



УДК 577.361*1'134:577.112.088.52

**СТРОЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ
ПИРОФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ***Буранова И. И., Терзян С. С., Воронова А. А.,
Смирнова Е. А., Вайнштейн В. К.**Институт кристаллографии Академии наук СССР, Москва**Хёне В., Хансен Г.**Институт физиологической и биологической химии
Берлинского Университета им. А. Гумбольдта*

Методом разностных синтезов Фурье исследованы кристаллические комплексы неорганической пирофосфатазы дрожжей с ионами металлов-активаторов и ингибиторов (Mg^{2+} , UO_2^{2+} , Tb^{3+}), а также с нерасщепляемым аналогом субстрата — пирофосфатом кальция. На атомной модели белка локализованы субстрат- и металл-связывающие участки активного центра фермента. Установлены природа и положение в полипептидной цепи аминокислотных остатков, расположенных в зоне активного центра. На основе полученных данных рассматривается возможный механизм катализа пирофосфатазой.

Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1), относящаяся к ферментам фосфорного обмена, играет существенную роль в энергетическом метаболизме клетки. Основная катализируемая реакция — расщепление фосфоангидридной связи неорганического пирофосфата (PP_i). In vivo эта реакция сопряжена с рядом важных анаболических процессов (биосинтез белков, полисахаридов, пукленовых кислот). Пирофосфатаза катализирует также кислородный обмен между неорганическим фосфатом и водой (P_i-H_2O), между фосфатом и пирофосфатом (P_i-PP_i) [1]. Пирофосфатаза может избирательно связывать анионы фосфата [2, 3]. Как показано недавно, при избытке фосфата в активном центре фермента имеет место синтез макроэргической пирофосфатной связи, причем образующийся в эквимолярных количествах пирофосфат остается связанным с ферментом [3, 4]. Перечисленные особенности делают пирофосфатазу интересным объектом для изучения общих закономерностей ферментативного распада и синтеза фосфоангидридной связи и объясняют значительный интерес к изучению ее строения и свойств.

Молекула неорганической пирофосфатазы пекарских дрожжей, являющаяся объектом нашего исследования, имеет молекулярную массу 64 000 и состоит из двух идентичных субъединиц [5, 6]. Каждая субъединица включает в себя 285 аминокислотных остатков, последовательность которых в полипептидной цепи установлена в 1978 г. [6] (рис. 1).

Пространственная структура пирофосфатазы изучается независимо Д. Войетом и нами [7—11]. Расчет синтеза электронной плотности при разрешении 3 Å, по которому ранее был определен ход полипептидной цепи, а в настоящее время построена атомная модель молекулы*, описан нами в работе [11]. На атомной модели, построенной с использованием оптического компаратора Ричардса, найдено положение 281 остатка из 285, составляющих субъединицу. Четыре С-концевых остатка не выражены на картах электронной плотности.

В предлагаемой статье приводятся данные о строении металл- и субстратсвязывающего участков активного центра пирофосфатазы, полученные

* Полное описание атомной модели неорганической пирофосфатазы будет приведено в отдельном сообщении.

H-Thr-Tyr-Thr-Thr-Arg-Gln-Ile-Gly-Ala-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Tyr-Lys-Val-Tyr-Ile-Glu-Lys-Asp-Gly-Lys-²⁰
¹⁰
 Pro-Val-Ser-Ala-Phe-His-Asp-Ile-Pro-Leu-Tyr-Ala-Asp-Lys-Glu-Asp-Asn-Ile-Phe-Asn-Met-Val-Val-Glu-Ile⁴⁰
³⁰
 Pro-Arg-Trp-Thr-Asn-Ala-Lys-Leu-Glu-Ile-Thr-Lys-Glu-Thr-Leu-Asn-Pro-Ile-Ile-Gln-Asn-Thr-Lys-Gly-⁷⁰
⁵⁰
 Lys-Leu-Arg-Phe-Val-Arg-Asn-Cys-Phe-Pro-His-His-Gly-Tyr-Ile-His-Asn-Tyr-Gly-Ala-Phe-Pro-Gln-Thr-Trp-⁹⁰
⁸⁰
 Glu-Asp-Pro-Asn-Val-Ser-His-Pro-Glu-Thr-Lys-Ala-Val-Gly-Asp-Asn-Asn-Pro-Ile-Asp-Val-Leu-Gln-Ile-Gly-¹¹⁰
¹⁰⁰
 Glu-Thr-Ile-Ala-Tyr-Thr-Gly-Gln-Val-Lys-Ala-Leu-Gly-Ile-Met-Ala-Leu-Leu-Asp-Glu-Gly-Glu-¹³⁰
¹¹⁰
 Thr-Asp-Trp-Lys-Val-Ile-Ala-Ile-Asp-Ile-Ala-Asp-Pro-Leu-Ala-Pro-Lys-Leu-Asn-Asp-Ile-Glu-Asp-Val-Glu-¹⁶⁰
¹⁵⁰
 Lys-Tyr-Phe-Pro-Gly-Leu-Leu-Arg-Ala-Thr-Asp-Glu-Trp-Phe-Arg-Ile-Tyr-Lys-Ile-Pro-Asp-Gly-Lys-Pro-Glu-¹⁸⁰
¹⁷⁰
 Asn-Gln-Phe-Ala-Phe-Ser-Gly-Glu-Ala-Lys-Asn-Lys-Lys-Tyr-Ala-Leu-Asp-Ile-Ile-Lys-Glu-Thr-His-Asn-Ser-²⁰⁰
¹⁹⁰
 Trp-Lys-Gln-Leu-Ile-Ala-Gly-Lys-Ser-Ser-Asp-Ser-Lys-Gly-Ile-Asp-Leu-Thr-Asn-Val-Thr-Leu-Pro-Asp-Thr-²³⁰
²¹⁰
 Pro-Thr-Tyr-Ser-Lys-Ala-Ala-Ser-Asp-Ala-Ile-Pro-Pro-Ala-Ser-Pro-Lys-Ala-Asp-Ala-Pro-Ile-Asp-Lys-Ser-²⁵⁰
²⁴⁰
 Ile-Asp-Lys-Trp-Phe-Phe-Ile-Ser-Gly-Ser-Val-OH²⁸⁰

Рис. 1. Первичная структура
 неорганической пирофосфа-
 тазы [6]; подчеркнуты остат-
 ки дикарбоновых кислот, ли-
 зина, аргинина и тирозина,
 сосредоточенные в полости
 активного центра

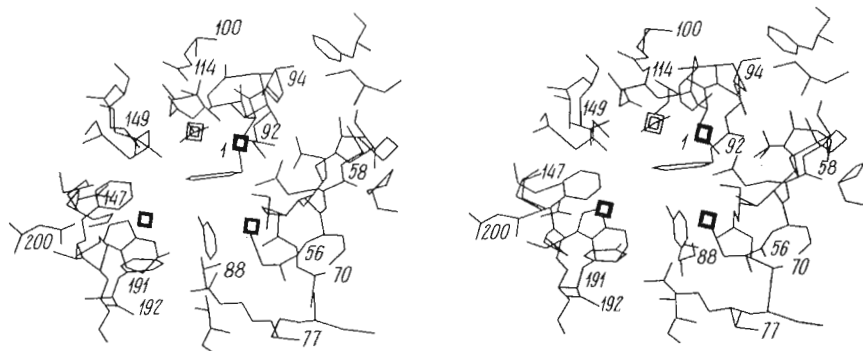


Рис. 2. Стереоскопическое изображение участка активного центра одной из субъединиц пирофосфатазы. Кубиками обозначены связанные ионы металла. 1 — первый центр, далее нумерация возрастает по часовой стрелке

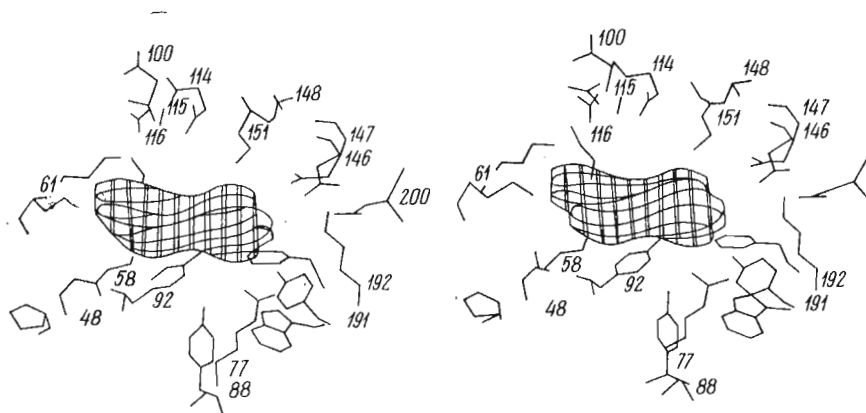


Рис. 3. Стереоскопическое изображение участка активного центра одной из субъединиц пирофосфатазы в комплексе с CaPP_i; максимум электронной плотности соответствует молекуле CaPP_i

при анализе атомной структуры нативной пирофосфатазы и ее комплексов с ионами уранила, тербия и магния (разрешение 3 Å) и нерасщепляемым аналогом субстрата — пирофосфатом кальция (разрешение 5 Å). Обсуждается также возможный механизм действия фермента, учитывающий полученные нами и имеющиеся в литературе данные.

Пирофосфатаза относится к металлозависимым ферментам, для каталитической активности которых необходимо присутствие ионов двухвалентных металлов. Поэтому локализация металлсвязывающих участков и установление природы аминокислотных остатков — лигандов ионов металла является важным моментом для выяснения механизма катализа.

Взаимодействие пирофосфатазы с ионами металлов рассматривается во многих работах [12–16]. Наилучшим активатором являются ионы магния. В отсутствие субстрата пирофосфатаза способна связать по два иона магния, марганца, кобальта или кальция на субъединицу. В присутствии субстрата число связываемых ионов увеличивается до трех и даже четырех [17–19].

Наряду с ионами-активаторами известны ионы-ингибиторы пирофосфатазы (Tb^{3+} , UO_2^{2+}). Избирательно присоединяясь в активном центре, они обратимо инактивируют фермент [20, 21]. Найдено, что в растворе пирофосфатаза связывает один ион уранила или два иона тербия на субъединицу.

Учитывая важность ионов металла для функционирования фермента и отсутствие сведений об их расположении в молекуле, при рентгенографическом исследовании мы определили места связывания металлов методом разностных синтезов Фурие. Способность ионов уранила связываться

в активном центре была использована нами для локализации этого участка на картах электронной плотности при разрешении 5 Å [10].

В кристаллическом комплексе пирофосфатазы с ионами UO_2^{2+} были найдены три иона уранила в каждой субъединице. Расположенные в глубокой нише, они образуют треугольник со сторонами от 6,5 до 9,5 Å (рис. 2). Было показано, что присоединившиеся ионы различаются по величине сродства к ферменту и выполняемой роли. Ионы уранила в центре наибольшего сродства уменьшают флуоресценцию молекулы, однако не влияют на ее устойчивость к тепловой инактивации (на рис. 2 центр 1). Ионы уранила в центрах 2 и 3, связанные менее прочно, защищают белок от термоинактивации [10].

Нами были приготовлены и исследованы также кристаллические комплексы пирофосфатазы с наилучшим естественным активатором — ионами магния и еще одним ингибирующим ионом — Tb^{3+} .

На разностных картах электронной плотности как в тербиевом, так и в магниевом комплексах найдено по одному месту связывания металла в каждой субъединице. Оба иона заняли один и тот же центр 4, расположенный между центрами 1 и 3, почти на равном расстоянии от каждого из них (рис. 2). Ввести ион магния или тербия в центр 2, как это наблюдается в растворе, в кристаллическом комплексе не удалось. Повышение концентрации солей сильно увеличивало растворимость кристаллов.

Исследование кристаллического комплекса пирофосфатазы с пирофосфатом кальция $CaPP_i$ выполнено при разрешении 5 Å. Расположение максимума электронной плотности, соответствующего молекуле псевдосубстрата ($CaPP_i$) и найденного лишь в одной из субъединиц пирофосфатазы, видно из рис. 3. Эта электронная плотность сосредоточена в том же участке молекулы, что и ионы металлов. Она вытянута в направлении от центра 1 к центру 3 и перекрывает как оба этих центра, так и центр 4. Поскольку связывание $CaPP_i$ с ферментом сопровождается присоединением по меньшей мере двух ионов Ca^{2+} , а за пределами данного максимума электронной плотности не обнаружено каких-либо дополнительных максимумов, естественно предположить, что присоединившиеся ионы кальция находятся в его границах.

Полученные результаты подтверждают, что ионы металлов-активаторов, так же как и ионы металлов-ингибиторов, связываются в том же участке молекулы, что и субстрат, т. е. в активном центре фермента.

Анализ строения этого участка на атомной модели пирофосфатазы позволил обнаружить следующие его особенности. В полости активного центра сосредоточены преимущественно полярные аминокислотные остатки с явным преобладанием остатков дикарбоновых кислот (рис. 1, 2). Столь высокое скопление остатков дикарбоновых кислот обнаружено лишь в данном участке молекулы. Здесь собрано около четверти остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, имеющих в полипептидной цепи. По-видимому, этим объясняется легкость присоединения положительных ионов в этом районе. Большинство остатков дикарбоновых кислот расположено вблизи ионов металла и может непосредственно или через молекулу воды входить в их координационную сферу. Аминокислотные остатки, окружающие ионы металла, перечислены в таблице.

Аминокислотные остатки — потенциальные лиганды, расположенные вблизи (≤ 6 Å) ионов металлов, связанных в активном центре пирофосфатазы
 M_1, M_2, M_3 — ионы уранила, M_4 — ионы тербия и магния

Металлсвязывающие центры	Аминокислотные остатки, расположенные вблизи ионов металлов
M_1	Glu ⁴⁸ , Lys ⁵⁶ , Glu ⁵⁸ , Tyr ⁹² , Asp ¹¹⁴ , Asn ¹¹⁶ , Asp ¹¹⁹ , Asp ¹⁵¹
M_2	Glu ⁴⁸ , Lys ⁵⁶ , Glu ⁵⁸ , Gln ⁷⁰ , Arg ⁷⁷ , Asn ¹¹⁶
M_3	Asp ¹⁴⁶ , Glu ¹⁴⁷ , Asp ¹⁵¹ , Tyr ¹⁹¹ , Asn ²⁰⁰
M_4	Tyr ⁸⁸ , Tyr ⁹² , Asp ¹¹⁴ , Asp ¹¹⁹ , Asp ¹⁵¹ , Lys ¹⁵³

Пресобладание дикарбоновых кислот в субстратсвязывающем центре объясняет также тот факт, что свободный отрицательно заряженный пирофосфат слабее связывается с ферментом, чем его соли. По-видимому, одна из ролей, которую ионы металла играют в пирофосфатазе, — роль мостиков между ферментом и субстратом, благодаря чему по крайней мере частично нейтрализуется суммарный отрицательный заряд полости активного центра. Этому способствуют и остатки основных аминокислот, часто соседствующих с остатками дикарбоновых кислот и в апоферменте, возможно, связанные с ними ионными или водородными связями. Например, расстояния между парами аминокислотных остатков $\text{Lys}^{197}-\text{Glu}^{147}$, $\text{Lys}^{153}-\text{Glu}^{119}$, $\text{Lys}^{56}-\text{Glu}^{58}$ таковы, что при соответствующей ориентации они могут образовывать водородные связи. Ионы металла, вовлекая в свою сферу карбоксильные группы остатков дикарбоновых кислот, освобождают остатки основных аминокислот для участия в связывании субстрата.

В ряде работ главным образом методами кинетики и химической модификации установлено, что в число остатков пирофосфатазы, существенных для ее активности, входят остатки аргинина, тирозина и дикарбоновых кислот [22–25]. Несколько противоречивы данные о роли остатков триптофана и лизина [22, 23, 26, 27]. Лишь для одного из функционально важных остатков, Arg^{77} , установлено место в полипептидной цепи [28].

Вписывая молекулу пирофосфата в соответствующую ей электронную плотность и анализируя ее окружение на атомной модели, мы получили информацию не только о природе аминокислотных остатков, присутствующих в зоне связывания, но и одновременно об их положении в полипептидной цепи и пространственной ориентации. Хотя по картам электронной плотности с разрешением 5 Å нельзя точно установить ориентацию молекулы пирофосфата, однако фиксация его между металлсвязывающими центрами ограничивает возможности выбора. Некоторые аминокислотные остатки, окружающие PP_i в активном центре фермента, схематически представлены на рис. 4. Уже упоминалось, что в комплексе пирофосфатаза — CaPP_i , центры 1, 3, 4 скорее всего заняты ионами металла. Металл в каждом из этих центров сближен с кислородными атомами остатков фосфата P_i^1 и P_i^2 (рис. 4). Ион металла в центре 4 попадает в позицию, позволяющую ему замкнуть шестичленный цикл между кислородными атомами, принадлежащими двум остаткам фосфата, составляющим молекулу пирофосфата. Ближайшими соседями P_i^1 оказываются Arg^{77} , Tyr^{191} , Lys^{197} и ион M_3 . Рядом с группой P_i^2 расположен ион металла в центре 1 и остаток Glu^{58} . В тех случаях, когда центр 2 занят, ион металла в нем также соседствует с атомами кислорода остатка P_i^1 . В рассматриваемом конкретном случае центр 2 остается свободным. В зоне связывания кроме Tyr^{191} присутствуют остатки Tyr^{88} и Tyr^{92} , которые скорее всего входят в координационную сферу ионов металлов M_1 или M_4 .

Таким образом, в зоне связывания субстрата обнаружены практически все виды аминокислотных остатков, участие которых в каталитическом акте вытекало из ряда биохимических экспериментов, а именно остатки аргинина, тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот (таблица и рис. 4). Остатки Lys^{56} , Lys^{153} и Lys^{197} близки как к потенциальным металлсвязывающим центрам, так и к месту связывания субстрата. Остатки Tyr^{152} и Tyr^{187} , наиболее близкие к зоне активного центра, тем не менее слишком удалены, чтобы непосредственно участвовать в связывании. Нельзя исключить, однако, что ориентация индольных колец может изменяться, когда субстрат или ионы металла связываются в активном центре.

Остатки P_i^1 и P_i^2 молекулы пирофосфата, находящиеся в различном окружении, должны различаться по величине сродства к ферменту, что и было показано в ряде работ [2, 3]. Неравноценность двух центров связывания P_i в активном центре была продемонстрирована Куперманом, изучавшим связывание неорганического фосфата пирофосфатазой в присутствии ионов марганца [2]. Он рассчитал, что один из двух остатков фосфата связывается в 75 раз прочнее другого. При этом связывание P_i в центре наибольшего сродства затруднялось при модификации остатка Arg^{77} . На

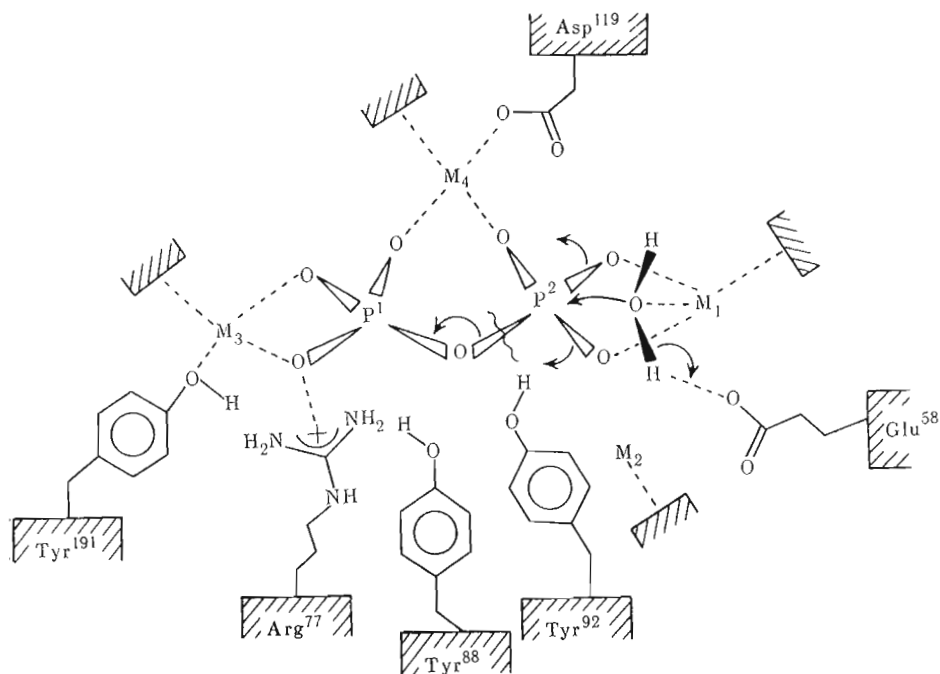


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая возможное участие аминокислотных остатков активного центра и ионов металла в связывании и расщеплении пирофосфата. M_1 – M_4 – ионы металла, связанные с ферментом (заштрихованные участки); аминокислотные остатки – потенциальные лиганды этих ионов, перечисленные в таблице. Индексы 1 и 2 при атомах фосфора соответствуют центрам высокого (1) и низкого (2) сродства к ионам фосфата

этом основании Куперман предположил, что Arg^{77} взаимодействует с P_1^1 расположенным в центре наибольшего сродства. Относительно аргинина имеются надежные данные о присутствии его в активных центрах ряда ферментов, в том числе фосфолифазы [29]. В ряде случаев, когда химическую модификацию в растворе удалось сопоставить с результатами структурного анализа кристаллов, было обнаружено, что гуанидиновая группа аргинина взаимодействует с различными фосфат-анионами, образуя по крайней мере одну водородную связь с кислородным атомом фосфата. При исследовании в качестве модельной системы соли кислого ортофосфата с бисметилгуанидином было показано существование прочных пар водородных связей гуанидиновой группы с двумя атомами кислорода ортофосфата [30]. Подобный тип взаимодействий, по-видимому, имеет место в неорганической пирофосфатазе. Как вытекает из рассмотрения трегичной структуры комплекса фермента и пирофосфата кальция, остаток Arg^{77} связан с P_1^1 , который, следовательно, является более прочно связанным остатком фосфата [3]. Кроме Arg^{77} остаток фосфата P_1^1 окружен несколькими остатками лизина, в то время как для P_2^2 ближайшим соседом оказывается карбоксильная группа остатка Glu^{58} .

Катализируемый ферментом разрыв фосфоангидридной связи в молекуле пирофосфата, протекающей скорее всего по $S_N 2$ -механизму, осуществляется в результате атаки нуклеофилом (в данном случае молекулой воды) электрофильного атома фосфора. Что известно о том, какой именно из атомов фосфора, P_1^1 или P_2^2 , является центром нуклеофильной атаки?

При изучении скорости обмена $PP_i \rightleftharpoons H_2O$ было установлено, что фосфат, являющийся центром нуклеофильной атаки, освобождается первым после разрыва фосфоангидридной связи [2, 19]. Скорее всего это остаток фосфата, связанный более слабо, т. е. P_2^2 на рис. 4. В таком случае положительный заряд на этом атоме фосфора увеличивается за счет поляризации $P-O$ -связи под действием металла в центре 1. Геометрия активного центра

не препятствует тому, чтобы металлы в центре 1 наряду с остатком Glu^{58} принимал участие в активации молекулы воды, как это показано на рис. 4. Согласно современным представлениям о стереохимии нуклеофильного замещения у тетраэдрического центра, которое протекает через переходное состояние с геометрией тригональной бипирамиды, и входящая и уходящая группы занимают апикальные положения. Иными словами, атака осуществляется со стороны, противоположной связи, подлежащей разрыву. Приводимая схема учитывает это условие. Расщепление фосфоангидридной связи PP_i сопровождается присоединением одного или двух протонов к P_i^1 и P_i^2 . Протон к P_i^2 поступает вместе с гидроксильной группой, донором второго протона может выступать Glu^{58} . Донором протона для уходящей P_i^1 -группы скорее всего является остаток Tyr^{191} . Таким образом, расположение аминокислотных остатков в субстратсвязывающем центре подтверждает выводы Найта и Купермана об участии в каталитическом акте остатков тирозина и дикарбоновой кислоты в качестве доноров протона, сделанные на основании определения величины pK групп, участвующих в реакции [31, 32]. Однако нельзя исключить, что такой группой может быть остаток лизина, например Lys^{56} .

Полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы о роли ионов металла в различных металлсвязывающих центрах. О возможной роли металла в центре 1, способного поляризовать $\text{P}-\text{O}$ -связь, уже упоминалось. Скорее всего именно металл, присоединившийся в этом центре, оказывает активирующее действие и участвует в фиксации молекулы воды в активном центре.

Как показано нами, ион магния в центре 4 присоединяется к белку в отсутствие субстрата. На этом основании можно было бы заключить, что это один из двух магниевых центров фермента — вероятно, центр наибольшего сродства. Однако этот вывод мы не считаем окончательным по следующим причинам. При связывании CaPP_i наблюдалось появление отрицательного максимума вблизи центра 1, причем для него не удалось найти соответствующего положительного максимума. По-видимому, вблизи центра 1 к нативному белку была присоединена молекула или ион, природа которого нам не известна. Занятость этого места могла препятствовать посадке в него ионов магния в условиях нашего эксперимента.

Ион металла в центре 4 может фиксировать в *cis*-положении два остатка фосфата, появляющиеся после разрыва фосфоангидридной связи. Как показано рядом авторов, при избытке фосфата в активном центре фермента имеет место синтез пирофосфата [4, 5]. Закрепляя положение остатков фосфата, ион в центре 4 может снижать энтропийный барьер и тем самым способствовать протеканию этой реакции.

Известно, что два иона металла связываются свободным ферментом, а третий ион привносится субстратом в процессе функционирования пирофосфатазы. Полученные нами данные наряду с литературными могут быть привлечены для того, чтобы локализовать третий центр. Согласно расчетам Купермана, для связывания субъединицей фермента третьего иона металла требуется присутствие остатка фосфата лишь в центре P_i^1 [32]. Вблизи этого остатка находятся ионы M_3 и M_4 . Металл в центре 4 связывается и в отсутствие субстрата. Считается, что ионы магния, связываемые в отсутствие субстрата, не занимают тех центров, в которые входит третий ион металла, связанный с субстратом, поскольку не обнаружено конкуренции между Mg^{2+} и MgPP_i [12]. В этом случае вместе с субстратом присоединяется металл в центре 3.

Заполнение центра 2 (как уже упоминалось, в комплексе пирофосфатазы с CaPP_i он остается свободным) может вызвать эффект торможения избытком металла активатора, затрудняя освобождение продукта.

В заключение следует отметить, что при рассмотрении области активного центра на атомной модели обращает на себя внимание богатый набор потенциальных лигандов для связывания катионов, сосредоточенных здесь. Некоторые аминокислотные остатки занимают такое положение, что лишь небольшие повороты, не затрагивающие положения основной

полипептидной цепи, позволяют им включаться в координационную сферу металла, находящегося в том или другом центре (см. таблицу). Этот факт должен быть принят во внимание при попытках объяснить различную способность разных двухвалентных катионов активировать гидролиз пирогосфата. Рассмотренная нами схема действия неорганической пирогосфатазы учитывает геометрию аминокислотных остатков в активном центре, установленную по синтезу электронной плотности с разрешением 3 Å, и находится в хорошем соответствии с совокупностью биохимических данных.

Для дальнейшего уточнения изложенных представлений желательно установить точные координаты второго атома магния, способного присоединяться к ферменту в отсутствие субстрата. Несмотря на значительное сходство ионов магния с ионами кальция и уранила в отношении к лигандам, имеется некоторая вероятность того, что при большом выборе потенциальных лигандов координационные сферы разных ионов окажутся неотжественными. Предполагается продолжить работу по приготовлению магниевых комплексов с двумя заполненными центрами.

Экспериментальная часть

Препарат неорганической пирогосфатазы из пекарских дрожжей с активностью 450 ME получали по модифицированной методике Купермана [33]. Выращивание кристаллов комплекса пирогосфатазы с ионами Mg^{2+} проводили в растворах белка ($3 \cdot 10^{-6}$ М) в 2-морфолинэтансульфокислотном (MES) буфере, pH 6,0, содержащем 16–18% 2-метил-2,4-пентандиола (MPD), в присутствии $MgSO_4$ или $Mg(NO_3)_2$ ($5 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ М), как описано в работе [8]. Комплекс с Tb^{3+} выращивали в аналогичных условиях в присутствии $Tb(NO_3)_3$ ($1 \cdot 10^{-5}$ М).

Кристаллы с ионами Mg^{2+} хранили в 0,03 М MES-буфере, pH 6,0, содержащем $1 \cdot 10^{-4}$ М Mg^{2+} и 30% MPD, кристаллы с ионами Tb^{3+} хранили в том же буфере, содержащем $1 \cdot 10^{-5}$ М Tb^{3+} и 30% MPD.

Кристаллы комплекса пирогосфатазы с пирогосфатом кальция выращивали из растворов $1,5 \cdot 10^{-6}$ М белка, содержащих 16% MPD, в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ М $CaCl_2$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М $Na_4P_2O_7$.

Атомная модель пирогосфатазы построена из скелетных моделей Кендрю методом совмещения их с сечениями электронной плотности в оптическом компараторе Ричардса. Использовали рассчитанный ранее синтез электронной плотности при разрешении 3 Å [11].

Координаты тяжелых атомов определяли по разностным синтезам Фурье [9]. Разностный синтез для комплекса пирогосфатазы с пирогосфатом кальция и нативной пирогосфатазы при разрешении 5 Å рассчитывали по полученным ранее фазам [11].

Авторы благодарны Э. Г. Арутюняну, внесшему значительный вклад в эту работу, и С. М. Аваевой и М. Я. Карпейскому за советы, данные при ее обсуждении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohn M. J. *Biol. Chem.*, 1958, v. 230, № 1, p. 369–379.
2. Hamm D. J., Cooperman B. S. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 19, p. 4033–4041.
3. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Awaeva S. M. *FEBS Lett.*, 1981, v. 124, № 2, p. 245–247.
4. Janson C. A., Degani C., Boyer P. D. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 10, p. 3743–3749.
5. Hansen G., Eitfler R., Heitmann P. *Acta biol. et med. Germ.*, 1972, v. 28, № 6, p. 977–987.
6. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrikson R. L. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 2, p. 889–897.
7. Bunick G., McKenna G. P., Searbrugh F. E., Uberbacher E. C., Voet D. *Acta crystallogr.*, 1978, v. B34, № 11, p. 3210–3215.
8. Смирнова Е. А., Махалдиани В. В., Воронова А. А., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К., Хайтман П., Хёне В. Е. *Кристаллография*, 1980, т. 25, вып. 2, с. 104–111.
9. Махалдиани В. В., Смирнова Е. А., Воронова А. А., Товбис А. Б., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К., Билвальд Б., Хансен Г., Хёне В. Е. *Кристаллография*, 1980, т. 25, вып. 2, с. 280–286.

10. Куранова И. П., Смирнова Е. А., Магалдиани В. В., Воронова А. А., Арутюнян Э. Г., Хёне В. Е., Хансен Г. Докл. АН СССР, 1981, т. 258, № 5, с. 1246–1250.
11. Арутюнян Э. Г., Терзьян С. С., Воронова А. А., Куранова И. П., Смирнова Е. А., Вайнштейн Б. К., Хёне В. Е., Хансен Г. Докл. АН СССР, 1981, т. 258, № 6, с. 1481–1485.
12. Rapoport T. A., Höhne W. E., Reich J. G., Heitmann P., Rapoport S. M. Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 2, p. 237–246.
13. Braga E. A., Avaeva S. M. FEBS Lett., 1972, v. 29, № 2, p. 251–255.
14. Rapoport T. A., Höhne W. E., Heitmann P., Rapoport S. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 2, p. 341–347.
15. Höhne W. E., Rapoport T. A. Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 2, p. 323–331.
16. Butler L. G., Sperow J. W. Bioinorg. Chem., 1977, v. 7, № 2, p. 141–150.
17. Baykov A. A., Tam-Villoslado J. J., Avaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 2, p. 228–238.
18. Cooperman B. S., Panackal A., Springs B., Hamm D. J. Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6051–6060.
19. Springs B., Welsh K. M., Cooperman B. S. Biochemistry, 1981, v. 20, № 22, p. 6384–6391.
20. Bienmald B., Heitmann P. Acta biol. et med. Germ., 1978, v. 37, № 1, p. 13–18.
21. Hansen G., Höhne W. E., Kuranova I. P. Acta biol. et med. Germ., 1982, v. 41, № 1, p. 23–30.
22. Heitmann P., Müllerke Ch., Uhlig H. J. Acta biol. et med. Germ., 1972, v. 20, № 4/5, p. 551–560.
23. Cooperman B. S., Chiu N. Yu. Biochemistry, 1973, v. 12, № 9, p. 1676–1682.
24. Heitmann P., Uhlig H. J. Acta biol. et med. Germ., 1974, v. 32, № 6, p. 565–574.
25. Avaeva S. M., Bakuleva N. P., Baratova L. A., Nazarova T. I., Fink N. Yu. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, № 1, p. 173–184.
26. Negi T., Samejima T., Irie M. J. Biochem., 1972, v. 71, № 1, p. 29–37.
27. Склянкина В. А., Медведева И. В., Аваева С. М. Докл. АН СССР, 1973, т. 211, № 2, с. 494–496.
28. Bond M. W., Chiu N. Y., Cooperman B. S. Biochemistry, 1980, v. 19, № 1, p. 94–102.
29. Arnone A., Bier C. I., Cotton F. A., Day V. W., Hazen E. E., Richardson D. C., Richardson J. S., Yonath A. J. Biol. Chem., 1971, v. 246, № 7, p. 2302–2316.
30. Cotton F. A., Day V. W., Hazen E. E., Larsen S., Wong S. T. K. J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 14, p. 4471–4478.
31. Knight W. B., Fitts S. W., Dunaway W. M. Biochemistry, 1981, v. 20, № 14, p. 4079–4086.
32. Cooperman B. S. Methods in Enzymol., 1982, v. 87, p. 526–548.
33. Cooperman B. S., Chiu N. Y., Bruckmann R. H., Bunick G. Y., McKenna G. P. Biochemistry, 1973, v. 12, № 9, p. 1665–1669.

Поступила в редакцию
5.V.1983

ACTIVE SITE STRUCTURE OF THE INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM BAKER'S YEAST BASED ON THE X-RAY INVESTIGATION

KURANOVA I. P., TERZYAN S. S., VORONOVA A. A., SMIRNOVA E. A.,
VAINSTEIN B. K., HÖHNE W., HANSEN G.

*A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Physiological and Biological Chemistry of Humboldt
University, Berlin*

Difference Fourier synthesis was used to investigate the crystalline complexes of inorganic pyrophosphatase from baker's yeast (EC 3.6.1.1) with the activating (Mg^{2+}) and inhibiting (UO_2^{2+} , Tb^{3+}) ions, as well as with the calcium pyrophosphate, the uncleavable substrate analogue. Both substrate-binding and metal-binding centers in the pyrophosphatase active site were identified in the framework of the atomic model of the molecule. Many polar amino acid residues, especially those of dicarboxylic acids, are clustered at the active site. Amino acid residues which can be considered as potential ligands for the metal ions or might take part in the binding of a substrate analogue were identified in the primary structure. The catalytic mechanism of the pyrophosphatase action is discussed in light of the obtained results.