

specimen of wound callus. We are also grateful to Professor C. RIMINGTON, F.R.S., and Mrs. A. LATTER from U.C.H.M.S., London, for their kind assistance in the preparation of the manuscript.

*Departamento de Química Biológica,
Orientación Química Biológica I,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Perú 272, Buenos Aires (Argentina)*

H. A. TIGIER
A. M. DEL C. BATLLE
G. LOCASCIO

- 1 D. SHEMIN AND C. S. RUSSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4873.
- 2 A. NEUBERGER AND J. J. SCOTT, *Nature*, 172 (1953) 1093.
- 3 A. M. C. BATLLE, A. M. FERRAMOLA AND M. GRINSTEIN, *Biochem. J.*, 104 (1967) 244.
- 4 D. L. NANDI, *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, 1963, p. 196.
- 5 C. O. MILLER, *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, 1963, p. 196.
- 6 D. J. MOORE AND R. F. LABBE, *Clin. Chem.*, 10 (1964) 1105.
- 7 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 8 J. BODMAN, in I. SMITH AND W. HEINEMANN, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. 2, Interscience, London, 1960, p. 127.
- 9 A. E. HARVEY, JR., J. A. SMART AND E. S. AMIS, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 26.

Received July 17th, 1967

Revised manuscript received September 15th, 1967

Biochim. Biophys. Acta, 151 (1968) 300-302

PRELIMINARY NOTES

BBA 61154

Spécificité "hydrophobique" d'une endopeptidase isolée de *Bacillus megaterium*

Un enzyme protéolytique exocellulaire provenant d'une culture en phase exponentielle de *Bacillus megaterium* (souche MA) en milieu minimal glucosé à 30° (réf. 1), a été purifié par précipitation fractionnée au moyen de l'alcool et du sulfate d'ammonium, puis par passage sur Sephadex G-200 (réf. 2). L'enzyme est stabilisé par le calcium et présente un optimum d'action sur la caséine à pH 7.2 (tampon Tris) en présence de $\text{CaCl}_2 2 \cdot 10^{-3}$ M. Le matériel s'est révélé homogène au cours de l'électrophorèse sur Cellogel réalisée à différents pH entre 4 et 10.3. D'autre part il ne fournit qu'un seul pic lorsqu'il est soumis à une filtration sur colonne de Sephadex G-75. Le produit paraissant correspondre à une seule espèce moléculaire, une étude de la spécificité d'action a été entreprise.

Activité exopeptidasique. L'enzyme est totalement dépourvu d'activité exopeptidasique. Il est sans action sur les substrats habituels des carboxypeptidases: Bz-Gly-Phe* (Yeda) et Bz-Gly-Leu (Fluka) pour la carboxypeptidase A, Bz-Gly-Arg

* Tous les acides aminés des substrats synthétiques contenant un carbone α -asymétrique sont de configuration L. Les abréviations suivantes sont utilisées: Bz, benzoyl; Z, carbobenzoxyl; Ac, acetyl; BAEE, benzoyl-arginyl ethyl ester; TAME, tosyl-arginyl methyl ester; BANA, benzoyl-arginyl *p*-nitranilide; ATEE, acetyl-tyrosyl ethyl ester; BTEE, benzoyl-tyrosyl ethyl ester.

et Bz-Gly-Lys (Mann) pour la carboxypeptidase B. Il n'attaque pas les substrats des aminopeptidases : l'enzyme est sans action sur les neuf amides suivantes : Gly(NH₂), Arg(NH₂), His(NH₂), Met(NH₂), Leu(NH₂), Tyr(NH₂), Trp(NH₂), Ser(NH₂) et Phe(NH₂) (Yeda) ainsi que sur la leucyl *p*-nitranilide.

Activités di- et tripeptidasique. La protéase est sans action sur les dipeptides suivants : Gly-Leu, Gly-Phe, Gly-Asp, Gly-Tyr, Gly-Gly, Ala-Gly, Ala-Leu, et Leu-Ala ainsi que sur les tripeptides Gly-Gly-Gly, Leu-Gly-Gly et Gly-Leu-Tyr (Produits Yeda, Fluka, Calbiochem, Hoffman-Laroche, N. B. C.). Par contre l'enzyme attaque certains de ces peptides lorsque les extrémités aminée et carboxylique sont bloquées. Il a donc les caractéristiques rigoureuses d'une endopeptidase.

Activité endopeptidasique. L'enzyme n'attaque pas les substrats habituels de la trypsine BAEE, TAME et BANA, ni ceux de la chymotrypsine ATEE et BTEE. Il ne scinde pas non plus la *N*-acetyl-Tyr(NH₂) ni la *N*-acetyl-Trp(NH₂). Il paraît exiger une véritable liaison peptidique et deux résidus d'acides aminés semblent indispensables.

L'action de l'enzyme a d'abord été étudiée sur divers polypeptides et protéines dont la séquence des acides aminés est connue de façon à observer une éventuelle spécificité. Ont été choisis : chaîne B carboxyméthylée de l'insuline (Mann), glucagon (Eli Lilly), cytochrome *c* (Type III Sigma), chymotrypsinogène (Choay), trypsinogène (Worthington), ainsi que deux peptides provenant d'inhibiteurs de la trypsine. Les fragments obtenus après scission des chaînes peptidiques ont généralement été séparés par chromatoélectrophorèse sur papier Whatman 3MM (réf. 3) : électrophorèse dans un tampon acétate de pyridine pH 6.4; 60 V/cm, 45–60 min; chromatographie dans le mélange alcool isoamylque-pyridine-eau (3:3:3.5, v/v/v) pendant 18 h. Les peptides sont révélés avec la ninhydrine diluée (0.01% dans l'alcool) et élusés avec de l'acide acétique 2%. La composition en acides aminés des fragments a été déterminée

TABLEAU I

LIAISONS DE DIVERS POLYPEPTIDES OU PROTÉINES SCINDÉES PAR LA PROTÉASE DE *B. megaterium*
INFLUENCE DU RÉSIDU ENGAGÉ PAR LE GROUPE AMINÉ

Les lettres entre parenthèses indiquent les peptides ou protéines dans lesquels la liaison a été scindée. La position de la liaison dans la chaîne peptidique est signalée par le numéro figurant sous le premier résidu (résidu engagé par son groupe carboxylique). B, chaîne B de l'insuline carboxyméthylée (Mann Research Laboratories, Inc.); G, glucagon (Eli Lilly Co.); C, cytochrome *c* du cœur de cheval, grade III (Sigma); E, endécapptide Gln-CySO₃H-CySO₃H-Ile-Ala-Ser-Ala-Gly-Phe-Val-Arg; T, tétrapeptide Asn-Asn-Phe-Lys; Tg, trypsinogène (Worthington); CTg, chymotrypsinogène (Choay).

Leu	Phe	Ile		Val	Ala	Thr
Tyr-Leu (B) 16	Gly-Phe (B) 23	Lys-Ile 8	(C)	Phe-Val (E) 9	Arg-Ala (G) 18	Tyr-Thr (B) 26
Tyr-Leu (G) 13	Gly-Phe (E) 8	Lys-Ile 6	(Tg)		Lys-Ala (C) 100	
His-Leu (B) 5, 10	Phe-Phe (B) 24	Arg-Ile 15	(CTg)		Ser-Ala (E) 6	
Ala-Leu 14	Asp-Phe (G) 21	CySO ₃ H-Ile (E) 3				
Asn-Leu (C) 31	Thr-Phe (G) 5					
Gly-Leu (C) 34	Asn-Phe (T) 2					

soit semi quantitativement par chromatoélectrophorèse sur papier³, soit quantitativement au moyen d'un analyseur automatique Spinco 120 B, après hydrolyse par HCl 6 M, en tube scellé sous vide, pendant 48 h à 105°. La composition permet de déduire la structure et de localiser le peptide dans la chaîne, donc de connaître la nature des liaisons scindées. Dans le cas de la chaîne B de l'insuline, du glucagon et des morceaux des inhibiteurs la totalité des fragments obtenus a été examinée mais pour les autres protéines l'étude n'a pas été effectuée d'une façon complète. Les 22 liaisons dont la scission a été observée, indiquées dans le Tableau I, ont été classées suivant la nature du résidu engagé par le groupe aminé. Il apparaît que la quasi totalité des scissions concerne des liaisons dans lesquelles ce résidu possède un caractère hydrophobe: Leu, Phe, Ile, Val, Ala. Le nombre de liaisons de la leucine et de la phénylalanine coupées est particulièrement élevé. En outre une étude de la vitesse de libération des peptides réalisée sur la chaîne B de l'insuline a révélé que la liaison Tyr-Leu était coupée la première après 1 min (rapport pondéral enzyme/substrat 2%), suivie de His-Leu, et d'une façon générale que les liaisons de la leucine et de la phénylalanine étaient rapidement attaquées et entièrement scindées après une durée d'hydrolyse relativement courte (5 h pour un rapport pondéral de 2%).

Les résultats obtenus avec les substrats naturels ont été confirmés et précisés en utilisant des dipeptides synthétiques dont le groupe aminé est bloqué par un radical benzoyl ou carbobenzoyl et le groupe carboxylique bloqué sous forme d'amide (Produits Cyclo). Dans la première série de substances utilisées le résidu fournissant le carboxyl est toujours la glycine et le résidu fournissant le groupe aminé est la leucine, la phénylalanine, l'isoleucine, la valine ou l'alanine. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau II. Il apparaît que la liaison Gly-Leu est celle qui est scindée le plus rapidement suivie par la liaison Gly-Phe mais que les liaisons Gly-Ile, Gly-Val et Gly-Ala sont peu ou pas scindées. La préférence de l'enzyme pour les liaisons de la leucine et de la phénylalanine est ici aussi particulièrement nette. Il semble d'autre part qu'en plus de la nécessité d'un résidu hydrophobe donnant le groupe aminé, certains caractères soient exigés du résidu fournissant le groupe carboxylique, puisque la scission des liaisons Lys-Ile, Phe-Val ou Arg-Ala a été observée dans le cas des chaînes polypeptidiques.

Une deuxième série de dérivés synthétiques a alors été mise en oeuvre: le résidu hydrophobe est toujours la phénylalanine et le résidu donnant le groupe carboxyl est

TABLEAU II

ACTION DE LA PROTÉASE DE *B. megaterium* SUR LES DIPEPTIDES SYNTHÉTIQUES DISUBSTITUÉS

<i>Influence du résidu donnant le groupe aminé</i>	<i>Influence du résidu donnant le groupe carboxylique</i>		
<i>Dérivé</i>	<i>μmoles hydrolysées par min par mg d'enzyme (37°)</i>	<i>Dérivé</i>	<i>μmoles hydrolysées par min par mg d'enzyme (37°)</i>
Bz-Gly-Leu(NH ₂)	0.6	Z-Gly-Phe(NH ₂)	0.4
Bz-Gly-Phe(NH ₂)	0.3	Z-Ser-Phe(NH ₂)	2.6
Z-Gly-Phe(NH ₂)	0.4	Z-His-Phe(NH ₂)	3.6
Z-Gly-Ile(NH ₂)	≤ 0.003	Z-Gly-Ala(NH ₂)	0.007
Z-Gly-Val(NH ₂)	≤ 0.003	Z-Phe-Ala(NH ₂)	0.023
Z-Gly-Ala(NH ₂)	0.007		

soit la glycine soit la sérine soit l'histidine. Les résultats obtenus (Tableau II) indiquent clairement que la scission est plus rapide lorsque le résidu fournissant le carboxyl est soit la sérine soit l'histidine. L'accélération est également notable lorsque ce résidu est de nature hydrophobe: le dérivé Z-Phe-Ala(NH₂) est scindé plus rapidement que le dérivé Z-Gly-Ala(NH₂) (*cf.* Tableau II).

L'enzyme possède donc une spécificité assez rigoureuse en ce qui concerne le résidu fournissant le groupe aminé qui doit posséder une chaîne latérale apolaire, mais une stimulation particulière est observée lorsque le résidu donnant le carboxyl possède un carbone α -asymétrique. Le nombre de scissions observées n'est pas encore assez élevé pour dégager l'influence de tel ou tel groupement dans ce résidu. On peut toutefois admettre dès maintenant que les deux acides aminés participant à la liaison peptidique interviennent dans la spécificité avec une importance déterminante du résidu fournissant le groupe aminé.

Des enzymes possédant une spécificité voisine de celle de la protéine de *B. megaterium*, ont été récemment purifiés à partir de *Bacillus subtilis*^{4,5} et de *Bacillus thermoproteolyticus*^{6,7} et ce type d'endopeptidase pourrait donc être assez répandu chez les espèces du genre *Bacillus*. Nous proposons d'appeler ces enzymes des "amino-endopeptidases" pour les distinguer des "carboxy-endopeptidases" telles la trypsine ou la chymotrypsine dont la spécificité dépend de la nature du résidu engagé dans la liaison peptide par le groupe carboxylique.

Les auteurs sont heureux de remercier ici Dr. O. K. BEHRENS qui leur a procuré un échantillon de glucagon, Dr. J. CHAUVET et Dr. W. FRAEFEL qui ont fourni les deux oligopeptides.

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

JACQUELINE MILLET*
ROGER ACHER

1 J. MILLET ET J. P. AUBERT, *Ann. Inst. Pasteur*, 98 (1960) 282.

2 J. MILLET ET J. P. AUBERT, en préparation.

3 J. CHAUVET, G. NOUVEL ET R. ACHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 115 (1966) 130.

4 J. FEDER, *Biochemistry*, 6 (1967) 2088.

5 J. FEDER ET C. LEWIS, JR., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28 (1967) 318.

6 H. MATSUBARA, R. SASAKI, A. SINGER ET T. H. JUKES, *Arch. Biochem. Biophys.*, 115 (1966) 324.

7 H. MATSUBARA, R. M. SASAKI ET R. K. CHAIN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57 (1967) 439.

Reçu le 9 octobre, 1967

* Adresse permanente: Service de Physiologie cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France.

Biochim. Biophys. Acta, 151 (1968) 302-305