



УДК 577.15.042

МЕХАНИЗМ ВЫЗЫВАЕМОЙ А-ФАКТОРОМ ИНАКТИВАЦИИ
ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В *ACTINOMYCES STREPTOMYCINI*

Воронина О. И., Товарова И. И., Хохлов А. С.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Ингибитор глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, образующийся под действием А-фактора в культуре *Actinomyces streptomycini* 733, выделен в высокоочищенном состоянии. Он идентифицирован как NADP-аза, продукт активности которой, фосфо-аденозиндифосфориаза (*P*-ADP-Rib), является высокоспецифическим ингибитором как NAD-зависимой (бактериальной), так и NADP-зависимой (дрожжевой и актиноцетной) Glc6P-дегидрогеназы *, но не действует на другие NAD-зависимые дегидрогеназы. Ингибирование конкурентно для NADP, значения K_m и K_i близки (соответственно 0,11 и 0,042 мМ). Приведены данные, позволяющие предполагать, что инактивация Glc6P-дегидрогеназы вызывается изменением конформации молекулы при присоединении *P*-ADP-Rib. Обсуждается роль NADP-азы в процессе регуляции биосинтеза стрептомицина и споруляции.

Ранее мы сообщали [1], что мутантный штамм *Actinomyces streptomycini* 1439, не образующий стрептомицина и А-фактора, отличается от исходного активного штамма 773 также высоким уровнем Glc6P-дегидрогеназной активности. Прибавление к нему извне А-фактора вызывает резкое снижение этой активности до уровня исходного штамма (когда она становится практически неизмеримой), что связано с образованием в присутствии А-фактора высокомолекулярного вещества, названного нами ингибитором.

Хотя вопросу регуляции Glc6P-дегидрогеназной активности у разных животных и микроорганизмов посвящено большое число работ многих исследователей, он остается малоизученным, поскольку в большинстве работ действие агентов, ингибирующих этот фермент, исследовалось только *in vitro*. К числу веществ, в той или иной мере подавляющих действие этой дегидрогеназы, относятся многие низкомолекулярные вещества: стероиды, витамины, нуклеотиды и в особенности такие аналоги кофермента, как NADPH-X, АТФ, АДФ и др. [2—5]. Имеются также указания, что подавление активности Glc6P-дегидрогеназы могут вызывать NADP-расщепляющие ферменты как путем разрушения свободного NADP, так и при их действии на NAD, связанный с ферментным белком [6—8]. В данном сообщении рассматривается выделение обнаруженного ранее [1] «ингибитора» Glc6P-дегидрогеназы в высокоочищенном состоя-

* В статье приняты сокращения в соответствии с рекомендациями Комиссии IUPAC по номенклатуре фосфорсодержащих соединений, для фосфо-аденозиндифосфориазы — *P*-ADP-Rib (Eur. J. Biochem. (1977) 79, 1—9).

Активность GlcB^P-дегидрогеназы (А) в присутствии бесклеточных экстрактов (1 мг белка/мл, *Act. streptomycini* 773, обработанных различными способами

Способ обработки	А, ед акт/мл	
	до обработки	после обработки
65°, 20–30 мин	0,038	0,073
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄ , 70% насыщения, осадок	0,035	0,035
Диализ (24 ч)	0,039	0,04
Добавление диизопропилфторфосфата (0,5 мкМ)	0,042	0,041
Добавление ε-аминокапроновой кислоты (2мМ)	0,038	0,039
Инкубация с проназой (12 ч)	0,039	0,077

Таблица 2

Очистка белка, инактивирующего GlcB^P-дегидрогеназу, из бесклеточных экстрактов *Act. streptomycini*, штамм 773

Стадия	Белок, мг	Активность, ед. акт.	Уд. акт., ед./мг	Повышение удельной активности	Выход по активности, %
Бесклеточный экстракт	15 000	30 000	2	1	100
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄	7500	28 000	4	2	90
Адсорбция на DEAE-сефадексе А-25	250	20 000	80	40	70
Колоночная хроматография на DEAE-сефадексе А-25	15	15 000	1000	500	50
Гель-фильтрация на сефадексе G-75	7	15 000	2200	1100	50

нии, его идентификация как специфической NADP-азы, расщепляющей NADP с образованием фосфо-аденозиндифосфорибозы (P-ADP-Rib), и взаимодействие P-ADP-Rib с GlcB^P-дегидрогеназой, а также обсуждается роль NADP-азы в регуляции метаболизма *Act. streptomycini*.

Основным объектом служил упомянутый активный штамм *Act. streptomycini* 773, образующий значительные количества стрептомицина и А-фактора. При определении ингибирующего действия in vitro использовались коммерческие препараты дрожжевой и бактериальной (из *B. mesentericus*) GlcB^P-дегидрогеназы.

Было показано, что если при определении GlcB^P-дегидрогеназы в реакционную смесь прибавить бесклеточные экстракты *Act. streptomycini* 773, то происходит очень быстрое снижение ее активности, скорость которого зависит от количества прибавленного экстракта [1]. Если бесклеточный экстракт предварительно прогреть 20–30 мин при 65°, ингибиторная активность исчезает. При прибавлении к бесклеточным экстрактам сульфата аммония (до 70% от насыщения) ингибиторная активность обнаруживалась в осадке. Эти данные, результаты диализа и исчезновение ингибиторной активности после обработки экстрактов проназой (комплексом протосолитических ферментов из *Str. griseus*) позволяют заключить, что ингибиторная активность бесклеточных экстрактов *Act. streptomycini* 773 связана с белком. Поскольку такие ингибиторы протеаз, как диизопропилфторфосфат и ε-аминокапроновая кислота (соответственно 0,5 мкМ и 2 мМ), не снижали ингибиторного действия, можно сделать вывод, что «ингибитор» не является протосолитическим ферментом (табл. 1).

Далее было проверено предположение, что ингибирование GlcB^P-дегидрогеназы связано с наличием в бесклеточных экстрактах *Act. streptomycini* 773 ферментов, способных расщеплять NADP и NAD — коферменты дегидрогеназы. В опытах была обнаружена значительная NADP-расщепляющая активность бесклеточных экстрактов *Act. strepto-*

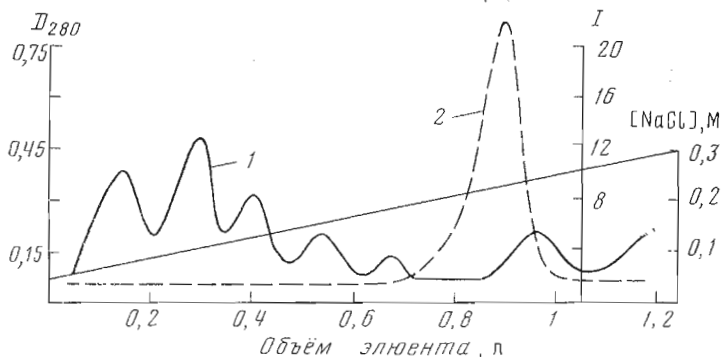


Рис. 1. Хроматография белков, содержащих ингибитор *GlcB*-дегидрогеназы, на DEAE-сефадексе А-25. 1 — D_{280} , 2 — ингибиторная активность I , ед. акт./0,1 мл

mycini (за 1,5 ч инкубации в 1 мл смеси, содержавшей 0,1 мг белка бесклеточного экстракта, расщепилось 10 из 13 мкмоль NADP). При этом в реакционной смеси было обнаружено увеличение свободного неорганического фосфата, никотиамида, AMP и NADPH. Отсюда следовало, что в бесклеточном экстракте *Act. streptomycini* 773 присутствуют различные NADP-расщепляющие ферменты и дегидрогеназы, восстанавливающие NADP.

Помимо актиномицетной и дрожжевой NADP-зависимой дегидрогеназы бесклеточные экстракты инактивируют также бактериальную (из *B. meningitidis*) NAD-зависимую *GlcB*-дегидрогеназу. Аналогичными опытами было подтверждено, что бесклеточные экстракты *Act. streptomycini* 773 обладают и NAD-расщепляющей активностью.

Однако ингибирование *GlcB*-дегидрогеназы бесклеточными экстрактами *Act. streptomycini* нельзя объяснить тем, что содержащиеся в них NADP- (и NAD-) расщепляющие ферменты разрушали кофактор. Как известно, NADP при 1 мМ концентрации полностью защищает *GlcB*-дегидрогеназу от инактивации ферментами, разрушающими кофактор [7—9]. Напротив, в наших опытах добавление 1 мМ NADP не препятствовало ингибиторному действию бесклеточных экстрактов. Кроме того, предположению, что причиной ингибирования является уменьшение концентрации NADP и NAD вследствие их расщепления, противоречила и высокая специфичность ингибитора, который не инактивировал ряд других NAD-зависимых дегидрогеназ (лактатдегидрогеназу, малатдегидрогеназу, глутаматдегидрогеназу). Поэтому следовало более подробно изучить причины инактивации *GlcB*-дегидрогеназы бесклеточными экстрактами *Act. streptomycini* 773.

Для дальнейшего изучения механизма ингибирования был получен ингибиторный белок в высокоочищенном состоянии (табл. 2, «Экспериментальная часть»). Наибольшее повышение удельной активности было достигнуто при ионообменной хроматографии на сефадексе DEAE А-25 (рис. 1). В результате белок, инактивирующий *GlcB*-дегидрогеназу, был очищен более чем в 1000 раз с выходом (по активности) около 50%. Дальнейшее изучение механизма действия белка, тормозящего активность *GlcB*-дегидрогеназы, проводилось с очищенным препаратом этого белка. С этой целью было детально рассмотрено взаимодействие ингибиторного белка, фермента и кофактора (NADP).

Изучение влияния порядка внесения компонентов в реакционную смесь при определении активности *GlcB*-дегидрогеназы в присутствии очищенного ингибиторного белка показало, что подавление дегидрогеназной активности максимально при добавлении *GlcB*-дегидрогеназы и *GlcB* к «ингибитору», предварительно инкубированному с NADP

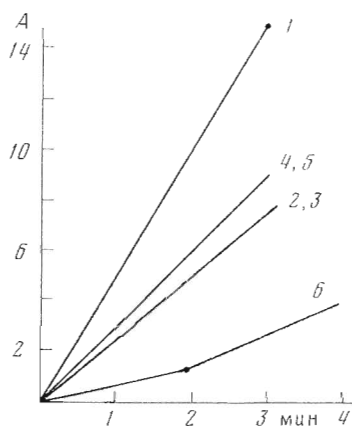


Рис. 2

Рис. 2. Влияние порядка добавления реагентов в смесь для определения активности Glc6P-дегидрогеназы (A , ед. акт./мл $\cdot 100$) на подавление ее активности. Реакционная смесь содержала в 1 мл 0,05 ед. акт. фермента и 20 мкг белка ингибитора. 1 — фермент без ингибитора, 2 — фермент в присутствии ингибитора (без инкубации), перед добавлением ингибитора фермент инкубировали 2 мин с NADP (3) или Glc6P (4), 5 — перед добавлением NADP и Glc6P фермент инкубировали с ингибитором, 6 — ингибитор инкубировали с NADP, затем добавляли Glc6P-дегидрогеназу и Glc6P, через 2 мин ферментативной реакции добавлено 0,2 мкмоль/мл NADP

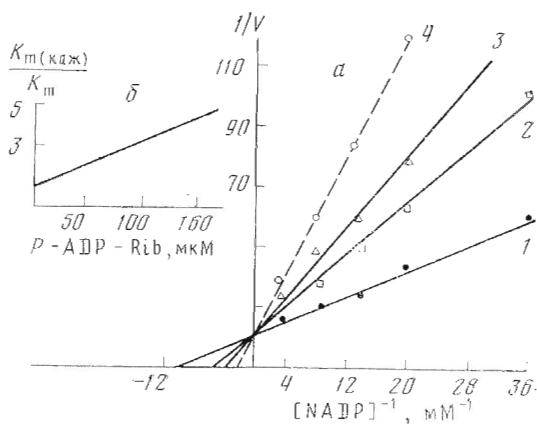


Рис. 3

Рис. 3. a — зависимость скорости Glc6P-дегидрогеназной активности по концентрации NADP без ингибитора (1) и в присутствии 30 (2), 85 (3), 170 мкмоль P -ADP-Rib (4). b — определение величины K_i^1 из данных рис. a

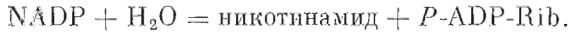
(рис. 2, 6). При добавлении «ингибитора» и NADP к Glc6P-дегидрогеназе, инкубированной с Glc6P (рис. 2, 4), подавление дегидрогеназной активности несколько меньше, чем в контрольном варианте (рис. 2, 2), что можно объяснить защитным действием субстрата на Glc6P-дегидрогеназу. Из результатов опыта можно сделать вывод, что либо «ингибитор» активируется в присутствии NADP, либо при взаимодействии «ингибитора» с NADP образуется соединение, непосредственно действующее на Glc6P-дегидрогеназу. В связи с этим далее было подробно проанализировано взаимодействие «ингибитора» с NADP и установлено, что при этом образуется низкомолекулярное вещество, инактивирующее Glc6P-дегидрогеназу.

Для доказательства образования низкомолекулярного инактиватора Glc6P-дегидрогеназы были подробно проанализированы продукты взаимодействия очищенного ингибиторного белка с NADP. Для этого использовали реакционную смесь, содержащую максимальное количество ингибиторного белка (2 мкг/мл, см. табл. 3). При осаждении белков из инкубационной смеси этанолом 100% ингибиторной активности оставалось в супернатанте. Хроматографический анализ супернатанта в тонком слое целлюлозы обнаружил помимо следов нерасщепленного NADP два вещества, одно из которых совпадало по хроматографическому поведению с пикотиномидом (R_f 0,83), другое — с фосфо-аденозиндифосфорибозой (R_f 0,63) [14]. При разделении продуктов реакции на колонке с сефадексом G-10 образовывались два УФ-поглощающих пика, один из которых был идентифицирован как никотинамид (ϵ_{260} 3000, pH 7,4), второй пик, проявлявший 100% ингибиторной активности, был подвергнут гидролизу. При анализе гидролизата в нем были обнаружены аденин (ϵ_{260} 13 350, pH 7,4), рибоза и ортофосфат в молярном соотношении 1 : 2 : 3, на основании чего вещество, обладающее ингибиторным действием на Glc6P-дегидрогеназу, было идентифицировано как аденозин-дифосфорибоза (P -ADP-Rib, ϵ 15 000, pH 7,4).

Влияние продолжительности инкубации «ингибитора» с NADP (0,7 мкмоль/мл) на его ингибиторное действие (I) на Glc6P-дегидрогеназу

«Ингибитор», мкг белка/мл	I, ед. акт./мл					«Ингибитор», мкг белка/мл	I, ед. акт./мл				
	Продолжительность инкубации, мин						Продолжительность инкубации, мин				
	2	5	15	30	60		2	5	15	30	60
2	20	20	20	20	20	0,1	2	3,5	11	17	20
0,5	6	18	20	20	20	0,05	0	1	4	8	20

Приведенные данные говорят о том, что ингибиторный белок относится к ферментам типа гликогидролаз (КФ 3.2.2) и катализирует реакции типа



Сравнение ингибиторной активности и степени прохождения NADP-азной реакции (NADP-азную реакцию определяли в 1 М KCN и по анализу продуктов расщепления NADP на колонке с сефадексом G-10) показало, что максимумы степени гидролиза NADP и степени ингибирования совпадают (табл. 3). Это подтвердило наш вывод о том, что ингибирующий эффект вызывается продуктом расщепления кофактора. Какой из продуктов гидролиза NADP непосредственно участвует в процессе ингибирования Glc6P-дегидрогеназы, было выяснено в результате ингибиторного анализа.

Как видно из рис. 3а, добавление P-ADP-Rib не влияет на максимальную скорость, но действует на эффективную константу Михаэлиса, т. е. наблюдается ингибирование по конкурентному типу. Константа ингибирования (K_i 0,042 мМ) близка по значению к константе Михаэлиса (K_m 0,11 мМ).

Предварительные данные позволяют заключить, что инактивация Glc6P-дегидрогеназы вызывается изменением конформации ее молекулы при присоединении P-ADP-Rib. Об этом, в частности, свидетельствуют опыты с мочевиной. Нами было показано, что присутствие мочевины в реакционной среде предохраняло Glc6P-дегидрогеназу от действия P-ADP-Rib и, наоборот, присутствие P-ADP-Rib предохраняло фермент от частичной инактивации под действием мочевины (рис. 4). Как видно из приведенных на рис. 4 данных, если P-ADP-Rib добавлялась к дегидрогеназе после внесения мочевины в реакционную смесь, то ее ингибиторное действие не проявлялось (рис. 4, 3). Если мочевина добавлялась к Glc6P-дегидрогеназе после внесения в смесь P-ADP-Rib, она не защищала фермент от действия ингибитора, но кривая инактивации Glc6P-дегидрогеназы мочевиной имела более плавный характер (рис. 4, 2), чем в случае действия мочевины на дегидрогеназу в отсутствие P-ADP-Rib (рис. 4, 1).

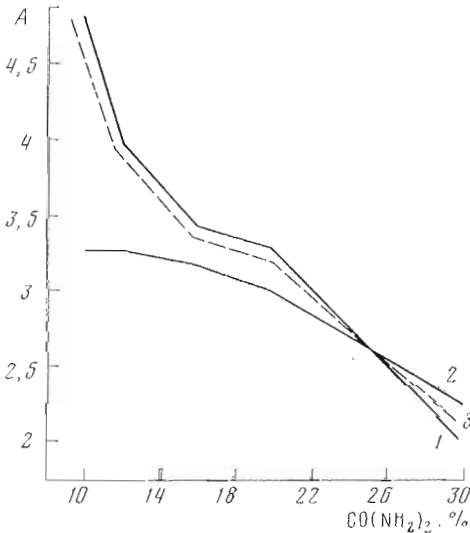


Рис. 4. Зависимость активности Glc6P дегидрогеназы (ед. акт./мл · 100) от концентрации мочевины без (1) и в присутствии 0,05 мкМ P-ADP-Rib, внесенной до (2) и после (3) добавления мочевины

В последнее время NAD-азам придается важная роль в контроле клеточного метаболизма эукариотов, в частности в регуляции критических стадий дифференциации организма [10, 11]. Например, у хорошо изученного сумчатого гриба *Neurospora crassa* показана активная роль NAD-аз при спорообразовании. Активность этого фермента в А-факторных вариантах *Act. streptomycini* достигает больших величин — 2—3 мкмоль гидролизованного NADP/мг белка при активности Glc6P-дегидрогеназы в отсутствие А-фактора порядка 100—400 нмоль восстановленного NADP/мг белка. Индуцирование А-фактором NADP-азной активности, возможно, является причиной глубоких изменений метаболизма *Act. streptomycini*. А-фактор может играть в конечном счете роль триггера, запускающего всю сложную систему регуляции как спорообразования, так и биосинтеза стрептомицина. Принимая это предположение, можно представить грубую схему механизма действия А-фактора на нулевой мутант (схема). В отсутствие А-фактора у нулевого мутанта кроме обычного пути Эмдена — Мейерхофа, обеспечивающего энергетические потребности ор-

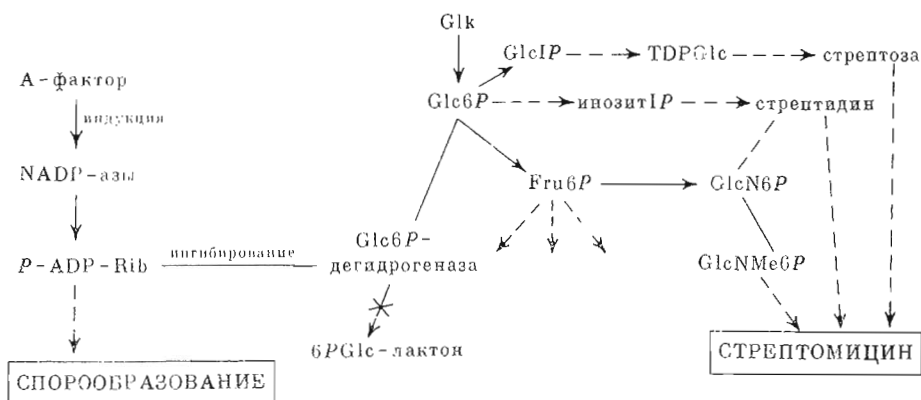


Схема действия А-фактора на образование стрептомицина и спор у *Act. streptomycini*

анизма, превращение глюкозы происходит также по пентозофосфатному пути, начинающемуся с действия Glc6P-дегидрогеназы, которая имеет у нулевого мутанта большую активность. А-фактор служит индуктором, включающим систему образования NADP-азы. Последняя расщепляет NADP с образованием P-ADP-Rib, которая, с одной стороны, инактивирует Glc6P-дегидрогеназу, блокируя тем самым пентозофосфатный путь и открывая возможность превращения глюкозы в стрептозу, стрептидин и глюкозамин, а из них и в стрептомицин, с другой — индуцирует споруляцию, что ведет к возникновению спор у мутанта 1439, не образующего их в отсутствие А-фактора. Конечно, эта схема является предварительной и предлагается в качестве рабочей гипотезы.

Экспериментальная часть

В работе использовались дрожжевая и бактериальная глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) (Calbiochem, США), малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37), лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27), глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.3; Boehringer, ФРГ), проназа (Serva, ФРГ), NAD и NADP (Merck, ФРГ), натриевая соль глюкозо-6-фосфата (Reanal, Венгрия), DEAE-сефадекс А-25, сефадекс G-75 (Pharmacia, Швеция), аквацид I (Calbiochem, США).

Получение бесклеточного экстракта. Активный продуцент стрептомицина *Act. streptomycini* выращивали 48 ч на синтетической среде [1]

в колбах или ферментере. Мицелий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием и промывали 2—3 раза трис-НСl-буфером, рН 7,7. Затем биомассу замораживали при -20° . В замороженном мицелии активность «ингибитора» сохранялась до 6 мес. Замороженные клетки оттаивали при 0° и разрушали лизоцимом (1 мг лизоцима в 1 мл суспензии клеток, содержавшей 3—4 мг белка) в течение 1,5 ч при 37° в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,7), содержавшем 6 мМ $MgCl_2$ и 5 мМ дитиотреит. Далее лизат центрифугировали на холоде последовательно при 6000 об/мин (40 мин), 30 000 об/мин (2 ч) или 100 000 об/мин (1 ч). Во всех случаях использовали супернатант.

Очистка ингибиторного белка (табл. 2). В ходе очистки «ингибитора» контроль осуществляли по определению ингибиторной активности I , за единицу которой принимали количество ингибиторного белка, вызывавшее 50%-ную инактивацию 0,03 ед. акт. Glc6P-дегидрогеназы за 1 мин в реакционной смеси для определения Glc6P-дегидрогеназной активности. Первой стадией очистки было фракционирование бесклеточных экстрактов осаждением $(NH_4)_2SO_4$ в трис-НСl-буфере (рН 6,7) при 0° . Далее, после диализа против воды, белки адсорбировали на DEAE-сефадексе А-25 (в воронке), предварительно уравновешенном 0,05 М фосфатным буфером (рН 6,7), содержащим EDTA, ϵ -аминокапроновую кислоту и дитиотреит (все 1 мМ). Элюцию проводили тем же буфером (рН 6,7) со ступенчатым градиентом NaCl (от 0,05 до 0,5 М). Элюаты, содержавшие 70% исходной активности (0,3 М NaCl), концентрировали осаждением $(NH_4)_2SO_4$, осадок диализовали против воды, концентрировали аквацидом. Сконцентрированный диализованный экстракт хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 (колодка $3,5 \times 44$ см), предварительно уравновешенном 0,05 М фосфатным буфером, рН 6,7 (рис. 1). Фракции элюата с концентрацией NaCl 0,2—0,22 М, содержавшие 50% исходной активности, концентрировали аквацидом и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75 (1×100 см) в трис-НСl-буфере, рН 7,4.

Активность Glc6P-дегидрогеназы определялась как указано ранее [1]. Реакционная смесь содержала в 1 мл 0,5 мкмоль NADP и 0,67 мкмоль Glc6P. При определении бактериальной Glc6P-дегидрогеназы вместо NADP использовали NAD. За единицу активности фермента A принимали такое его количество, которое восстанавливало 1 мкмоль NADP или NAD за 1 мин. В опытах с мочевиной раствор мочевины вносили в реакционную смесь непосредственно перед определением активности Glc6P-дегидрогеназы.

Активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по восстановлению NAD [12].

Суммарная активность NADP- и NAD-расщепляющих ферментов. Для определения NADP-расщепляющей способности бесклеточных экстрактов инкубировали NADP (13 мМ) с бесклеточным экстрактом (0,1 мг белка на 1 мл инкубационной смеси) в трис-НСl-буфере (рН 7,7) при 37° в течение 1,5 ч. При этом брали столь малое количество бесклеточного экстракта, которое на вызывало заметной инактивации дрожжевой Glc6P-дегидрогеназы за время тестирования аликвот инкубационной смеси. Через различные промежутки времени отбирали аликвоты (по 100 мкл) инкубационной смеси и добавляли в систему, содержащую все компоненты для определения активности Glc6P-дегидрогеназы, кроме NADP, и проводили определение дегидрогеназной активности, на основании которой высчитывали количество NADP в аликвоте. NAD-расщепляющая активность определялась аналогичными опытами с NAD, но вместо дрожжевой использовали бактериальную, NAD-зависимую Glc6P-дегидрогеназу.

Гликогидролазная активность бесклеточных экстрактов определялась по методу, основанному на реакции цианида с NADP [13]. Цианид реа-

гирует с четвертичным азотом NADP, но не реагирует с фосфо-аденозиндифосфорибозой или свободным никотинамидом. Реакционная смесь содержала в 1 мл трис-НСI-буфера (рН 7,4) 2 мкмоль NADP и 0,2 мкг очищенного ингибиторного белка. После инкубации при 37° к 0,1 мл реакционной смеси добавляли 2 мл 1 М раствора KCN и определяли поглощение при 325 мкм. Величину гликогидролазной активности определяли по снижению D_{325} при инкубации NADP с ингибиторным белком по сравнению с поглощением NADP до прибавления ингибиторного белка. Продукты NADP-гликогидролазной реакции анализировали хроматографией в тонком слое целлюлозы (пластинки 20 × 20 см) в системе этанол — 0,1 М уксусная кислота (1 : 1) [14].

Аналитическое и препаративное разделение продуктов гликогидролазного расщепления NADP ингибиторным белком (0,7—20 мкмоль нуклеотидов) проводили на колонке (1 × 25 см) с сефадексом G-10 в 0,1 М трис-НСI-буфере, рН 7,4. Разделение контролировали по D_{260} , хроматографией в тонком слое целлюлозы и анализом гидролизатов продуктов разделения.

Гидролиз продуктов гликогидролазного расщепления NADP ингибиторным белком осуществляли в 72%-ной HClO_4 при 100° в течение 1 ч. Продукты гидролиза определяли количественно: аденинспектрофотометрически, рибозу — с орциновым реактивом [15], фосфат — по Фиске — Суббароу [16].

Необходимую для ингибиторного анализа *P*-ADP-Rib получали путем расщепления NADP очищенным препаратом NADP-азы (1 мкг белка фермента, 20 мкмоль NADP в 1 мл реакционной смеси, 37°, 60 мин, расщепление 95%) и последующего разделения продуктов реакции на колонке с сефадексом G-10.

Величину K_i для *P*-ADP-Rib вычисляли из данных по определению K_m для NADP в присутствии различных концентраций ингибитора, используя соотношение [17]

$$\frac{K_{m(\text{каж})}}{K_m} = 1 + \frac{[I]}{K_i}.$$

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронина О. И., Товарова И. И., Хохлов А. С. (1975) Биоорг. химия, 1, 985—989.
2. Levi H. R. (1963) J. Biol. Chem., 238, 775—784.
3. Kawaguchi A., Bloch K. (1974) J. Biol. Chem., 249, 5793—5799.
4. Yoshida A., Dave V. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 169, 298—303.
5. Grove T. N., Ishaque A., Levy H. R. (1976) Arch. Biochem. and Biophys., 177, 307—316.
6. Carson P. E., Shrier S. L., Kellermeyer R. W. (1959) Nature, 184, 1292—1293.
7. Kirkman H. N., Hendrickson E. (1962) J. Biol. Chem., 237, 2371—2376.
8. Bonsignore A., De Flora A., Mangiarotty M. A., Lorenzoni I., Alema S. (1968) Biochem. J., 106, 147—152.
9. Chung A. E., Langdon R. G. (1963) J. Biol. Chem., 238, 2317—2324.
10. Hayashi O. (1976) TIBS, 9—10.
11. Green S. (1974) in International Symposium «Poly-(ADP-Ribose)», Fogarty International Center, Proc., vol. 26, pp. 15—24.
12. Bergmeyer H. U. (1970) in Methoden der enzymatischen Analyse, 2, Auflage, Bd 1, S. 533—541, 575—585, 607—616, Academic-Verlag, Berlin.
13. Golowick S. P., Kaplan N. O., Giottj M. M. (1951) J. Biol. Chem., 191, 447—453.
14. Zatman L. J., Kaplan N. O., Golowick S. P. (1953) J. Biol. Chem., 200, 197—205.
15. Horecher B. L. (1957) in Methods in Enzymology, vol. III, pp. 105—107, Acad. Press, Inc., N. Y.
16. Fiske C. H., Subbarow J. (1925) J. Biol. Chem., 66, 375—381.
17. Диксон М., Уэбб М. (1966) Ферменты, с. 289—293, «Мир», М.

Поступила в редакцию
17.IV.1978

После доработки
6.VI.1978

STUDIES ON THE A-FACTOR INDUCED INHIBITION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN *ACTINOMYCES STREPTOMYCINI*

VORONINA O. I., TOVAROVA I. I., KHOKHLOV A. S.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase (Glc6P-dehydrogenase), which is formed in *Actinomyces streptomycini* cells under the action of A-factor, has been isolated and purified about 1100-fold. It was identified as NADP-ase (E. C. 3.2.2), an enzyme possessing NADP-cleaving activity. Phosphoadenosine diphosphate ribose (*P*-ADP-Rib) produced by this enzyme was found to be a highly specific inhibitor for both NADP- and NAD-dependent Glc6P-dehydrogenases and not for the other NAD-dependent dehydrogenases. The mode of the Glc6P-dehydrogenase inhibition by *P*-ADP-Rib was competitive with NADP. For the yeast Glc6P-dehydrogenase the values of Michaelis constant for NADP and inhibition constant for *P*-ADP-Rib were estimated as 110 μ M and 42 μ M, respectively. The biological role of NADP-ase and *P*-ADP-Rib in the streptomycin biosynthesis and sporulation was discussed.
