

Réactions synthétiques par la ribonucléase T_1 *

La RNase T_1 ** de la Takadiastase digère l'ARN en hydrolysant spécifiquement la liaison ester phosphorique secondaire du guanosine-3'-phosphate. Le guanosine-2',3'-phosphate cyclique se produit comme un intermédiaire de la réaction¹⁻³.

Nous montrons dans ce travail que la RNase T_1 catalyse aussi la synthèse des oligonucléotides à partir du guanosine-2',3'-phosphate cyclique.

Préparation de Gp! De l'ARN de levure est digéré par de la RNase T_1 dans un sac à dialyse et Gp!, dans le dialysat, est séparée par chromatographie sur papier (solvant⁴; isopropanol-eau (7:3); phase gazeuse: ammoniacque).

Synthèse de GpG, GpA, GpU et GpC. 1 mg de Gp! et 2 mg de A, G, U ou C dans 0.1 ml de la solution enzymatique contenant 0.1 μ g de RNase T_1 dans un tampon au phosphate (0.025 M, pH 7.0) sont mélangés; le mélange de réaction est maintenu à 2° pendant 24 h, puis chromatographié sur papier. Le chromatogramme obtenu est montré dans la Fig. 1. Les taches 1 et 2 sont celles des produits de la réaction. La tache 1 est celle de Gp. On peut identifier 2-G, 2-A, 2-U et 2-C avec GpG, GpA, GpU et GpC respectivement, car des produits de l'hydrolyse alcaline (N NaOH) ou de l'hydrolyse enzymatique (RNase T_1) à 37° (Fig. 2) des taches 2 ont donné Gp et les nucléosides correspondants.

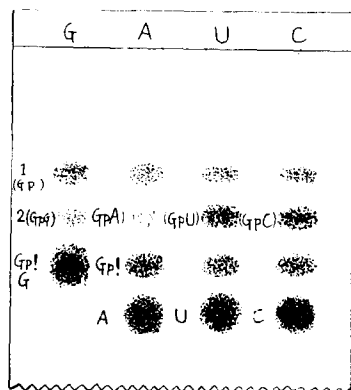


Fig. 1.

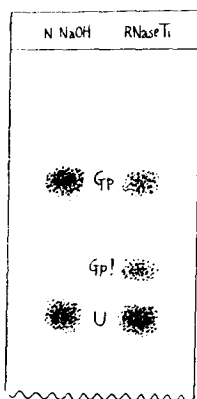


Fig. 2.

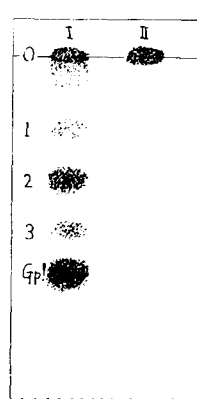


Fig. 3.

Fig. 1. Synthèse des dinucléoside-monophosphates à partir de guanosine-2',3'-phosphate cyclique et des accepteurs (G, A, U, C) par la RNase T_1 . Solvant: isopropanol-eau (7:3); taches localisées par l'absorption à 257.3 m μ .

Fig. 2. Les produits de l'hydrolyse alcaline ou enzymatique (RNase T_1) de la tache 2 de la Fig. 1 avec l'uridine comme accepteur.

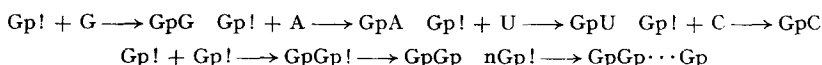
Fig. 3. Synthèse des acides oligoguanyliques. I: localisé par l'absorption à 257.3 m μ . II: localisé par la réaction à la galloxyanine.

Synthèse des acides oligoguanyliques. 15 mg de Gp! sont dissous dans 0.1 ml de la solution enzymatique contenant 10 μ g de RNase T_1 dans le tampon au phosphate (0.025 M, pH 7.0); le mélange est maintenu à 2° pendant 24 h. Il est ensuite chromatographié sur papier (Fig. 3). On trouve 4 taches. La tache 2 est celle de Gp. L'hydrolyse alcaline des produits obtenus par élution des autres taches ne donne que du Gp. Ils doivent donc être des produits de polymérisation de Gp. On pourrait supposer, d'après les valeurs de R_F que les taches 1 et 3 sont celles de GpGp et GpGp! respectivement. La tache 0 doit être celle d'oligonucléotides plus grands. En effet, nous avons trouvé que la tache 0, et elle seule, est positive à la réaction à la galloxyanine, qui est regardée comme une réaction spécifique des tétranucléotides⁵ et des polynucléotides à poids moléculaire plus élevés.

* Exécuté avec une subvention du Ministère de l'Education du Japon.

** Abréviations: RNase, ribonucléase; ARN, acide ribonucléique; Gp, acide 3'-guanylique; Gp!, guanosine-2',3'-phosphate cyclique; G, guanosine; A, adénosine; U, uridine; C, cytidine.

Nos résultats montrent que la RNase T₁ catalyse les réactions synthétiques suivantes:



La synthèse est analogue à celle des oligopyrimidine-nucléotides catalysée par la ribonucléase pancréatique⁶.

*Institut de Chimie de la Faculté des Sciences
Université de Nagoya (Japon)*

KIMIKO SATO-ASANO
FUJIO EGAMI

¹ K. SATO ET F. EGAMI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 44 (1957) 753.

² K. SATO ET F. EGAMI, *Compt. rend. soc. biol.*, 151 (1957) 1792.

³ K. SATO-ASANO, *J. Biochem. (Tokyo)*, 45 (1958), sous presse.

⁴ R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 558.

⁵ C. SCHOLTISSEK, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 309 (1957) 129.

⁶ L. A. HEPPEL, P. R. WHITFIELD ET R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 60 (1955) 9.

Reçu le 14 mai 1958

The dependence of ¹⁴C-glycine uptake by protein fractions on the ribonucleic acid (RNA) biosynthesis in slices of regenerating rat liver

Recently there have been many indications in favour of a direct interrelationship between RNA and protein synthesis^{1,2}. To obtain further evidence for this relationship in proliferating animal tissues, the inhibitory effect of 6-uracil methyl sulfone (6-UMS) on the incorporation of ¹⁴C-glycine into the proteins as well as on that of ¹⁴C-otic acid, which is a well-known precursor of the nucleic acid pyrimidines^{1,3}, into RNA was investigated with slices of regenerating rat liver. The mechanism of the inhibition by 6-UMS of the orotic acid metabolism in liver slices is also described.

Regenerating liver slices (0.5 g) prepared from partially hepatectomized rats (20 to 24 h after the operation) were incubated with 1 μ C (0.268 μ mole) of 2-¹⁴C-glycine or 2 μ C (0.143 μ mole) of 2-¹⁴C-otic acid in Krebs-Ringer phosphate solution at 37° for 2 h. Thereafter, soluble protein, ribo- and desoxyribonucleoprotein fractions were obtained employing the modified method of GRIFFIN, *et al.*⁴. In experiments with ¹⁴C-glycine, each protein fraction was purified by repeated washings with cold trichloroacetic acid (TCA), ethanol, and hot ethanol-ether, and the nucleic acid moieties were removed by extraction with hot TCA. In the experiments with ¹⁴C-otic acid, RNA was extracted with hot TCA from the ribonucleoprotein obtained as described above and isolated as a lead salt. The incorporation of ¹⁴C-otic acid into RNA was further identified by paper chromatography after the hydrolysis of RNA with 6 N HCl at 120° for 2 h. Orotidine-5'-phosphate (O-5-P) and uridine-5'-phosphate (U-5-P) in the liver slices were extracted with cold

TABLE I

THE EFFECT OF 6-UMS ON THE CONVERSION OF ¹⁴C-OROTIC ACID INTO O-5-P AND U-5-P

Incubation at 37° for 2 h. All data are the averages of three experiments. ¹⁴C-2-otic acid (2 μ C = 978 division/min with the Lauritsen electroscopie) were added.

	¹⁴ C-activity ⁶			
	6-UMS (10 ⁻⁴ M)			
	Orotic acid			
	10 ⁻⁴ M		10 ⁻⁴ M	
Orotic acid	87	117	89	107
O-5-P	23	5	20	9
U-5-P	29	6	22	11

* Expressed as $\frac{\text{division/min/total fraction}}{\text{division/min/}^{14}\text{C-otic acid added}} \times 1000$