

LA PROTÉINE LYSANTE II DE LA RATE DU LAPIN

III. DÉTERMINATION DES AMINOACIDES N- ET C-TERMINAUX

par

PIERRE JOLLÈS ET CLAUDE FROMAGEOT

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

Un précédent travail a donné la composition quantitative en acides aminés de la protéine lysante II de la rate du lapin¹. Cette protéine possède une action enzymatique qui, en première analyse, se montre analogue à celle du lysozyme de l'oeuf de poule. L'étude comparée des structures de ces deux protéines lysantes présente donc un intérêt évident; et c'est à ce point de vue que nous avons cherché à caractériser les acides aminés N- et C-terminaux éventuellement présents dans la protéine lysante de la rate du lapin.

Caractérisation de la lysine comme acide aminé N-terminal. Cette caractérisation est faite selon la technique classique de SANGER²: la DNP-protéine, obtenue par traitement de 10 mg de protéine lysante II de la rate du lapin, est hydrolysée par chauffage à reflux pendant six heures avec HCl 6 N. Les DNP-aminoacides extraits par l'éther en milieu acide dans les conditions habituelles sont concentrés sous vide et évaporés à sec; le résidu est soumis d'une part à une chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 507 en utilisant le mélange phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1) et d'autre part à une chromatographie sur papier Whatman 1 en utilisant le mélange pyridine-alcool isoamylique-ammoniacal 1.6 N (6:14:20)³. Ces deux chromatographies ont permis de caractériser la di-DNP-lysine comme unique DNP-aminoacide soluble dans l'éther. Ce DNP-aminoacide, élué du papier de l'une ou de l'autre des chromatographies précédentes, par du carbonate de soude (éluat A), est soumis à une nouvelle chromatographie sur papier Whatman 1 en utilisant le mélange: chloroforme-acide acétique 1.5 N-*n*-propanol (10:6:10)⁴. On sait que dans ce solvant tous les DNP-aminoacides migrent assez rapidement sauf la di-DNP-tyrosine et la di-DNP-lysine. Il a été ainsi possible de vérifier la présence de la seule di-DNP-lysine; la lysine apparaît donc le seul acide aminé N-terminal.

L'éluat A est soumis à des mesures photométriques permettant de comparer son absorption ($\lambda = 400 \text{ m}\mu$) à celle d'une solution témoin de di-DNP-lysine. On a pu de cette façon calculer que la quantité de di-DNP-lysine extraite correspond à 0.72 molécule de lysine par molécule de protéine (P.M. 14,300)¹. D'autre part, des opérations témoins ont été faites de la façon suivante: une solution à 1% de di-DNP-lysine a été traitée à chaud par HCl 6 N dans les mêmes conditions que la DNP-protéine, le produit résultant étant soumis ensuite exactement aux mêmes traitements (chromatographie et élution) décrits plus haut. Le dosage photométrique de la di-DNP-lysine récupérée finalement montre que le rendement de ces opérations est de 75%. La valeur trouvée de 0.72

molécule de di-DNP-lysine par molécule de protéine correspond donc, en fait, à $0.72/0.75 = 0.96$ molécule de lysine N-terminale par molécule de protéine.

Le rendement en di-DNP-lysine, obtenue à partir de la protéine en question, et même en absence de toute correction, est considérablement plus élevé que celui que l'on obtient dans le cas de la lysine N-terminale du lysozyme d'oeuf de poule^{5,6}. Ce fait nous paraît devoir être rapproché de la différence de ces protéines en tryptophane, dont la présence a été rendue responsable de la labilité particulière de la di-DNP-lysine dans le lysozyme^{7,8}.

Caractérisation de la leucine comme acide aminé C-terminal. La détermination des extrémités carboxyliques libres est faite en utilisant la carboxypeptidase: 900 μ g de suspension commerciale de carboxypeptidase Worthington sont mis en contact avec 5 mg de protéine en solution à 0.5% dans un tampon phosphate 0.2 M, pH 7.7 en présence de 0.3% de LiCl et de 0.1% de diisopropylfluorophosphate, à 37°. La réaction enzymatique est arrêtée après des temps définis, par addition d'acide trichloracétique; après centrifugation des protéines précipitées, le liquide clair est déminéralisé par passage sur Amberlite IR-4B, puis soumis à des chromatographies unidimensionnelles sur papier Whatman 1 en utilisant d'une part le mélange *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10) et d'autre part le *n*-butanol tamponné à pH 4⁹. La révélation est faite par la ninhydrine dans les conditions habituelles. Dans les expériences au cours desquelles l'action de l'enzyme n'a pas dépassé 5 heures, on observe une tache unique correspondant à la leucine. La quantité de leucine ainsi formée est approximativement déterminée par la méthode de POLSON¹⁰. Il apparaît ainsi que, après 5 heures d'action de la carboxypeptidase, cette quantité est de 0.20 molécule de leucine par molécule de protéine. Une durée d'action enzymatique sensiblement supérieure à 5 heures fait apparaître de nouveaux acides aminés venant compliquer l'interprétation des résultats.

Toutefois, sans changer autrement les conditions expérimentales, la quantité de leucine libre formée atteint 0.40 molécule après 5 heures, si l'on fait agir la carboxypeptidase sur la DNP-protéine. Dans ce cas, la DNP-protéine est en suspension, et le milieu est constamment agité; en outre la réaction enzymatique est arrêtée par addition d'acide chlorhydrique N. Les DNP-protéines sont alors éliminées par centrifugation, et le liquide surnageant est soumis à des évaporations pour éliminer l'acide chlorhydrique en excès. La solution finalement obtenue est prête à être chromatographiée.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats précédents montre que, comme le lysozyme de l'oeuf^{5,11,12}, la protéine lysante II de la rate du lapin est constituée par une chaîne peptidique unique possédant une molécule de lysine comme acide aminé N-terminal et une molécule de leucine comme acide aminé C-terminal.

RÉSUMÉ

Appliquant à la protéine lysante II de la rate du lapin la méthode au fluorodinitrobenzène de SANGER et soumettant d'autre part cette protéine à l'action de la carboxypeptidase, il a été possible de montrer que, comme le lysozyme de l'oeuf de poule, la protéine lysante II de la rate du lapin est constituée par une chaîne peptidique unique possédant une molécule de lysine comme acide aminé N-terminal et une molécule de leucine comme acide aminé C-terminal.

SUMMARY

By applying SANGER's fluorodinitrobenzene method to the lytic protein II of the spleen of the rabbit, and submitting also this protein to the action of carboxypeptidase, it was possible to show that, as the lysozyme of hen's egg, the lytic protein II of the spleen of the rabbit is formed by a unique peptidic chain having one molecule of lysine as N-terminal and one molecule of leucine as C-terminal amino acid.

ZUSAMMENFASSUNG

Das lytische Protein II der Milz des Kaninchens wurde einerseits der Aktion des SANGER'schen Reagens (Fluordinitrobenzol), und andererseits derjenigen der Carboxypeptidase ausgesetzt. Es konnte so festgestellt werden dass, wie das Lysozym aus dem Hühnerei, auch das lytische Protein II der Milz des Kaninchens bloss aus einer einzigen Peptidkette besteht und eine Molekel Lysin als Amino- und eine Molekel Leucin als Carboxyl-Endgruppe aufweist.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 219.
- ² F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ³ G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- ⁴ F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 353.
- ⁵ F. C. GREEN ET W. A. SCHROEDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1385.
- ⁶ M. JUTISZ ET L. PÉNASSE, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 480.
- ⁷ A. R. THOMPSON, *Nature*, 168 (1951) 390.
- ⁸ S. R. DICKMAN ET R. O. ASPLUND, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5208.
- ⁹ E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- ¹⁰ A. POLSON, M. MOSLEY ET R. W. G. WYCKOFF, *Science*, 105 (1947) 603.
- ¹¹ A. R. THOMPSON, *Nature*, 169 (1952) 495.
- ¹² J. I. HARRIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2944.

Reçu le 25 février 1954