

Fig. 1. pH-activity curve of the sea-anemone apyrase activity.  $3.3 \cdot 10^{-3} M \text{ MgCl}_2$  (x—x) or  $\text{CaCl}_2$  (o—o);  $0.14 M \text{ KCl}$ ; ATP =  $120 \mu\text{g}$  labile P. Other conditions are the same as in Table I except that pH of the reaction mixture varied.

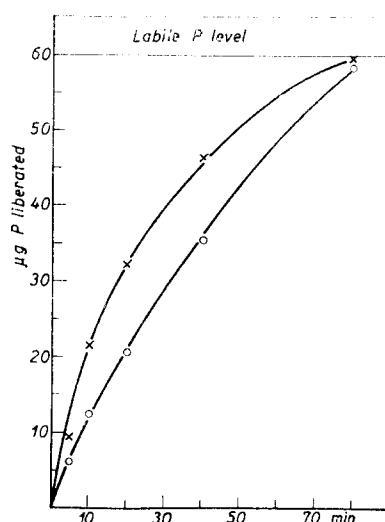


Fig. 2. Time-activity curve of the sea-anemone apyrase activity.  $3.3 \cdot 10^{-3} M \text{ MgCl}_2$  (x—x) or  $\text{CaCl}_2$  (o—o);  $0.14 M \text{ KCl}$ . Other conditions are the same as in Table I except that incubation time varied.

The writer is indebted to Messrs. M. YOSHIDA and H. MOHRI of the Misaki Marine Biological Station for laboratory facilities. He also wishes to thank Dr. J. ISHIDA for his kind interest.

KOSAK MARUYAMA

Zoological Institute, Faculty of Science, Tokyo University,  
Tokyo (Japan)

<sup>1</sup> J. W. MEHL, *Biol. Bull.*, 79 (1940) 488.

<sup>2</sup> K. MARUYAMA, *Enzymologia*, 17 (1950) 10.

<sup>3</sup> A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, 2nd Ed., Academic Press Inc., New York, 1951.

<sup>4</sup> K. LOHMANN AND L. JENDRÁSSIK, *Biochem. Z.*, 178 (1926) 419.

Received January 31st, 1955

### Formation de sérylarginine pendant l'activation du chymotrypsinogène de boeuf

L'isolement récent d'une chymotrypsine possédant une seule chaîne ouverte<sup>1</sup> nous a incités à schématiser de façon nouvelle<sup>1,2</sup> quelques-unes des réactions de protéolyse conférant au chymotrypsinogène une activité chymotrypsique plus ou moins intense. Le schéma proposé, d'ailleurs approximatif et préliminaire, diffère de celui de GLADNER ET NEURATH<sup>3</sup> par le fait qu'il prévoit la formation de un ou de plusieurs peptides (désignés par le symbole X-Base) aussi bien pendant l'activation "rapide"<sup>4</sup> donnant naissance à l'enzyme-δ que pendant l'activation "lente"<sup>5</sup> engendrant l'enzyme-α.

Afin de vérifier la validité de ce schéma, nous avons traité à 0° et pH = 7.6 des solutions à 2.4 % de chymotrypsinogène 5 fois cristallisé par des quantités de trypsine telles que la concentration finale en enzyme soit 0.06 et 0.02 % (activation rapide) ou  $0.056 \cdot 10^{-2} \%$  (activation lente). Après des laps de temps variables (10 min-48 h), nous avons mesuré la teneur en azote non-protéique des solutions et leur activité chymotrypsique vis-à-vis de l'acétyl-L-tyrosine éthyl ester. Quelle que

soit la concentration de la trypsine, les courbes relatives à l'azote non-protéique subissent toujours un brusque changement de pente au moment où l'activité atteint sa valeur maximum. Ce fait suggère que, conformément à notre schéma, le processus d'activation du chymotrypsinogène provoque dans tous les cas la libération de un ou de plusieurs peptides spécifiques qu'il s'agit maintenant de reconnaître et d'identifier.

Les mélanges de peptides ont été étudiés au moyen de trois techniques: (a) la chromatographie sur papier des filtrats trichloracétiques préalablement débarrassés de l'acide trichloracétique par la Nalcite SAR; (b) la chromatographie directe des solutions sur des colonnes de Dowex 50 élutées successivement par des tampons citrate et phosphate puis par du bicarbonate et du carbonate de Na; la préparation des dérivés dinitrophényles (DNP), l'extraction des DNP-peptides par HCl N, l'acétate d'éthyle, la méthyléthylcétone et le carbonate de Na, suivie d'une chromatographie des divers extraits sur des colonnes de silicagel tamponné.

1. *Activation rapide.* Les solutions analysées jusqu'ici (durée du traitement 30 min, 0.06 % de trypsine), contiennent beaucoup de sérylarginine (un peu moins ou plus de 0.5 mole par mole de chymotrypsinogène) et une série d'autres peptides dont les proportions individuelles sont très faibles. On peut donc penser que ces derniers proviennent d'une dégradation générale non-spécifique des molécules protéiques et que la sérylarginine représente le seul peptide spécifique de l'activation rapide (Schéma 1).

Ce schéma appelle quelques commentaires: (a) Possédant un résidu basique sur son flanc carbonyle, la liaison arginylsoleucine est certainement rompue par la trypsine. Cette rupture représente la première des protéolyse spécifiques subies par le chymotrypsinogène. (b) Si la protéine primaire ainsi formée est déjà une chymotrypsine (la chymotrypsine- $\pi$  de JACOBSEN<sup>4</sup>), la rupture de la liaison arginylsoleucine détermine à elle seule l'activation. Des expériences sont en cours afin d'éclaircir ce point. Mais on peut supposer dès maintenant que la protéine primaire est bien active puisque la deuxième liaison rompue (liaison leucylsérine) correspond mieux aux besoins structuraux de la chymotrypsine qu'à ceux de la trypsine\*.

En somme, nos résultats sont actuellement compatibles avec le concept d'une chymotrypsine- $\pi$  formée par rupture trypsique d'une liaison arginylsoleucine au sein du chymotrypsinogène ( $T_1$ ) et d'une chymotrypsine- $\delta$  formée ultérieurement par rupture trypsique ( $T_2$ ) ou autolytique ( $A_1$ ) d'une liaison leucylsérine et ablation du peptide sérylarginine.

2. *Activation lente.* Les expériences réalisées dans les conditions de l'activation lente (40 h à 0-5°) sont encore peu nombreuses. Signalons toutefois dès maintenant que le mélange de peptides engendrés dans ces conditions contient lui aussi des quantités très importantes de sérylarginine\*\* (environ 1 mole par mole de zymogène) mais qu'il est beaucoup plus complexe que le précédent. Nous pensons donc que la sérylarginine représente également le peptide X-Base de l'activation lente ou tout au moins la séquence C-terminale de ce peptide. Mais nous ignorons encore si l'activation lente donne ou non naissance à d'autres peptides spécifiques, prélevés par exemple dans la région de la tyrosine et de lalanine terminales de la chymotrypsine- $\alpha$ .

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,  
Marseille (France)*

M. ROVERY  
M. POILROUX  
A. CURNIER  
P. DESNUELLE

<sup>1</sup> M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 145.

<sup>2</sup> M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 1437.

<sup>3</sup> J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 345.

<sup>4</sup> C. J. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. Chim.*, 25 (1947) 325.

<sup>5</sup> J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia Univ. Press, New York, 1948.

<sup>6</sup> P. H. MARS, *Pharm. Weekblad*, 89 (1954) 33.

Reçu le 22 janvier 1955

\* Dans ce cas, la deuxième rupture pourrait être, non pas d'origine trypsique comme le croit JACOBSEN<sup>4</sup>, mais d'origine autolytique.

\*\* Divers auteurs<sup>2,6</sup> ont déjà donné la composition globale en aminoacides du mélange des peptides de l'activation lente. Aucun n'a encore signalé dans ce mélange la présence de sérylarginine.