

LA PROTÉINE LYSANTE II DE LA RATE DU LAPIN

II. COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS*

par

GEORGES JOLLÈS ET CLAUDE FROMAGEOT

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

Un précédent travail¹ a montré l'existence dans la rate du lapin, de deux protéines douées de propriétés lysantes vis à vis de *Micrococcus lysodeikticus*. L'une de ces protéines, représentant environ 83 % de l'ensemble, a été isolée sous une forme chromatographiquement pure, et a été obtenue cristallisée à l'état d'acétate. C'est cette protéine que nous avons désignée sous le nom de protéine lysante II.

L'obtention du "matériel primaire" à partir duquel est préparée la protéine en question, telle qu'elle a été décrite précédemment¹, repose sur un procédé qui, quoique donnant des résultats satisfaisants, est assez laborieux. Nous basant sur les données acquises au cours de l'étude du comportement chromatographique des protéines constituant ce matériel primaire, nous avons mis au point un nouveau procédé, beaucoup plus simple, pour son obtention.

Dans le présent travail, nous décrivons d'une part la préparation, ainsi simplifiée, de la protéine lysante II, obtenue ici sous forme libre, et nous indiquons, d'autre part, sa composition totale en acides aminés.

Préparation de la protéine lysante II

3150 g de rates (organes frais, soit environ 3000 rates) sont broyés, extraits à l'eau et déprotéinisés à 100° en milieu acétique. On obtient ainsi 12 litres d'un liquide jaune, de pH 4.5, et d'activité $A/P_{ph} = 0.03^1$. La protéine active est alors adsorbée par l'Amberlite dans les conditions suivantes: on introduit dans le liquide précédent 300 ml d'Amberlite XE-64 tamponnés à pH 6.54 par un tampon phosphate $M/5$. On agite le tout pendant quatre heures puis on recueille la résine par décantation. Cette résine est ensuite lavée six fois avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que le liquide de lavage ne soit plus jaune. L'élution de la substance active, est faite, à la température ordinaire, par lavage de la résine avec du tampon phosphate 1.2 M (pH 6.54) par portions successives de 50 ml; le liquide étant chaque fois recueilli après une brève centrifugation. Après 12 de ces lavages, on recueille plus de 95 % de l'activité initiale; celle-ci se trouve alors contenue dans 600 ml d'un liquide incolore; $A/P_{ph} = 0.83$.

On dialyse ce liquide à 2° contre de l'eau distillée jusqu'à disparition d'environ 90 % des phosphates (une dialyse plus poussée entraînerait une perte de substance active). On obtient alors un liquide incolore, $A/P_{ph} = 1.08$; des aminoacides ou des peptides qui avaient été entraînés au cours de l'adsorption se trouvent donc ainsi

* Nous sommes heureux de remercier la Fondation Rockefeller de l'aide matérielle qu'elle a apportée à l'exécution de ce travail.

éliminés par dialyse. La solution dialysée est lyophilisée: on obtient 1.75 g d'une poudre blanche, volumineuse, dont la composition et l'activité sont les suivantes: N % 15.12; PO_4 % 6.84; $\text{A/P}_{\text{ph}} = 1.08$. Cette poudre est analogue au "matériel primaire" du travail précédent¹; en effet, 500 mg de cette poudre, chromatographiés sur une colonne d'Amberlite XE-64 de 20×4 cm à pH 6.54, donnent les mêmes trois fractions déjà signalées¹, et dont la troisième correspond à la protéine lysante II.

Remarques:

1. *En ce qui concerne l'adsorption de la protéine active*, l'Amberlite est ajoutée à l'extrait brut de rate, dont le pH est, après dilution en milieu acétique, de 4.5. Par suite de son immersion en milieu plus acide, la résine tend vers un nouvel équilibre: elle libère des ions Na^+ et sa charge négative augmente; cette augmentation de charge doit être assez grande pour permettre une adsorption totale de la protéine sur la résine, mais suffisamment faible pour que cette adsorption reste sélective. Lorsque l'agitation est convenable, l'adsorption est complète au bout de 4 heures (Tableau I).

TABLEAU I

VITESSE D'ADSORPTION DE LA PROTÉINE LYSANTE PAR L'AMBERLITE XE-64

30 ml de résine tamponnée à pH 6.5 par un tampon phosphate $M/5$, dans 100 ml de l'extrait actif à pH 4.5. Température 10° .

Temps d'agitation (heures)	Produit actif adsorbé (% de l'activité initiale)
1	45.2
2	67.2
3	85.5
4	99.4
5	99.5

2. *En ce qui concerne l'élution*, celle-ci est effectuée ici à pH 6.54 par du tampon 1.2 M. Elle pourrait aussi se faire à un pH plus élevé en présence d'une force ionique

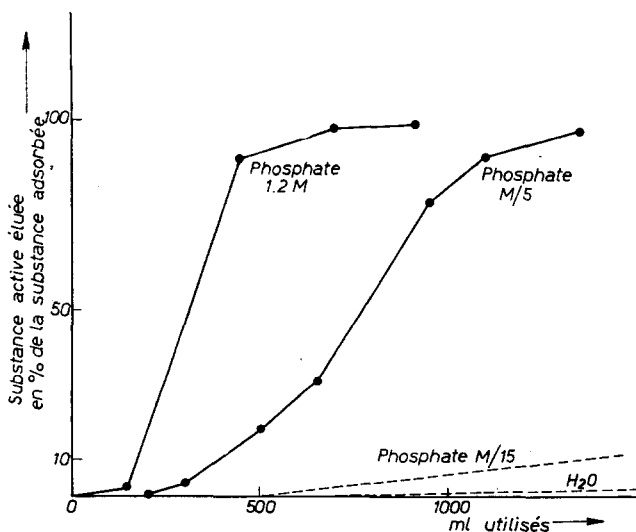


Fig. 1. Influence de la concentration de la solution tampon (phosphate pH 6.5) sur l'élution de la protéine lysante, adsorbée sur Amberlite XE-64. Quantité d'Amberlite: 100 ml. Température: 20° .

plus faible. L'importance de la force ionique est considérable: la variation de la facilité de l'élution en fonction de la molarité des tampons employés, est indiquée par les courbes de la Fig. 1.

Ces courbes montrent que l'on a intérêt à prendre un tampon aussi concentré que possible. L'emploi d'un tampon de même molarité à un pH plus élevé, compatible avec la stabilité de la protéine, ne modifie pratiquement pas les résultats.

Cristallisation de la protéine lysante II

La fraction séparée par chromatographie, et correspondant à la protéine lysante II, est soumise à une dialyse prolongée, au cours de laquelle on n'hésite pas à perdre une certaine quantité de la protéine pour assurer l'élimination quasi-totale des phosphates ($\text{PO}_4 < 0.3\%$). On obtient ainsi finalement 137 mg de protéine active II pure.



Fig. 2. Cristaux de protéine lysante II de la rate du lapin. Protéine libre. $\times 75$.

Cette protéine cristallise spontanément, quand, au cours de la concentration qui suit la dialyse, on abandonne une solution très enrichie quelques heures au froid. Les cristaux formés sont ici ceux de la protéine libre; leur forme diffère de celle des cristaux obtenus par précipitation par l'acétone, en présence d'acide acétique, qui correspondent à un acétate de la protéine; néanmoins, les cristaux de la protéine libre sont aussi très hygroscopiques (Fig. 2).

Analyse de la protéine lysante II

A. *Azote total*. L'élimination aussi rigoureuse que possible des éléments minéraux susceptibles d'accompagner la protéine, est faite par dialyse dans un sac de collodion, préparé au moment de l'emploi, et contre de l'eau distillée en présence de deux échangeurs d'ions: l'Amberlite IR-120 et l'Amberlite IRA-400. La dialyse, avec agitation, a lieu à 2°, et dure 17 heures. Au bout de ce temps, la solution dans le sac de collodion contient encore 65% de la protéine, alors que la proportion des phosphates est tombée à moins de 0.2%, quelle qu'ait été leur concentration initiale (Fig. 3). Les phosphates non encore éliminés sont alors dosés avec précision (méthode de FISKE ET SUBBAROW²) et l'on en tient compte pour apporter au dosage d'azote une correction qui n'est d'ailleurs que très légère. La protéine est lyophilisée; un échantillon est prélevé, séché sous vide

à 56°, sur lequel on dose l'azote; un autre est utilisé pour la détermination rigoureuse du poids sec (100°, sous 1/2 mm Hg). Cinq dosages effectués sur des échantillons provenant

de diverses préparations, ont donné: N total = 17.7% (± 0.08). C'est cette valeur que nous utilisons dans la suite pour le calcul de tous les autres résultats analytiques. Cette valeur en N total est, comme on devait s'y attendre, nettement supérieure à celle trouvée précédemment pour l'acétate de la protéine.

B. *Acides aminés*. Une chromatographie sur papier, bidimensionnelle (phénol + eau suivi de butanol + acide formique) a tout d'abord montré qualitativement que les mêmes acides aminés que l'on trouve dans un hydrolysate de lysozyme d'oeuf se retrouvent dans un hydrolysate acide de la protéine lysante II de la rate de lapin.

La composition quantitative en acides aminés de la protéine lysante II a été faite d'une part par la méthode de MOORE ET STEIN³, d'autre part par divers dosages colorimétriques sur les acides aminés préalablement séparés en groupe⁴; en outre, le trypto-

phane et la cystine ont fait l'objet d'opérations particulières. L'absence de cystéine dans la protéine elle-même a été constatée avant hydrolyse de cette protéine; celle-ci ne donne en effet aucune réaction avec le nitroprussiate, en présence ou en absence d'urée.

Dans chaque analyse, environ 6 mg de la protéine sont hydrolysés 24 heures à 110° en tube scellé, sous vide, avec 2 ml d'acide chlorhydrique 6 N dans les conditions habituelles. L'hydrolysate obtenu est évaporé à sec sous vide en présence de potasse et d'anhydride phosphorique. Le résidu est repris par de l'eau distillée, celle-ci est évaporée et cette opération est répétée encore deux fois.

I. *Dosages par la méthode de MOORE ET STEIN*. Le résidu repris par 1 ml du tampon qui imbibe la colonne au début de l'opération est alors prêt pour l'analyse.

a. *Acides aminés basiques*. L'opération est faite sur une colonne de Dowex-50 de 15 \times 0.9 cm avec les tampons préconisés par MOORE ET STEIN³. Chaque fraction (1 ml) est analysée par dosage à la ninhydrine⁵. Le Tableau II indique les valeurs obtenues dans trois analyses faites indépendamment.

TABLEAU II
ACIDES AMINÉS BASIQUES (MÉTHODE DE STEIN ET MOORE)
NOMBRE DE RÉSIDUS POUR 10,000 g DE PROTÉINE

Protéine analysée mg	I 5.17	II 4.77	III 5.74	Moyenne
Histidine	0.750	0.834	0.750	0.778
Lysine	4.30	4.35	4.37	4.34
Arginine	4.32	4.22	4.23	4.26

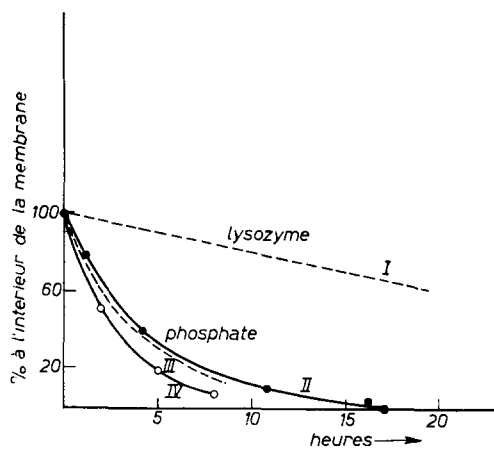


Fig. 3. Dialyse de la protéine lysante en solution tampon phosphate 0.2 M, pH 6.5, contre eau distillée tenant en suspension un mélange d'Amberlite IR-120 et d'Amberlite IRA-400. Température 0°; I. protéine lysante, sac de collodion; II. phosphates, sac de collodion; III. protéine lysante, sac de cellophane; IV. phosphate, sac de cellophane.

b. *Acides aminés dicarboxyliques, aromatiques et neutres, à l'exception du tryptophane et de la cystine.* Les opérations mettent en jeu des quantités de protéines de l'ordre de 6 mg; elles sont faites sur des colonnes de Dowex-50 de 100×0.9 cm; les tampons et les températures sont ici encore ceux préconisés par MOORE ET STEIN. Les résultats obtenus sont donnés par le Tableau III.

TABLEAU III
ACIDES AMINÉS NEUTRES ET ACIDES (MÉTHODE DE MOORE ET STEIN)
NOMBRE DE RÉSIDUS POUR 10,000 g DE PROTÉINE

Poids de protéine (mg)	I 4.56	II 6.74	III 5.24	Moyenne
Acide aspartique	14.4	(11.9) *	14.4	14.4
Thréonine	5.02 **	5.15 **	4.77 **	5.0
Sérine	6.42 ***	6.18 ***	6.26 ***	6.29
Acide glutamique	7.68	7.83	8.0	7.84
Proline	3.63	3.70	—	3.66
Glycocolle	7.92	(8.68)	7.92	7.92
Alanine	9.44	9.28	9.32	9.35
Valine	3.9	4.36	4.1	4.12
Méthionine	1.09	1.25	1.29	1.21
Isoleucine	5.21	4.97	(3.30)	5.09
Leucine	7.18	7.16	7.02	7.12
Tyrosine	2.10	2.22	2.74	2.35
Phénylalanine	2.08	2.23	2.24	2.18

* Cette valeur, évidemment aberrante, s'explique par un accident de température survenu au cours de l'analyse. On n'en a pas tenu compte dans la moyenne.

** Chiffres multipliés par 1.04 pour tenir compte de la destruction de la thréonine au cours de l'hydrolyse⁷.

*** Chiffres multipliés par 1.09 pour tenir compte de la destruction de la sérine au cours de l'hydrolyse⁷.

2. *Dosages spécifiques de quelques acides aminés après leur séparation en groupes.* La méthode suivie est analogue à celle qui a été décrite précédemment dans le cas du lysozyme de l'oeuf de poule^{6,7}.

a. *Azote amidé.* En première approximation, on peut admettre que l'ammoniac formé au cours de l'hydrolyse de la protéine correspond à l'azote amidé de la protéine, avec en plus, l'azote provenant de la décomposition de la sérine; la décomposition de la thréonine est trop faible pour jouer ici un rôle; quant à celle du tryptophane, on sait qu'elle ne donne naissance à aucun NH_3 . En fait, le dosage d'azote a donné 2.34 g pour 100 g de protéine, soit 16.7 radicaux NH_2 pour 10,000 g. La correction appliquée plus haut pour tenir compte de la décomposition de la sérine correspond à environ 0.52 atome d'azote pour 10,000 g de la protéine; cette quantité de protéine renferme donc 16.2 résidus amidés.

b. *Acides aminés divers.* L'échantillon débarrassé de son ammoniac est déminéralisé pendant 15 minutes à l'aide de l'appareil décrit par ACHER *et al.*⁸ puis passé sur une colonne de silice (6 g). Les acides aminés basiques restent adsorbés sur la colonne; ils sont élués par 100 ml de HCl 0.1 *N*; tous les autres acides aminés se retrouvent dans le filtrat. Parmi les acides aminés ainsi séparés, nous avons dosé spécifiquement: l'histidine, par la méthode de Pauli selon MACPHERSON⁹, l'arginine par la méthode de SAKAGUCHI selon MACPHERSON⁹, la tyrosine par la méthode de UDENFRIEND¹⁰ et la proline (a) par la méthode de CHINARD¹¹; en outre, la proline a été dosée par la même méthode,

sur un hydrolysats de protéine passé sur colonne de Dowex-50 (b). Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau IV.

TABLEAU IV
ACIDES AMINÉS DOSÉS PAR RÉACTIONS COLORIMÉTRIQUES SPÉCIFIQUES
Nombre de résidus pour 10,000 g de protéine

	I	II	III	Moyenne
Histidine	0.72	0.73	0.74	0.73
Arginine	4.16	4.19	4.23	4.19
Tyrosine	2.18	—	—	2.18
Proline	3.69 (a)	3.67 (b)	—	3.68
Tryptophane	1.31	1.35	—	1.33
Cystine	3.40	—	—	3.40

3. *Dosage du tryptophane et de la cystine.* Nous avons déterminé le tryptophane par la méthode de SPIES ET CHAMBERS¹² dans les conditions que LEWIS *et al.*¹³ ont décrites pour le dosage de cet acide aminé dans le lysozyme de l'oeuf de poule; cette méthode ne nécessite pas l'hydrolyse préalable de la protéine. En outre, nous avons comparé, à l'aide de la méthode de VOISENET¹⁴, les teneurs en tryptophane de solutions de lysozyme d'oeuf de poule et de protéine lysante II de rate de lapin, à des concentrations moléculaires égales. Pour ce faire, nous avons considéré le poids moléculaire du lysozyme d'oeuf comme étant de 14,700, et celui de la protéine lysante de la rate comme étant de 14,000 (voir Tableau V).

TABLEAU V
COMPOSITION DE LA PROTÉINE LYSANTE II DE LA RATE DU LAPIN

Acides aminés	Nombre de résidus par 10,000 g	Poids moléculaire calculé sur la base de 1 résidu d'histidine	Nombre de résidus	Poids des résidus	Nombre d'atomes de N
Acide aspartique	14.4	13,900	20	2300	20
Alanine	9.35	13,910	13	923	13
Arginine (STEIN ET MOORE)	4.26	14,100	6	936	24
Arginine (SAKAGUCHI)	4.19	14,310	6		
Cystine	3.40	14,700	5	1020	10
Acide glutamique	7.84	14,025	11	1419	11
Glycocolle	7.92	13,915	11	627	11
Histidine (STEIN ET MOORE)	0.778	12,850	1	137	3
Histidine (PAULI)	0.73	13,700	1		
Isoleucine	5.09	13,755	7	791	7
Leucine	7.12	14,050	10	1130	10
Lysine	4.34	13,800	6	768	12
Méthionine	1.21	16,520	2	262	2
Phénylalanine	2.18	13,740	3	441	3
Proline (STEIN ET MOORE) (b)	3.67	13,625	5	485	5
Proline (CHINARD) (a)	3.69	13,550	5		
Sérine	6.29	15,900	10	870	10
Thréonine	5.0	14,000	7	707	7
Tryptophane	1.33	15,000	2	372	4
Tyrosine (STEIN ET MOORE)	2.35	12,750	3	489	3
Tyrosine (UDENFRIEND)	2.18	13,770	3		
Valine	4.12	14,580	6	594	6
Azote amidé	16.7	13,200	22		22
Total					183
Poids moléculaire		14,070		14,267	14,480

La cystine est dosée par le réactif de FOLIN-MARENZI¹⁵ en appliquant la correction de LUGG¹⁶ sur un hydrolysât spécial, obtenu en chauffant 36 heures à reflux la protéine dissoute dans un mélange d'acide chlorhydrique à 20% et d'acide formique à 50%.

Les résultats des dosages du tryptophane et de la cystine sont également donnés dans le Tableau IV.

Composition générale et poids moléculaire

L'ensemble des résultats précédents permet de calculer le poids moléculaire minimum de la protéine lysante II de la rate du lapin, ainsi que le nombre de résidus de chacun des acides aminés qui la constituent. On trouve ainsi les chiffres du Tableau V. D'autre part, la facilité avec laquelle la protéine en question dialyse à travers une membrane de cellophane ou de collodion (Fig. 3), indique que son poids moléculaire réel ne dépasse pas 15,000. On peut donc conclure que le poids moléculaire de la protéine lysante II est égal au poids de la somme des résidus qui la constituent, poids que nous avons trouvé égal à 14,267. Il est intéressant de noter l'accord existant entre cette valeur et celle que l'on peut calculer à partir du nombre d'atomes d'azote (183) et de la teneur en azote (17.7%), selon l'équation: $\frac{183,000 \cdot 14}{17.7} = 14,480$.

Comparaison entre la protéine lysante II de la rate du lapin et le lysozyme de l'oeuf

Aucune étude précise n'a encore été faite concernant la cinétique de l'action enzymatique de la protéine lysante analysée ici. Toutefois, il nous paraît intéressant de signaler dès maintenant que, sur une cinquantaine d'espèces ou de souches différentes de bactéries, la protéine lyse les mêmes microorganismes, et les mêmes seulement, que le lysozyme de l'oeuf de poule (Tableau VI). On peut donc en conclure que son action enzymatique porte sur le même polysaccharide constitutif des parois cellulaires micro-

TABLEAU VI

ACTIONS LYSANTES COMPARÉES DE LA PROTÉINE LYSANTE II DE LA RATE DE LAPIN ET DU LYSOZYME D'OEUF DE POULE VIS À VIS DE DIVERSES ESPÈCES OU SOUCHES DE BACTÉRIES

1. Dans le cas des essais sur boîtes de Petri les signes + ou — indiquent s'il y a ou non une zone d'inhibition après 48 heures d'incubation. Dilution employée: 50 µg/ml sauf pour les germes très sensibles (1 à 5 µg/ml).

2. Pour les essais de lyse de la poudre acétonique, le signe + signifie qu'il y a une diminution d'opacité d'au moins 60% en 5 minutes avec une concentration de 15 µg d'enzyme par ml de suspension bactérienne. Le signe — signifie qu'il y a absence de lyse même après un temps d'incubation assez prolongé. Cependant pour *Bacillus megatherium* B 899, il faut pour la lyse une concentration de 1 mg/ml.

Par lyse, on entend une destruction définitive du microorganisme avec diminution de l'opacité de la suspension bactérienne.

Bactéries	Lysozyme d'oeuf de poule		Lysozyme de rate de lapin	
	essai sur boîtes de Petri	lyse de poudre acétonique	essai sur boîtes de Petri	lyse de poudre acétonique
<i>Aerobacter aerogenes</i>	—	—	—	—
<i>Bacillus anthracis</i>	—	—	—	—
<i>Bacillus megatherium</i> B 899	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> américain	—	—	—	—
B 90	—	—	—	—
champignon	—	—	—	—
Lille III	—	—	—	—

TABLEAU VI (suite)

<i>Bactéries</i>	<i>Lysozyme d'oeuf de poule</i>		<i>Lysozyme de rate de lapin</i>	
	<i>essai sur boîtes de Petri</i>	<i>lyse de poudre acétonique</i>	<i>essai sur boîtes de Petri</i>	<i>lyse de poudre acétonique</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (gravis)	—	—	—	—
<i>Corynebacterium preiz-nocardi</i>	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	—	—	—
<i>Klebsilia pneumoniae</i>	—	—	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i>	—	—	—	—
<i>Micrococcus cereus</i>	—	—	—	—
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> :				
NCTC 3665 (Fleming)	+	+	+	+
Souche K. Meyer	+	+	+	+
Souche Callerio	+	+	+	+
Souche Wolff	+	+	+	+
<i>Moraxella lwoffii</i>	—	—	—	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	—	—	—	—
<i>Neisseria intracellularis</i> A	—	—	—	—
<i>Neisseria intracellularis</i> B	—	—	—	—
<i>Neisseria intracellularis</i> C	—	—	—	—
<i>Paracolonobactrum aerogenes</i> coliformae	—	—	—	—
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>	—	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i>	—	—	—	—
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	—	—	—	—
<i>Salmonella paratyphi</i> A	—	—	—	—
<i>Salmonella paratyphi</i> B	—	—	—	—
<i>Salmonella typhi</i> TO 901	—	—	—	—
<i>Sarcina flava</i> Coccus P	+	+	+	+
Val de Grâce	+	+	+	+
Souche (laboratoire)	+	+	+	+
<i>Sarcina lutea</i>	+	+	+	+
<i>Shigella alcalescens</i>	—	—	—	—
<i>Shigella ambigua</i>	—	—	—	—
<i>Shigella dispar</i>	—	—	—	—
<i>Shigella dysenteriae</i>	—	—	—	—
<i>Shigella flexneri</i>	—	—	—	—
<i>Shigella Manchester</i>	—	—	—	—
<i>Shigella sonnei</i>	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> :				
type α	—	—	—	—
type α - β	—	—	—	—
Dusiaux	—	—	—	—
Oxford	—	—	—	—
Val de Grâce	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecalis</i>	—	—	—	—
<i>Vibrio el Tor</i>	—	—	—	—
<i>Vibrio cholerae</i>	—	—	—	—

biennes que le lysozyme d'oeuf. Si l'on compare maintenant la formule brute de la protéine lysante II de la rate du lapin [Gly₁₁Ala₁₃Leu₁₀Ileu₇Pro₅Phe₃(CyS-)₁₀Met₂Try₂Arg₆His₁Lys₆Asp₂₀Glu₁₁Ser₁₀Thr₇Tyr₃Val₆Amid₂₂](H₂O) avec celle du lysozyme d'oeuf¹⁷ [Gly₁₁Ala₁₀Leu₈Ileu₆Pro₂Phe₃(CyS-)₁₀Met₂Try₈Arg₁₁His₁Lys₆Asp₂₀Glu₄Ser₁₀Thr₇Tyr₃Val₆Amid₁₈](H₂O), il apparaît quelques différences marquantes, concernant particulièrement l'arginine, la proline, l'acide glutamique et le tryptophane. C'est évidemment à ces différences de composition que sont dues les différences de comportement de la protéine lysante de la rate du lapin et du lysozyme d'oeuf de poule¹⁸, lors de leur passage sur Amberlite XE-64.

RÉSUMÉ

La protéine lysante II de la rate du lapin, isolée précédemment sous forme d'acétate, a été obtenue, par un procédé plus simple, sous forme de protéine libre cristallisée. Sa composition en acides aminés a été déterminée, et correspond à la formule: $[\text{Gly}_{11}\text{Ala}_{13}\text{Leu}_{10}\text{Ileu}_7\text{Pro}_5\text{Phe}_3(\text{CyS})_{10}\text{Met}_2\text{Try}_2\text{Arg}_6\text{His}_1\text{Lys}_6\text{Asp}_{20}\text{Glu}_{11}\text{Ser}_{10}\text{Thr}_7\text{Tyr}_3\text{Val}_6\text{Amid}_{22}] (\text{H}_2\text{O})$, de poids moléculaire 14,267. Il s'agit d'un enzyme dont l'action lysante s'exerce, au moins qualitativement, sur les mêmes micro-organismes que le lysozyme d'oeuf; c'est donc un enzyme dépolymérisant le même polysaccharide.

SUMMARY

The lytic protein II of the spleen of the rabbit isolated before in the form of an acetate, has been obtained, by a simpler process, in the form of a free, crystallized protein. Its amino acid composition has been determined; it is: $[\text{Gly}_{11}\text{Ala}_{13}\text{Leu}_{10}\text{Ileu}_7\text{Pro}_5\text{Phe}_3(\text{CyS})_{10}\text{Met}_2\text{Try}_2\text{Arg}_6\text{His}_1\text{Lys}_6\text{Asp}_{20}\text{Glu}_{11}\text{Ser}_{10}\text{Thr}_7\text{Tyr}_3\text{Val}_6\text{Amid}_{22}] (\text{H}_2\text{O})$ with a molecular weight of 14,267. It is an enzyme whose lytic action is exerted, at least qualitatively, on the same microorganisms as the lysozyme of hen's egg; it is therefore an enzyme depolymerizing the same polysaccharide.

ZUSAMMENFASSUNG

Das lytische Protein II, das schon vorher aus der Milz des Kaninchens als Acetat kristallisiert wurde, konnte durch ein vereinfachtes Verfahren, als freies, kristallisiertes Protein erhalten werden. Seine Zusammensetzung in Aminosäuren wurde festgestellt und die Formel lautet: $[\text{Gly}_{11}\text{Ala}_{13}\text{Leu}_{10}\text{Ileu}_7\text{Pro}_5\text{Phe}_3(\text{CyS})_{10}\text{Met}_2\text{Try}_2\text{Arg}_6\text{His}_1\text{Lys}_6\text{Asp}_{20}\text{Glu}_{11}\text{Ser}_{10}\text{Thr}_7\text{Tyr}_3\text{Val}_6\text{Amid}_{22}] (\text{H}_2\text{O})$ welche einem Molekulargewicht von 14,267 entspricht. Es handelt sich um ein Enzym dessen lytische Wirkung sich, zu mindestens qualitativ, gegenüber denselben Microorganismen auswirkt wie die des Lysozyms aus dem Hühnerei; das Enzym depolymerisiert also dasselbe Polysaccharid.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 95.
- ² C. H. FISKE ET Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- ³ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
- ⁴ C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ⁵ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- ⁶ C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 82.
- ⁷ C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 509.
- ⁸ R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 442.
- ⁹ H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 470.
- ¹⁰ S. UDENFRIEND ET J. R. COOPER, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 227.
- ¹¹ F. P. CHINARD, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 91.
- ¹² J. R. SPIES ET D. C. CHAMBERS, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.
- ¹³ J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSCHMANN ET H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 23.
- ¹⁴ O. FÜRTH ET Z. DISCHE, *Biochem. Z.*, 146 (1924) 275.
- ¹⁵ O. FOLIN ET A. P. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 103.
- ¹⁶ J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 26 (1932) 2144.
- ¹⁷ H. L. FEVOLD, *Adv. in Prot. Chem.*, 6 (1951) 187.
- ¹⁸ H. H. TALLAN ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 507.

Reçu le 19 février 1954