

de ceux correspondant aux acides aspartique et glutamique intramoléculaires. La séparation de tous ces isomères pose des problèmes qui n'ont pas encore été résolus.

Nous avons recherché un procédé général permettant d'identifier, après une hydrazinolyse, tous les produits correspondant aux résidus C-terminaux d'une protéine, y compris ceux d'asparagine et de glutamine. Le mélange réactionnel (1 à 10 mg de protéine) est chromatographié sur une colonne d'Amberlite IRC-50 forme H⁺ suivant le procédé de LAY et POLGLASE⁶. En lavant la colonne à l'eau (environ 50 ml), on récupère les acides aminés libres acides et neutres. Nous avons constaté que les hydrazides, provenant des résidus C-terminaux d'asparagine et de glutamine (asparthydrazide-4 et glutamhydrazide-5), étaient également élués dans ces conditions. Par contre, l'asparthydrazide-1 et le glutamhydrazide-1 restent sur la colonne. Le lavage par une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M, pH 7 (15 ml) permet d'éluer les acides aminés basiques. L'asparthydrazide-1 et le glutamhydrazide-1, s'ils sont présents dans le milieu, sont également élués par l'acétate d'ammonium, mais ils ne gênent pas pour l'identification des acides aminés basiques par chromatographie sur papier (voir ci-dessous).

La résine peut être régénérée par lavage à la soude 0,2 N, à l'eau et à l'acide chlorhydrique 0,2 N.

Pour identifier les aminoacides et les hydrazides provenant de l'extrémité C-terminale d'une protéine nous avons utilisé la chromatographie soit sur papier, soit en couche mince. Sur papier, deux systèmes de solvants peuvent être employés avantageusement, l'un dû à MIZELL et SIMPSON⁷ et l'autre à AMBE et TAPPEL⁸. Le premier consiste en un mélange de *n*-butanol-acide acétique-eau (25:6:25 v/v) pour la première direction (l'asparthydrazide-4 et le glutamhydrazide-5 migrent entre l'histidine et la sérine), et en *n*-butanol-méthyléthylcétone (MEC)-eau (2:2:1 v/v), en présence de vapeurs de cyclohexylamine, pour la seconde direction (les R_f des hydrazides en question sont légèrement inférieurs à celui de la valine). Un résultat sensiblement analogue est obtenu dans le deuxième système⁸. Révélés à la ninhydrine, l'asparthydrazide-4 donne une tache rose brun, et le glutamhydrazide-5, une tache pourpre.

En chromatographie en couche mince de cellulose⁹, un bon résultat est obtenu en utilisant le système¹⁰ MEC-pyridine-acide acétique-eau (70:15:2:15 v/v) pour la première direction (R_f: Val 0,27, Glu (NH-NH₂)-5 0,24, Asp (NH-NH₂)-4 0,20, Pro 0,16) et le solvant méthanol-eau-pyridine (80:20:4 v/v) pour la seconde direction (R_f: Gly 0,39, Glu (NH-NH₂)-5 0,24, Asp (NH-NH₂)-4 0,18).

Afin d'éprouver l'efficacité de la méthode décrite, nous l'avons appliquée successivement à l'insuline de boeuf cristallisée (Insuline Organon à 24,6 U/mg)¹¹, au lyso-

zyme (Armour, 3 fois cristallisé) et aux peptides provenant de l'hydrolyse trypsique de l'insuline. Dans ce dernier cas, connaissant la spécificité de cet enzyme, nous espérons trouver, après une hydrazinolyse, à côté des acides aminés C-terminaux de l'insuline, les résidus d'arginine (dégradée en ornithine) et de lysine.

Dans l'hydrazinolyse de l'insuline, nous avons identifié, conformément aux prévisions¹²⁻¹⁴, l'alanine, l'asparthydrazide-4 et l'acide aspartique. Ce dernier provient, ainsi que nous l'avons constaté, de la décomposition partielle de l'asparthydrazide-4 en solution. Cette décomposition en solution atteint également, mais à un degré moindre, le glutamhydrazide-5.

Dans le cas du lysozyme, un seul acide aminé libre a été identifié, la leucine (voir^{14,15}).

L'hydrazinolyse du protéolysat de l'insuline (la trypsine exempte de MgSO₄ a été utilisée afin d'éviter la présence de sel dans le milieu) a donné naissance d'une part à l'alanine, à l'asparthydrazide-4 et à l'acide aspartique, identifiés dans l'éluat à l'eau de la colonne d'Amberlite, et d'autre part à la lysine et un peu d'ornithine, mises en évidence dans l'éluat à l'acétate d'ammonium 0,1 M.

Summary. Description of a general procedure for identification of C-terminal residues liberated by protein hydrazinolysis. All free amino acids (C-terminal), and the hydrazides corresponding to the C-terminal residues of asparagine and glutamine, can be identified by chromatography of a hydrazinolysate on a column of Amberlite IRC-50 followed by paper or thin layer chromatography.

P. DE LA LLOSA,

COLETTE TERTRIN et MARIAN JUTISZ

Laboratoire de Morphologie Expérimentale et Endocrinologie, Collège de France, Paris (France), le 6 décembre 1963.

⁶ W. P. LAY et W. J. POLGLASE, *Can. J. Biochem. Physiol.* **35**, 39 (1957).

⁷ M. MIZELL et S. B. SIMPSON JR., *J. Chromatogr.* **5**, 157 (1961).

⁸ K. S. AMBE et A. L. TAPPEL, *J. Chromatogr.* **5**, 546 (1961).

⁹ P. WOLLENWEBER, *J. Chromatogr.* **9**, 369 (1962).

¹⁰ M. JUTISZ et P. DE LA LLOSA, *Bull. Soc. chim. France* **1963**, 2913.

¹¹ Nous remercions le Dr. J. LENS, directeur de N.V. Organon, de nous avoir fourni gracieusement l'insuline cristallisée.

¹² J. LENS, *Biochim. biophys. Acta* **3**, 367 (1949).

¹³ F. SANGER et E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.* **52**, iii (1952).

¹⁴ J. I. HARRIS, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2944 (1952).

¹⁵ A. R. THOMPSON, *Nature* **169**, 495 (1952).

Histidine Decarboxylase in the Bone Marrow of the Rat

From the investigations of KAHLSON et al., it has appeared that some growing tissues - notably the foetal rat liver - have a high histidine decarboxylase activity¹⁻⁴. The time course of the activity of this enzyme in the foetal liver coincides approximately with that of the hepatosplenic hematopoiesis⁵. The possibility of a connection between hematopoiesis and the formation of histamine was

further supported by the observation that the bone marrow of the adult rat contains high histidine decarboxylase activity⁶.

Histidine decarboxylase in the foetal rat has been found to be of a different kind compared to the histamine-forming enzyme present in the kidney cortex of the rabbit and the guinea-pig^{7,8}. While the foetal enzyme seems fairly specific, the kidney enzyme is non-specific, capable of decarboxylating all aromatic amino acids^{9,10}. Some data on the properties of the foetal enzyme have been given elsewhere¹¹.

The present investigation is an attempt to identify the enzyme responsible for the formation of histamine in the bone marrow of the adult rat. The red bone marrow was taken from the femoral and tibial bones of decapitated rats and homogenized in ice-cold 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. About 20 animals were sacrificed for each enzyme preparation. The homogenate was centrifuged at $20,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was precipitated with a saturated solution of ammonium sulphate. The bulk of enzyme activity was found in the fraction precipitated at between 25 and 40% saturation. The precipitate was taken up in phosphate buffer and dialysed against water at 4°C overnight. After pre-incubation with pyridoxal-5-phosphate for 15 min at room temperature the extract was incubated with histidine under various experimental conditions. In some experiments C^{14} -labelled histidine was

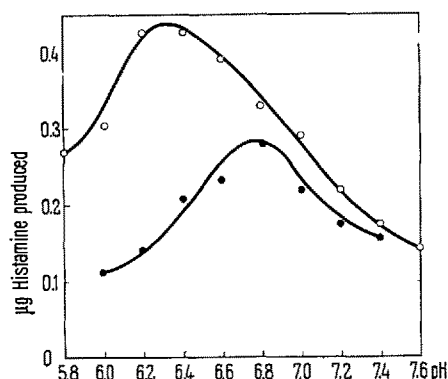


Fig. 1 illustrates the change in pH optimum with different substrate concentrations. Enzyme activity is expressed as μg histamine formed. The conditions of the experiments are given in the text. At least two experiments were performed at each substrate concentration. o-o $5 \times 10^{-3} M$ histidine concentration, $1 \mu\text{g}$ pyridoxal-5-phosphate/ml. ●-● $5 \times 10^{-4} M$ histidine concentration, $1 \mu\text{g}$ pyridoxal-5-phosphate/ml.

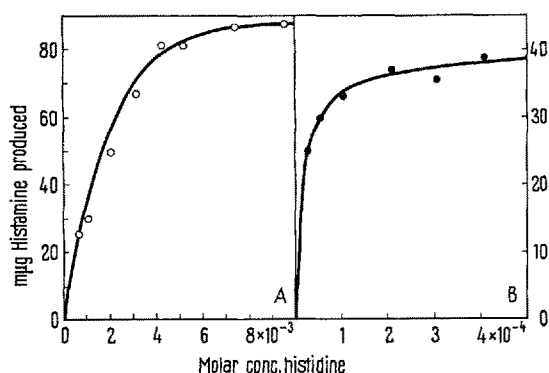


Fig. 2. The influence of pH on the substrate saturation of the enzyme. (A) illustrates the relation between histamine formation and concentration of histidine at pH 6.2 and in the presence of $1 \mu\text{g}$ pyridoxal-5-phosphate. (B) illustrates the relation between histamine formation and concentration of histidine at pH 7.0 and in the presence of $1 \mu\text{g}$ pyridoxal-5-phosphate. The results given in the Figures represent only parts of the experiments. A further increase in substrate concentrations did not result in higher enzyme activities.

used. All incubations were performed in 0.1 M phosphate buffer in a total volume of about 1 ml in an atmosphere of nitrogen at 37°C. The histidine decarboxylase activity was estimated by measuring the amount of histamine formed in 1 h essentially as described by BURKHALTER⁸. The values are given in μg histamine (free base) produced. The amount of C^{14} -histamine formed was determined in a gas flow-counter after organic extraction and final isolation by paper chromatography. A detailed account of this method will be given elsewhere (HÅKANSON, to be published).

The pH optimum of the enzyme was found to vary with the substrate concentration as illustrated in Figure 1. The substrate saturation point turned out to be highly dependent on pH as shown in Figure 2. The implications of almost identical observations on the kinetic properties of the foetal enzyme have been discussed elsewhere¹¹. No L-dihydroxy-phenylalanine (DOPA) decarboxylase activity could be demonstrated in the enzyme preparation by means of a sensitive method using C^{14} -labelled DOPA as substrate¹². The addition of non-radioactive L-DOPA to a final concentration of $10^{-3} M$ did not influence the formation of histamine. In all these respects the bone marrow enzyme behaves exactly as foetal histidine decarboxylase. From these observations it seems reasonable to conclude that the enzymes are identical or at least very similar. Thus, it seems as if the process of growth and cell multiplication in some tissues of the rat coincides with the high activity of an enzyme with special characteristics, capable of decarboxylating histidine. Whether histidine is the sole substrate of this enzyme is unknown at present. From what is known there seems to be little doubt, however, that of the two histamine-forming enzymes so far characterized the foetal variety is the only one for which the name histidine decarboxylase is possibly adequate.

Résumé. Dans l'étude ci-dessus la formation d'histamine dans la moelle osseuse du rat adulte a été attribuée à une enzyme identique ou semblable à la décarboxylase d'histidine du rat foetal. Par conséquent, l'enzyme de la moelle osseuse diffère de l'enzyme qui, étant présente dans l'écorce rénale des animaux adultes, forme l'histamine.

R. HÅKANSON

Department of Pharmacology, University of Lund (Sweden), January 27, 1964.

- ¹ G. KAHLSON, E. ROSENGREN, H. WESTLING, and T. WHITE, *J. Physiol.* **144**, 337 (1958).
- ² G. KAHLSON, K. NILSSON, E. ROSENGREN, and B. ZEDERFELDT, *Lancet* **II**, 230 (1960).
- ³ D. MACKAY, P. B. MARSHALL, and J. F. RILEY, *J. Physiol.* **153**, 31 P (1960).
- ⁴ R. HÅKANSON, *Exper.* **17**, 402 (1961).
- ⁵ G. KAHLSON, *Perspectives in Biology and Medicine* (1962), vol. V, p. 179.
- ⁶ G. KAHLSON and E. ROSENGREN, *Exper.* **19**, 182 (1963).
- ⁷ P. O. GANROT, A. M. ROSENGREN, and E. ROSENGREN, *Exper.* **17**, 263 (1963).
- ⁸ A. BURKHALTER, *Biochem. Pharmacol.* **11**, 315 (1962).
- ⁹ S. UDENFRIEND, U. M. LOVENBERG, and H. WEISSBACH, *Fed. Proc.* **19**, 7 (1960).
- ¹⁰ E. ROSENGREN, *Acta physiol. scand.* **49**, 364 (1960).
- ¹¹ R. HÅKANSON, *Biochem. Pharmacol.* **12**, 1289 (1963).
- ¹² R. HÅKANSON and H. MÖLLER, *Acta dermat.-vener.* **43**, 485 (1963).