

CARACTÉRISATION DU RÉSIDU

 β -ASPARTIQUE ($-\text{NH}\cdot\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\cdot\text{CO}-$) DANS L'INSULINE*

par

PIERRE JOLLÈS ET CLAUDE FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

La nature des acides aminohydroxybutyriques éventuellement formés par hydrolyse d'une protéine préalablement réduite par AlLiH_4 permet de déterminer le mode de liaison α (acide α -amino- γ -hydroxybutyrique) ou β (acide β -amino- γ -hydroxybutyrique) par lequel l'acide aspartique est engagé dans la protéine¹. Nous avons étudié à ce point de vue les acides aminohydroxybutyriques provenant de l'insuline.

Réduction de l'insuline. Exemple: 335 mg d'insuline (Zn-insuline cristallisée à 25.6 U.I./mg, lot 488,098, Lilly Research Laboratories) à 15.5 % N total sont mis en suspension dans 10 ml de N-éthylmorpholine. On ajoute 118 mg de LiAlH_4 et on laisse les réactifs en contact pendant huit heures à 55°, sous atmosphère d'azote sec, en agitant énergiquement. On détruit ensuite l'excès d'hydrure métallique par une trace d'eau, on filtre le précipité, on le lave soigneusement avec de l'éther sec. Ce précipité (806 mg) est introduit dans 50 ml de HCl N; la plus grande partie s'y dissout. On oxyde les groupes SH en faisant passer dans la solution un courant d'air pendant deux heures, puis l'ensemble est dialysé pendant 24 heures à 0°. Après lyophilisation, la protéine réduite (220 mg, à 13 % d'azote total) se présente sous la forme d'une poudre blanche légère. 100 mg de cette substance sont hydrolysés pendant 24 heures à 110° en tube scellé, sous vide, par 6 ml de HCl 6 N.

*Séparation de l'hydrolysât en différentes fractions*². Après avoir été évaporé à sec sous vide à plusieurs reprises, l'hydrolysât est repris par 10 ml d'eau et neutralisé par LiOH (pH 8)**. Un courant de vapeur d'eau entraîne, sous un vide partiel, NH_3 qui est recueilli dans une solution titrée de SO_4H_2 0.01 N et dosé.

Après dessalification (15 minutes)⁴, on fait passer le liquide dont on a éliminé NH_3 (5 ml, pH 7) sur une colonne de silice (5 g). On obtient ainsi d'une part la fraction neutre et la fraction acide, correspondant au filtrat A_1 (250 ml d'eau) et d'autre part la fraction basique correspondant à l'éluat B_1 (100 ml HCl 0.1 N). Le filtrat A_1 concentré, est saturé par H_2S . Le liquide, dont le pH est ramené à 7, est chromatographié sur une colonne d'alumine (5 g). On obtient ainsi un filtrat A_2 (70 ml d'eau saturée de H_2S) contenant la fraction neutre, et un éluat B_2 (30 ml de HCl 2 N à 95°) contenant la fraction acide (Tableau I).

TABLEAU I

N EN % DE N TOTAL DANS LES DIVERSES FRACTIONS. TROIS EXPÉRIENCES DIFFÉRENTES

N	I	II	III
Ammoniacal	13.8	14.0	13.9
Fraction basique	20.1	18.9	18.1
Fraction neutre	42.3	40.3	44.0
Fraction acide	20.0	19.6	19.0
Total	96.2	92.8	95.0

* Ce travail a fait l'objet d'un bref exposé lors de la discussion du rapport de Dr SANGER, au IIème Congrès International de Biochimie, Paris, Juillet 1952.

Nous sommes heureux de remercier la Fondation Rockefeller de l'aide matérielle qu'elle a apportée à l'exécution de ce travail, et les Etablissements Eli Lilly & C° Indianapolis, de l'échantillon d'insuline qu'ils nous ont aimablement offert.

** Dans ces conditions, les lactones formées au cours de l'hydrolyse acide s'ouvrent en régénérant les acides aminohydroxybutyriques correspondants³.

Caractérisation du résidu β -aspartique. La fraction neutre (filtrat A₂) est dessalifiée et concentrée sous vide à 2 ml. On fait une première chromatographie préparative sur papier¹ (Whatman n° 1; solvant: butanol 75 + acide formique 15 + eau 10). On découpe la bande comprise entre $R_F = 0.25$ et $R_F = 0.30$, c'est-à-dire entre l'acide aspartique ($R_F = 0.24$) et l'aspartidol ($R_F = 0.31$); on élue par 3 ml d'eau (éluat B₃). Cet éluat contient ainsi le glycolle, la thréonine et l'un *ou* l'autre, ou l'un *et* l'autre des acides aminohydroxybutyriques. Une deuxième chromatographie préparative faite à partir de l'éluat B₃ sur papier (Whatman n° 1; solvant: phénol 80 + eau 20) permet de séparer d'une part le glycolle et la thréonine, et d'autre part les acides aminohydroxybutyrique. On obtient ces derniers en solution par élution à l'eau (éluat B₄). Dans la solution B₄, on détermine, d'une part la totalité des acides aminohydroxybutyriques par dosage de N total (micro-Kjeldahl, méthode CONWAY), et d'autre part l'acide β -amino- γ -hydroxybutyrique par l'acide periodique (microdosage, méthode Conway) en tenant compte de l'azote éventuellement apporté par le papier. Pour tenir compte également des pertes subies au cours des diverses opérations (élutions, etc.), nous avons déterminé le rendement de ces opérations, en dosant par les mêmes procédés, la thréonine, dont on sait qu'il existe 2 résidus par 12,000 g environ d'insuline⁵ (Tableau II).

TABLEAU II

NOMBRE DE RÉSIDUS DE THRÉONINE ET D'ACIDE AMINOHYDROXYBUTYRIQUE, POUR 12,000 G D'INSULINE, CALCULÉS D'APRÈS N TOTAL ET N "PERIODIQUE"

N total		N periodique	
Thréonine	Ac. aminohydroxybutyrique	Thréonine	Ac. β -amino- γ -hydroxybutyrique
1.7	1.8	0.7	1.0
1.7	1.5	0.8	0.7

Les résultats du Tableau II montrent que: 1. dans le cas de la thréonine, considérée comme témoin, les quantités de N total et de N "periodique" retrouvé, ne sont respectivement que de 80 à 90% et de 40% des quantités théoriques; 2. les chiffres fournis par N "periodique" correspondant à l'acide β -amino- γ -hydroxybutyrique étant très voisins de ceux correspondant à la thréonine, et les valeurs de N total étant sensiblement les mêmes dans le cas des acides aminohydroxybutyriques et dans le cas de la thréonine, on peut en conclure d'une part qu'il ne s'est pas formé d'acide α -amino- γ -hydroxybutyrique, et d'autre part que la quantité d'acide β -amino- γ -hydroxybutyrique est voisine de celle de la thréonine, à savoir de 2 résidus par 12,000 g environ d'insuline.

Il apparaît ainsi que, sur les 6 résidus d'acide aspartique que contiennent ces 12,000 g d'insuline, 4 ont leurs 2 groupes carboxyliques protégés contre toute réduction³; 2 ont leurs groupes carboxyliques en α libres, donc réductibles, alors que leurs groupes carboxyliques en β sont protégés. Ces résidus participent ainsi à la structure: $R \cdot CO-NH \cdot CH(COOH) \cdot CH_2 \cdot CO-NH \cdot R'$. Ce résultat est en excellent accord avec les données récentes de SANGER^{7,8}, d'après lequel l'asparagine est en position terminale dans la chaîne A de l'insuline, R' représentant dans ce cas H.

Remarque. La méthode de caractérisation des acides aminés en bout de chaîne, à groupes carboxyliques libres, sous la forme utilisée précédemment⁹, ne permettait pas de déceler l'asparagine comme groupe terminal. En effet, la séparation des aminoalcools résultant de la réduction des amino-

acides en question, reposait sur le caractère basique de ces substances. Or, le corps obtenu dans le cas actuel est neutre, et suit par conséquent les autres acides aminés neutres au cours des fractionnements.

RÉSUMÉ

De l'insuline a été réduite par AlLiH_4 , et après élimination des acides aminés acides et basiques, l'ensemble des acides aminohydroxybutyriques a été séparé des autres acides aminés neutres par chromatographie sur papier. Des microdosages de N total et de N "periodique" ont permis de conclure à l'existence, dans 12,000 g environ d'insuline, de 4 résidus d'acide aspartique dont les deux groupes carboxyliques sont protégés contre toute réduction, et de 2 résidus ayant chacun son groupe carboxylique en α libre et son groupe carboxylique en β substitué.

SUMMARY

Insulin has been reduced by AlLiH_4 , and, after elimination of the acidic and basic amino acids, the mixture of aminohydroxybutyric acids has been separated from the other neutral amino acids by paper chromatography. Microdeterminations of total N and of "periodic" N have shown the existence, in about 12,000 g insulin, of 4 residues of aspartic acid in which the 2 carboxylic groups are protected against reduction, and 2 residues each having its α carboxylic group free and its β carboxylic group substituted.

ZUSAMMENFASSUNG

Insulin wurde mit LiAlH_4 reduziert; nach Eliminierung der sauren und basischen Aminosäuren, wurden die Aminoxybuttersäuren von den anderen neutralen Aminosäuren durch Papierchromatographie getrennt. Microstickstoffbestimmungen (Kjeldahl und Periodsäureverfahren) haben bewiesen dass sich, in je 12,000 g Insulin, 4 Asparaginsäurereste befinden, deren 2 Carboxylgruppen gegen jede Reduktion geschützt sind, und 2 Asparaginsäurereste deren Carboxylgruppe in α -Stellung frei, und in β -Stellung substituiert ist.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. JOLLES ET C. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim.*, 5ème série 18 (1951) 862.
- ² C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ³ M. D. ARMSTRONG, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 3399.
- ⁴ R. ACHER, M. JUTISZ, ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 442.
- ⁵ C. FROMAGEOT, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 14 (1950) 49.
- ⁶ A. C. CHIBNALL ET M. W. REES, *Biochem. J.*, 50 (1952) (sous presse).
- ⁷ F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 50 (1952) (sous presse).
- ⁸ F. SANGER, E. O. P. THOMPSON ET H. TUPY, *IIe Congrès International de Biochimie, Symposium sur les Hormones protéiques*, p. 26. Paris 1952.
- ⁹ C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, D. MEYER, ET L. PÉNASSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 283.

Reçu le 31 juillet 1952