 1, p. 363–370.
7. Peller L., Alberty R. A. Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics. I. The mechanism involving a single substrate and product.— J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 22, p. 5845–6094.
8. Alberty R. A., Bloomfield V. Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics. V. Effect of pH on the rate of a simple enzymatic reaction.— J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 8, p. 2804–2810.
9. Vogt V. M. Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*.— Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 1, p. 192–200.
10. Hammes G. G. Elementary steps in enzyme catalysis and regulation.— Pure and Appl. Chem., 1974, v. 40, № 2, p. 525–547.
11. Schwarzenbach G., Gut R., Anderegg G., Komplexone V. Die Äthylendiamin-tetraessigsäure.— Helv. chim. acta, 1954, v. 37, № 3, p. 937–944.
12. Billo E. J., Brito K. K., Wikins R. G. Kinetics of formation and dissociation of metal-carboxypeptidases.— Bioinorgan. Chem., 1978, v. 8, № 1, p. 461–475.
13. Сенченко В. Н., Колбаиовская Е. Ю., Бочаров А. Л. Получение и некоторые характеристики функционального гомогенного препарата нуклеазы S_1 из α -амилоризина.— Мол. биол., 1979, т. 13, № 6, с. 1377–1383.
14. Warshaw M. M., Tinoco J. Absorption and optical rotatory dispersion of six dinucleoside phosphates.— J. Mol. Biol., 1965, v. 13, № 1, p. 54–64.
15. Handbook of biochemistry selected date for molecular biology. 2nd Ed. The Chemical Rubber Co. USA, 1970, p. G-3 – G-238.
16. Ames B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases.— In: Methods Enzymology. New York — London: Acad. Press, 1966, v. 8, p. 115–118.
17. Vallee B. L., Gibson J. G. An improved dithizone method for the determination of small quantities of zinc in blood and tissue samples.— J. Biol. Chem., 1948, v. 176, № 1, p. 435–441.
18. Oshima T., Uenishi N., Imanori K. Simple assay methods for ribonuclease T_1 and T_2 and nuclease P_1 .— Anal. Biochem., 1976, v. 71, № 2, p. 632–634.

Поступила в редакцию
13.III.1981

KINETIC STUDIES ON THE NUCLEASE S_1 CLEAVAGE OF LOW MOLECULAR WEIGHT SUBSTRATES

SENCHENKO V. N., YAKOVLEV G. I., KOLBANOVSKAYA E. Yu.,
SMIRNOV I. V., KARPEISKY M. Ya.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A steady-state kinetic study of pH-dependence of k_{cat} and K_m for the ApA hydrolysis and 3'-AMP dephosphorylation catalyzed by nuclease S_1 has been carried out over the 3-8 pH range. For both reactions the k_{cat}/K_m ratio has an identical pH-dependence revealing the influence of ionizable groups which in the free enzyme have pK 4.2 and 6.0. The deprotonated state of the former and protonated of the latter correspond to the active enzyme. The substrate of nucleotidase reaction, namely 3'-AMP, acts as competitive inhibitor of ApA hydrolysis catalyzed by nuclease S_1 . In addition, the effect of zinc content on the catalytic activity of nuclease S_1 was investigated. The removal of zinc ions from enzyme - zinc complex completely inactivates the enzyme in respect to DNA, RNA, dinucleosidemonophosphates or mononucleotides. After the excess of zinc ions was added to the inactivated enzyme, the full restoration of enzymatic activity was observed. The results obtained suggest that both nuclease and nucleotidase reactions take place in the same active site of nuclease S_1 .
