



УДК 577.152.241\*1.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ *b*  
С НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ, НИКОТИНАМИДОМ,  
N-НИКОТИНОИЛ- $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ  
И НИКОТИНАМИДНЫМИ КОФЕРМЕНТАМИ

Клинова Н. И., Чеботарева Н. А., Клинов С. В.,  
Курганов В. И., Буланова Л. Н., Копелевич В. М.,  
Гунар В. И.

Научно-производственное объединение «Витамины». Москва

Изучено ингибирующее действие никотиновой кислоты, никотинамида, N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты. NAD, NADH, NADP, NADPH на гликогенфосфоорилазу *b* из скелетных мышц кролика. Ингибирование является обратимым и характеризуется положительной кооперативностью (значение коэффициента Хилла превышает единицу). Определены значения концентрации «полунасыщения» и значения коэффициента Хилла для исследованных соединений: для никотиновой кислоты (28 мМ; 1,4), никотинамида (4,4 мМ; 1,2), N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты (9,5 мМ; 1,4), NAD (4,4 мМ; 1,2), NADH (0,93 мМ; 1,2). Методом скоростной седиментации охарактеризован NADH-связывающий центр субъединицы гликогенфосфоорилазы *b*. Микроскопическая константа диссоциации определена равной  $86 \pm 9$  мкМ (рН 6,8; 20° С). Показано, что NADH препятствует ассоциации гликогенфосфоорилазы *b*, индуцируемой АМР.

Гликогенфосфоорилаза (КФ 2.4.1.1) в интактных организмах катализирует фосфоролитическое расщепление гликогена с образованием  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфата [1]. В мышце, находящейся в состоянии покоя, преобладает дефосфорилированная форма фермента [2]. Индуцируемая аллостерическим активатором АМР каталитическая активность гликогенфосфоорилазы *b* в покоящейся мышце в сильной степени подавлена аллостерическими ингибиторами — АДФ, АТР и глюкозо-6-фосфатом [3]. К природным соединениям, способным ингибировать мышечную гликогенфосфоорилазу *b*, относится также NAD и NADH [3, 4]. Кристаллографические исследования, проведенные с разрешением 3,5 Å, выявили связывание NADH в двух нуклеотидных центрах фермента: в активаторном и ингибиторном, которые находятся на расстоянии 3,3 и 1,2 нм от каталитического центра соответственно. При связывании с ферментом NADH сохраняет свернутую конформацию, в которой никотинамидный и адениновыи фрагменты расположены вблизи друг от друга на расстоянии 0,6 нм. NAD связывается в двух нуклеотидных центрах гликогенфосфоорилазы *b* [4]. По литературным данным, NADP и NADPH слабо ингибируют гликогенфосфоорилазу *b* [3, 5], хотя NADPH способен элюировать гликогенфосфоорилазу *b* с АМР-сепарозы [6].

Настоящая работа посвящена изучению ингибирования мышечной гликогенфосфоорилазы *b* никотиновой кислотой, никотинамидом и никотинамидными коферментами. Было также изучено ингибирование гликогенфосфоорилазы *b* производным никотиновой кислоты, обладающим нейрoфармакологической активностью, N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислотой [7, 8]. Связывание NADH гликогенфосфоорилазой *b* охарактеризовано методом скоростной седиментации. С помощью этого метода изучено также влияние NADH на индуцируемую АМР ассоциацию гликогенфосфоорилазы *b*.

Нами впервые исследовано ингибирование гликогенфосфоорилазы *b* под действием никотинамида и его производных. Никотинамид, никотиновая кислота и N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляная кислота снижают каталитическую активность гликогенфосфоорилазы *b*, индуцируемую АМР (рис. 1).

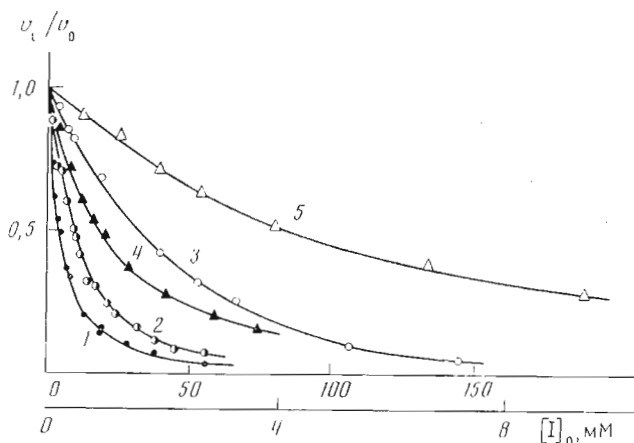


Рис. 1. Зависимости относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой  $b$  в присутствии 0,1 мМ АМР, от концентрации никотинамида (1), N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты (2), никотиновой кислоты (3), NADH (4) и NAD (5). Для кривых 4 и 5 — нижняя ось абсцисс

Ингибирование гликогенфосфорилазы  $b$  в присутствии никотиновой кислоты, никотинамида и N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты обратимо, поскольку предварительное смешивание раствора фермента с концентрированным раствором ингибитора не приводит к изменению степени ингибирования по сравнению со смешиванием раствора фермента с разбавленным раствором ингибитора (при условии равенства конечных концентраций фермента и ингибитора). Количественный анализ ингибирующего действия никотиновой кислоты и ее производных проводили с использованием линейной формы уравнения Хилла (см. [9], с. 43):

$$\lg \left( \frac{v_0}{v_1} - 1 \right) = n_H \lg [I]_0 - n_H \lg [I]_{0,5}, \quad (1)$$

где  $v_0$  и  $v_1$  — начальные скорости ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно,  $[I]_0$  — общая концентрация ингибитора,  $[I]_{0,5}$  — значение  $[I]_0$ , при котором  $v_1/v_0 = 1/2$ ,  $n_H$  — коэффициент Хилла. Параметры уравнения (1) и стандартные ошибки определяли с использованием метода наименьших квадратов. Ингибирующее действие никотиновой кислоты, никотинамида и N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты на гликогенфосфорилазу  $b$  характеризуется положительной кинетической кооперативностью (таблица), что свидетельствует о существовании положительных кооперативных взаимодействий между центрами связывания никотиновой кислоты и ее производных в димерной молекуле гликогенфосфорилазы  $b$ . Величина коэффициента Хилла для никотинамида немного ниже, чем для никотиновой кислоты и N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты, в то время как величина  $[I]_{0,5}$  для никотиновой кислоты в 6 раз превышает значение концентрации «полунасыщения» для никотинамида. Сравнение величин  $[I]_{0,5}$  для никотинамида и N-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты свидетельствует о том, что присоединение карбоксипропильной группы к карбоксамидному атому

Параметры уравнения Хилла для ингибирования гликогенфосфорилазы  $b$  никотиновой кислотой и ее производными

Ингибитор	$n_H$	$[I]_{0,5}$ , мМ
Никотиновая кислота	$1,43 \pm 0,02$	$28 \pm 2$
Никотинамид	$1,22 \pm 0,01$	$4,4 \pm 0,1$
N-Никотиноил- $\gamma$ -аминомасляная кислота	$1,37 \pm 0,01$	$9,5 \pm 0,3$
NADH	$1,20 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,05$
NAD	$1,20 \pm 0,02$	$4,4 \pm 0,3$

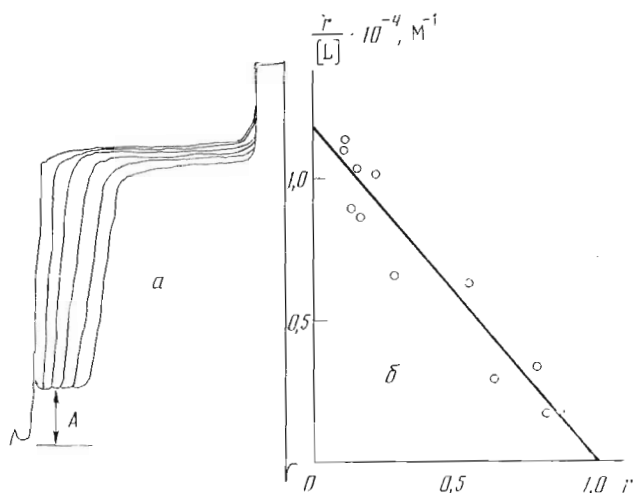


Рис. 2. Седиментация комплекса гликогенфосфорилазы *b* с NADH: *a* — седиментограммы, прописанные с интервалом 6 мин. Направление седиментации слева направо. Скорость вращения ротора 60 000 об/мин. Концентрация фермента в расчете на мономер — 146,2 мкМ, концентрация NADH — 23,6 мкМ; *b* — линейная анаморфоза данных по связыванию NADH с ферментом в координатах Скэтчарда

азота никотинамида приводит к более чем двукратному увеличению концентрации «полунасыщения».

В связи с обнаруженным кооперативным характером ингибирующего действия никотинамида на гликогенфосфорилазу *b* нами было проведено исследование ингибирующего действия никотинамидных коферментов на гликогенфосфорилазу *b* (рис. 1, 4, 5). Ингибирующее действие NAD и NADH на гликогенфосфорилазу *b* обратимо и характеризуется положительной кинетической кооперативностью (таблица). Значения коэффициентов Хилла для NAD и NADH превышают единицу, что говорит о существовании положительных кооперативных взаимодействий между центрами связывания NAD и NADH в димерной молекуле гликогенфосфорилазы *b*. Сравнение величин  $[I]_{0,5}$  для изученных соединений показывает, что в группе никотиновой кислоты и ее производных NADH обладает наиболее высоким сродством к гликогенфосфорилазе *b*. Следует отметить, что NADP и NADPH характеризуются более низким сродством к ферменту по сравнению с NAD и NADH: степень ингибирования составляет 26 и 46% для 7,6 мМ NADPH и 8,7 мМ NADP соответственно.

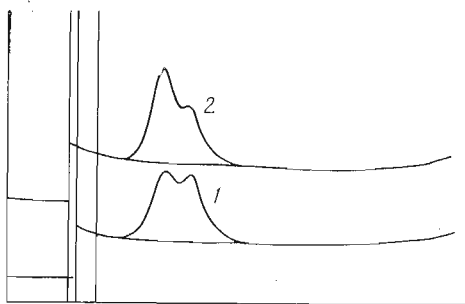
Дополнительная информация о взаимодействии NADH с гликогенфосфорилазой *b* была получена методом скоростной седиментации, который позволяет оценить прочность взаимодействия лиганда с ферментом и определить стехиометрию процесса комплексообразования. Типичная седиментограмма смеси фермента с NADH приведена на рис. 2*a*. Седиментацию регистрировали по поглощению лиганда при 340 нм, где поглощением фермента можно пренебречь. Свободный NADH практически не седиментирует, поэтому наблюдаемая граница седиментации связана с движением комплекса фермент — NADH, а остаточное плато у мениска (*A*) соответствует поглощению свободного лиганда.

Данные по связыванию NADH гликогенфосфорилазой *b* представляли в координатах  $\{r/[L]; r\}$  (рис. 2*b*) в соответствии с уравнением Скэтчарда:

$$\frac{r}{[L]} = \frac{n}{K} - \frac{1}{K} r, \quad (2)$$

где  $K$  — микроскопическая константа диссоциации комплекса фермента с лигандом,  $n$  — число центров связывания NADH в мономере фермента,  $r$  — число молей связанного NADH на моль мономеров фермента. Концентрацию свободного лиганда ( $[L]$ ) рассчитывали на основании значений оптического поглощения ( $A$ ), регистрируемого к определенному моменту

Рис. 3. Влияние NADH на ассоциацию гликогенфосфорилазы *b*, индуцируемую 1 мМ АМР. Шлирен-седиментограммы гликогенфосфорилазы *b* (8 мг/мл) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,7 мМ NADH. Направление седиментации — слева направо. Время седиментации 20 мин



времени в области остаточного плато у мениска в ячейке, содержащей смесь фермента с NADH (рис. 2а), и оптического поглощения лиганда на том же радиальном расстоянии в контрольной ячейке (без фермента) ( $A_0$ ) по формуле

$$[L] = [L]_0 A/A_0,$$

где  $[L]_0$  — общая концентрация лиганда. Такой способ расчета позволяет избежать ошибок, связанных с радиальным разбавлением. Концентрацию связанного лиганда  $[EL]$  определяли как разность между величинами  $[L]_0$  и  $[L]$ , а величину  $r$  — как отношение  $[EL]/[E]_0$ , где  $[E]_0$  — общая концентрация фермента в расчете на мономер. Прямая на рис. 2б проведена с использованием параметров уравнения Скэтчарда, определенных по методу наименьших квадратов. Величины  $K$  и  $n$  оказались равными  $(86 \pm 9)$  мкМ и  $(1,0 \pm 0,1)$ . Таким образом, расчет показывает, что одна молекула NADH связывается с мономером гликогенфосфорилазы *b*.

По данным кристаллографии [4], при больших концентрациях (100 мМ) NADH связывается в двух нуклеотидных центрах фермента, активаторном и ингибиторном, причем заполнение ингибиторного центра более слабое. При использованных нами концентрациях NADH (до 1 мМ) связывание происходит по одному центру, и, по-видимому, это нуклеотидный активаторный центр, для которого было показано лучшее связывание [4]. Положительная кинетическая кооперативность, обнаруженная нами для ингибирования гликогенфосфорилазы *b* под действием NADH, может быть интерпретирована как проявление положительных кооперативных взаимодействий центров связывания NADH, расположенных на различных субъединицах.

Методом скоростной седиментации с использованием шлирен-оптики нами также было изучено влияние NADH на ассоциацию гликогенфосфорилазы *b*, индуцируемую АМР. Гликогенфосфорилаза относится к классу медленно ассоциирующих ферментных систем типа димер  $\rightleftharpoons$  тетрамер, и поэтому оказывается возможным подобрать такие экспериментальные условия, при которых обе олигомерные формы видны на седиментограмме как два частично перекрывающихся пика. На рис. 3 представлена шлирен-седиментограмма фермента при 17° С в присутствии 1 мМ АМР и 0,1 М КСl (0,05 М глицил-глициновый буфер, рН 6,8). Доли димерной и тетрамерной форм фермента в этих условиях приблизительно равны (кривая 1). Димерной форме соответствует левый пик с коэффициентом седиментации  $s_{20,w} = 8,2$  S. При добавлении в систему 0,7 мМ NADH эта форма фермента становится преобладающей (кривая 2). Площадь пика на шлирен-седиментограмме соответствует концентрации определенной олигомерной формы фермента. Поэтому с помощью графического интегрирования [10] можно оценить площадь под каждым пиком и, следовательно, доли димерной и тетрамерной форм. Это, в свою очередь, дает возможность оценить константу ассоциации ( $K_A$ ) по формуле ([9], с. 153):

$$K_A = \frac{1}{8[D]_0} \left\{ \frac{(2-\gamma)^2}{\gamma^2} - 1 \right\}, \quad (3)$$

где  $\gamma$  — доля димерной формы,  $[D]_0$  — общая концентрация фермента в расчете на димер. Проведенная оценка показала, что в отсутствие NADH доля димерной формы составляет 0,52, а константа ассоциации равна 2,2.

$\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . При внесении в систему  $0,7 \text{ mM}$  NADH доля димерной формы увеличивается до  $0,68$ , а константа ассоциации снижается до  $0,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Таким образом, NADH сдвигает положение равновесия димер  $\rightleftharpoons$  тетрамер в сторону образования димера. Как отмечалось выше, NADH связывается, по-видимому, в активаторном центре фермента. Поэтому влияние NADH на положение равновесия димер  $\rightleftharpoons$  тетрамер может быть обусловлено конкуренцией NADH с AMP за активаторный центр.

Физиологическое значение ингибирующего действия витамина PP и его коферментных форм на гликогенфосфорилазу *b* может состоять в том, что эти соединения выступают в роли регуляторов процессов метаболизма гликогена. Повышенное содержание гликогена при избыточном поступлении никотиновой кислоты [11] может быть обусловлено замедлением фосфоролита гликогена вследствие снижения каталитической активности гликогенфосфорилазы под действием никотиновой кислоты и ее метаболитов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали динатриевую соль аденозин-5'-монофосфорной кислоты и дикалиевую соль глюкозо-1-фосфорной кислоты (Reanal, Венгрия), сефадекс G-10 и DEAE-сефадекс A-25 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Великобритания), остальные реактивы производства «Союзреактив» марки х. ч. и ч. д. а.

Никотинамид и никотиновую кислоту отечественного производства, NADP (Serva, ФРГ) и NADPH (Boehringer, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Очистку NAD (Reanal, Венгрия) проводили с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе DE-52 с последующим обессоливанием на сефадексе G-10 [12] и лиофильным высушиванием. Очистку NADH (Reanal, Венгрия) проводили с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе A-25 [13] с последующим осаждением пятикратным объемом холодного ацетона [14]. Натриевую соль *N*-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты синтезировали по методу, предложенному в работе [15]. Концентрацию никотиновой кислоты, никотинамида, *N*-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты и никотинамидных коферментов определяли спектрофотометрически с использованием следующих величин молярных коэффициентов поглощения:  $\epsilon_{280} = 17,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для NAD и NADP [16],  $\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для NADH и NADPH [17],  $\epsilon_{261,5} = 2,85 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для никотинамида [18],  $\epsilon_{260,6} = 3733 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для *N*-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты (величина  $\epsilon$  получена авторами настоящей работы),  $\epsilon_{261,5} = 2,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для никотиновой кислоты. Последняя величина была рассчитана, исходя из значения  $\epsilon_{261,5} = 3,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для никотиновой кислоты при pH 5,6 [18] и определенного нами соотношения оптического поглощения эквимольных растворов никотиновой кислоты при pH 5,6 и 6,8, равного 1,08.

Гликогенфосфорилазу *b* выделяли из скелетных мышц кролика по методу, описанному в работе [19]. Четырехкратно перекристаллизованный препарат фермента использовали не более чем в течение 2 лет после выделения. AMP удаляли из раствора фермента адсорбцией на активированном угле Norit A по методике, описанной в работе [19]; полученный препарат гликогенфосфорилазы *b* использовали в течение 1 дня. Гликоген из печени свиный производства Олавицкого завода химических реактивов очищали по методике, описанной в работе [20]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 280 нм, удельный коэффициент поглощения  $1,32 \text{ (г/л)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [21].

Ферментативную реакцию проводили в направлении наращивания полисахаридных цепей гликогена в присутствии  $4 \text{ mM}$  глюкозо-1-фосфата,  $1,0 \text{ г/л}$  гликогена при  $30^\circ \text{C}$  с использованием  $0,05 \text{ M}$  глицил-глицинового буфера, pH 6,8, содержащего  $0,2 \text{ M}$  EDTA и  $0,3 \text{ M}$  KCl. Каталитическую активность определяли турбидиметрическим методом, предложенным в работе [22]. Ферментативную активность в присутствии никотиновой кислоты, никотинамида и *N*-никотиноил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты определяли при 310 нм, а в присутствии никотинамидных коферментов — при 400 нм. Ферментативную реакцию начинали, добавляя от 30 до 50 мкг гликогенфосфорилазы *b* к реакционной смеси. Специально было показано, что порядок добавления компонентов не влияет на величину начальной скорости ферментативной реакции. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 3%.

Седиментационные исследования проводили в аналитической ультрацентрифуге Spinco, модель E, оборудованной абсорбционной оптической системой, фотоэлектрическим сканирующим устройством, монохроматором, мультиплексором (Beckman, Австрия) и двухкоординатным самописцем NE-230 (EMG, Венгрия). В опытах по связыванию NADH ферментом использовали четырехканальный ротор An-F, Ti и двухсекторные ячейки с угольными 12-мм вкладышами (№ 306 493). В опыте использовали три ячейки, в двух из которых была смесь NADH и гликогенфосфорилазы *b*, а в третьей (контрольная) — только NADH в той же концентрации, что и в

оставшихся ячеек. Седиментацию регистрировали по поглощению лиганда при 340 нм. После оседания комплекса фермента с NADH на дно ячейки концентрацию оставшегося лиганда в области плато у мениска принимали равной равновесной концентрации свободного лиганда.

Влияние NADH на олигомерное состояние фермента было изучено с использованием шпирен-оптики и двухканального ротора An-D. Скорость вращения ротора составляла 56 000 об/мин. В роторе одновременно находились две ячейки с раствором фермента в буфере, содержащем 1 мМ АМР; в одну из ячеек был добавлен NADH. Использование клиновидного кварцевого стекла в одной из ячеек позволяло получать обе седиментограммы на одной фотографии. В седиментационных исследованиях использовали 0,05 М глицил-глициновый буфер, рН 6,8, содержащий 0,2 мМ EDTA и 0,1 М KCl.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Dombradi V.* // *Int. J. Biochem.* 1981. V. 13. № 2. P. 125-139.
2. *Krebs E. G., Fischer E. H.* // *J. Biol. Chem.* 1955. V. 216. № 1. P. 113-120.
3. *Morgan H. E., Parmeggiani A.* // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. № 8. P. 2440-2445.
4. *Stura E. A., Zanotti G., Babu Y. S., Sansom M. S. P., Stuart D. I., Wilson K. S., Johnson L. N., Van de Werve G.* // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 170. № 2. P. 529-565.
5. *Madsen N. B., Shechosky S.* // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. № 14. P. 3301-3307.
6. *Dombradi V., Vereb G., Bot G.* // *Int. J. Biochem.* 1979. V. 10. № 11. P. 905-908.
7. *Бендикова Э. А., Шмуйлович Л. М., Копелевич В. М.* // *Бюлл. exper. биол.* 1972. № 1. С. 65-69.
8. *Копелевич В. М., Сытинский И. А., Гунар В. И.* // *Хим.-фарм. журн.* 1981. Т. 15. № 5. С. 27-39.
9. *Курганов Б. И.* Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978.
10. *Chervenka C. H.* A Manual of Methods for the Analytical Ultracentrifuge, Spinco Division of Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, 1969. P. 9.
11. *Koch R.* // *Intern. Z. Vitamin-Forsch.* 1950. B. 22. № 1. S. 136-145.
12. *Dickinson F. M., Engel P. C.* // *Anal. Biochem.* 1977. V. 82. № 2. P. 523-531.
13. *Wenz I., Loesche W., Till U., Petermann H., Horn A.* // *J. Chromatogr.* 1976. V. 120. № 1. P. 187-196.
14. *Kornberg A.* // *Meth. Enzymol.* 1957. V. 3. P. 876-879.
15. *Ковалев Г. И., Копелевич В. М., Буланова Л. Н., Гурский Р. Н., Гунар В. И., Ржевский К. С.* // *Хим.-фарм. журн.* 1979. Т. 13. № 10. С. 18-23.
16. *Winer A. D.* // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. № 10. P. PC 3598-PC 3600.
17. *Horscker B. L., Kornberg A.* // *J. Biol. Chem.* 1948. V. 175. № 1. P. 385-390.
18. *Березовский В. М.* Химия витаминов. М.: Пищ. пром-сть, 1973. С. 293-294.
19. *Fischer E. H., Krebs E. G.* // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 231. № 1. P. 65-71.
20. *Sutherland E. W., Wosilait W. D.* // *J. Biol. Chem.* 1956. V. 218. № 1. P. 459-468.
21. *Buc M. H., Ulmann A., Goldberg M., Buc H.* // *Biochimie.* 1971. B. 53. № 3. S. 283-289.
22. *Сугробова И. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И.* // *Биохимия.* 1982. Т. 47. Вып. 11. С. 1883-1888.

Поступила в редакцию  
6.I.1987

#### THE INTERACTION OF MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE *b* WITH NICOTINIC ACID, NICOTINAMIDE, N-NICOTINOYL- $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID, AND NICOTINAMIDE COENZYMES

KLINOVA N. I., CHEBOTAREVA N. A., KLINOV S. V.,  
KURGANOV B. I., BULANOVA L. N., KOPELEVICH V. M.,  
GUNAR V. I.

*All-Union Vitamin Research Institute, Moscow*

The inhibitory action of nicotinic acid, nicotinamide, N-nicotinoyl- $\gamma$ -aminobutyric acid, NAD, NADH, NADP, and NADPH on the rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b* has been studied. The inhibition is reversible and positively cooperative (the value of Hill coefficient exceeds unity). Half-saturation concentrations and Hill coefficients were determined for the following compounds: nicotinic acid (28 mM; 1,4), nicotinamide (4,4 mM; 1,2), N-nicotinoyl- $\gamma$ -aminobutyric acid (9,5 mM; 1,4), NAD (4,4 mM; 1,2), NADH (0,93 mM; 1,2). NADH-binding site of glycogen phosphorylase *b* subunit was characterised by the sedimentation velocity method. Microscopic dissociation constant was found to be  $86 \pm 9 \mu\text{M}$  (pH 6,8; 20° C). AMP-induced association of glycogen phosphorylase *b* is hindered by NADH.