

Etude comparée des séquences N-terminales des chymotrypsinogènes A et B

Il est intéressant de comparer les structures des deux chymotrypsinogènes (chymotrypsinogène A (ChTg-A) et chymotrypsinogène B (ChTg-B)) synthétisés par le pancréas de boeuf en vue selon toute apparence de la même fonction biologique. On sait déjà que ces précurseurs sont constitués par une seule chaîne peptidique¹ et qu'ils possèdent la même séquence N-terminale² (Cys-Gly-Val), des séquences C-terminales analogues² et des poids moléculaires voisins^{3,4}. Mais leurs compositions globales en amino acides^{3,4} et leurs points isoélectriques diffèrent notablement. L'objet de la présente note est de montrer que les 17 premiers résidus des précurseurs sont identiques, à l'exception du résidu 14 qui est la sérine dans ChTg-A et l'alanine dans ChTg-B.

Lorsque ChTg-B pur¹ est activé par la trypsine dans les conditions provoquant l'activation "rapide" de ChTg-A, il apparaît 1 résidu d'isoleucine N-terminale par mole. Mais, ni la sérylarginine, ni aucun autre peptide spécifique ne peuvent être décelés par chromatographie directe sur Dowex-50 ou chromatographie sur papier des dérivés dinitrophénylés. Il est donc vraisemblable que l'activation primaire des deux précurseurs, c'est à dire la formation de ChT-A _{π} et ChT-B _{π} ^{*}, résulte, comme on l'a d'ailleurs déjà envisagé⁵, de la rupture du même type de liaison. Mais, dans le cas de ChTg-B, cette rupture ne paraît pas être aussitôt suivie, comme dans le cas de ChTg-A, de l'autolyse⁶ d'une liaison voisine. Un tel fait peut s'expliquer par une activité moindre de ChT-B _{π} ou par une différence spécifique de structure à l'endroit précis où l'autolyse doit normalement s'effectuer.

La seconde hypothèse est susceptible d'être vérifiée en comparant la structure des chaînes A^{***} de ChT-A _{π} et ChT-B _{π} . Les deux précurseurs (20 mg/ml de solution) sont donc activés à 0° durant 1.5 h par la trypsine (1/40° en pds) dans un tampon à pH 7.8 0.05 M en phosphate et 0.1 M en β -phénylpropionate. Après addition d'un gros excès de DFP, les solutions sont dialysées contre HCl 10⁻³ M, centrifugées, déchlorurées sur Dowex-2 et oxydées par l'acide performique⁸. Les produits lyophilisés (60 mg) sont traités à l'eau et les extraits sont chromatographiés⁸ dans une colonne (1.5 \times 40 cm) de Sephadex G-50 équilibrée avec HCl 0.005 N. Les fractions qui composent le deuxième pic^{***} (élution pour un volume compris entre 2 et 3 fois le volume de rétention de la colonne) sont lyophilisées, reprises dans 1 ml de formiate d'ammonium 0.2 M à pH 3.25 et chromatographiées à nouveau dans une colonne (0.9 \times 15 cm) de Dowex-50 X2 équilibrée avec le tampon précédent. L'établissement d'un gradient exponentiel de force ionique et de pH (1ère chambre, 100 ml de formiate d'ammonium 0.2 M à pH 3.25; 2ème chambre, acétate d'ammonium 1.0 M à pH 5.15) fait sortir dans les deux cas un grand pic symétrique situé dans la région des peptides neutres (6ème volume de rétention de la colonne après l'établissement du gradient).

Abbreviations: ChTg-A, chymotrypsinogène A; ChTg-B, chymotrypsinogène B.

* On connaît à l'heure actuelle trois chymotrypsines (π , δ , α) dérivant de ChTg-A. Elles sont désignées par les symboles ChT-A _{π} , ChT-A _{δ} et ChT-A _{α} . La chymotrypsine primaire issue de ChTg-B est désignée par le symbole ChT-B _{π} .

** Le symbole A' est utilisé ici afin de bien marquer qu'il s'agit de chaînes appartenant à des chymotrypsines de type π , au sein desquelles l'autolyse ne s'est pas produite, et non de chaînes "A" comme celle existant par exemple au sein de ChT-A _{α} (réf. 7).

*** Ce pic, dépourvu d'acides aromatiques, est trouvé par des mesures d'absorption à 230 m μ (réf. 8).

Des analyses effectuées à l'aide d'un appareil automatique Spinco Beckman donnent les formules brutes suivantes pour les chaînes A' ainsi isolées:

Chaîne A' de ChT-A_π:

Ala_{1.00}, Arg_{0.86}, CySO₃H_{0.98}, Glu_{1.88}, Gly_{2.83}, Ileu_{0.98}, Leu_{1.98}, Pro_{2.07}, Ser_{1.89}, Val_{1.97}.

Chaîne A' de ChT-B_π:

Ala_{2.00}, Arg_{1.00}, CySO₃H_{1.00}, Glu_{1.98}, Gly_{2.02}, Ileu_{0.97}, Leu_{1.97}, Pro_{2.03}, Ser_{0.96}, Val_{1.98}.

On voit que la composition de la chaîne A' de ChT-A_π correspond exactement à celle de la chaîne A (réf. 7), plus les deux résidus Ser et Arg éliminés à l'état de Ser-Arg au cours de l'autolyse. La chaîne A' de ChT-B_π contient le même nombre de résidus, soit 15. Mais un résidu de sérine y est remplacé par un résidu d'alanine. En attaquant les chaînes par les carboxypeptidases B et A, on s'aperçoit que le remplacement est intervenu en position 14, juste avant le résidu C-terminal d'arginine.

Afin de vérifier que le reste de leur structure est bien identique, les chaînes (2 μmoles/ml) sont traitées par la subtilisine* (280 μg/ml) à pH 8.0 et 20° durant 6 h. Des chromatographies des hydrolysats sur Dowex-50 X2 donnent deux diagrammes analogues, permettant d'identifier les peptides suivants: (CySO₃H, Gly, Val, Pro, Ala), (Ileu, Val, Pro, Glu), (Leu, Ser) et (Gly, Leu). Le diagramme correspondant à la chaîne A' de ChT-A_π contient en outre le peptide (Ser, Arg) et celui correspondant à ChT-B_π, le peptide (Ala, Arg). Le peptide donnant après hydrolyse Ileu, Val, Pro et Glu se trouve dans la région des peptides neutres, mélangé avec Gly, Leu. Il renferme ainsi un résidu de glutamine, non d'acide glutamique.

Compte tenu des résultats antérieurement obtenus^{4,7} sur la chaîne A de ChT-A_α, il est donc tout à fait vraisemblable que les deux chaînes A' ont la même structure, sauf en position 14.

Cys-Gly-Val-Pro-Ala-Ileu-Val-Pro-Glu(NH₂)-Leu-Ser-Gly-Leu-(Ser ou Ala)-Arg.

A la droite de l'arginine, se trouve dans les deux cas la séquence Ileu-Val. La comparaison porte donc en définitive sur les 17 premiers résidus de ChTg-A et ChTg-B.

La substitution en position 14 de l'alanine à la sérine au sein de séquences par ailleurs identiques s'étendant sur 17 résidus est intéressante car elle révèle l'existence d'une variation spécifique de l'information contrôlant la biosynthèse de deux enzymes pancréatiques étroitement apparentés. C'est elle probablement qui empêche, de façon directe ou par le biais d'une modification de structure tertiaire, l'autolyse de ChT-B_π, même en l'absence de β-phénylpropionate.

Les résultats précédents montrent également que l'activation des deux précurseurs est déterminée par la rupture de la même liaison (liaison Arg-Ileu) occupant la même position dans les chaînes (entre les résidus 15 et 16).

Au cours de ce travail, nous avons été aidés par le Centre National de la Recherche Scientifique, le Fonds de Développement de la Recherche Scientifique et Technique (Convention 61-FR-113), le Public Health Service (Grant A-4642) et la Fondation Rockefeller (Grant RF 62022).

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

O. GUY
M. ROVERY
P. DESNUELLE

* Nous remercions le Dr. M. OTTESEN, Directeur du Laboratoire Carlsberg, qui nous a aimablement fourni un échantillon de subtilisine A cristallisée et communiqué les conditions expérimentales utilisées par Mrs. B. MEEDOM dans son étude de la structure de la chaîne A de ChT-A_α (réf. 7).

- ¹ M. ROVERY, O. GUY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 554.
² B. KASSEL ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 413.
³ B. KASSEL ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1996.
⁴ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Advan. Protein Chem.*, 16 (1961) 139.
⁵ B. KASSEL ET M. LASKOWSKI, *Federation Proc.*, 19 (1960) 332.
⁶ F. R. BETTELHEIM ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 241.
⁷ B. MEEDOM, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 429.
⁸ DINH VAN HOANG, M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 613.

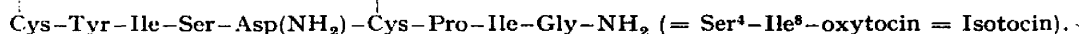
Reçu le 13 octobre, 1962

Biochim. Biophys. Acta, 69 (1963) 191-193

PN 1183

The synthesis of Ser⁴-Ile⁸-oxytocin (Isotocin)

The oxytocic principle from the pituitaries of the teleost fishes *Pollachius virens* L., *Merluccius merluccius* L. and *Gadus luscus* L. was isolated by ACHER and coworkers¹. They proposed for the new hormone the nonapeptide structure having the following amino acid sequence



We have synthesized this nonapeptide in the manner outlined in Fig. 1*.

N-Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-serine methyl ester (I) was prepared from *N*-carbobenzoxy-L-isoleucine² and methyl L-serinate³ by the mixed anhydride procedure (yield 62%; m.p. 180.5-181.5° (ethyl acetate-petroleum ether); $[\alpha]_D^{25} = +3.9^\circ$ (in dimethylformamide). Calcd. for C₁₈H₂₆N₂O₆: C, 59.00; H, 7.16; N, 7.64%. Found: C, 59.15; H, 7.05; N, 7.75%). Catalytic hydrogenation of the protected dipeptide I in methanol-conc. HCl gave the hydrochloride of L-isoleucyl-L-serine methyl ester (II) (yield 88%; m.p. 203-204° (decomp.) (methanol-acetone-ether); $[\alpha]_D^{25} = +12.6^\circ$ (in methanol). Calcd. for C₁₀H₂₀N₂O₄·HCl: C, 44.70; H, 7.88; N, 10.42; Cl, 13.19%. Found: C, 44.61; H, 7.61; N, 10.26; Cl, 13.28%). The coupling of *S*-benzyl-*N*-tosyl-L-cysteinyl-L-tyrosine⁴ with II according to the *N,N'*-dicyclohexyl-carbodiimide method in dimethylformamide-acetonitrile gave *S*-benzyl-*N*-tosyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-serine methyl ester (III) (yield 45%; m.p. 219-221° (methanol); $[\alpha]_D^{25} = -16.2^\circ$ (in pyridine). Calcd. for C₃₆H₄₆N₄O₉S₂: C, 58.20; H, 6.25; N, 7.53; S, 8.64%. Found: C, 58.28; H, 6.27; N, 7.71; S, 8.64%), which was converted to the corresponding hydrazide IV (yield 61%; m.p. 226-229° (decomp.) (dimethylformamide-acetonitrile); $[\alpha]_D^{25} = -69.2^\circ$ (in formic acid). Calcd. for C₃₅H₄₆N₆O₈S₂: C, 56.58; H, 6.25; N, 11.32; S, 8.64%. Found: C, 56.50; H, 6.26; N, 11.40; S, 8.57%). Hydrazinolysis of *N*-carbobenzoxy-L-asparaginyl-*S*-benzyl-L-cysteine methyl ester⁵ afforded *N*-carbobenzoxy-L-asparaginyl-*S*-benzyl-L-cysteine hydrazide (V) (yield 70%; m.p. 214.5-215.5° (decomp.) (dimethylformamide-acetonitrile); $[\alpha]_D^{25} = -29.7^\circ$ (in dimethylformamide). Calcd. for C₂₂H₂₇N₅O₆S: C, 55.79; H, 5.75; N, 14.79; S, 6.77%. Found: C, 55.79; H, 5.61; N, 14.89; S, 6.83%). Reaction of the hydrazide V with NaNO₂ in dimethylformamide-1 *N* HCl gave the azide, which was condensed with L-prolyl-L-isoleucylglycinamide⁶ in dimethylformamide to obtain *N*-carbobenzoxy-L-asparaginyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucylglycin-

* All of the intermediates with the exception of the protected nonapeptide VIII, which contained a minor impurity, were found to be homogeneous by thin-layer chromatography using several solvent systems.