

STRUCTURE PRIMAIRE DE LA PARACASEINE κ BOVINE

Ghislaine BRIGNON, Jean-Claude MERCIER et Bruno RIBADEAU-DUMAS

Laboratoire de Recherches sur les Protéines, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas, France

et

B.C. DAS

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette, France

Received 16 August 1972

The complete amino acid sequence of bovine para- κ -casein is given.

1. Introduction

Au cours de la phase primaire de la coagulation du lait de vache, la présure hydrolyse spécifiquement une liaison phénylalanine-méthionine très labile de la chaîne peptidique de la caséine κ [1, 2], qui se scinde alors en deux fragments: un fragment NH_2 -terminal appelé paracaseine κ , et un fragment COOH -terminal appelé caséinomacropeptide, dont la séquence est connue [3].

Jollès et al. [4] ont déterminé la structure primaire de quelques peptides trypsiques et chymotrypsiques de la paracaseine κ et donné l'enchaînement de 18 résidus d'acides aminés de l'extrémité COOH -terminale pour laquelle nous avons récemment proposé une séquence sensiblement différente [3]. Le résidu NH_2 -terminal de la chaîne peptidique, non identifié jusqu'ici, serait bloqué.

Dans le présent travail nous décrivons les méthodes utilisées et les résultats ayant permis d'établir la structure primaire complète de la paracaseine κ dont nous discuterons les principales caractéristiques.

2. Méthodes et résultats

La caséine κB a été préparée à partir du lait d'une vache de race Française Frisonne Pie-Noire, homo-

zygote pour l'allèle $\kappa\text{-Cn}^{\text{B}}$, selon la méthode de Zittle et Custer [5]. La paracaseine κB a été séparée d'un hydrolysate "présure" de la caséine κB , par chromatographie sur carboxyméthylcellulose microgranulaire en milieu Tris-diméthylformamide [6]. La séquence de la paracaseine κ a été établie en utilisant comme matériel de départ: i) Le fragment "CNBr" NH_2 -terminal (peptide κBCN1) de la caséine κB , obtenu selon les méthodes précédemment décrites [3]. ii) La SCM-paracaseine κB , résultant de la carboxyméthylation [7] de la paracaseine κB .

La composition en acides aminés de la paracaseine κ (Asx_7 , Thr_3 , Ser_7 , Glx_{16-17} , Pro_{12-13} , Gly_1 , Ala_9 , $1/2\text{Cys}_2$, Val_5 , Met_1 , Ile_6 , Leu_7 , Tyr_{8-9} , Phe_4 , Lys_6 , His_3 , Trp_1 , Arg_5) déduite de l'analyse des acides aminés de la SCM-paracaseine κB et des fragments CNBr de la caséine κB_1 [3], est relativement proche de celles rapportées antérieurement par plusieurs auteurs [6, 8, 9]. Sa séquence complète a été établie en analysant des fragments trypsiques, pepsiques et "NBS" de la SCM-paracaseine κB , ainsi que des fragments chymotrypsiques du peptide κBCN1 (fig. 1).

Treize peptides, représentant 80% environ de la chaîne peptidique, ont été isolés du surnageant de deux hydrolysats trypsiques de la SCM-paracaseine κB (rapport molaire enzyme/substrat 1/100; 40°; pH 8.5; durées respectives de l'incubation: 3 hr et 17 hr).

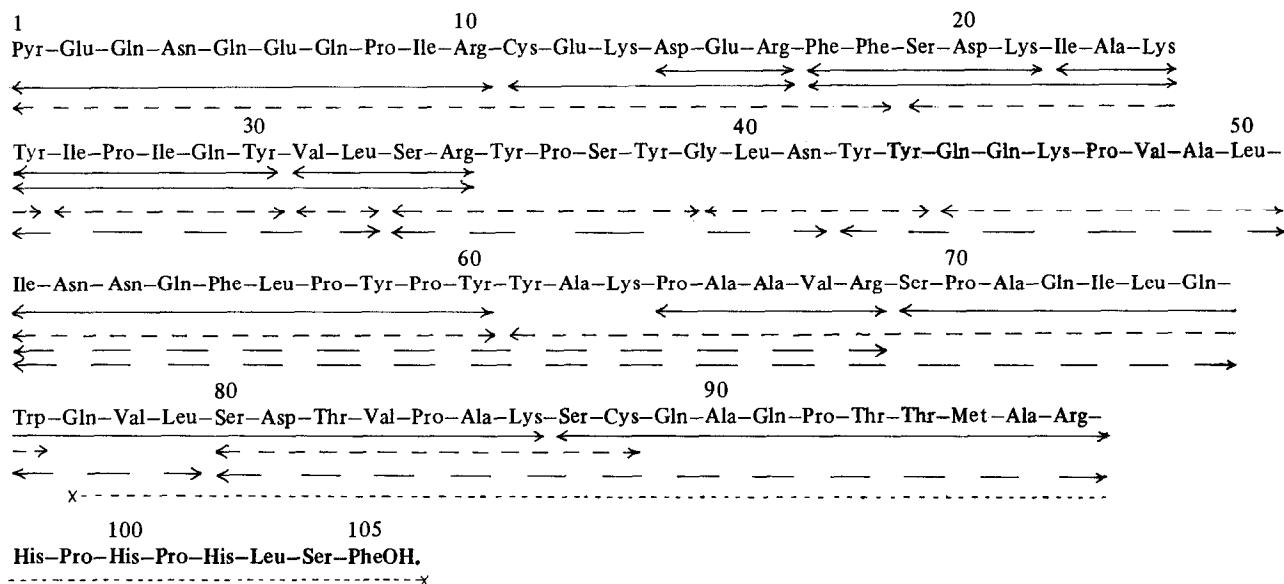


Fig. 1. Structure primaire de la paracaseïne κ bovine: \longleftrightarrow peptides tryptiques; $\leftarrow \rightarrow$ peptides pepsiques; $\leftarrow - \rightarrow$ principaux peptides chymotrypsiques; $\times \cdots \times$ peptide "NBS". La séquence des dix derniers résidus, imprimée en caractères gras, a été établie précédemment [3] lors de l'étude du peptide κB_1CN3 .

Mais la plupart de ces fragments tryptiques ont été obtenus avec un faible rendement car la paracaseïne κ , très insoluble à pH 8,5, est difficilement attaquée par la trypsine.

Le précipité de l'hydrolysate tryptique a donc été dissous dans l'acide formique 5 vol. % et soumis à une hydrolyse pepsique très ménagée (rapport molaire enzyme/substrat 1/6000; 20°, 8 hr d'incubation). L'étude de sept fragments pepsiques purifiés nous a permis de préciser l'enchaînement de quelques peptides tryptiques et d'établir la séquence partielle de la paracaseïne κ .

L'enchaînement des peptides tryptiques de la partie COOH-terminale a été confirmé par l'analyse d'un peptide "NBS" résultant de l'hydrolyse sélective de la paracaseïne κ au niveau du groupe carbonyle du résidu tryptophanyle. Ce peptide, obtenu en hydrolysant la SCM-paracaseïne κB par la N-bromosuccinimide (NBS) en présence d'acétate de mercure [10], a été isolé par chromatographie sur Sephadex G-50.

L'étude des peptides isolés d'un hydrolysate chymotrypsique (rapport molaire enzyme/substrat 1/200; 40°; pH 8,0; 5 hr d'incubation) du peptide $\kappa BCN1$

rendu soluble par maléylation [11], nous a finalement donné tous les recoupements nécessaires à l'établissement de l'enchaînement complet des 105 résidus d'acides aminés de la paracaseïne κ .

Tous ces peptides tryptiques, pepsiques et chymotrypsiques ont été isolés, selon les techniques précédemment décrites [12], par chromatographie sur Dowex 50 et Sephadex G-50 ou G-25, suivie si nécessaire d'une repurification sur papier par électrophorèse ou chromatographie préparative. Leur séquence a été déterminée à l'aide des méthodes classiques enzymatiques et chimiques: dégradation par les exopeptidases (carboxypeptidases A, B et C, leucine aminopeptidase, aminopeptidase M) et les endopeptidases (telles que la pepsine et la thermolysine pour recouper si nécessaire un peptide en fragments plus petits); dégradation soustractive d'Edman; hydrazinolyse. Cependant dans deux cas, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse. L'élucidation de la structure primaire du décapeptide tryptique 1-10 dont l'extrémité NH_2 -terminale est bloquée et qui contient en outre six résidus Glx et un résidu Asx, pouvait difficilement être résolue à l'aide des méthodes d'analyse classiques, mais ne posait aucun

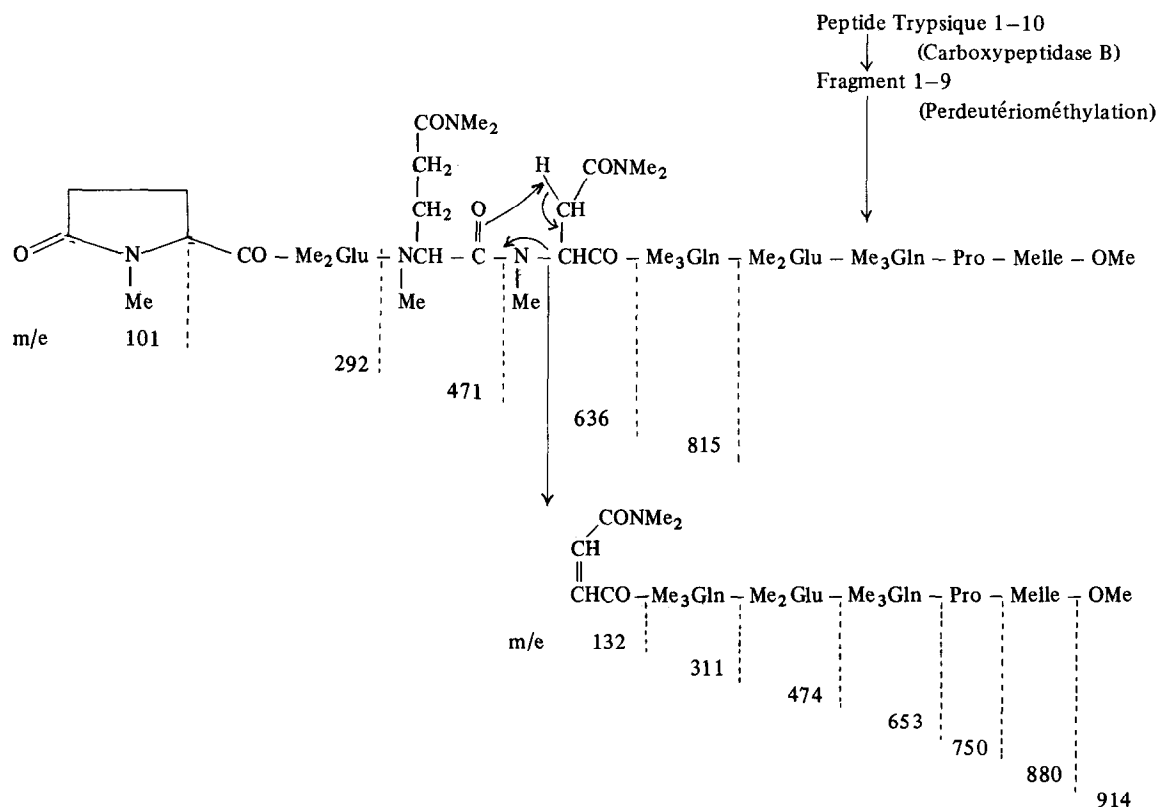


Fig. 2. Détermination par spectrométrie de masse de la séquence du peptide trypsique 1-10. La première série de pics, qui correspond aux coupures des liaisons peptidiques du fragment 1-9, donne la séquence des 5 premiers résidus. La deuxième série de pics qui donne la séquence des résidus 5 → 9 résulte de la fragmentation de la liaison N-C du résidu asparaginyne, suivie d'une coupure normale au niveau des liaisons peptidiques. Ce clivage au niveau de la liaison N-C de l'asparagine (ou de l'acide aspartique) est similaire à celui qui a été observé lors de l'étude de peptides contenant de la tyrosine ou du tryptophane [15, 16]. Me = CD₃.

problème en spectrométrie de masse. Après élimination du résidu arginyle COOH-terminal à l'aide de la carboxypeptidase B, le peptide résiduel 1-9 a été perdeutériométhylé [13] et analysé au spectromètre de masse. La nature et l'enchaînement complet des 9 résidus d'acides aminés ont été déduits de l'interprétation (fig. 2) de deux séries de pics figurant sur le spectre de masse.

Le second peptide analysé au spectromètre de masse, après N-acétylation du groupe ε-NH₂ de la lysine et perméthylation [13, 14], est le fragment chymotrypsique 44-50 qui était bloqué à son extrémité NH₂-terminale par suite de la cyclisation du résidu glutaminyle 44. La séquence de ses sept résidus

constitutifs a été déduite de l'analyse du spectre de masse (fig. 3)

3. Discussion

La paracaséine κ est constituée d'une chaîne peptidique de 105 résidus d'acides aminés: Asp₃, Asn₄, Thr₃, Ser₇, PyroGlu₁, Glu₄, Gln₁₂, Pro₁₂, Gly₁, Ala₉, 1/2Cys₂, Val₅, Met₁, Ile₆, Leu₇, Tyr₉, Phe₄, Lys₆, His₃, Trp₁, Arg₅, bloquée à son extrémité NH₂-terminale par un résidu pyroglutamyle, ce qui explique l'échec de toutes les tentatives faites pour identifier directement le résidu NH₂-terminal de la caséine κ. Nos résultats sont

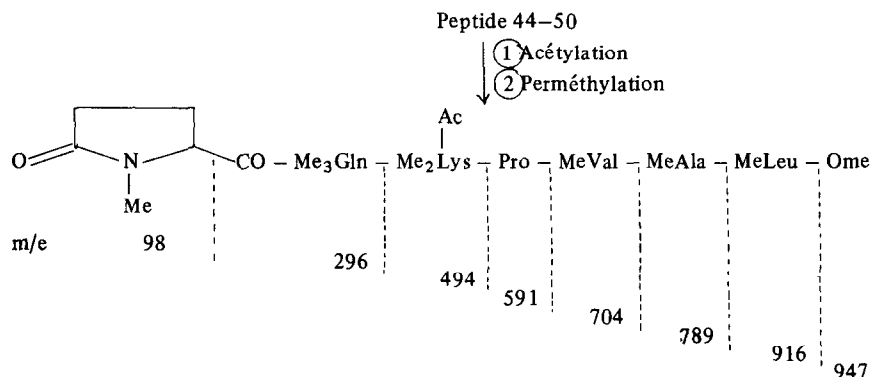


Fig. 3. Détermination par spectrométrie de masse de la séquence du peptide chymotrypsique 44-50 acétylé et perméthylé.

en bon accord avec ceux, partiels, de Jollès et al. [4]: les éléments de séquence donnés par ces auteurs correspondent manifestement aux fragments 11-16, 17-25, 31-34, 64-68, 1-10, 25-30 et 87-105 de la chaîne peptidique. Toutefois, les séquences proposées pour les trois derniers fragments (respectivement Gln-Gln-Gln-Asn-Glu-Glu-Glu-Pro-Ile-Arg; Tyr-Ile-Pro-Ile-Tyr-Gln; Ser-Cys-...-Arg-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-PheOH) diffèrent de celles que nous avons établies.

La masse moléculaire du monomère de paracaseïne κ , calculée d'après la séquence, est 12 269 daltons. L'hydrophobicité moyenne de la molécule, calculée selon Bigelow [17], est de l'ordre de 1310 cal/res. La paracaseïne κ a donc un caractère nettement plus hydrophobe que le caséinomacropéptide dont l'hydrophobicité moyenne est voisine de 1083 cal/res [3]. La paracaseïne κ est caractérisée par la prédominance des résidus basiques, et au pH normal du lait, qui est de l'ordre de 6,8, elle possède une charge nette positive voisine de 4,5, ce qui explique sa migration vers la cathode à pH alcalin.

La chaîne peptidique présente plusieurs particularités remarquables: présence d'un résidu pyroglutamyle en position NH₂-terminale; forte teneur (11,5%) et répartition uniforme des résidus prolyle, ce qui limite les possibilités de structure en hélice α ; inégale répartition des résidus hydrophobes et des résidus chargés, ces derniers étant localisés principalement dans la partie NH₂-terminale de la chaîne peptidique; présence de 2 résidus cystéyle situés respectivement au voisinage des deux extrémités de la chaîne.

Deux points de méthodologie méritent d'être signalés. Mentionnons tout d'abord l'intérêt de l'anhydride maléique [11] comme agent chimique modifiant la solubilité d'un substrat: le peptide κ BCN1 après blocage des résidus lysyle devient parfaitement soluble à pH 8,5, ce qui a facilité son hydrolyse par la chymotrypsine. Quant à la spectrométrie de masse, sa valeur comme méthode d'analyse des peptides [18] n'est plus à démontrer et l'exemple du peptide 1-10 est à cet égard significatif: cette méthode est particulièrement bien adaptée à l'étude de peptides bloqués à leur extrémité NH₂-terminale ou comportant plusieurs résidus Glx ou Asx consécutifs qu'il faut identifier.

La connaissance des structures primaires de la paracaseïne κ et du caséinomacropéptide [3], qui sont les deux éléments constitutifs de la caséine κ , devrait permettre de mieux comprendre le rôle que joue cette protéine dans l'édification et la stabilité des micelles de caséine.

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Joël Uro.

Références

- [1] A. Delfour, J. Jollès, C. Alais et P. Jollès, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19 (1965) 452.

- [2] P. Jollès, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* 5 (1966) 558.
- [3] J.C. Mercier, J. Uro, B. Ribadeau-Dumas et F. Grosclaude, *European J. Biochem.* 27 (1972) 535.
- [4] J. Jollès, C. Alais et P. Jollès, *Helv. Chim. Acta.* 53 (1970) 1918.
- [5] C.A. Zittle et J.H. Custer, *J. Dairy Sci.* 46 (1963) 1183.
- [6] Y.K. Kim, M. Yaguchi et D. Rose, *J. Dairy Sci.* 52 (1969) 316.
- [7] J.H. Woychik, *Arch. Biochem. Biophys.* 109 (1965) 542.
- [8] E.B. Kalan et J.H. Woychick, *J. Dairy Sci.* 48 (1965) 1423.
- [9] P.J. de Koning, thèse (1967) Université d'Amsterdam.
- [10] L.K. Ramachandran et B. Witkop, *Biochemistry* 3 (1964) 1603.
- [11] P.J.G. Butler, J.I. Harris, B.S. Hartley et R. Leberman, *Biochem. J.* 103 (1967) 78.
- [12] F. Grosclaude, J.C. Mercier et B. Ribadeau-Dumas, *European J. Biochem.* 14 (1970) 98.
- [13] D.W. Thomas, *FEBS Letters* 5 (1969) 53.
- [14] D.W. Thomas, B.C. Das, S.D. Géro et E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32 (1968) 519.
- [15] H.R. Morris, D.H. Williams et R.P. Ambler, *Biochem. J.* 125 (1971) 189.
- [16] B.C. Das et R.D. Schmid, *FEBS Letters* 25 (1972) 253.
- [17] C.C. Bigelow, *J. Theor. Biol.* 16 (1967) 187.
- [18] B.C. Das et E. Lederer, dans: *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*, eds. A. Niederwieser and G. Pataki (Ann Arbor, Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan, 1971) p. 175.