

The data imply that cells grown with acetate (or citrate) as sole carbon source do not oxidize propionate solely *via* succinate, either through preliminary condensation of CO<sub>2</sub> with propionate to yield succinate directly<sup>4,5</sup>, or *via* the intermediate formation of isosuccinate<sup>3,4</sup>, for the rate of oxygen uptake with propionate as substrate exceeds that with succinate, which should not be possible if the rate of oxygen uptake with propionate as substrate is limited by some oxidative step(s) subsequent to succinate. If, however, the rate of oxidation of succinate when succinate was the substrate was limited at some point prior to the first oxidative step, such as by cell permeability or substrate activation, then the difference in rates of oxygen uptake could occur, but such a limitation cannot account for the result, as succinate is in fact utilized more rapidly than is propionate, even though cells from the acetate medium take up oxygen more rapidly when attacking propionate than succinate.

Whether or not propionate is oxidized *via* pyruvate through the mechanism proposed by MAHLER AND HUENNEKENS<sup>2</sup> in cells grown in synthetic media with succinate, acetate, or citrate as carbon sources cannot be determined from the data available.

The complete oxidation of propionate has been observed in this study only under conditions of greatly reduced rate of utilization of substrate and hence might be due to a slower rate of entry of propionate than of those compounds only partially oxidized into a common enzyme system. That this is unlikely, however, is evident from the fact that butyrate is utilized even more slowly than propionate and yet is only partially oxidized (Table I).

Evidence has been obtained that is consistent with the view that a conventional tricarboxylic acid cycle is present in this organism<sup>7</sup>. The results reported here indicate the possible existence of an alternate system for the complete oxidation of propionate.

The whole cell preparations used in this work oxidize *D*-lactate, *DL*-lactate, glycolate, malonate, oxalate, and formate at an extremely low rate, if at all.

N. TOMLINSON

Fisheries Research Board of Canada, Pacific Fisheries Experimental Station,  
Vancouver, B.C. (Canada)

R. A. MACLEOD

<sup>1</sup> R. A. MACLEOD, E. ONOFREY AND M. E. NORRIS, *J. Bacteriol.*, 68 (1954) 680.

<sup>2</sup> H. R. MAHLER AND F. M. HUENNEKENS, *Biochem. Biophys. Acta*, 11 (1953) 575.

<sup>3</sup> J. KATZ AND I. L. CHAIKOFF, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 2659.

<sup>4</sup> M. FLAVIN, *Federation Proc.*, 14 (1955) 211.

<sup>5</sup> J. B. WOLFE, *Federation Proc.*, 14 (1955) 306.

K. LANG AND K. H. BÄSSLER, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 401.

R. A. MACLEOD, N. TOMLINSON AND M. E. NORRIS, *Federation Proc.*, 14 (1955) 248.

Received September 20th, 1955

## Quelques considérations préliminaires sur la conversion du chymotrypsinogène en chymotrypsine- $\alpha$

Le mécanisme chimique de l'activation "lente" du chymotrypsinogène est vraisemblablement assez complexe puisqu'il comporte, d'une part, les protéolyses de l'activation "rapide" donnant naissance à la sérilarginine<sup>1-3</sup> et, d'autre part, certaines protéolyses additionnelles<sup>4,5</sup> responsables de la présence dans la chymotrypsine- $\alpha$  de deux résidus terminaux supplémentaires: la tyrosine C-terminale et l'alanine N-terminale. Ces protéolyses additionnelles ne semblent d'ailleurs pas faire partie du processus d'activation proprement dit. Elles sont néanmoins intéressantes par les lumières qu'elles projettent sur la formation de la plus classique des chymotrypsines, par le nouvel argument qu'elles fournissent en faveur de l'existence chez les chymotrypsines d'un centre actif étroitement limité, et enfin par les exemples suggestifs qu'elles donnent d'une famille d'enzymes issue d'une même protéine-mère grâce à une série de dégradations successives.

Le résidu C-terminal supplémentaire étant la tyrosine, on peut penser que les protéolyses additionnelles de l'activation "lente" sont d'origine chymotrypsique et qu'elles résultent donc, soit de l'attaque préalable du zymogène par les chymotrypsines de l'activation "rapide"<sup>6</sup> ( $\pi$  et  $\delta$ ), soit d'une autolyse ultérieure de ces enzymes. Les chiffres du Tableau I (colonnes 5-8) indiquent que les deux phénomènes ont lieu et qu'ils forment des protéines contenant de la thréonine et de l'alanine en position N-terminale. Ils expliquent donc vraisemblablement l'apparition de ces mêmes résidus pendant l'activation "lente" (colonnes 1-4).

Quelques remarques importantes doivent être faites au sujet des chiffres de ce tableau:

a) L'attaque du chymotrypsinogène par la chymotrypsine ne semble provoquer aucune activation notable. Pour être "activante", la protéolyse du zymogène doit donc se produire en un endroit défini de la molécule, lequel paraît être la liaison Arg-Ileu coupée par la trypsine<sup>2</sup>. En outre, on comprend maintenant pourquoi le chymotrypsinogène est beaucoup plus stable que le trypt-

TABLEAU I

ETUDE PAR LA TECHNIQUE AU FDNB DE L'ATTAQUE DU CHYMOTRYPSINOGENE (ChTg)  
ET DE L'AUTOLYSE DE LA CHYMOTRYPSINE- $\delta$  (ChT- $\delta$ )

Un certain poids d'inhibiteur du soja (indiqué ci-après en fonction du poids de trypsine) a été ajouté aux préparations de ChT- $\delta$  afin de stopper l'action ultérieure de la trypsine. Tous les essais ont été effectués à pH = 7.6.

En outre, les DNP-dérivés ont été soigneusement lavés avec une série de solvants afin d'éliminer la majeure partie des DNP-peptides. Les résidus N-terminaux éventuellement présents au début des expériences ont été retranchés. Les chiffres indiquent donc les résidus N-terminaux *apparus* dans les *protéines* au cours des traitements.

	Activation "lente" de ChTg				Attaque de ChTg par ChT- $\delta$		Autolyse de ChT- $\delta$	
	1*	2*	3	4	5	6	7	8
Rapport pondéral enzyme/substrat	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-1}$	-	-
Trypsine-inhibiteur	-	-	-	-	4	4	5	5
Durée (h)	40	40	48	48	48	43	24	48
SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub> (M)	0	0.1	0	0.3	0.3	1.0	0.3	0.8
Température	0°	0	5°	6°	0	6	0	6°
Résidus N-terminaux								
Ileu (+ évent. Leu et Val)	1.3	1.2	1.0	1.0	0.1	0.1	0.0	-
Ala	0.3	0.5	0.5	0.7	0.2	0.0	0.1	0.5
Thr	0.4	#0	0.3	0.1	0.4	0.2	0.4	0.2
Ser (- évent. Glu)	-	-	-	0.1	0.1	0.2	0.1	-
Activité spécifique (estérasiqne)	3.2	2.8	-	2.7	0	0	-	-

\* Chiffres tirés d'une de nos précédentes publications<sup>1</sup>.

sinogène et le pepsinogène: son attaque par l'enzyme correspondant est lente et elle ne présente aucun caractère autocatalytique. (b) On pourrait s'étonner de ne pas rencontrer plus de sérine parmi les résidus N-terminaux engendrés par l'attaque chymotrypsique du chymotrypsinogène, puisqu'une liaison Leu-Ser s'autolyse<sup>6</sup> très aisément dans la chymotrypsine- $\gamma$ . Peut-être cette liaison ne devient-elle labile qu'après la rupture de la liaison Arg-Ileu voisine\*. (c) Enfin, au cours des trois phénomènes envisagés, l'alanine N-terminale de la chymotrypsine- $\alpha$  ne semble pas se former tout de suite mais bien remplacer peu à peu la thréonine N-terminale. Cette substitution, qui est favorisée par une élévation de température (0-6°) et la présence de sulfate d'ammonium\*\*, rappelle de façon très curieuse la substitution de l'arginine C-terminale par la leucine pendant la conversion de l'enzyme  $\pi$  en enzyme  $\delta$ . Dans un cas comme dans l'autre, un peptide doit être libéré et celui-ci doit contenir de la thréonine N-terminale. En fait, si l'on chromatographie<sup>7</sup> sur une colonne de Dowex-50  $\times$  4 (Fig. 1, diagramme a), un hydrolysât chymotrypsique de chymotrypsinogène (contenant dans sa fraction protéique 0.5 résidus d'alanine N-terminale et 0.2 résidus de thréonine), on trouve un pic important, contenant environ 0.4 mole de Thr.Asp (ou Asp(NH<sub>2</sub>))\*\*\*. Le petit pic de Ser.Arg est vraisemblablement dû à la présence d'une trace de trypsine (ou d'un enzyme analogue) dans la chymotrypsine- $\alpha$  utilisée. Aucun inhibiteur de trypsine n'a en effet été ajouté au début de cette expérience particulière.

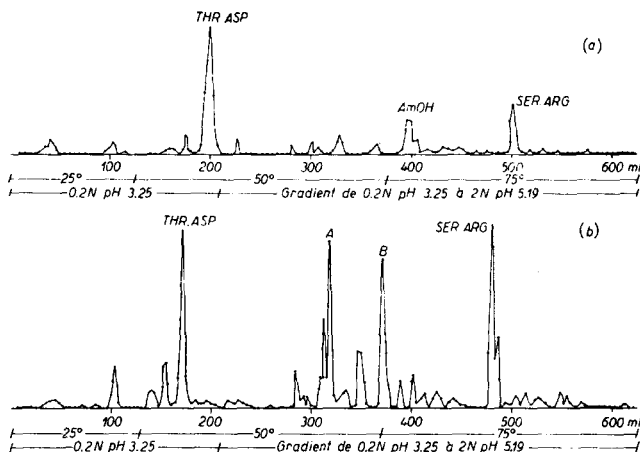
Le diagramme (b) de la Fig. 1 est relatif aux peptides engendrés pendant l'activation "lente" du chymotrypsinogène. Il possède quatre pics principaux: Le premier contient à nouveau Thr.Asp (ou Asp(NH<sub>2</sub>)) et le dernier, Ser.Arg. Le pic B est vraisemblablement formé par l'ammoniaque et le pic A fournit par hydrolyse des quantités importantes de 3 amino-acides: Ser, Gly et Leu (ou Ileu).

\* On notera également que le zymogène est attaqué ici par l'enzyme  $\delta$  et non par l'enzyme  $\pi$ . Or, l'autolyse de la liaison Leu-Ser s'effectue dans l'enzyme  $\pi$ .

\*\* Il n'est pas sans intérêt de noter ici que la préparation classique de la chymotrypsine- $\alpha$  s'effectue à 5° à partir d'un "gâteau" de chymotrypsinogène contenant du sulfate d'ammonium.

\*\*\* Ce peptide avait déjà été identifié sous forme de dérivé DNP dans l'une de nos publications précédentes<sup>2</sup>.

Fig. 1. Peptides formés pendant l'attaque chymotrypsique du chymotrypsinogène (a) et pendant l'activation "lente" de ce zymogène (b). (a): ChTg:  $4.4 \cdot 10^{-3}$  M; ChT- $\alpha$ :  $0.45 \cdot 10^{-3}$  M; Temp.:  $0^\circ$ ; pH = 7.6; Durée du traitement: 46 h. (b): ChTg:  $4.4 \cdot 10^{-3}$  M; Trypsine:  $4.8 \cdot 10^{-7}$  M;  $\text{SO}_4\text{Am}_2$ : 0.3 M; Temp.:  $6^\circ$ ; pH: 7.6; Durée du traitement: 46 h. Après traitement des hydrolysats par le diisopropylfluorophosphate, les peptides qu'ils renferment sont débarrassés des protéines et éventuellement des ions  $\text{SO}_4$  par adsorption sur Dowex-50  $\times 12$  forme  $\text{H}^+$  et élution avec  $\text{NH}_4\text{N}$ . Colonne de 87 cm. Chambre de mélange: 330 ml. Débit: 8 ml/h. Fractionnement par ml. Dessalage des pics (en vue de l'étude ultérieure sur papier de leurs hydrolysats): par échange de leurs ions avec ceux de l'acétate d'ammonium.



Nos expériences ne sont pas encore assez avancées pour permettre d'interpréter de façon définitive le phénomène de l'activation "lente". Nous ignorons en particulier si certains peptides ne sont pas perdus pendant le traitement préalable des hydrolysats par le Dowex-50  $\times 12$  et si une élution plus complète des colonnes de Dowex-50  $\times 4$  ne ferait pas sortir d'autres pics. Mais il est utile de signaler dès maintenant que cette activation engendre au moins trois peptides. Deux d'entre eux sont formés par des processus d'ores et déjà connus. Nous cherchons actuellement l'origine du troisième.

Les résultats du Tableau I suggèrent enfin que la thréonine N-terminale apparue pendant l'activation appartient bien à une protéine active, et non à une impureté peptidique comme on le pense quelquefois<sup>5-6</sup>. Si tel est le cas, il faudrait prévoir l'existence d'un nouvel enzyme de l'activation "lente", la chymotrypsine- $\alpha_1$  possédant tous les résidus terminaux de l'enzyme- $\alpha$ , sauf l'alanine qui serait remplacée par la thréonine.

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

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

<sup>1</sup> M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 590.

<sup>2</sup> M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 565.

<sup>3</sup> W. J. DREYER ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 814.

<sup>4</sup> M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 130 (1954) 30.

<sup>5</sup> M. ROVERY, M. POILROUX ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 145.

<sup>6</sup> F. R. BETTELHEIM ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 241.

<sup>7</sup> S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.

E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 189.

Reçu le 9 septembre 1955

## The incorporation of labeled amino acids into the cytoplasmic particles of rat muscle\*

Results from a number of laboratories have provided evidence that of the various cell particulates isolated by the SCHNEIDER AND HOGEBLOOM<sup>1</sup> technique, the microsomal fraction plays a leading role in the incorporation of labeled amino acids into protein. The high rate of incorporation

\* This investigation was supported in part by a grant from the Medical Fluid Research Fund, of the Yale University School of Medicine to one of us (J.R.Mc.) and in part by a research grant (A-428-C) from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases of the National Institutes of Health, Public Health Service to one of us (M.V.S.).