

SUR UNE NOUVELLE L-AMINOACIDEOXYDASE, ACTIVABLE PAR LE MAGNÉSIUM

J. ROCHE, P.-E. GLAHN, PH. MANCHON ET N. V. THOAI

*Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris,
et Laboratoire de Biologie marine du Collège de France, Concarneau, Finistère (France)*

(Reçu le 22 Novembre, 1958)

SUMMARY

A new L-amino acid oxidase activated by magnesium

1. The L-amino acid oxidase of the hepato-pancreas of *Cardium tuberculatum* L was purified and studied.

2. The specificity of the enzyme with regard to 24 amino acids was investigated and discussed; the enzyme also attacks basic amino acids. Details are given of the structural configurations that amino acids must have in order to serve as substrate. Certain amino acids that are not attacked by the enzyme have an inhibitory effect on its action. This inhibition is competitive in the absence of Mg^{++} and non-competitive in its presence.

3. The L-amino acid oxidase loses 85 % of its activity during purification; it can be reactivated by Mg^{++} (optimum action at pH 8.8), the only one of a number of metal ions tested having this property. In this respect there is an extreme specificity that is not encountered in the case of other enzymes activated by divalent cations.

4. The enzyme fraction that remains active in the absence of Mg^{++} , oxidizes the same amino acids, but shows optimum activity at a different pH (7.6); it can be activated by tris(hydroxymethyl)aminomethane.

INTRODUCTION

Depuis les travaux initiaux de KREBS¹, un certain nombre de L-aminoacideoxydases ont été décrites chez des Mammifères², des Reptiles³, des microorganismes^{4,5} et des Oiseaux^{6,7}. Nous avons mis en évidence la présence d'un enzyme de ce type dans plusieurs groupes d'Invertébrés^{8,9}, entre autres chez la Moule (*Mytilus edulis* L). L'enzyme de l'hépatopancréas de celle-ci n'a pu être séparé des particules cellulaires; mais, parmi les nombreux Lamellibranches examinés, l'un des plus communs en Bretagne, *Cardium tuberculatum* L, s'est montré renfermer une L-aminoacideoxydase soluble¹⁰. Les caractères de cet enzyme, dont la principale particularité est d'être activable par l'ion magnésium, font l'objet de ce travail.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

L'activité de l'enzyme a été déterminée dans l'appareil de Warburg, par mesure

Bibliographie p. 122.

de l'absorption d'oxygène, à 30°, dans l'air et, sauf indications contraires, en présence de tampon au borate 0.05 *M*, de pH = 9, de L-leucine 0.0167 *M* comme substrat et de MgSO₄ 0.01 *M*. La quantité d'enzyme était telle que l'absorption était de 120 à 200 $\mu\text{l O}_2/\text{h}$ pour un volume total de 3 ml. La présence de potasse ou d'acide pour absorber le gaz carbonique ou l'ammoniac n'est pas nécessaire à ce pH. Les lectures sont faites à 5, 15, 25 et 35 min après l'introduction du substrat; pendant cette période, l'absorption est proportionnelle aux temps et l'on calcule l'activité, exprimée en $\mu\text{l/h}$, à partir de la différence obtenue entre les lectures à 5 et à 35 min. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité qui donne une absorption d'O₂ de 60 $\mu\text{l/h}$. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{l d'O}_2$ absorbés/h/mg de produit sec (Q_{O_2}) ou, dans les derniers stades de la purification, par le rapport A/E du nombre d'O₂ absorbés/h à la densité optique de la préparation à 275 m μ , mesurée sous 1 cm d'épaisseur.

L'ammoniac est dosé selon CONWAY, après oxydation complète du substrat. Le gel d'hydroxylapatite, utilisé dans la purification a été préparé selon TISELIUS¹¹. Pour la chromatographie préparative, nous avons utilisé des colonnes de 7 cm² \times 40 cm, avec un écoulement de 3 ml/cm² de section/h, obtenu par une surpression d'environ 30 cm Hg.

La flavine-dinucléotide a été fournie par General Biochemicals, Inc., Chagrins Falls (Ohio) et le flavine-mononucléotide par Hofmann-La Roche, comme les acides aminés, sauf l'acide DL- α -aminobutyrique, fourni par Dr. THÉODOR SCHUHARDT, et les acides DL- α -amino- δ -hydroxyvalérianique et DL- α -amino- ϵ -hydroxycaproïque préparés par le Professeur R. GAUDRY (Montréal).

Purification de l'enzyme

Les *Cardium* ont été pêchés dans la région de Concarneau (Finistère) et conservés au maximum 3 jours dans des bassins. Ils ont été traités par lots de 150 à 300 kg, dont l'ensemble, groupant environ 16,500 individus, atteignait 1,500 kg. Les hétopancréas, séparés de l'organisme, sont broyés ("waring blender") avec leur volume d'eau glacée et extraits à 3° pendant quelques heures, sous agitation mécanique. L'homogénat est centrifugé à 12,000 $\times g$ pendant 20 min. Une couche dense de graisse qui s'est rassemblée à la surface est éliminée par filtration sur coton de verre; le filtrat est dialysé contre 40 fois son volume d'eau, pendant 14 h à 5°. Après élimination du précipité, le dialysat est traité par 10 volumes d'acétone à -10°; le précipité, recueilli sur filtre de Büchner, est lavé par deux volumes d'acétone, puis séché sous vide sulfurique. La poudre acétonique ainsi obtenue, gardée à +5°, ne perd pas plus de 10 % de son activité en un an.

Elle est extraite à l'eau distillée (10 ml/g), puis centrifugée 20 min à 12,000 $\times g$. Le liquide surnageant (prép. I) est porté à 55° pendant 80 min, puis dialysé contre 40 fois son volume d'eau distillée, 12 h à 5°. Les protéines inactives qui flocculent pendant le chauffage sont éliminées par centrifugation. Le liquide surnageant (prép. II) est fractionné par (NH₄)₂SO₄ à pH = 4; le précipité recueilli entre 40 % et 55 % de saturation en sel est repris par l'eau; la solution amenée à pH = 6 est dialysée contre 100 fois son volume d'eau. Les protéines inactives qui précipitent sont éliminées par centrifugation et la solution enzymatique (prép. III) est soumise à un nouveau fractionnement, mais à pH = 6; le précipité recueilli entre 45 % et 55 % de la saturation en sel est traité de la même façon.

La préparation ainsi obtenue (prép. IV) est adsorbée sur une colonne d'hydroxylapatite, puis éluée avec un tampon de phosphate de sodium 0.001 *M* de pH = 6.8¹¹. L'éluat contenant l'enzyme est fractionné à nouveau entre 45 % et 55 % de la saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La solution enzymatique obtenue (prép. V) est utilisée après dialyse.

QO_2 de l'extrait de poudre acétonique (prép. I) varie de 2.5 à 5 suivant les récoltes. Il passe à environ 20 (prép. III), puis 50 (prép. IV) après les premiers fractionnements par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La colonne d'hydroxylapatite retient 85 % des protéines et 10 % seulement de l'activité. La valeur du rapport: *A/E* passe alors d'environ 70 à 350, puis à 700 par le dernier fractionnement à $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. La purification obtenue à partir du premier stade (prép. I) est de l'ordre de 100, avec un rendement de 30 %. La préparation contient encore des impuretés non protéiques, mais la difficulté d'obtenir des quantités plus grandes de matériel de départ nous a empêchés de pousser plus loin la purification de l'enzyme. L'intérêt du traitement thermique, en dehors du fait qu'il dénature un certain nombre de protéines inactives, réside surtout dans le fait qu'il conduit à une activation d'environ 50 %, que l'on peut attribuer à la destruction d'un inhibiteur protéique. L'activité varie suivant les époques de l'année; la plus grande a été trouvée dans les animaux pêchés en automne.

Caractères de l'enzyme purifié

Activation par le magnésium: Une perte importante d'activité s'observe au cours de la purification. La réactivation est obtenue par l'addition d'un extrait enzymatique bouilli, ou d'un extrait des cendres de la poudre acétonique. Le caractère minéral de l'activateur est donc probable; en fait l'ion Mg^{++} peut être substitué à l'extrait des cendres.

TABLEAU I
INHIBITION PAR FORMATEURS DE COMPLEXE

Corps ajouté	Activité prép. II μl/h	Activité prép. V μl/h
Témoin	149	137
Mg^{++} 0.01 <i>M</i>	183	402
Pyrophosphate 0.01 <i>M</i>	78	132
Versène 0.01 <i>M</i>	92	138

La réactivation obtenue par addition de Mg^{++} varie suivant le stade de la purification. L'activité résiduelle, sans magnésium, est égale, dans l'extrait brut de poudre acétonique, à 85 % de celle observée en la présence de celui-ci. Elle est un peu diminuée par le chauffage et la dialyse; après le premier fractionnement par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ elle tombe à 30 %.

L'activité résiduelle des préparations purifiées ne peut être diminuée ni par de nouvelles précipitations à pH = 4, ni par dialyse contre des solutions d'éthylène-diaminetétraacétate (versène) ou de pyrophosphate.

Le pourcentage de l'activité résiduelle est plus grand si la précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est réalisée à un pH > 4. Néanmoins il peut être ramené à 30 % par une précipitation ultérieure à pH = 4. Une dialyse contre du versène 0.001 *M* à pH = 6 est moins efficace; à pH = 4 elle détruit une grande partie de l'activité. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

paraît donc stabiliser l'enzyme, le pH devant s'abaisser notablement pour provoquer la dissociation du métal.

L'inhibition qu'exercent les formateurs de complexe tels que le versène et le pyrophosphate, confirme la présence probable d'un métal dans l'enzyme. La prép. II, très incomplètement purifiée, est inhibée par ces corps; elle l'est aussi (11 %) par l'acide citrique 0.01 *M*, mais non par le fluorure de sodium 0.01 *M* en présence de phosphate 0.01 *M*. Au contraire, la préparation purifiée (prép. V), n'est pas inhibée par les premiers, ce qui peut traduire l'absence d'un constituant métallique¹²⁻¹⁴ (Tableau I).

Pour identifier les métaux susceptibles d'activer l'enzyme purifié, celui-ci a été préincubé 15 min à 30° dans une solution tampon au véronal de pH = 9, 0.1 *M*, en présence de divers cations 0.001 *M* et l'activité a été mesurée après addition de 0.5 ml de L-leucine 0.1 *M* (Tableau II). Dans ces conditions, Mg⁺⁺ est le seul ion étudié possédant une action activatrice significative. Mn⁺⁺ et Hg⁺⁺ dénaturent vraisemblablement l'enzyme. De plus, en présence de l'ion Mg⁺⁺, les ions Ca⁺⁺, Sr⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺ et Be⁺⁺ sont sans influence sur l'activation due au premier. L'action de Mg⁺⁺ sur l'enzyme de *Cardium* est donc spécifique, alors que tel n'est pas le cas lors de l'activation de très nombreux autres enzymes par des cations divalents.

TABLEAU II
ESSAI D'ACTIVATION PAR DES IONS MÉTALLIQUES
Conditions expérimentales décrites dans le texte.

Métal ajouté	Anion du sel	Activité μl/h
—	—	58-64
Mg ⁺⁺	SO ₄ ⁻⁻	156-157
Ca ⁺⁺	Cl ⁻	63
Ba ⁺⁺	Cl ⁻	68
Sr ⁺⁺	Cl ⁻	73
Zn ⁺⁺	SO ₄ ⁻⁻	71
Cd ⁺⁺	SO ₄ ⁻⁻	62
Co ⁺⁺	NO ₃ ⁻	63
Ni ⁺⁺	NO ₃ ⁻	60
Mn ⁺⁺	SO ₄ ⁻⁻	0
Cu ⁺⁺	SO ₄ ⁻⁻	52
Pb ⁺⁺	CH ₃ COO ⁻	46
Hg ⁺⁺	Cl ⁻	0
K ⁺	Cl ⁻	59
Li ⁺	Cl ⁻	52
Be ⁺⁺	Cl ⁻	52
Fe ⁺⁺⁺	Cl ⁻	56

Variations de l'activité en fonction de la concentration en magnésium: La vitesse d'oxydation varie en fonction de la concentration en magnésium, suivant une courbe reproduite dans la Fig. 1, analogue aux courbes de dissociation. Dans le cas où un seul ion Mg⁺⁺ interviendrait pour chaque molécule d'enzyme, la loi d'action des masses appliquée à l'équilibre: $E + Mg \rightleftharpoons EMg$, permet le calcul de la constante de dissociation apparente K'_D par l'expression: $K'_D = Mg(V - v)/v$, dans laquelle V est la vitesse maximum et v la vitesse observée pour une concentration en magnésium Mg . Nous avons calculé par la forme linéaire de cette équation: $1/v = K'_D/V \cdot 1/Mg + 1/V$, la constante K'_D correspondant aux valeurs expérimentales obtenues pour des concentrations en magnésium variant entre 10^{-2} et $5 \cdot 10^{-2}$ *M*.

L'existence d'une activité résiduelle non liée à la présence de métal oblige à distinguer deux cas. D'une part, si cette activité est indépendante de la concentration en métal, il est légitime de retrancher sa valeur de toutes les valeurs observées. D'autre part, si l'activité résiduelle est soumise à des variations dues à la présence de magnésium, le calcul doit être fait à partir des valeurs expérimentales elles-mêmes.

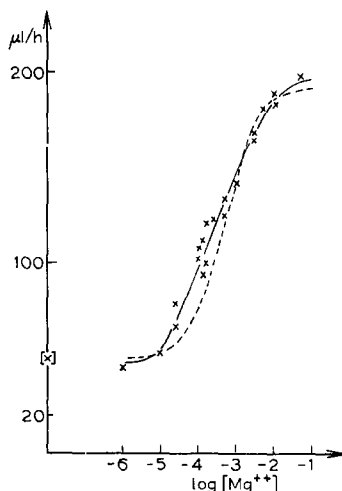


Fig. 1. Courbe d'activation de l'enzyme en fonction de $[Mg^{++}]$ à $pH = 9.1$. Abscisses: logarithme de la concentration en Mg^{++} . Ordonnées: O_2 absorbé/h, en μl . Volume total (3 ml), renfermant en dehors de $MgSO_4$, tampon borate à $pH = 9.1$, 50 mM; L-leucine, 16.7 mM et 0.5 ml d'enzyme (prép. V). Le point entre crochets marque l'activité obtenue sans addition de Mg^{++} . La courbe en pointillés est la courbe calculée (voir le texte).

La valeur de K'_D calculée dans le premier cas est de $5 \cdot 10^{-4} M$, et, dans le second de $3.5 \cdot 10^{-4} M$. Cette dernière valeur est certainement plus correcte, car la part de l'activité résiduelle devient alors négligeable; elle est néanmoins faussée par la fixation du magnésium sur les impuretés contenues dans la préparation enzymatique, et par une fixation non spécifique sur l'enzyme. On peut cependant remarquer qu'elle est du même ordre que celles trouvées pour d'autres enzymes activés par le magnésium, par MALSTRÖM¹² pour l'énolase et par GRIFFITHS et collaborateurs¹⁵ pour l'arginine-phosphokinase ($K'_D = 3.6 \cdot 10^{-4} M$) et par d'autres encore^{14, 16, 17} pour divers enzymes (de $1 \cdot 10^{-4}$ à $5 \cdot 10^{-4} M$). On a reporté sur la Fig. 1, une courbe calculée à partir de la valeur de K'_D obtenue dans le second cas, en majorant les valeurs calculées de l'activité résiduelle observée.

La fixation du magnésium à l'enzyme est immédiate; l'activité optima est obtenue sans préincubation. En effet, l'addition simultanée de leucine et de Mg^{++} conduit à la même activité que dans le cas où le métal est préincubé à 30° pendant 15 min avec l'enzyme. Par contre, l'addition de Mg^{++} 25 min après l'addition de leucine produit une activation moindre, toutefois d'autant plus complète que la concentration en Mg^{++} est plus grande.

Influence du pH: L'enzyme naturel présente une activité optima à un pH voisin de 9.10; l'activité décroît lentement au-dessous et rapidement au-dessus. L'enzyme purifié ne présente pas le même pH optimum en l'absence de magnésium ($pH = 7.6$) et en sa présence ($pH = 8.8$) (Fig. 2). Les variations d'activité en fonction du pH

d'un enzyme dépourvu de magnésium (courbe 1) passent par un maximum plus élevé que celles observées en présence de métal (courbe 2), établies avec un tampon au tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris).

Action d'autres effecteurs: Le fait que le maximum à $\text{pH} = 7.6$, en l'absence de Mg^{++} , soit supérieur à celui déterminé à $\text{pH} = 8.8$ en présence du métal (Fig. 2) est dû à l'action activatrice du tampon Tris. En effet, comme le montrent les Tableaux III et IV, ce tampon double l'activité de l'enzyme, aussi bien à $\text{pH} = 7.6$ qu'à $\text{pH} = 9$. Le tampon véronal est sans influence notable sur l'activité à $\text{pH} = 9$, tandis que le borate produit une inhibition nette. L'activation par le Tris n'empêche pas l'activation par Mg^{++} à $\text{pH} = 9$, tandis qu'à $\text{pH} = 7.6$ le métal diminue fortement la première; dans ce cas, des concentrations croissantes en Mg^{++} provoquent une inhibition apparente (Fig. 3).

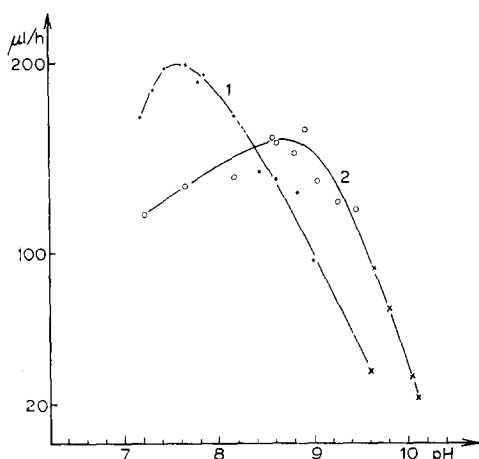


Fig. 2. Variation de l'activité en fonction du pH, en l'absence et en la présence de l'ion Mg^{++} . Abscisses: pH du mélange réactionnel, mesuré après l'essai. Ordonnées: O_2 absorbé/h, en μl . Volume total (3.1 ml): tampon au pH indiqué, 50 mM; L-leucine, 16.7 mM et 0.5 ml d'enzyme; 0.1 ml de KOH à 20% dans le compartiment central. Pour la courbe 2, il y a de plus une concentration de MgSO_4 égale à 10 mM. O = tampon Tris; \times = tampon carbonate.

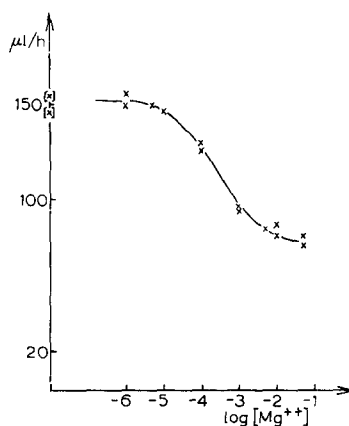


Fig. 3. Inhibition apparente par Mg^{++} à $\text{pH} = 7.6$, en présence de Tris. Abscisses: logarithme de la concentration en Mg^{++} . Ordonnées: O_2 absorbé/h, en μl . Volume total (3.1 ml) renfermant en dehors de MgSO_4 : Tris à $\text{pH} = 7.6$, 50 mM; L-leucine, 16.7 mM et 0.5 ml d'enzyme; on a ajouté 0.1 ml de KOH à 20% dans le compartiment central. Les points entre crochets marquent l'activité obtenue sans addition d'ion Mg^{++} .

TABLEAU III
INFLUENCE DES TAMPONS SUR L'ACTIVITÉ
Les chiffres expriment μl O_2 absorbé par heure.

Tampon $\text{pH} \approx 9$	—	Véronal 0.1 M	Tris 0.1 M	Borate 0.05 M
Sans Mg^{++}	81	75	162	46
Avec Mg^{++}	215	193	201	181

Lorsque le métal de l'enzyme (prép. II) n'a pas été dissocié par la précipitation à $\text{pH} = 4$ l'activation par le Tris est moindre: l'addition de pyrophosphate, qui le fixe, permet au Tris d'exercer une action plus marquée (Tableau V).

TABLEAU IV
ACTION DU TRIS ET DE L'ION AMMONIUM SUR L'ACTIVITÉ

Corps ajouté	Sans tampon pH = 7.6	Tris 0.1 M pH = 7.6	Véronal 0.1 M pH = 9	Tris 0.1 M pH = 9
—	120	232	77	153
Mg ⁺⁺ 0.01 M	134		198	219
NH ₄ ⁺ 0.1 M	217		153	
Pyrophosphate 0.01 M		241		97
Versène 0.01 M				120

TABLEAU V

ACTIVATION PAR LE PYROPHOSPHATE EN PRÉSENCE DU TAMPON TRIS 0.1 M, pH = 7.6

	Prép. I	Prép. II	Prép. III	Prép. V
Activité μ l/h	143	171	164	246
Activité en présence de pyrophosphate 0.01 M	162	207	159	244

L'influence de celui-ci paraît être de même nature que celle du métal; elle est également réduite par le pyrophosphate et, dans une mesure moindre, par le versène. L'ion ammonium exerce le même effet que le Tris (Tableau IV); il est activateur à pH = 7.6 comme à pH = 9.

L'enzyme n'est sensible à aucun des effecteurs suivants: parachloromercurobenzoate (10^{-3} M), acide iodoacétique ($2 \cdot 10^{-3}$ M), cyanure de potassium (10^{-2} M), semicarbazide (10^{-2} M), acide de sodium (10^{-2} M) et acide sulfanilique (10^{-2} M).

Spécificité et inhibition par certains acides aminés non oxydables: L'étude de la spécificité a été poursuivie à pH = 7.6 en l'absence de Mg⁺⁺ et à pH = 8.8 en la présence de celui-ci, à la concentration en substrat de 0.0167 M. Le Tableau VI expose les résultats obtenus avec 24 acides aminés, les vitesses d'oxydation étant exprimées en pourcentage de celle de la L-leucine. La spécificité absolue est la même à pH = 7.6 et à pH = 8.8; elle présente toutefois quelques variations dans les vitesses relatives d'oxydation et ne varie pas au cours des purifications¹⁰.

Nous avons par ailleurs étudié l'action des acides aminés non oxydables sur la désamination oxydative de la leucine (Tableau VII). On observe une forte inhibition par les acides aminés à chaîne courte (alanine, glycine et sérine) aux pH = 7.6 et 9.2. La D-alanine est aussi un inhibiteur énergique, comme la proline, à pH = 9, mais non à pH = 7.6. Les autres acides aminés inhibent dans une proportion moindre.

La représentation selon LINEWEAVER ET BURK¹⁸ de l'inhibition de l'oxydation de la leucine par divers acides aminés non-oxydables, fait ressortir (Figs. 4 et 5) une différence dans la nature de cette inhibition suivant les conditions expérimentales adoptées. A pH = 7.6, en l'absence de Mg⁺⁺ (Fig. 4), l'inhibition par la sérine, l'alanine, la valine et la proline est concurrente; à pH = 9 et en présence de Mg⁺⁺ (Fig. 5), l'inhibition par la proline, l'alanine, l'isoleucine, et la thréonine est non concurrente. Ces différences ne sont pas dues aux variations du pH, mais à la présence de Mg⁺⁺. En effet, à pH = 9 et sans addition de Mg⁺⁺, l'alanine est un inhibiteur concurrent de l'oxydation de la leucine par l'enzyme purifié, alors que la préparation

TABLEAU VI

SPÉCIFICITÉ DE L'ENZYME PURIFIÉ À pH = 8.8 EN PRÉSENCE DE Mg^{++} ET À pH = 7.6
EN L'ABSENCE DE Mg^{++}

Les fioles contiennent: tampon Tris à pH = 8.8 pour la colonne 1 et à pH = 7.6 pour la colonne 2, 50 mM; acide aminé, concentration par rapport à la forme L, 16.7 mM; $MgSO_4$, 10 mM dans le cas de la colonne 1, et 0.5 ml d'enzyme; on a ajouté 0.1 ml de KOH à 20 % dans le compartiment central dans le cas de la colonne 2.

Corps essayé	¹ pH = 8.8	² pH = 7.6
L-leucine	100	100
ac. DL- α -aminobutyrique	30	32
DL-norvaline	70	86
DL-norleucine	60	57
ac. DL- α -amino- δ -hydroxyvalérianique	32	22
ac. DL- α -amino- ε -hydroxycaproïque	51	25
DL-méthionine	38	20
L-phénylalanine	70	112
L-tryptophane	47	36
L-lysine	18	15
L-histidine	40	33
L-arginine	25	10
L-citrulline	76	89
L-ornithine	25	48
L-asparagine	33	33
glycine	0	0
DL-alanine	0	0
L-valine	0	0
L-isoleucine	0	0
DL-sérine	0	0
DL-thréonine	0	0
ac. L-aspartique	0	0
ac. L-glutamique	0	0
L-proline	0	0
D-alanine		0
D-leucine		0
D-histidine		0

TABLEAU VII

INHIBITION PAR LES ACIDES AMINÉS NON OXYDABLES

Les fioles contiennent, pour un volume total de 3.0 ou 3.1 ml: tampon Tris au pH indiqué, 50 mM; L-leucine, 16.7 mM; acide aminé non oxydable, 16.7 mM, sauf pour les acides dicarboxyliques (8.4 mM) et les acides aminés de la forme D (33.3 mM); 0.5 ml d'enzyme; plus $MgSO_4$ pour les essais à pH = 9.2; on a ajouté, pour les essais à pH = 7.6, 0.1 ml de KOH à 20 % dans le compartiment central.

Acide aminé	% inhibition à pH = 7.6	% inhibition à pH = 9.2
DL-alanine	89	71
glycine	51	56
L-proline	24	74
L-sérine	54	73
L-thréonine	20	14
L-isoleucine	12	14
L-valine	24	30
ac. L-aspartique	13	12
ac. L-glutamique	26	
D-histidine	12	
D-leucine	5	
D-alanine	39	

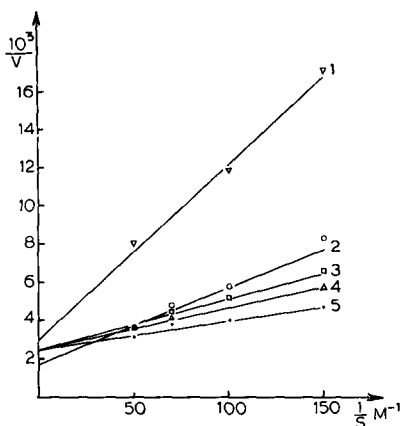


Fig. 4. Inhibition par les acides aminés non oxydables à $\text{pH} = 7.6$. Abscisses: inverse de la concentration en leucine, en M^{-1} . Ordonnées: inverse de l'activité, en $10^3 \text{ h}/\mu\text{l}$. Les fioles contiennent, pour un volume total de 3.1 ml: tampon Tris à $\text{pH} = 7.6$, 0.1 M; leucine, concentration indiquée et sérine, 16.7 mM pour la courbe 1; alanine, 2 mM pour la courbe 2; valine, 16.7 mM pour la courbe 3; proline, 16.7 mM pour la courbe 4. La courbe 5 est réalisée sans addition d'acide aminé non oxydable; on a ajouté 0.1 ml de KOH à 20 % dans le compartiment central.

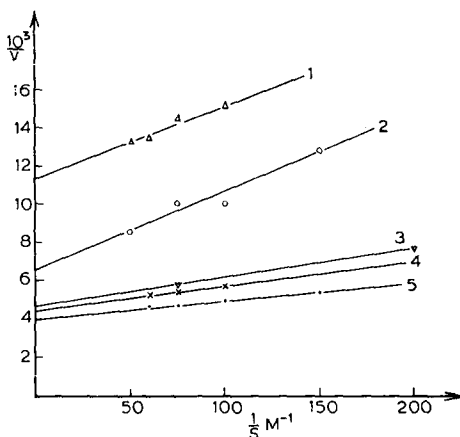


Fig. 5. Inhibition par les acides aminés non oxydables à $\text{pH} = 9$. Abscisses: inverse de la concentration en leucine en M^{-1} . Ordonnées: inverse de l'activité en $10^3 \text{ h}/\mu\text{l}$. Les fioles contiennent, pour un volume total de 3 ml: tampon Tris à $\text{pH} = 9$, 50 mM; MgSO_4 , 10 mM; leucine, concentration indiquée et proline, 10 mM pour la courbe 1; alanine, 2 mM pour la courbe 2; isoleucine, 33 mM pour la courbe 3; thréonine, 16.7 mM pour la courbe 4. La courbe 5 a été réalisée sans addition d'acide aminé nonoxydable.

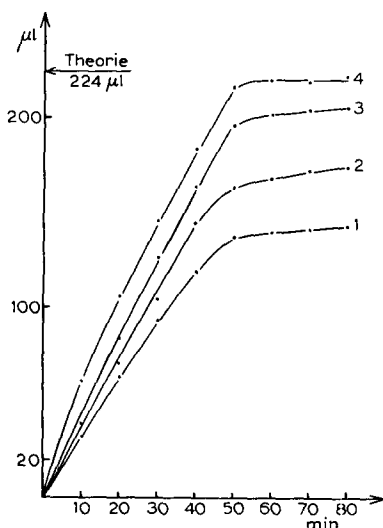
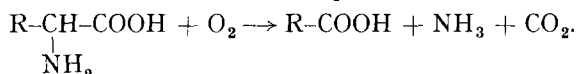


Fig. 6. Oxydation couplée de l'éthanol. Abscisses: temps, en minutes. Ordonnées: O_2 absorbé, en μl . Les fioles contiennent, pour un volume total de 3.1 ml: tampon Tris 50 mM; L-leucine, 10^{-5} mole et 0.5 ml d'enzyme; plus, pour les courbes 1, 2 et 3, 0.1 ml d'éthanol à 10 %, pour la courbe 4, 0.3 ml d'éthanol à 30 %; et respectivement pour les courbes: 1, 2, 3 et 4, 100 μg , 500 μg , 1000 μg et 1200 μg de catalase cristallisée; on a ajouté 0.1 ml de KOH à 20 % dans le compartiment central.

II est inhibée d'une manière non concurrente par l'alanine et la proline à pH = 7.6.

L'inhibition qu'exercent les acides aminés non oxydables est donc liée à la longueur de la chaîne carbonée, quant à son degré, et à la présence de magnésium, quant à sa nature (caractère concurrent).

Mécanisme de la réaction d'oxydation. Le bilan stoechiométrique de l'oxydation correspond au schéma de réaction admis pour les L-aminoacideoxydases, soit :



L'absorption d'O₂ est égale, pour 10⁻⁵ mole de L-leucine, à 223 μl (théorie: 224 μl) en l'absence de catalase. En présence de celle-ci par contre, l'absorption n'est plus que de 124 μl, soit un peu supérieure à l'absorption théorique: 112 μl. La formation d'H₂O₂ est d'ailleurs prouvée par les essais d'oxydation couplée réalisés selon KEILIN ET HARTREE¹⁹ (Fig. 6). Au fur et à mesure que les quantités de catalase augmentent, l'utilisation d'H₂O₂ pour l'oxydation de l'éthanol, prédomine de plus en plus sur la dégradation catalasique. On a déterminé dans 3 essais, le rapport de l'absorption d'O₂ à NH₃ formé, en l'absence de catalase et en utilisant la leucine comme substrat; il est égal à 0.91, 0.93 et 0.97.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

La spécificité et les caractères stoechiométriques de la réaction que catalyse l'enzyme extrait de l'hépatopancréas de *Cardium tuberculatum* L permettent de le classer parmi les L-aminoacideoxydases. Par analogie avec d'autres enzymes de ce groupe, et en raison de la formation d'H₂O₂, il est vraisemblable qu'il contienne un coenzyme flavinique. Néanmoins, l'addition de flavine-adeninedinucléotide ou de flavine mononucléotide à différents stades de purification n'a pas exercé d'activation; toutefois des co-facteurs éventuels ont pu ne pas être alors réversiblement dissociés, comme tel est aussi le cas dans les L-aminoacideoxydases de *Neurospora*⁵, de rein de Rat²⁰ et de venin de Mocassin²¹.

La spécificité de l'enzyme est la même pour l'extrait brut de poudre acétonique que pour le produit purifié, à pH = 9 en la présence de Mg⁺⁺, comme à pH = 7.6 et en l'absence de cet ion. L'enzyme présente une spécificité analogue à celle de la L-aminoacideoxydase de l'hépatopancréas de Moule^{9,10}; par contre, celui du venin de Cobra²² n'oxyde pas les acides aminés basiques.

L'enzyme de *Cardium* dégrade plus énergiquement les acides aminés monoaminés et monocarboxylés que les acides aminés basiques, ce qui tient sans doute à la présence dans ceux-ci d'un groupe basique en ω, puisque la citrulline est oxydée, presque aussi rapidement que la leucine, tandis que l'arginine et l'ornithine ne le sont qu'à une vitesse plus faible. Les acides aminés dicarboxylés ne sont pas dégradés tandis que l'asparagine l'est. L'acide α-aminobutyrique est oxydable par l'enzyme, alors que la valine et la thréonine ne le sont pas. De même, l'isoleucine est seule réfractaire à l'action enzymatique parmi les trois leucines isomères. L'introduction d'un second carboxyle ou celle d'un substituant sur le carbone β, révèle donc un acide aminé réfractaire à l'action de l'enzyme. Enfin, les acides aminés dont la chaîne carbonée comprend moins de quatre atomes de carbone (alanine, glycine) ne sont pas oxydables.

L'inhibition, qu'exercent sur la désamination oxydative de la leucine, les acides

aminés inaptes à servir de substrat, montre qu'ils présentent toutefois une affinité appréciable pour l'enzyme. Celle-ci est plus grande pour les corps de cette série dont la chaîne linéaire renferme moins de quatre atomes de carbone, que pour les acides aminés dont le carbone β est porteur d'un substituant ou renfermant deux groupements carboxyles.

On peut, dès lors, considérer que, pour servir de substrat à la L-aminoacidoxydase de *Cardium*, un acide aminé doit présenter la structure d'une alanine substituée: $R-CH_2-\underset{\substack{| \\ NH_2}}{CH}-COOH$, où R comporte au moins un atome de carbone, qui peut être lié

à une chaîne aliphatique, à un cycle ou à un reste d'amide. Un groupement hydroxylé compris dans R diminue la vitesse d'oxydation, un groupe basique plus notablement encore, et un radical carboxylique l'annule. Un deuxième substituant sur le carbone β (isoleucine) fait perdre à l'acide α -aminé son caractère de substrat.

L'enzyme de *Cardium* est la première L-aminoacidoxydase pour laquelle une activation par un métal a été observée. L'inhibition de l'enzyme brut par le versène ou le pyrophosphate, l'inactivation progressive à la suite des fractionnements par $(NH_4)_2SO_4$ à pH = 4, la réactivation de l'enzyme purifié par Mg^{++} , à l'exclusion d'autres métaux, l'existence du même pH optimum d'activité pour l'enzyme brut et l'enzyme réactivé sont en faveur de la présence de magnésium dans le complexe enzymatique naturel. On peut envisager que le rôle de ce métal est de déterminer une modification des charges à la surface de la protéine enzymatique, ce qui modifierait la fixation du substrat sur elle. Cette interprétation rend compte du pouvoir inhibiteur, concurrent ou non, des acides aminés non oxydables, selon qu'il s'exerce en la présence ou en l'absence de métal. Elle permet d'interpréter également l'action du tampon Tris et de l'ion ammonium, avec cette différence que la modification provoquée par le métal, mais non celle déterminée par le Tris et l'ion NH_4^+ , sans doute plus profonde, entraînerait simultanément un déplacement du pH optimum d'action.

La L-aminoacidoxydase de *Cardium tuberculatum* peut donc être considérée comme un enzyme associé au magnésium dans la nature ou renfermant celui-ci. A cet égard, elle possède un caractère particulier qui permet de la distinguer d'autres L-aminoacidoxydases, indépendamment de sa spécificité, qui s'étend aux acides aminés basiques.

RÉSUMÉ

1. La L-aminoacide oxydase de l'hépatopancréas de *Cardium tuberculatum* L a été purifiée et étudiée.

2. La spécificité de l'enzyme vis-à-vis de 24 acides aminés a été étudiée et discutée; elle s'étend aux acides aminés basiques. La configuration structurale qui permet l'oxydation enzymatique a été précisée. Certains des acides aminés ne servant pas de substrat à l'enzyme exercent sur lui une inhibition concurrente, ou non selon qu'elle a lieu en l'absence ou en la présence de Mg^{++} .

3. La L-aminoacidoxydase perd 85 % de son activité au cours de la purification, elle est réactivable par l'ion Mg^{++} (pH optimum d'action: 8.8) à l'exclusion de nombreux autres ions métalliques étudiés. Mg^{++} présente à cet égard une spécificité étroite, que l'on ne rencontre pas dans les cas d'autres enzymes activables par des cations divalents.

4. La fraction de l'enzyme demeurant active en l'absence de Mg^{++} , oxyde les mêmes acides aminés et présente une activité optima à un pH différent (7.6); elle est activable par le tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ H. A. KREBS, *Z. physiol. Chem.*, 217 (1933) 191; *Biochem. J.*, 29 (1935) 1620.
- ² M. BLANCHARD, D. E. GREEN, V. NOCITO ET S. RATNER, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 421.
- ³ E. A. ZELLER ET A. MARITZ, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1888.
- ⁴ P. K. STUMPF ET D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 387.
- ⁵ K. BURTON, *Biochem. J.*, 50 (1951) 258;
P. S. THAYER ET N. H. HOROWITZ, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 755.
- ⁶ P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. rend.*, 241 (1955) 613.
- ⁷ J. STRUCK ET I. W. SIZER, *Federation Proc.*, 16 (1957) 257.
- ⁸ J. ROCHE, NG. V. THOAI ET P.-E. GLAHN, *Experientia*, 8 (1952) 428.
- ⁹ H. BLASCHKO ET D. B. HOPE, *Biochem. J.*, 62 (1956) 335.
- ¹⁰ P.-E. GLAHN, PH. MANCHON ET J. ROCHE, *Compt. rend. soc. biol.*, 149 (1955) 509.
- ¹¹ A. TISELIUS, S. HJERTEN ET O. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- ¹² B. G. MALMSTRÖM, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 381.
- ¹³ E. ADAMS ET E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 671.
- ¹⁴ S. A. KUBY, L. NODA ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 65.
- ¹⁵ D. E. GRIFFITHS, J. F. MORRISON ET A. H. ENNOR, *Biochem. J.*, 65 (1957) 153.
- ¹⁶ E. L. SMITH ET D. H. SPACKMAN, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 271.
- ¹⁷ A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 779.
- ¹⁸ H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- ¹⁹ D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Proc. Roy. Soc.*, 119-B (1936) 141; *Biochem. J.*, 39 (1945) 293.
- ²⁰ M. BLANCHARD, D. E. GREEN, V. NOCITO ET S. RATNER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 583.
- ²¹ T. P. SINGER ET E. B. KEARNEY, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 348.
- ²² A. E. BENDER ET H. A. KREBS, *Biochem. J.*, 46 (1950) 210.

THE EFFECT OF METAL IONS AND PROTEINS ON THE STABILITY OF THE β -GALACTOSIDASE OF *ESCHERICHIA COLI*

HOWARD V. RICKENBERG

Department of Microbiology, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Wash. (U.S.A.)

(Received November 24th 1958)

SUMMARY

It was found that the β -galactosidase of crude extracts of *Escherichia coli* lost activity when diluted to protein concentrations below 100 μ g per ml unless protected by the manganous ion. A variety of extraneous proteins also protected the bacterial β -galactosidase against loss of activity.

The enzyme was completely inactivated by prolonged dialysis against H_2O . This inactivation appeared to be independent of the protein concentration. The presence during dialysis of any one of a number of salts protected β -galactosidase against loss of activity.

The following abbreviations have been used: β -g, β -galactosidase; ONPG, *o*-nitrophenyl- β -galactoside; NRS, normal rabbit serum; BSA, bovine albumin plasma fraction V (Armour Laboratories); phosphate buffer, sodium phosphate buffer, 0.05 *M*, pH 7; EDTA, (ethylenediamino) tetraacetic acid disodium salt.

References p. 129.