

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'hydrolysat 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'hydrolysat: 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'hydrolysat trypsique¹. 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

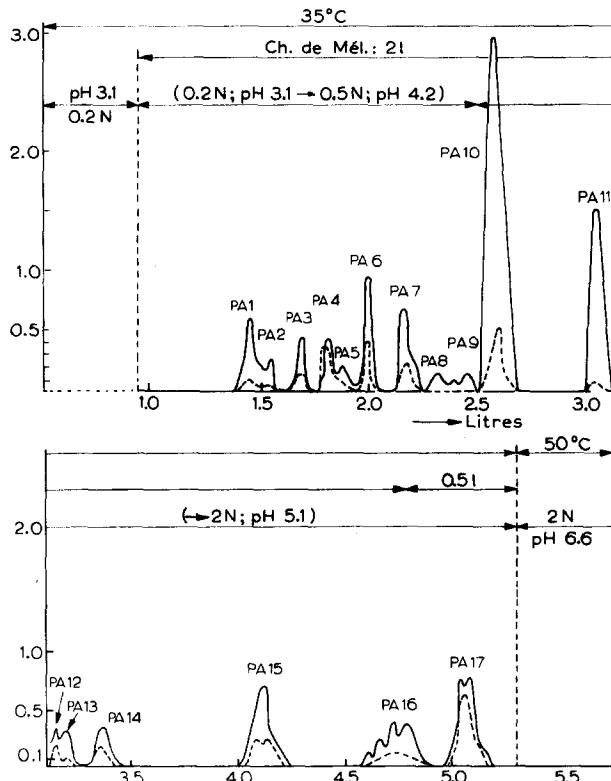


Fig. 1. Séparation des produits obtenus par action de la pepsine sur 20 μ moles de lysozyme.
— Coloration ninhydrine après hydrolyse alcaline. —— coloration ninhydrine directe exprimée en conc. mM d'équiv.-leucine.

TABLEAU I

COMPORTEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE ET IONOPHORÈSE SUR PAPIER, RENDEMENT ET
 COMPOSITION DES PICS ISOLÉS APRÈS HYDROLYSE PEPSIQUE 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	0	0	62	Leu libre
PA 5	0.36	0		11	Ser ₂ , Leu ₁
PA 6	0.31	0	+0.15	52	Ala ₁ , Val ₁ , Glu ₁
PA 7a	0.55	0		20	Ala ₁ , Thr ₁ , Ileu ₁
b	0.63	0		5	Ala, Leu, Ileu
PA 8a	0			31	Gly, Ala, Ser, Thr, Asp, Glu, Arg
b	0.63	0		3	Phe libre
PA 9	0			3	Arg, etc.
PA10a	0	—0.15	0	25	Gly ₁ , Ala ₁ , Ser ₁ , Thr ₂ , Asp ₂₋₃ , Glu ₁ , Arg ₁
b	0.05			25	Ser, Phe, Asp, Glu
c	0.16	—0.46	0	22	Gly ₁ , Ala ₁ , Ser ₁ , Thr ₂ , Tyr ₁ , Asp ₂ , Glu ₁ , Arg ₁
PA11	0	0	+0.07	25	Gly ₁ , Leu ₁ , Ileu ₁
PA12	0.75			8	Arg, etc.
PA13	0			17	Gly ₁ , Ser ₁ , Leu ₁ , Tyr ₁ , Asp ₁
PA14	0.43				

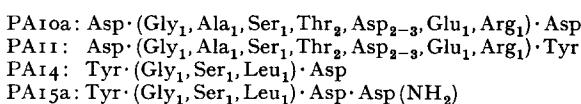
PA15a	0.27		25	Gly ₁ , Ser ₁ , Leu ₁ , Tyr ₁ , Asp ₂
b	0.50	o	15	Try libre
PA16a	0.71			Ala, Val, Leu, Ileu
b	0.80		45	Gly ₁ , Leu ₁ , Ileu ₁ , Tyr ₁
PA17	0.16		87	Ala ₁ , Phe ₁ , Lys ₁
PA18a	o	+ 0.2		Gly, Ala, Leu, Asp, Glu, Arg, His, Lys
b	0.05			
c	0.18	+ 0.5		Gly ₁ , Tyr ₁ , Arg ₁

* 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 = o 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 lalanine.

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

H·Lys·Val·Phe·Gly·Arg.
 [. Arg·His·Lys·Glu^{*}·Asp^{*}·Ala·Tyr·Gly·Ser·Leu·Asp·Asp(NH₂)·Tyr·Arg·Gly·], [. Ala·Lys·Phe·Glu^{*}·Ser·Phe·Asp·Glu^{*}·Ala·Thr·Asp^{*}·Arg^{*}], [. Cys·Glu^{*}·Ala·Leu·Ala·Ala·Met·Lys·Arg^{*}], [. Thr·Pro·Gly·Ser·Arg^{*}], [. Val·Ala·Try·Arg^{*}], [. Val·Glu(NH₂)·Ala·], [. Ileu·Thr·Ala·], [. Gly·Ileu·Leu·], [. Asp^{*}·Ala·Try·], [. Leu·Pro·], [. Asp(NH₂)·Arg^{*}], [. Cys·Lys·], [. Arg·Gly·Tyr·Ileu·Leu·(Gly, Ser₂, Thr, Ileu, Asp^{*}₄, Glu^{*})·Arg^{*}], . . . Gly·Cys·Arg·Leu·OH

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

REMERCIEMENT

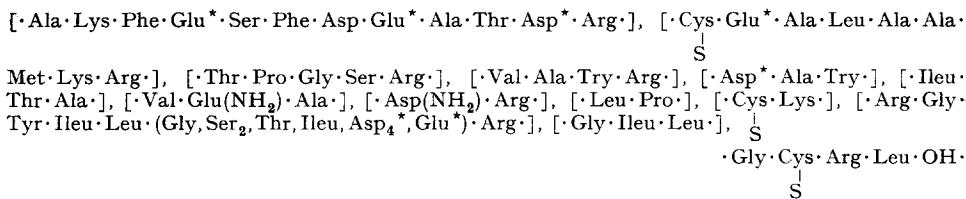
Nous sommes heureux de remercier MARYVONNE BOURDAIN et CLAUDE GUTTON, dont la collaboration technique a été précieuse.

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:

H·Lys·Val·Phe·Gly·Arg.

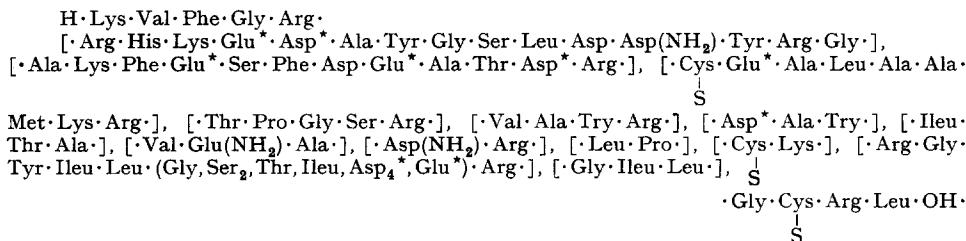
[. Arg·His·Lys·Glu^{*}·Asp^{*}·Ala·Tyr·Gly·Ser·Leu·Asp·Asp(NH₂)·Tyr·Arg·Gly·],



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

SUMMARY

Various peptides, resulting from the hydrolysis of hen's egg lysozyme by pepsin have been separated and isolated in a pure state. The structure of some of them has been established. The results allow us to extend our knowledge concerning the chemical structure of lysozyme and to assign the following partial structure to it:



* It has not been determined whether or not these residues contain an amido group.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 298.
- 2 P. JOLLÈS ET J. THAUREAUX, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1685.
- 3 J. THAUREAUX ET P. JOLLÈS, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1926.
- 4 G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 95.
- 5 C. H. W. HIRS, W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 623.
- 6 F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 511.
- 7 R. ACHER, U. R. LAURILA ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 97.
- 8 P. JOLLÈS, J. JOLLÈS-THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Symposium on Prot. Structure, Paris, Juillet 1957* (sous presse).

Reçu le 10 août 1957

ÉTUDE DE LA FLOCULATION SPONTANÉE DES FORMES R DE CERTAINES ENTEROBACTÉRIACÉES*

J. DIRKX, J. BEUMER ET M. P. BEUMER-JOCHMANS

Institut Pasteur de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Dans un travail récent^{1,2}, nous avons étudié la fixation du phage H-SHPB(Ca) sur différents germes sensibles, dans différentes conditions ioniques et nous avons montré

* Dans ce travail, nous avons utilisé la terminologie généralement en usage dans la science des colloïdes, plutôt que celle de la bactériologie. C'est ainsi que nous appelons flocculation les phénomènes désignés en bactériologie sous les noms d'agglutination, agglomération, etc.