

Sur l'existence de formes dégradées et encore activables du chymotrypsinogène („Néochymotrypsinogènes”)

On sait^{1,2} que le chymotrypsinogène est attaqué rapidement par la trypsine, même à basse température, au niveau d'une liaison arginyl-*isoleucine* et que la rupture de cette liaison provoque l'activation de la molécule. La chymotrypsine agit beaucoup plus lentement sur le chymotrypsinogène. Elle fait apparaître des résidus de thréonine et d'alanine en position N-terminale mais, chose remarquable, elle ne provoque aucune activation³. Les substances qu'elle engendre sont donc de simples formes dégradées du chymotrypsinogène et la question se pose de savoir si ces formes sont encore activables. Dans l'affirmative, nous pourrions en effet les considérer comme les premiers représentants d'une nouvelle classe de zymogènes que nous proposons d'appeler „néochymotrypsinogènes”.

Du chymotrypsinogène pur (cristallisé 5 fois et lyophilisé) en solution à 10 % dans SO_4Am_2 0.3 M* est attaqué à 6° et à pH = 7.4 par le 1/10° de son poids de chymotrypsine- α pure⁴. Au bout de 48 h, l'activité chymotrypsique du mélange vis à vis de l'acétyl-L-tyrosine éthylester n'a guère varié. Par contre, son activité potentielle^{5,6} est toujours considérable. On arrête la réaction en ajoutant 10 mole de diisopropylfluorophosphate (DFP) par mole de chymotrypsine, on précipite les protéines dans SO_4Am_2 0.7 M à pH = 4.0 et on cristallise la masse en employant les conditions de la cristallisation du chymotrypsinogène. On obtient de cette façon des bâtonnets ressemblant à ceux du chymotrypsinogène, mais un peu plus épais et plus courts (rendement après 4 cristallisations: 35 %). Après dialyse et lyophilisations on détermine quantitativement les résidus terminaux de la préparation au moyen du fluorodinitrobenzène et de la carboxypeptidase préalablement incubée avec DFP (rapport molaire enzyme/substrat: 1/40). On trouve en position N-terminale§ de l'alanine (0.6 mole) et de la thréonine (0.1 mole); en position C-terminale, de la tyrosine (0.7 mole après 3 h et 0.9 mole après 6 h) et des traces de leucine. La préparation contient donc au moins deux protéines (Ala-Tyr et Thr-Tyr) que la cristallisation ne peut pas séparer. Ces protéines ne semblent se différencier, comme d'ailleurs les chymotrypsines- α et α_1 ³, que par la nature du résidu N-terminal. Elles se différencient en tout cas toutes deux du chymotrypsinogène par leur structure „ouverte” que trahit l'existence d'un résidu C-terminal et d'un résidu N-terminal.

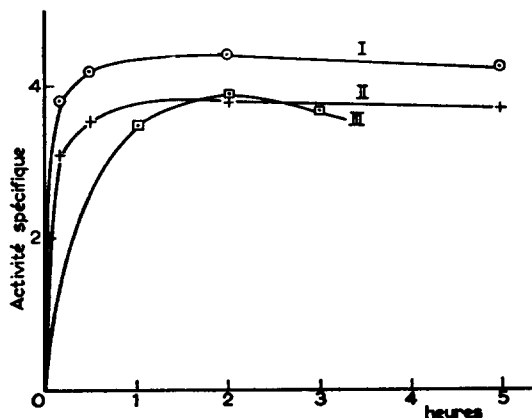


Fig. 1. Courbes d'activation par la trypsine. Les conditions d'activation sont celles de l'activation rapide, à savoir: concentration molaire du zymogène: $10.6 \cdot 10^{-4}$; de la trypsine: $0.26 \cdot 10^{-4}$. Temp.: 0°, pH = 7.6. Les activités spécifiques sont mesurées avec l'acétyl-L-tyrosine éthylester. Elles sont exprimées en milliéquivalents acides par min et par mg d'azote protéique. I: chymotrypsinogène; II: néochymotrypsinogène; III: néochymotrypsinogène traité deux fois par la carboxypeptidase pendant 6 h (voir le texte).

Nous n'avons pas encore pu démontrer de façon définitive un fait suggéré par le dosage des résidus terminaux, à savoir que la préparation est pratiquement dépourvue de chymo-

* Le sulfate d'ammonium est là pour favoriser la formation de l'alanine N-terminale aux dépens de la thréonine. Ce phénomène est analogue à celui déjà constaté pendant l'activation lente du chymotrypsinogène³.

** La légère activité trypsique que l'on trouve généralement dans les préparations les plus pures de chymotrypsine- α cristallisée est annulée en incubant l'enzyme à 0° et pH = 7.4 avec du trypsine-inhibiteur du soja (2.8 % en poids). On évite ainsi un début d'activation du chymotrypsinogène pendant l'opération.

*** L'activité potentielle est l'activité spécifique maximum susceptible d'être obtenue en traitant le mélange par la trypsine dans les conditions classiques de l'activation rapide⁴.

§ En plus évidemment du résidu N-terminal de 1/2 cystine déjà décelable dans le chymotrypsinogène oxydé par l'acide performique⁵. Les quantités de résidus terminaux sont données en mole pour 1 mole de protéine pesant 22,500 g.

trypsinogène. Néanmoins, étant donné la très forte activité potentielle du mélange (courbe II de la Fig. 1), on peut d'ores et déjà penser que les protéines "ouvertes" sont activables et qu'elles méritent par conséquent d'être appelées néochymotrypsinogènes.

On notera que les résidus terminaux des néochymotrypsinogènes précédents sont justement ceux que les protéolyses additionnelles de l'activation lente¹ font apparaître dans les chymotrypsines du type α . Il est curieux de constater que l'"ouverture" du chymotrypsinogène produit des protéines actives quand elle est faite par la trypsine en un point apparemment bien déterminé de la molécule, et qu'elle produit des protéines inactives mais encore activables quand elle est faite par la chymotrypsine en un autre point.

Il est d'ailleurs intéressant de signaler que la dégradation que comporte cette "ouverture" peut être encore poursuivie sans que l'aptitude à l'activation soit perdue. A côté de la tyrosine C-terminale, la chaîne contient vraisemblablement de la leucine et de la lysine*. Or, l'ablation des trois résidus par la carboxypeptidase n'influe pas de façon sensible sur l'activité potentielle. (courbe III de la Fig. 1). Toute cette région de la molécule ne paraît donc pas essentielle.

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

M. ROVERY
A. YOSHIDA **
P. DESNUELLE

¹ M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 590; 17 (1955) 565.

² W. J. DREYER ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 814; *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 527.

³ M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 57.

⁴ C. F. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 25 (1947) 325.

⁵ F. R. BETTELHEIM, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 235.

Reçu le 28 janvier 1956

* Nous avons vu que l'attaque du néochymotrypsinogène par la carboxypeptidase engendre 1 mole de tyrosine et des traces de leucine. Si, au terme de cette 1^{re} étape, on dialyse le mélange et on ajoute à nouveau de l'enzyme, on obtient après 6 h d'incubation des quantités substantielles de leucine et de lysine. La séquence C-terminale est donc vraisemblablement — (Lys, Leu)•Tyr. C'est cette séquence qui peut être coupée sans que l'activité potentielle soit diminuée.

** Professeur associé à l'Université de Tokyo.

Stimulation by ribonucleic acid of induced β -galactosidase formation in *Bacillus megaterium*

A recent report of REINER AND GOODMAN¹ on the effect of polynucleotides on induced enzyme formation in *Escherichia coli* has prompted us to record some similar results obtained while studying adaptation in *Bacillus megaterium*.

The strain KM of *B. megaterium*, very kindly supplied by Dr. McQUILLEN, was grown at 30° in a glucose/NH₃/salts medium (McQUILLEN²). The conditions of growth and maintenance of the culture were as used by McQUILLEN², and the organism also grew readily—after a lag period of a few hours—when the glucose in the medium was replaced by an equal weight of lactose (medium C/L). The strain trained to grow on lactose was maintained by daily sub-culture on C/L in the same way as that trained to grow on C/G. It was found that there was always a small amount of β -galactosidase activity present in culture of *B. megaterium* growing on glucose alone, but the amount of enzyme was increased about thirty-fold when 0.5 % lactose was present (C/L). The present work was initiated to determine whether the level of β -galactosidase found in cells growing on C/G could be increased by incorporating into the medium nucleic acid obtained from the strain trained to grow on lactose.

The nucleic acid was obtained by a method to be described in more detail elsewhere. Briefly, cells of *B. megaterium* suspended in *M* NaCl were converted into protoplasts by treatment with lysozyme, and then stirred slowly for several hours in the presence of an equal volume of sodium dodecylsulphate (SDS at 0.4 % weight/volume). Nucleic acid was precipitated with alcohol from the clear supernatant liquid obtained after centrifuging at 10,000 *g*. Initial attempts to separate the DNA (constituting up to 40 % of the mixture) from the RNA by the methods of DUTTA, JONES AND STACEY³ were unsuccessful, but it was found that the SDS-protein precipitate still contained varying amounts of DNA. DNA free from RNA could be liberated by treatment of this precipitate suspended in *M* NaCl with CHCl₃-octanol as in the SEVAG procedure. On the other hand, most of the DNA could be precipitated, together with some RNA, from the mixed nucleic acids dissolved in 0.1 *M* NaCl by high speed centrifugation at 100,000 *g*. It was then possible to precipitate RNA of greater than 90 % purity from the supernatant fluid. The RNA