

- ¹ I. P. CRAWFORD AND C. YANOFSKY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 1161.
- ² C. YANOFSKY AND I. P. CRAWFORD, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 1016.
- ³ C. YANOFSKY AND M. RACHMELER, *Biochim. Biophys. Acta*, 28 (1958) 640.
- ⁴ E. RACKER, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1957, p. 294-295.
- ⁵ M. RACHMELER, *A Study of the Normal and Mutationally Altered Forms of Tryptophan Synthetase of Neurospora*, Doctoral Thesis, Western Reserve University, 1960.

Received October 4th, 1960

Biochim. Biophys. Acta, 45 (1960) 405-407

Structure chimique de la moitié N-terminale du lysozyme de blanc d'oeuf de poule

Au cours de l'étude de la structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule, le pentapeptide N-terminal déjà connu¹: H-Lys-Val-Phe-Gly-Arg a pu être intégré dans une séquence contenant soixante des quelques 130 acides aminés de la protéine. Huit peptides obtenus par hydrolyse trypsique ("unités trypsiques") du lysozyme réduit par l'acide thioglycolique puis traité par l'acide iodacétique² se sont en effet trouvés placés dans cet enchaînement N-terminal compte tenu des résultats acquis dans l'étude des peptides formés au cours de l'hydrolyse chymotrypsique ("unités chymotrypsiques") et contenant des résidus d'acides aminés basiques.

Sur les 8 unités trypsiques, 7 avaient déjà été décrites précédemment^{1,3}:

T 1: Lys libre

T 2: Arg libre

T 3: Val-Phe-Gly-Arg

T 4: His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH₂)-Tyr-Arg

T 5: Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys

T 6: Phe-Glu-Ser-Asp(NH₂)-Phe-Asp(NH₂)-Glu(NH₂)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH₂)-Arg

T 7: Asp-(Gly,Ser,Thr,Thr,Asp)-Asp-Tyr-Gly-Ileu-Leu-(Glu,Ileu,Asp,Ser)-Arg
La structure de la huitième unité:

T 8: Gly-Tyr-(Gly,Ser,Leu)-Asp(NH₂)-Try-Val-Cys-Ala-Ala-Lys

n'a été établie que récemment⁴. On sait de plus que T 2 s'enchaîne à T 5 car il a été possible d'isoler dans l'hydrolysat trypsique le peptide: Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys-Arg.

Quelques unités chymotrypsiques du lysozyme avaient déjà été étudiées en partant de la protéine dénaturée par la chaleur⁵. Cependant parmi ces peptides aucun ne pouvait contenir de demi-résidu de cystine. Cette étude a été reprise en soumettant le lysozyme réduit par l'acide thioglycolique et traité par l'acide iodacétique³ à l'action de la chymotrypsine (pH 7.5; 3 h; 37°; rapport enzyme/substrat: 1/50; concentration en protéine: 1%). On sait qu'après réduction chaque résidu de cystine est transformé en deux résidus de S-carboxyméthylcystéine^{2,3}; tous les autres acides aminés et même le tryptophane restent inchangés, à l'exception de la méthionine⁶: des peptides contenant à la fois des résidus de cystine et de tryptophane pouvaient ainsi être isolés; c'est en effet la présence de ces deux acides aminés qui rend si difficile l'étude du

lysozyme et la différence de celles de l'insuline, de la ribonucléase et de la protéine du virus de la mosaïque du tabac. Les unités chymotrypsiques ont été séparées par chromatographie sur colonne de résine Dowex 50X2 (100 × 4 cm en partant de 500 mg de lysozyme): 24 pics ont été repérés grâce à un dosage à la ninhydrine. Comme certains contenaient plusieurs peptides leur purification a été achevée par chromatographie ou ionophorèse sur papier après dessalification. Parmi les nombreux peptides isolés figurent seuls ici ceux qui ont permis de réunir les unités T 1 à T 8. (R_F dans le solvant: *n*-butanol-acide formique-eau (75, 15, 10, v/v/v); mobilité m par rapport à celle de l'arginine = +1 et de l'acide cystéique = -1, à pH 6.5):

C 1: Lys-Val-Phe (pic 20; m = +0.4; R_F , 0.35)

C 2: Gly-Arg-Cys-Glu-Leu (pic 16; m = -0.25; R_F , 0.12)

C 3: Ala-Ala-Ala-Met-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH_2)-Tyr (pic 24; m = +0.30; R_F , 0)

C 4: Arg-Gly-Tyr (pic 21; m = +0.5; R_F , 0.20)

C 5: Val-Cys-Ala-Ala-Lys-Phe (pic 17; m = 0; R_F , 0.27)

C 6: Arg-Asp-(Gly,Ser,Thr,Thr,Asp)-Asp-Tyr (pic 16; m = -0.23; R_F , 0)

C 1 réunit T 1 et T 3; C 2 réunit T 3 et T 5; C 3 réunit T 5, T 2 et T 4; C 4 réunit T 4 et T 8; C 5 réunit T 8 et T 6. Enfin T 6 et T 7 avaient déjà été réunis¹ grâce à un peptide obtenu par hydrolyse pepsique du lysozyme et aussi grâce à C 6. Ainsi les unités T 1 à T 8 constituent, une fois réunies, l'enchaînement N-terminal du lysozyme et correspondent à la moitié environ de sa molécule. Dans la formule ci-dessous, les flèches indiquent les liaisons scindées par la chymotrypsine; son action s'est exercée spécifiquement au niveau des groupements carboxyliques des résidus des acides aminés aromatiques et de la leucine, avec une seule exception au niveau d'un résidu d'asparagine.

H-Lys-Val-Phe \downarrow Gly-Arg-Cys-Glu-Leu \downarrow Ala-Ala-Ala-Met-Lys-Arg-His-Gly-Leu \downarrow Asp-Asp(NH_2)-Tyr \downarrow Arg-Gly-Tyr \downarrow (Gly,Ser,Leu)-Asp(NH_2)-Tyr \downarrow Val-Cys-Ala-Ala-Lys-Phe \downarrow Glu-Ser-Asp(NH_2)-Phe \downarrow Asp(NH_2)-Glu(NH_2)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH_2)-Arg-Asp \star -(Gly,Ser,Thr,Thr,Asp \star)-Asp-Tyr \downarrow Gly-Ileu-Leu \downarrow (Glu \star ,Ileu,Asp \star ,Ser)-Arg...

Notons enfin que dans la moitié C-terminale du lysozyme l'enchaînement contenant 34 acides aminés¹ déjà caractérisé vient d'être prolongé: une formule provisoire du lysozyme a pu ainsi être proposée⁷.

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

JACQUELINE JOLLÈS
PIERRE JOLLÈS

¹ J. JOLLÈS ET P. JOLLÈS, 1^o *Symp. sul lisozima di Fleming*, Milan, 1959.

² P. JOLLÈS ET J. JOLLÈS, *Compt. rend.*, 246 (1958) 1109.

³ P. JOLLÈS ET J. JOLLÈS, *Bull. soc. chim. Biol.*, 40 (1958) 1933.

⁴ J. JOLLÈS ET P. JOLLÈS, résultat inédit.

⁵ P. JOLLÈS, J. JOLLÈS ET J. JAUREGUI, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 96.

⁶ H. G. GRUNDLACH, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1761.

⁷ J. JOLLÈS, P. JOLLÈS ET J. JAUREGUI-ADELL, *Bull. soc. chim. Biol.*, 42 (1960) sous presse.

Reçu le 5 octobre, 1960

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