

Quelques nouveaux peptides constitutifs du lysozyme de l'oeuf de poule

Continuant nos investigations sur la structure du lysozyme de l'oeuf de poule, nous avons isolé quatre nouveaux peptides résultant de l'action de la trypsine sur cette protéine:

Asp(NH₂)·Arg, Ileu·Arg, Thr·Pro·Gly·Sér·Arg, Val·Ala·Try·Arg.

Conditions d'hydrolyse. Le lysozyme est dénaturé, en solution aqueuse à 5 %, pendant 1 heure à 100°. Il est laissé ensuite en contact avec la trypsine cristallisée Worthington pendant 6 heures, à 37°, et à pH 7.8 (concentration en protéine 1 %; rapport enzyme: substrat 1:100). Les longs peptides et la protéine non attaquée sont éliminés par précipitation alcoolique. Le liquide surnageant est concentré et soumis à différentes chromatographies sur papier.

Purification des peptides. Chaque peptide est purifié par deux chromatographies sur papier dans deux solvants différents suivies d'une ionophorèse. La première chromatographie est faite dans le mélange (A): *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10) sur papier Whatman No. 4 pendant 16 heures. La deuxième chromatographie est faite dans le solvant (B): *n*-butanol-phénol-acide acétique-eau (75:75:50:100) sur papier Whatman No. 1 pendant 24 heures. L'introduction du phénol dans le mélange butanol-acide acétique augmente le cheminement des peptides basiques et favorise la séparation de ceux qui ont un *R*_F voisin. L'ionophorèse est faite sur papier Whatman No. 1 dans le mélange (C): pyridine-eau-acide acétique (100:900:4) à pH 6.5 pendant 2 heures 30 sous 1,000 volts.

TABLEAU I

COMPORTEMENT DES PEPTIDES

a: migration égale à celle des acides aminés témoins indiqués.
b: mobilité par rapport à celle de l'arginine.

Peptides	1 ^{re} chromatographie (A)	2 ^{me} chromatographie (B)	Ionophorèse (C)
	<i>a</i>	<i>R</i> _F	<i>b</i>
Asp(NH ₂)·Arg	Cys	0.28	0.7
Thr·Pro·Gly·Sér·Arg	Lys	0.37	0.6
Ileu·Arg	Ala	0.56	0.7
Val·Ala·Try·Arg	Ala	0.65	0.5

Structure des peptides

a. Asp(NH₂)·Arg. La composition du peptide déterminée après hydrolyse totale est (Asp, Arg). On vérifie l'absence de tryptophane⁸. La technique de SANGER³ indique que Asp est en position N-terminale. La structure pouvait donc être Asp·Arg, mais le comportement de ce peptide par ionophorèse à pH 6.5 n'est pas celui d'un peptide neutre par compensation (mobilité nulle). Il chemine au contraire comme un dipeptide basique (mobilité 0.7). La désamidation par hydrolyse acide conduit à un peptide de mobilité nulle et de structure Asp·Arg confirmant ainsi que la structure du peptide primitif est Asp(NH₂)·Arg.

b. Ileu·Arg. La composition du peptide est (Ileu, Arg). l'absence de Try est vérifiée². Par les méthodes d'EDMAN⁴ et de SANGER³, la structure Ileu·Arg a été établie.

c. Thr·Pro·Gly·Sér·Arg. Par hydrolyse totale, la présence d'un seul résidu de chacun des acides aminés suivants a été établie: (Thr, Pro, Gly, Sér, Arg). L'absence de Try a été vérifiée². L'acide aminé N-terminal, Thr, a été déterminé par la méthode de SANGER³. L'hydrolyse partielle acide du pentapeptide donne un mélange complexe de peptides à faibles rendements. Après élimination de l'acide aminé N-terminal par la méthode d'EDMAN⁴, l'hydrolyse partielle acide du tétrapeptide résultant donne au contraire avec un excellent rendement deux dipeptides dont la structure a été établie: Pro·Gly et Sér·Arg. Comme de plus le tétrapeptide entier réagit à l'isatine⁶, réactif spécifique des peptides commençant par la proline, la structure du pentapeptide s'est trouvée établie: Thr·Pro·Gly·Sér·Arg. Cette structure est en contradiction avec l'enchaînement Val·Thr·Pro·Gly·Ala donné par THOMPSON⁶. La validité de l'enchaînement que nous proposons est confirmée par les observations suivantes: le lysozyme ne contient que deux résidus de proline; l'un est engagé dans l'enchaînement Leu·Pro⁷, l'autre fait partie du présent enchaînement: Thr·Pro·Gly. Du côté N-terminal la spécificité des coupures obtenues par la trypsine suggère que Thr doit être précédé par un acide aminé basique. D'autre part nous avons toujours constaté l'absence d'une alanine qui serait liée ici au carboxyle du glycocolle.

d. Val-Ala-Try-Arg. Par hydrolyse totale acide, (Val, Ala, Arg) ont été obtenus en quantités équimoléculaires. La présence de Try a été décelée spécifiquement sur le peptide entier²; par la méthode d'EDMAN⁴, il a été possible de détacher successivement: Val, Ala et Try. L'arginine libre a été retrouvée à la fin de l'opération.

Scission de la leucine C-terminale. Il est intéressant de noter que, après traitement du lysozyme par la trypsine dans les conditions réalisées ici, on trouve, comme acides aminés à l'état libre, uniquement de la lysine, de l'arginine et de la leucine en quantités inférieures à une molécule pour une molécule de lysozyme. La lysine ainsi libérée est évidemment la lysine N-terminale; l'arginine ne peut provenir que d'une liaison Lys-Arg ou Arg-Arg; quant à la leucine, elle ne peut représenter que la leucine C-terminale^{8,9}. Il en résulte que l'acide aminé précédent immédiatement la leucine est soit la lysine, soit l'arginine.

JACQUELINE THAUREAUX
ROGER ACHER

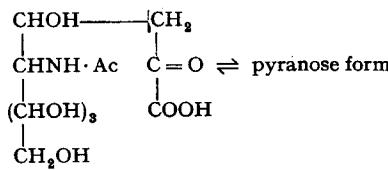
Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences,
Paris (France)

- ¹ A. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH ET R. KITAI, *Biochem. J.*, 60 (1955) 541.
- ² J. TABONE, D. ROBERT, S. THOMASSEY ET N. MAMOUNAS, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 529.
- ³ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 511.
- ⁴ P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 283.
- ⁵ R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- ⁶ A. R. THOMPSON, *Biochem. J.*, 61 (1955) 253.
- ⁷ R. ACHER, J. CHAUVET, C. CROCKER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 167.
- ⁸ J. I. HARRIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2944.
- ⁹ A. R. THOMPSON, *Nature*, 169 (1952) 495.

Reçu le 7 mars 1956

The linkage of sialic acid in mucoprotein

It has been established that sialic acid¹ and N-acetyl neuraminic acid² respectively are components of many mucoproteins and that 2-carboxypyrrrole isolated³ from the alkali hydrolysate of these mucoproteins is derived from neuraminic acid⁴. The structure shown below was recently assigned⁵ to N-acetyl neuraminic acid (I) on the basis of the analytical data available and is supported



by the isolation of 2-carboxypyrrrole from a Knorr-type condensation of D-glucosamine with pyruvic acid. The characteristic features of I, (i) the aldol type of linkage between N-acetyl hexosamine and pyruvic acid providing favourable conditions for the production of 2-carboxypyrrrole upon alkali treatment and (ii) the presence of an α -keto acid grouping yielding readily to decarboxylation by mineral acid with the formation of a substituted 2-deoxy aldose, account for most of its chemical properties. Sialic acid has an additional O-acetyl group which is easily split off⁶ attached to one of the C atoms 4, 6, 7, 8 or 9.

Human urine mucoprotein² (UM) and bovine submaxillary gland mucoprotein⁷ (BSM) are known to contain 4% I and 17% sialic acid respectively. When acted upon by the influenza virus enzyme or by the receptor destroying enzyme (RDE) of vibrio cholerae, these mucoproteins release a dialysable substance engaging in the same chemical reactions as do the acetylated neuraminic acids⁸. The substance liberated from UM was identified as I². These observations would suggest that mono- and diacetyl neuraminic acid respectively occupy terminal positions in the mucoprotein molecule. For UM it is known that neuraminic acid is located in the carbohydrate-prosthetic group⁹.

Both neuraminic acids have strong reducing power in analogy to that of 2-ketogluconic acid.