

STRUCTURE DU LYSOZYME D'OEUF DE POULE

II. ETUDE DE QUELQUES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT PEPSIQUE

P. JOLLÈS, J. JOLLÈS-THAUREAUX ET C. FROMAGEOT

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

Continuant nos recherches sur la structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule^{1,2,3}, nous avons soumis cette protéine à l'action de la pepsine.

Conditions d'hydrolyse

Le lysozyme provenant des laboratoires Armour de Chicago (lot No. 381-187) est laissé en contact avec la pepsine Worthington pendant 24 heures à 37°C dans une solution tampon de citrates de pH 2.2 et 0.2 N. (Concentration en protéine: 1%; rapport enzyme/substrat: 1/100.) L'action enzymatique est stoppée en ajustant le pH à 7 avec NaOH 0.2N. L'évolution en fonction du temps de l'hydrolyse pepsique montre que l'action de l'enzyme est à peu près complète au bout de 6 heures; mais après trois heures déjà, une partie aliquote de l'hydrolysate ne lyse plus une suspension de *Micrococcus lysodeikticus*⁴.

Séparation des peptides

La séparation des peptides (ou acides aminés) est faite par chromatographie sur colonne de résine Dowex-50X2 suivant la méthode de HIRS, STEIN ET MOORE⁵. La Fig. 1 rend compte des différents constituants de l'hydrolysate: 17 pics (PA1 à PA17) ont été repérés par un dosage à la ninhydrine avant et après hydrolyse alcaline. Une dix-huitième fraction est obtenue par élution de la résine en milieu alcalin (PA18). Les pics sont dessalifiés et les peptides sont analysés après purification, comme cela a été décrit lors de l'étude de l'hydrolysate tryptique¹. Le comportement et la composition des peptides sont indiqués dans le Tableau I. On n'a pas tenu compte de ceux obtenus avec un rendement inférieur à 3%.

Structure de quelques peptides

Les structures de ces peptides ont été obtenues en déterminant les acides aminés N-terminaux par la méthode de SANGER⁶ et les acides aminés C-terminaux par action de la carboxypeptidase:

PA5: Leu·Ser·Ser

PA6: Val·Glu(NH₂)·Ala; (l'acide glutamique est amidé, la mobilité du peptide étant nulle à pH 6.5.)

PA7a: Ileu·Thr·Ala

PA12: Gly·Ileu·Leu

PA16b: Gly·Tyr·Ileu·Leu; (par action de la carboxypeptidase, la leucine se détache plus rapidement que l'isoleucine)

PA17: Ala·Lys·Phe

PA18c: Tyr·Arg·Gly

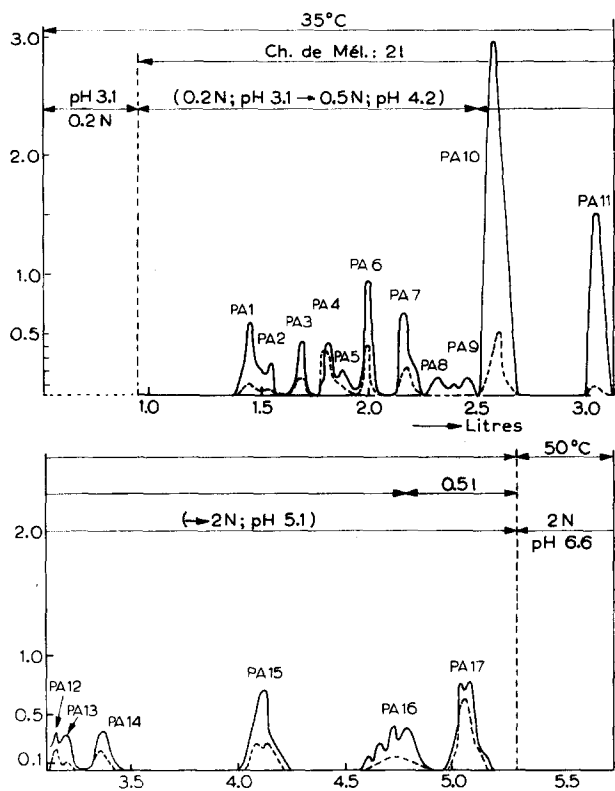


Fig. 1. Séparation des produits obtenus par action de la pepsine sur 20 μ moles de lysozyme. — Coloration ninhydrine après hydrolyse alcaline. ---- coloration ninhydrine directe exprimée en conc. mM d'équiv.-leucine.

TABLEAU I

COMPORTEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE ET IONOPHORÈSE SUR PAPIER, RENDEMENT ET COMPOSITION DES PICS ISOLÉS APRÈS HYDROLYSE PEPTIQUE DU LYSOZYME

Peptides	$R_F(A)^1$	m^* (pH 6.5)	m^* (pH 3.6)	r (%)	Composition
PA 1a	0.05	—0.45		15	Ser ₂ , Asp ₁
b	0.16			10	Ala ₁ , Ser ₁ , Ileu ₁ , Asp ₁ , Thr ₁
PA 2	0.05	—0.45		15	Ser ₁ , Asp ₁ , Glu ₁
PA 3	0.20	—0.4		18	Ser ₁₋₂ , Leu ₁ , Asp ₁
PA 4	0.71	o	o	62	Leu libre
PA 5	0.36	o		11	Ser ₂ , Leu ₁
PA 6	0.31	o	+ 0.15	52	Ala ₁ , Val ₁ , Glu ₁
PA 7a	0.55	o		20	Ala ₁ , Thr ₁ , Ileu ₁
b	0.63	o		5	Ala, Leu, Ileu
PA 8a	o			31	Gly, Ala, Ser, Thr, Asp, Glu, Arg
b	0.63	o		3	Phe libre
PA 9	o			3	Arg, etc.
PA10a	o	—0.15	o	25	Gly ₁ , Ala ₁ , Ser ₁ , Thr ₂ , Asp ₂₋₃ , Glu ₁ , Arg ₁
b	0.05				
c	0.16	—0.46		25	Ser, Phe, Asp, Glu
PA11	o	o	+ 0.07	22	Gly ₁ , Ala ₁ , Ser ₁ , Thr ₂ , Tyr ₁ , Asp ₂ , Glu ₁ , Arg ₁
PA12	0.75			25	Gly ₁ , Leu ₁ , Ileu ₁
PA13	o			8	Arg, etc.
PA14	0.43			17	Gly ₁ , Ser ₁ , Leu ₁ , Tyr ₁ , Asp ₁

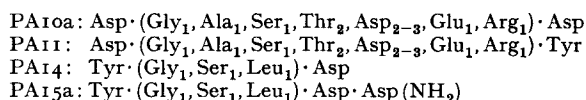
PA15a	0.27		25	Gly ₁ , Ser ₁ , Leu ₁ , Tyr ₁ , Asp ₂
b	0.50	0	15	Try libre
PA16a	0.71			Ala, Val, Leu, Ileu
b	0.80		45	Gly ₁ , Leu ₁ , Ileu ₁ , Tyr ₁
PA17	0.16	+ 0.9	87	Ala ₁ , Phe ₁ , Lys ₁
PA18a	0	+ 0.2		Gly, Ala, Leu, Asp, Glu, Arg, His, Lys
b	0.05			
c	0.18	+ 0.5		Gly ₁ , Tyr ₁ , Arg ₁

* m = mobilité du peptide calculée par rapport à celle de l'arginine égale à e = + 1 ou par rapport à celle de l'acide cystéique égale à — 1. m = 0 pour le glucose.

Trois de ces peptides avaient déjà été caractérisés en suivant un autre mode de purification⁷.

L'action de la pepsine sur le lysozyme donne naissance à trois acides aminés libres : leucine (PA4), phénylalanine (PA7b) et tryptophane (PA15b).

Les acides aminés N- et C-terminaux des quatre peptides suivants ont été déterminés :

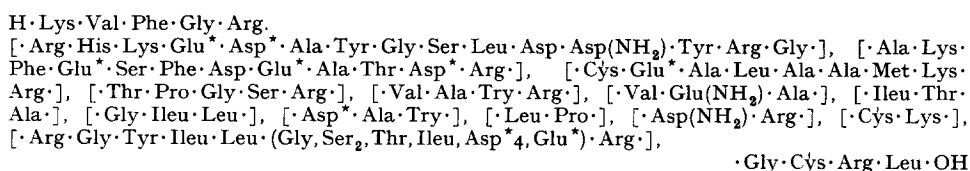


Enfin l'enchaînement . . Arg·His·Lys . . fait partie du peptide PA18a, dont l'acide aminé N-terminal est l'alanine.

Le Tableau II résume les connaissances actuelles sur la structure chimique du lysozyme telles qu'elles se dégagent de notre précédent travail^{1,8} complété par les résultats rapportés ici.

TABLEAU II

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA STRUCTURE CHIMIQUE DU LYSOZYME



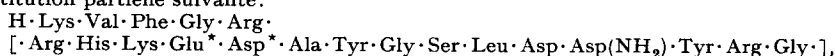
* Il n'a pas été déterminé si ces résidus sont amidés ou non.

REMERCIEMENT

Nous sommes heureux de remercier MARYVONNE BOURDAIN et CLAUDE GUTTON, dont la collaboration technique a été précieuse.

RÉSUMÉ

Divers peptides résultant de l'hydrolyse du lysozyme d'oeuf de poule par la pepsine ont été séparés et isolés à l'état pur. La structure de quelques-uns d'entre eux a été établie. Les résultats obtenus permettent d'étendre nos connaissances sur la structure chimique du lysozyme et d'en donner la constitution partielle suivante :



Bibliographie p. 442.

Bibliographie p. 453.