

homogenizing medium may be expected to inhibit the metal mediated enzymic or non-enzymic oxidation of phenols¹². The cysteine tends to keep phenols in reduced condition¹³. The enhancement of enzyme activities by incorporating cysteine and sodium metabisulphite in the isolation medium was likely to be due to the fact that these reagents keep the phenols in their unoxidized non-inhibitory state.

The present communication reveals that enzyme isolation from immature stages of insects requires protection from phenols¹⁴.

Zusammenfassung. Die Aktivitäten von Cytochrom-c-Oxydase und Succinat-Dehydrogenase sowie die oxydative Phosphorylation wurden in isolierten Mitochondrien von *S. ruficornis*-Larven durch Zusatz von BSA,

EDTA und Cystein zu den Homogenaten vor Schädigung durch phenolische Substanzen geschützt.

G. N. VERMA and R. N. SHUKLA¹⁵

Department of Zoology, Lucknow University and Biochemistry Department, University of Lucknow, Lucknow 22 60 07 (India), 16 October 1974.

¹³ J. W. ANDERSON and K. S. ROWAN, *Phytochemistry* 6, 1047 (1967).

¹⁴ Acknowledgment. The authors feel grateful to Prof. P. D. GUPTA for providing laboratory facilities and valuable help and to Prof. R. RAKSHPAL for encouragement.

¹⁵ Biochemistry Department, University of Lucknow.

Action de leucine aminopeptidase I et II extracellulaires d'*Aspergillus oryzae* (I.P.410) sur des peptides synthétiques

Action of Leucine Aminopeptidase 1 and 2 (*Aspergillus oryzae* 410) on Various Synthetic Peptides

Au cours de travaux antérieurs, nous avons pu isoler et étudier dans un milieu de culture d'*Aspergillus oryzae* (I.P.410) 2 fractions extracellulaires à activité leucine aminopeptidasique (LAP)¹⁻⁴. Comme une fraction extraite de *Serratia indica*⁵, elles ne possèdent pas d'activité envers la leucine-amide mais possèdent une activité arylamidase envers la L-leucyl-4-nitroanilide (LpNa).

Nous avons pu observer que ces fractions étaient activables par la température et que la présence d'ions Mg⁺⁺ augmentait l'activité de la fraction LAP 1 (50%). L'activité de LAP 2 par contre, ne subit aucune modification. L'oxydation du tryptophane de ces glycoprotéines par le N-bromosuccinimide amène une perte totale d'activité. La mise en évidence de liaisons O-glycosidiques par la méthode de « β élimination»⁶ s'accompagne d'une perte totale de l'activité enzymatique et antigénique. Nous avons voulu ici comparer les activités de ces fractions vis à vis de peptides synthétiques⁷.

Matériel et méthodes. La coupure de la liaison leucyl a été mise en évidence après incubation (24 h à 30°C), en

tampon phosphate de sodium (3 ml) 0,05 M pH 8, de 2,5 mg de dipeptide ou de 3,5 mg de tripeptide et de 500 μ g de fraction enzymatique.

L'acide amine terminal libéré est identifié après chromatographie sur plaque de gel de silice dans un système n-butanol-acide acétique-eau (4.1.1) de 10 μ l de milieu réactionnel. Il a été également dosé à partir de 10 μ l de milieu d'incubation par le réactif ninhydrine-KCN à 570 nm.

Résultats et discussion. L'examen du Tableau nous permet de définir les différentes liaisons coupées par les fractions fongiques. Il apparaît que la liaison leucyl est coupée de préférence par les 2 fractions, alors que ces dernières ne possèdent pas d'activité carboxypeptidase envers CBZ-alanine-leucine, ce qui justifie leur caractère leucine aminopeptidasique (LAP).

De manière identique à la fraction LAP 1 extraite également d'*Aspergillus oryzae* (460) par NAKADAI et al.⁸ ces fractions n'ont aucune action sur les liaisons glycyl-glycine, gly-pro-ala ainsi que les liaisons gly-cyst-gly (glutathion). Une activité envers les liaisons glycyl, quand elle est associée à la leucine dans gly-leu-tyr semble exister dans le cas de LAP 1. On peut également noter une légère activité non spécifique envers des liaisons telles que tryptophanyl et tyrosyl et une activité, assez importante de LAP 1 sur les liaisons du type histidyl dans his-leu. Ces résultats sont confirmés par l'étude cinétique de la réaction en chromatographie sur plaque de gel de silice.

En outre, nous avons étudié l'activité de ces fractions sur le LpNa en présence d'alcools linéaires, à des concentrations croissantes compatibles avec leur miscibilité.

Action de LAP 1 et LAP 2 sur les différents peptides

	Δ D.O. à 570 nm	
	LAP 1	LAP 2
LEU-GLY-GLY	0,900*	0,900
GLY-PRO-ALA	0	0
GLY-LEU-TYR	0,600	0,100
GLY-CYS-TYR (Glutathion)	0	0
TRY-TYR	0,250	0,300
TRY-ALA	0,150	0
TYR-GLY	0,300	0
LEU-GLY	0,900	0,600
HIS-LEU	0,600	0,250
TYR-PHE	0,100	0,230
GLY-GLY	0	0
CBZ-ALA-LEU	0	0

* L'activité maximale étant déjà atteinte après 4 h d'incubation. Les résultats sont donnés en différence de densité optique à 570 nm (dosage à la ninhydrine) des milieux réactionnels avant et après incubation.

¹ J. P. LABBÉ et P. REBEYROTTE, *Biochimie* 56, 839 (1974).

² P. REBEYROTTE et J. P. LABBÉ, *C.r. Acad. Sci.*, Paris 274, 2370 (1972).

³ J. P. LABBÉ, P. REBEYROTTE et M. TURPIN, *C.r. Acad. Sci.*, Paris 278, 2699 (1974).

⁴ J. P. LABBÉ, P. REBEYROTTE, E. MOREL et M. TURPIN, *C.r. Acad. Sci. Paris* 279, 2139 (1974).

⁵ A. TJEDER et B. HOFSTEN, *Acta chem. scand.* 217, 1721 (1967).

⁶ K. TANAKA et W. PIGMAN, *J. biol. Chem.* 240, 1487 (1965).

⁷ J. P. LABBÉ, en préparation.

⁸ T. NAKADAI, S. NASUNO et N. IGUCHI, *Agric. biol. Chem.* 37, 757 (1973).

Comme les fractions tissulaires⁹ les fractions LAP 1 et LAP 2 sont inhibées par les alcools en fonction du nombre de carbone de la chaîne linéaire³, alors que les alcools à chaînes ramifiées n'ont aucune action inhibitrice.

Les fractions LAP fongiques ne sont pas inhibées par certains peptides tels que: But H-Thr-Phe-OH à l'inverse des fractions tissulaires¹⁰. Ce phénomène avait déjà été mentionné par RONCARI et ZUBER¹¹ dans le cas de LAP isolée de *Bacillus stearothermophilus*. Certains caractères d'activité^{1,3,4} permettent de rapprocher les fractions fongiques que nous avons isolées, de certaines fractions tissulaires. D'autres propriétés: non activité envers la leucine amide, non inhibition par certains peptides¹⁰, activité moins spécifique envers des peptides synthétiques, activation par la température, sont caractéristiques des LAP extraites de micro-organismes.

Nos résultats concernant l'action de LAP 1 vis à vis de peptides synthétiques sont analogues à ceux obtenus par NAKADAI et al.⁸ à partir de la fraction 1 (souche 460) dont la taille moléculaire est très différente de LAP 1. La fraction LAP 2, quoique moins active, est plus spécifique de la liaison leucyl que la fraction 1.

Summary. By use of di- or tripeptides as substrates, LAP 1 and LAP 2, 2 fractions from *Aspergillus oryzae* hydrolyze oligopeptides that possess leucine as N-terminal amino acid. LAP 1 fraction also hydrolyzes the histidyl bond. Both fractions have no activity towards peptides as glutathion, gly-pro-ala; they have low or no activity towards tyrosyl and tryptophanyl bond.

J. P. LABBÉ et M. TURPIN¹²

Laboratoire de Biochimie, Institut d'Immuno-Biologie de l'INSERM et de l'Association Claude Bernard, Hôpital Broussais, 96, rue Didot, F-75674 Paris-Cedex 14 (France), 6 mars 1975.

⁹ R. HILL et E. SMITH, J. biol. Chem. 224, 209 (1957).

¹⁰ R. JOST, FEBS Lett. 29, 7 (1973).

¹¹ G. RONCARI et H. ZUBER, Int. J. Protein Res. 1, 45 (1969).

¹² Nous remercions la Société Rapidase (Seclin) de nous avoir fourni les milieux de culture.

Efflux of Cyclic AMP from Resealed Erythrocyte Ghosts is not Enhanced by Hepes

It is generally accepted that intracellular levels of cyclic AMP are controlled by the relative activities of the enzymes responsible for its synthesis and degradation: adenylate cyclase and phosphodiesterase respectively. The possibility exists however, that efflux and influx of the cyclic nucleotide may be additional factors affecting its concentration within the cell. The findings of cyclic nucleotides in several body fluids^{1,2} and the hormone-stimulated release of cyclic AMP from the liver³ and kidney⁴ suggest that efflux at least may be of biological importance.

Working with WI-38 human embryonic fibroblasts, d'ARMIENTO et al.⁵ observed a significant efflux of intracellular cyclic AMP when the culture medium contained organic zwitterionic buffers such as Hepes⁶. (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid). Bicarbonate-buffered media did not produce this response; hence it was postulated that cell membranes might become permeable to cyclic AMP in the presence of organic buffers.

We have tested this hypothesis directly by incorporating [³H]-cyclic AMP into resealed human erythrocyte ghosts and following the efflux of the tritiated nucleotide into unbuffered, bicarbonate-buffered and Hepes-buffered isotonic choline chloride. There are many advantages in using erythrocytes for this type of study: they constitute a convenient system for incorporating exogenous compounds and following their subsequent efflux⁷; they contain only low levels of adenylate cyclase and phosphodiesterase activities, and so the transport of incorporated cyclic AMP can be unambiguously observed; and in general, erythrocyte membrane transport is similar to that of other mammalian cells.

Materials and methods. Tritiated cyclic AMP was incorporated into re-sealed ghosts by a modification of the method of WHITTAM⁷. The cells were collected and washed as described by DUFFY and SCHWARZ⁸, and squirted into 7 volumes of double distilled water containing 0.625 μ M cyclic AMP (sodium salt; Sigma) and [8-³H]adenosine 3',5'-cyclic phosphate (Ammonium salt; The Radiochemical Centre, Amersham) at a final specific activity of 250 μ Ci/ μ mole. After 15 min at room temperature sufficient 3 M KCl was added to restore physiological

tonicity. After being washed 6 times with 0.15 M choline chloride, replicate 0.2 ml aliquots of packed ghosts were suspended in 1.8 ml each of the following 3 media: unbuffered choline chloride (0.15 M), and choline chloride (0.15 M) buffered at pH 7.40 with 20 mM Hepes or with 20 mM NaHCO₃. The efflux of cyclic AMP (measured as dpm of the radioactive nucleotide and converted into pmoles) and protein leakage into the various media (determined by optical density measurements at 280 nm) were monitored during a 4 h incubation at 37°C with gentle agitation. Analysis of the efflux media by paper chromatography according to SHEPPARD and BURGHARDT⁹ established that 97% of the tritium label had an R_f value identical to that of authentic cyclic AMP (sodium salt; Sigma).

Results and discussion. There was an efflux of cyclic AMP from the resealed erythrocyte ghosts into each of the 3 media studied, and in each case the efflux followed a similar pattern and was of a similar magnitude. The Figure illustrates the results from a typical experiment in which each 0.2 ml aliquot of resealed ghosts contained 83 pmoles of cyclic AMP before the incubation period. After 4 h incubation 35% of the cyclic nucleotide (i.e. 29 pmoles) had been released into the medium.

¹ T. D. PRICE, D. F. ASHMAN and M. M. MELICOW, Biochim. biophys. Acta 138, 452 (1967).

² G. A. ROBINSON, R. W. BUTCHER and E. W. SUTHERLAND, *Cyclic AMP* (Academic Press, New York and London, 1971), p. 29.

³ A. E. BROADUS, N. I. KAMINSKY, R. C. NORTHCUTT, J. C. HARDMAN, E. W. SUTHERLAND and G. W. LIDDLE, J. clin. Invest. 49, 2237 (1970).

⁴ L. R. CHASE and G. D. AURBACH, Proc. natn. Acad. Sci., USA 58, 518 (1967).

⁵ M. D'ARMIENTO, G. S. JOHNSON and I. PASTAN, Nature New Biol. 242, 78 (1973).

⁶ N. E. GOOD, G. D. WINGET, W. WINTER, T. N. CONNOLLY, S. IZAWA and R. M. M. SINGH, Biochemistry 5, 467 (1966).

⁷ R. WHITTAM, Biochem. J. 84, 110 (1962).

⁸ M. J. DUFFY and V. SCHWARZ, Biochim. biophys. Acta 330, 294 (1973).

⁹ H. SHEPPARD and C. BURGHARDT, Biochem. Pharmac. 18, 2576 (1969).