



УДК 577.159.022

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ НУКЛЕАЗЫ S_1
ИЗ *ASPERGILLUS ORYZAE* В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБСТРАТОВКарнейский М. Я., Сенченко В. Н., Яковлев Г. И.,
Колбановская Е. Ю.

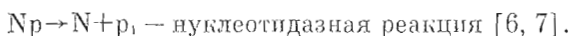
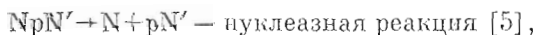
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Изучена нуклеазная и нуклеотидазная активности нуклеазы S_1 на природных субстратах и их аналогах с модифицированными основаниями и фосфорибозными остатками и определены требования к основному структурному элементу субстрата. «узнаваемому» ферментом.

Среди ферментов, катализирующих расщепление фосфодиефирных связей в нуклеиновых кислотах, особый интерес вызывают нуклеазы, т. е. ферменты, гидролизующие как ДНК, так и РНК. Как правило, ферменты этого класса проявляют специфичность к пространственной организации субстрата, а природа гетероциклического основания практически не влияет на каталитические параметры гидролиза [1–3].

С целью выявления молекулярных механизмов, обеспечивающих субстратную специфичность нуклеаз, мы исследовали гидролиз низкомолекулярных субстратов нуклеазой S_1 из *Aspergillus oryzae* — ферментом, который специфически (по одноцепочечным участкам) расщепляет нуклеиновые кислоты [4].

Недавно было показано, что нуклеаза S_1 кроме нуклеазной активности обладает способностью дефосфорилировать нуклеозид-3'-фосфаты и катализирует гидролиз «минимальных» субстратов по схеме



В табл. 1 приведены результаты кинетического анализа гидролиза ряда динуклеозидмонофосфатов и нуклеозид-3'-фосфатов, катализируемого нуклеазой S_1 . Видно, что в ряду исследованных соединений константа Михаэлиса изменяется незначительно. Поскольку, согласно полученным нами ранее данным, K_m является константой диссоциации в случае 3'-АМР [6], становится очевидным, что нуклеаза S_1 не обладает выраженной специфичностью ни к природе гетероциклического основания и сахарного остатка, ни к последовательности оснований субстрата (в реакции с динуклеозидмонофосфатами) на стадии образования фермент-субстратного комплекса. Вместе с тем из табл. 1 следует, что существует определенное различие в кинетических константах, характеризующих ферментативный гидролиз природных нуклеозидфосфатов *рибо*-ряда. Так, отношение $K_{кат}/K_m$ для 3'-АМР превышает соответствующее значение для 3'-ГМР примерно в 6 раз. Наблюдаемое различие, как видно из табл. 1, определяется разницей в значениях констант диссоциации комплексов нуклеотидов с ферментом.

Есть все основания полагать, что структура продуктивных фермент-субстратных комплексов различных нуклеозидфосфатов с нуклеазой S_1 одинакова. При этом наиболее вероятно, что вариация K_m в ряду нуклеотидов обусловлена различием их конформаций в растворе. Из конформационных параметров, характеризующих состояние нуклеотидов в растворе, наибольшему изменению свободной энергии соответствует соотношение

Кинетические параметры гидролиза низкомолекулярных субстратов нуклеазой S₁

Субстрат	$K_m^* \cdot 10^4, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$(k_{кат}/K_m) \cdot 10^{-6}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
АрА	3,0±0,2	510±50	17
АрС	6,6±0,6	320±20	4,3
СрА	4,9±0,2	150±10	3,1
3'-АМР	4,4±0,03	90±3	20
3'-ГМР	3,6±0,5	130±20	3,6
3'-СМР	1,5±0,2	87±4	5,8
3'-УМР	2,0±0,3	130±20	6,5
3'-ТМР	6,1±0,6	1,6±0,1	0,026
8-Вг-3'-АМР	1,3±0,1	36±1	2,8
8-Тно-3'-АМР	1,8±0,2	51±6	2,8

* $K_m = K_d$ (набл).

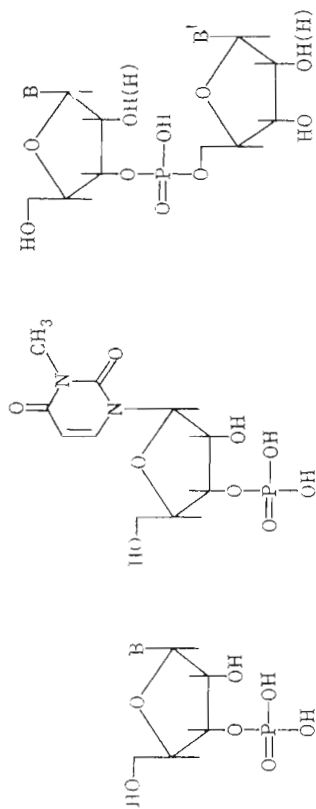
син- и *анти*-форм. Так, для 3'-АМР отношение концентраций конформеров с *син*- и *анти*-ориентацией основания относительно рибозного фрагмента составляет 2,6 [8]. То же отношение для 3'-СМР равно ~12 [9]. Очевидно, что в комплексе субстрат — фермент нуклеозид фиксирован в некой определенной конформации. Вполне вероятно, что эта конформация относится к *анти*-области значений гликозидного угла, так как природный субстрат фермента — одноцепочечная нуклеиновая кислота, мономерные звенья которой фиксированы в *анти*-конформации [10]. Дополнительным свидетельством в пользу правильности сделанного предположения служит тот факт, что для ряда ферментов, субстратами которых являются нуклеотиды, было показано, что в фермент-субстратных комплексах нуклеозидный фрагмент фиксируется в *анти*-форме [11—13]. Скорее всего это обусловлено необходимостью образования водородных связей между определенными гетероатомами основания и белка в продуктивном комплексе, а также предпочтением в энергетическом отношении *анти*-формы, преобладающей для нуклеозидных фрагментов природных субстратов — полинуклеотидов. Легко видеть, что в случае *анти*-конформации нуклеотида в комплексе наблюдаемая величина константы диссоциации его комплекса с ферментом, $K_{d(набл)}$, связана с константой *син*-*анти*-равновесия в растворе, K , соотношением

$$K_{d(набл)} = K_d(1+K),$$

где K_d — константа диссоциации нуклеотида в случае, когда его конформация в растворе и комплексе одинакова. Расчет по приведенному уравнению K_d для 3'-АМР и 3'-СМР дает значения 12 и 11 мкМ соответственно, т. е. практически одинаковые величины. Определяющее влияние конформации нуклеотида в растворе на K_m дополнительно подтверждается результатами измерений с использованием в качестве субстратов 8-замещенных производных 3'-АМР. Эти соединения характеризуются существенным преобладанием *син*-формы по сравнению с 3'-АМР [14]. Точное соотношение *син*- и *анти*-форм в этом случае неизвестно, но можно считать, что доля *анти*-формы для водных растворов 8-бром- и 8-тио-3'-АМР составляет не более чем 10%, т. е. отношение *син*:*анти* ≥ 9. Тогда для этих субстратов $K_m \leq 15$ мкМ.

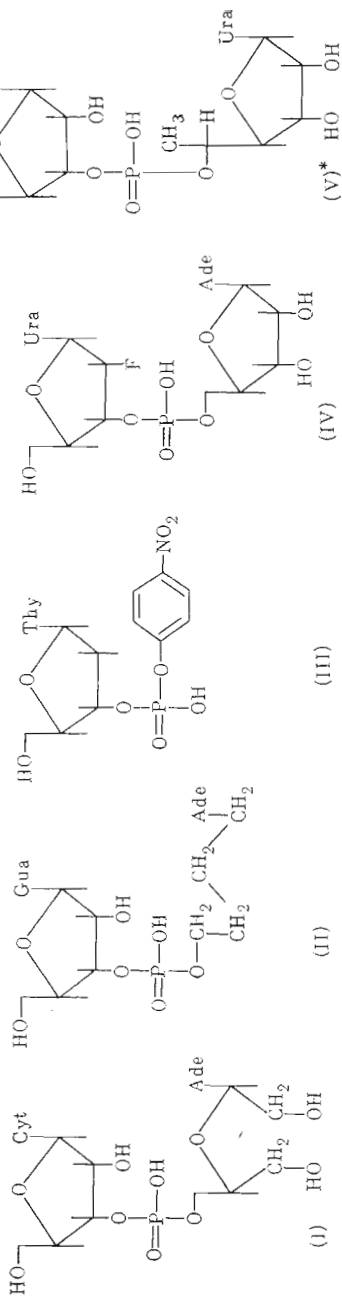
Если на первой стадии — образовании фермент-субстратного комплекса — в ряду исследованных субстратов не происходит никакой дискриминации, то на стадии превращения фермент-субстратного комплекса в продукты реакции выявляются заметные различия между субстратами (см. табл. 1), обусловленные структурой и основанием, и сахарного кольца субстрата. Эти результаты хорошо согласуются с выдвинутым нами положением о влиянии взаимодействия с белком переаггирующих фрагментов молекулы субстрата на структуру и концентрацию продуктивного фермент-субстратного комплекса [15]. Более детальная информация о структурных

Группа I. Субстраты



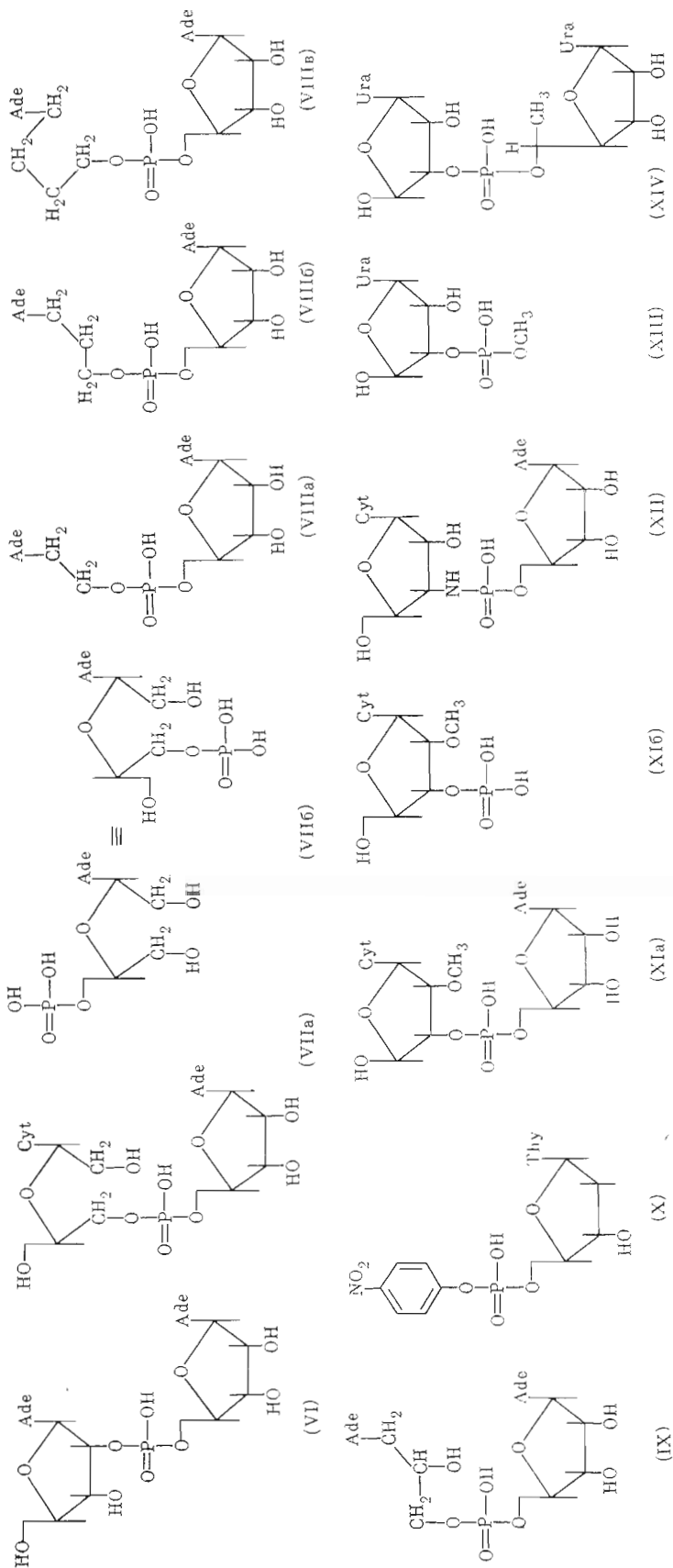
B, B' = Ade, Gua, Cyt, Thy, Ura

Группа II. Гидролизуемые аналоги субстратов



* Наблюдаемая скорость гидролиза соединения (V) в 100 раз меньше, чем в случае динуклеозидомонофосфатов.

Группа III. Негидролизуемые аналоги субстратов**



** Для соединений группы III наблюдаемая скорость гидролиза по крайней мере в 10^3 раз меньше, чем для динуклеозидмонофосфатов.

аспектах «узнавания» нуклеотидов нуклеазой S_1 была получена нами при изучении действия фермента на различные аналоги низкомолекулярных субстратов (I) — (XIV).

На основании результатов сравнительного хроматографического анализа реакционных смесей все исследованные соединения были разделены на три группы. Природные низкомолекулярные субстраты рибо- и дезоксирибонуклеозидмонофосфаты и рибонуклеотиды, а также 3-N-метил-3'-UMP гидролизуются на 100% за 15 мин и составляют первую группу. Интересно, что, несмотря на замещение атома Н(3) на метильную группу в 3'-UMP, скорости гидролиза 3'-UMP и 3'-N-метил-3'-UMP близки между собой. Очевидно, атом N(3) в 3'-UMP не участвует в образовании водородной связи с группами активного центра нуклеазы S_1 , т. е. «узнавание» нуклеозидного фрагмента субстрата протекает без участия этого гетероатома.

Ко второй группе были отнесены те аналоги динуклеозидмонофосфатов, для которых через 15 мин после начала реакции было обнаружено появление некоторого количества продуктов гидролиза, однако реакция протекала медленно и даже через 24 ч в реакционной смеси присутствовало исходное вещество. В эту группу попали все соединения, имеющие по отношению к расщепляемой связи неизменный 3'-нуклеозидный фрагмент и модифицированный 5'-нуклеозидный фрагмент молекулы «минимального» субстрата. Таким образом, нарушение структуры 5'-концевого нуклеозидного остатка привело к уменьшению скорости гидролиза этих соединений нуклеазой S_1 по сравнению с природными субстратами — динуклеозидмонофосфатами.

В *n*-нитрофениловом эфире 3'-тимидиловой кислоты *n*-нитрофенильная группа, являющаяся сильным акцептором электронов, усиливает электрофильность атакуемого атома фосфора по сравнению с динуклеозидмонофосфатами, поэтому можно было ожидать увеличения скорости гидролиза этого соединения. Так как в этом случае на самом деле происходит уменьшение наблюдаемой скорости гидролиза, можно предположить, что скорость лимитируется факторами, не связанными с перераспределением электронной плотности у атома фосфора. Скорее всего, наблюдаемая незначительная скорость гидролиза соединений этой группы нуклеазой S_1 обусловлена их низким родством к ферменту. Другими словами, наличие в молекуле минимального субстрата 5'-нуклеозидного фрагмента обязательно для его «узнавания» на стадии образования фермент-субстратного комплекса и желательно на стадии превращения в продукты реакции. Поскольку в эту группу вошли все те аналоги динуклеозидмонофосфатов, у которых модифицирован 5'-нуклеозидный фрагмент, становится очевидным, что в активном центре существует функционально важный участок, комплементарный данному фрагменту субстрата. Очевидно, что взаимодействие между субстратом и этим участком активного центра фермента оказывает существенное влияние на формирование продуктивного фермент-субстратного комплекса. Тот факт, что оба 5'-метилзамещенных аналога уридила (3'→5')уридина (соединения (V) и (XIV) с одинаковой прочностью связываются с активным центром, но только один из них, *алло*-изомер (соединение (V)), расщепляется ферментом, указывает на необходимость жесткой фиксации реагирующих групп в комплексе, достигаемой за счет детального топологического соответствия между реагирующим фрагментом молекулы субстрата и каталитическим участком активного центра фермента на стадии трансформации продуктивного фермент-субстратного комплекса.

Крайне интересные, на наш взгляд, выводы о структуре активного центра нуклеазы S_1 и характере взаимодействия в фермент-субстратном комплексе можно сделать при рассмотрении строения и свойств аналогов нуклеотидов и динуклеозидмонофосфатов, которые не расщепляются нуклеазой S_1 (группа III, табл. 2). В эту группу вошло соединение (VI), устойчивость которого свидетельствует о необходимости определенной пространственной ориентации отдельных частей молекулы субстрата по отношению к активному центру фермента. К этой группе относятся также все

Константы ингибирования негидролизуемыми аналогами субстратов нуклеазы S_1

Соединение	Константа ингибирования, K_i , М	Субстрат
(V)	$(5,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	СрА
(VIIa)	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	СрА
(VIIб)	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	СрА
(XIa)	$> 10^{-1}$	3'-UMP *
(XII)	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	СрА
(XII)	$> 10^{-1}$	3-UMP **
(XIV)	$(5,0 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	СрА
3'-AMP	$(0,34 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$	АрА
5'-AMP	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	АрА
Ado	$> 10^{-3}$	АрА

* Эксперимент проводили при pH 4,6 и 6,3 (37° С).

** Эксперимент проводили при pH 4,5 (37° С).

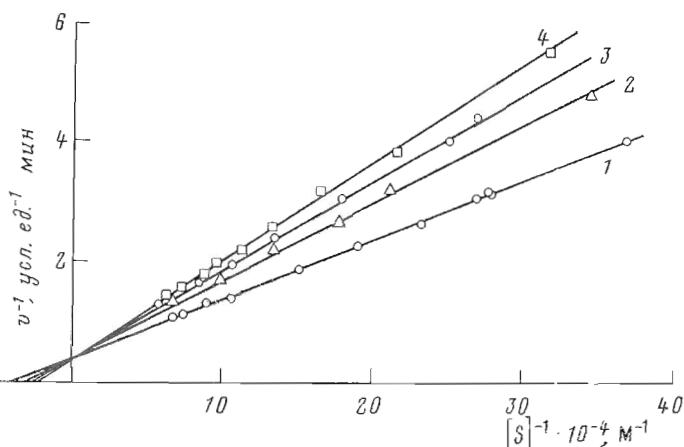
те аналоги субстратов, у которых нарушена целостность рибозного кольца в 3'-нуклеозидном фрагменте молекулы субстрата (соединения (VII) — (IX)). Вместе с тем, как следует из рис. 1 и данных табл. 2, эти аналоги являются конкурентными ингибиторами, причем значения K_i для них близки значениям K_m для соответствующих субстратов. Таким образом, становится очевидным, что сахарное кольцо 3'-нуклеозидного фрагмента субстрата играет роль связующего звена между гетероциклическим основанием и фосфатной группой субстрата и не вносит сколько-нибудь заметного вклада в свободную энергию образования фермент-субстратного комплекса. Вместе с тем тот факт, что аналоги с раскрытым рибозным кольцом связываются с ферментом, но не гидролизуются, непосредственно указывает на необходимость однозначного топологического соответствия между остатком рибозы 3'-нуклеозидного фрагмента субстрата и белком для превращения сорбционного фермент-субстратного комплекса в продуктивный комплекс. Другими словами, взаимодействие 3'-нуклеозидного фрагмента субстрата с комплементарным ему участком активного центра фермента обеспечивает необходимую ориентацию и электронное состояние реагирующих групп субстрата и белка в каталитическом участке активного центра фермента. Хорошо согласуется со сделанными выводами устойчивость к действию нуклеазы S_1 *n*-нитрофенилового эфира 5'-тимидиловой кислоты (X), который в модельной системе расщепляется с образованием *n*-нитрофенолят-иона существенно быстрее, чем гидролизуются динуклеозидмонофосфат.

Несколько неожиданным является крайне низкое сродство к ферменту аналогов субстратов — соединений (XIa) и (XIб). По-видимому, это связано с тем, что в комплексе фермент — субстрат рибозный цикл 3'-нуклеозидного фрагмента субстрата погружен в полость белка и введение в 2'-положение метильной группы препятствует образованию необходимых контактов между белком и субстратом.

Одним из наиболее интересных соединений среди не гидролизуемых аналогов субстрата является соединение (XII), отличающееся от природного динуклеозидмонофосфата лишь заменой атома кислорода в уходящей группе на NH-группу. Эта замена привела к превращению субстрата в конкурентный ингибитор, структура которого максимально близка структуре субстрата. Известно, что необходимым условием гидролитического расщепления фосфоамидной связи является протонирование NH-группы, обладающей весьма слабыми основными свойствами [16, 17]. Следовательно, устойчивость этой связи в комплексе фосфоамида (XII) с нуклеазой S_1 означает, что в каталитическом участке активного центра невозможно осуществить протонирование фосфоамидной группы. Этот вывод хорошо согласуется с существующим в настоящее время представлением о механизме расщепления фосфодиэфирной связи нуклеазами, согласно которо-

му протонирование уходящей группы осуществляется только после присоединения молекулы воды (или другого нуклеофильного агента) к фосфодиэфирной группе [18, 19]. Таким образом, комплекс нуклеазы S_1 с соединением (XII) представляет собой «замороженный» фермент-субстратный комплекс на стадии, предшествующей образованию пентаковалентного промежуточного соединения.

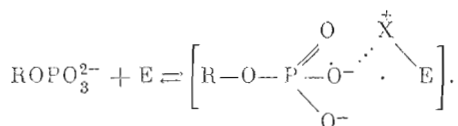
Завершая обсуждение роли нуклеозидных фрагментов субстрата при образовании и превращении фермент-субстратного комплекса, необходимо упомянуть, что метиловый эфир 3'-уридилевой кислоты (XIII), устойчивый к действию нуклеазы S_1 , практически с ферментом не связывается ($K_i > 0,1$ М). Следовательно, связывание 5'-нуклеозидного фрагмента суб-



Конкурентное ингибирование реакции гидролиза цитидилил (3'→5') аденозина (1), катализируемой нуклеазой S_1 , устойчивыми аналогами субстратов (XIV) 0,17 мМ (2), (VIIIb) 0,22 мМ (3) и (VIIa) 0,11 мМ (4). Концентрация фермента 4 нМ

страта является необходимым условием образования фермент-субстратного комплекса, трансформация которого в продуктивный фермент-субстратный комплекс осуществляется за счет взаимодействия с ферментом 3'-нуклеозидного фрагмента молекулы субстрата.

Согласно нашим данным, обе реакции, катализируемые нуклеазой S_1 , протекают в одном и том же участке активного центра и имеют общий механизм [20]. Однако остается неясным, как практически может реализоваться такая схема, поскольку один субстрат является моноанионом, а другой — дианионом фосфорной кислоты, тем более что мононуклеотиды связываются с ферментом в форме дианиона, как следует из приведенных выше экспериментов (соед. (XIII)). На основании данных по ингибированию нуклеазной реакции 3'-AMP и аденозином (табл. 2) можно полагать, что при связывании с ферментом нуклеозид-3'-фосфатов основной вклад в свободную энергию комплекса вносит электростатическое взаимодействие дианиона фосфатной группы нуклеотида с положительно заряженным участком активного центра фермента. Последующий конформационный переход фиксирует комплекс в состоянии, аналогичном таковому для комплекса фермента с моноанионом — динуклеозидмонофосфатом:



Результаты проведенного исследования позволяют сделать определенные выводы относительно структуры активного центра нуклеазы S_1 и механизма «узнавания» минимальных субстратов, определяющего специфичность фермента в реакции гидролиза нуклеиновых кислот. В активном центре нуклеазы S_1 существует протяженный участок, в котором при об-

разовании фермент-субстратного комплекса фиксируется не менее двух нуклеозидных звеньев. Эта фиксация осуществляется за счет многоточечных взаимодействий, в которых участвуют практически все фрагменты минимального субстрата. Таким образом, для образования продуктивного фермент-субстратного комплекса при взаимодействии нуклеазы S_1 с нуклеиновой кислотой необходимо, чтобы в молекуле нуклеиновой кислоты были бы фрагменты, не вовлеченные во внутри- или межмолекулярные взаимодействия, т. е. одноцепочечные участки.

Экспериментальная часть

Выделение нуклеазы S_1 из α -амилоризина П10Х (экстракт мицелия *Aspergillus oryzae*, штамм 740-A2) проводили по описанной методике [5]. В работе были использованы следующие аналоги низкомолекулярных субстратов нуклеазы S_1 : 8-бромаденозин-3'-фосфат [21]; 8-тиоаденозин-3'-фосфат [14]; 3-N-метилуридин-3'-фосфат [21]; цитидиллил(3'→5')-9-[1',5'-диокси-4'-(S)-оксиметил-3'-оксапент-2'-(R)-ил]аденин (I) [22]; гуанилил(3'→4')-9-(4'-оксибутил)аденин (II) [23]; 2'-фтор-2'-дезоксуридин-3'-фосфориллил(3'→5')аденозин (IV) [24]; ApA (VI); 1-[1',5'-диокси-4'-(S)-оксиметил-3'-оксапент-2'-(R)-ил]цитозин-4'-фосфориллил(4'→5')аденозин (VIIa) [22]; 9-[1',5'-диокси-4'-(S)-оксиметил-3'-оксапентил-2'-(R)-ил]аденин-5'-фосфат (VIIб) [25]; 9-(2'-оксипропил)аденин-2'-фосфориллил(2'→5')аденозин (VIIIa) [26]; 9-(3'-оксипропил)аденин-3'-фосфориллил(3'→5')аденозин (VIIIб) [26]; 9-(4'-оксибутил)аденин-4'-фосфориллил(4'→5')аденозин (VIIIв) [26]; 9-(2'-(S),3'-диоксипропил)аденин-3'-фосфориллил(3'→5')аденозин (IX) [22]; 2'-O-метиладенозин-3'-фосфориллил(3'→5')аденозин (XIa) и 2'-O-метилцитидин-3'-фосфат (XIб) любезно предоставлены В. Л. Флорентьевым; 3'-дезоксид-3'-аминоцитидиллил(3'→5')аденозин (XII) [27]; уридин-3'-фосфориллил(3'→5')-1-(6'-дезоксид-β-D-аллофуранозил)урацил (V) [28]; уридин-3'-фосфориллил(3'→5')-1-(6'-дезоксид-α-L-талофуранозил)урацил (XIV) [28]. *n*-Нитрофениловые эфиры (III) и (X) — препараты фирмы «Serwa».

Метилловый эфир 3'-уридилевой кислоты (XIII) был получен расщеплением уридин-2',3'-дифосфата РНКазой А в растворе вода — метанол с последующим разделением продуктов реакции на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте (0→0,15 M) концентрации NH_4HCO_3 .

Значения молярных коэффициентов поглощения (ϵ) и разностных молярных коэффициентов поглощения ($\Delta\epsilon$) были найдены из спектров поглощения субстратов и продуктов их полного гидролиза нуклеазой S_1 . При расчете использовали литературные данные для нуклеозидов и нуклеотидов [29].

При $(25 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ для ApA $\epsilon_{280} 5,0 \cdot 10^3$, $\Delta\epsilon_{280} 650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; для CpA $\epsilon_{280} 9,25 \cdot 10^3$, $\Delta\epsilon_{280} 600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; для ApC $\epsilon_{290} 3,4 \cdot 10^3$, $\Delta\epsilon_{290} 560 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Начальную скорость гидролиза динуклеозидмонофосфатов определяли в том же буферном растворе по изменению D_{280} или D_{290} при $(37 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Спектры поглощения и начальную скорость гидролиза динуклеозидмонофосфатов получали с помощью спектрофотометра «Cary-118» (Varian, США).

Реакцию гидролиза нуклеозид-3'-фосфатов нуклеазой S_1 проводили в буфере 0,02 M трис-ацетат, 0,02 M ацетат натрия (pH 5), 0,1 M NaCl, 0,1 mM ZnCl_2 при $(37 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ в течение 5–15 мин. Образующийся неорганический фосфат определяли по методу [30].

Анализ кинетических данных гидролиза динуклеозидмонофосфатов и нуклеозид-3'-фосфатов нуклеазой S_1 выполняли по методу наименьших квадратов с учетом статистических весов, используя настольную ЭВМ HP 9830 A (США).

Продукты гидролиза природных и модифицированных нуклеотидов идентифицировали методом ТСХ. При хроматографическом анализе растворы исследуемых соединений (0,01 M) в 0,02 M натрий-ацетатном буфере (pH 4,6), содержащем 0,03 M NaCl и 0,1 mM ZnCl_2 , выдерживали от 15 мин до 48 ч в присутствии нуклеазы S_1 при 20°C . Хроматографию об-

разцов выполняли на силуфолс UV₂₅₄ в системе изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2).

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам института И. В. Антонову, С. Н. Михайлову, А. В. Ажаеву, Н. Ш. Падюковой, В. Л. Флорентьеву за любезно предоставленные соединения и И. В. Смирнову за помощь в математической обработке кинетических данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anfinsen C. B., Cuatrecasas P., Taniuchi H. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D., 3rd Ed. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 4, p. 177—204.
2. Laskowski M. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D., 3rd Ed. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 4, p. 313—328.
3. Bernardi A., Bernardi G. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D., 3rd Ed. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 4, p. 329—336.
4. Vogt V. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 1, p. 192—200.
5. Сенченко В. Н., Колбаповская Е. Ю., Бочаров А. Л. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 6, с. 1377—1383.
6. Сенченко В. Н., Колбаповская Е. Ю., Яковлев Г. И., Карпейский М. Я. Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 3, с. 746—750.
7. Oleson A. E., Sasakuma M. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 204, № 1, p. 361—370.
8. Davies D. Progress in NMR spectroscopy, 1978, v. 12, p. 135—225.
9. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 749—757.
10. Saenger W. In: Nucleoside Analog. Chem., Biol. and Med. Appl. Lect. NATO Adv. Study Inst. Urbino. New York — London, 1979, p. 1—13.
11. Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sakharovsky V. G., Yakovlev G. I. Eur. J. Biochem., 1978, v. 87, № 1, p. 45—54.
12. Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya., Bezborodova S. I., Beletskaja O. P., Sakharovsky V. G. Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 75—85.
13. Follman H. In: Nuclear Resonance Spectroscopy in Molecular Biology / Ed. Pullman D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1978, p. 323—337.
14. Антонов И. В., Карпейский М. Я., Падюкова Н. Ш., Яковлев Г. И., Сахаровский В. Г. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 280—288.
15. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И., Антонов В. К. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 645—654.
16. Garrison A. W., Boozer C. E. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, № 13, p. 3486—3494.
17. Letsinger R. L., Mungall W. S. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 11, p. 3800—3803.
18. Benkovic S. J., Schray K. J. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D., 3rd Ed. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 8, p. 201—238.
19. Benkovic S. J., Schray K. J. In: Transition States of Biochemical Processes / Eds Gandour R. D., Schowen R. L. New York — London: Plenum Press, 1978, p. 493—528.
20. Сенченко В. Н., Яковлев Г. И., Колбаповская Е. Ю., Смирнов И. В., Карпейский М. Я. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1348—1357.
21. Holy A., Chladek S., Zemička I. Collect. Czech. Chem. Commun., 1969, v. 34, № 1, p. 253—271.
22. Флорентьев В. Л. Синтез и свойства конформационно-подвижных аналогов нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов. Автореф. дис. ... д-ра хим. наук / Институт молекулярной биологии. М., 1980, с. 1—45.
23. Mikhailov S. N., Smrt J. Collect. Czech. Chem. Commun., 1975, v. 40, № 9, p. 2353—2363.
24. Антонов И. В., Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 9, с. 1209—1219.
25. Smrt J., Mikhailov S. N., Hynic S., Florent'ev V. L. Collect. Czech. Chem. Commun., 1975, v. 40, № 11, p. 3399—3403.
26. Михайлов С. Н., Крицын А. М., Колобушкина Л. П., Флорентьев В. Л. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 4, с. 915—916.
27. Озол А. М., Косенюк А. В., Дяткина Н. Б., Агражев А. М., Ажиев А. В., Кузнецова М. К., Краевский А. А., Готтх В. П., Смирн П. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1307—1315.
28. Radukova N. Sh., Smrt J. Collect. Czech. Chem. Commun., 1980, v. 45, № 9, p. 2550—2557.
29. Handbook of Biochemistry Selected Date for Molecular Biology. 2nd Ed. The Chemical Rubber Co, USA, 1970, p. G-3—G-238.
30. Ames B. N. In: Methods Enzymology. New York — London: Acad. Press, 1966, v. 8, p. 115—118.

Поступила в редакцию
4.VIII.1981

SUBSTRATE SPECIFICITY OF NUCLEASE S₁ FROM *ASPERGILLUS*
ORYZAE IN HYDROLYSIS OF LOW MOLECULAR WEIGHT SUBSTRATES

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

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

The hydrolysis of low molecular weight substrates by nuclease S₁ from *Aspergillus oryzae* has been studied. The enzyme showed no specificity either towards the nature of heterocyclic base or that of ribose moiety on the stage of the enzyme-substrate complex formation. On the stage of conversion of enzyme-substrate complex into reaction products a marked difference between substrates was observed. A study of the nuclease S₁ action on various analogs of low molecular weight substrates revealed that the binding of 5'-nucleoside fragment is essential for the formation of the enzyme-substrate complex in the nuclease reaction. The transformation of this complex into productive one is accomplished by the interaction of nuclease S₁ with the 3'-nucleoside fragment of a substrate.