

## STRUCTURE PRIMAIRE DU CASEINOMACROPEPTIDE DES CASEINES $\kappa$ PORCINE ET HUMAINE

Jean-Marc CHOBERT, Jean-Claude MERCIER\*, Chantal BAHY et Gérard HAZÉ  
*Laboratoire de Recherches sur les Protéines, I.N.R.A.-C.N.R.Z., 78350, Jouy-en-Josas, France*

Received 28 August 1976

### SUMMARY

The amino acid sequence of porcine and human caseinomacropeptides (CMP), the C-terminal glycopeptide released from  $\kappa$ -casein by chymosin at the initial step of milk coagulation, have been investigated. The complete amino acid sequence of porcine CMP and that of the first 59 amino acid residues of human CMP have been determined. Porcine and human CMPs contain 71 and likely 65 amino acid residues respectively. The extra hexapeptide 38–43 found in porcine CMP arises obviously from the duplication of the DNA fragment coding for the 6 preceding amino acids.

### 1. Introduction

La coagulation du lait par la chymosine (EC 3.4.23.4) résulte de la floculation des micelles de caséines consécutives à la rupture d'une liaison peptidique très labile de la caséine  $\kappa$ . La protéolyse limitée de cette glycoprotéine, qui possède la remarquable propriété de stabiliser les autres caséines vis-à-vis du calcium lorsqu'elle est intacte, donne naissance à 2 fragments: un fragment N-terminal (paracaséine  $\kappa$ ) qui coprécipite avec les autres caséines, et un fragment C-terminal soluble ou caséinomacropeptide (CMP), riche en glucides.

Dans le présent article, nous exposons les résultats de l'étude de la séquence des acides aminés des CMPs porcins et humains dont aucun élément de la structure primaire n'était connu à l'exception de la séquence N-terminale du CMP humain, H.Ile-Ala-(Pro<sub>2</sub>,Ile)-Lys, publiée en 1966 par Malpress et Seid-Akhavan [1].

### 2. Matériel et méthodes

Les CMPs porcins et humains ont été préparés en

*Abbreviation:* CMP, caseinomacropeptide

\*A qui doivent être adressées les demandes de tirés-à-part.

traitant par la chymosine de la caséine  $\kappa$  brute de porc et de femme obtenue par fractionnement de la caséine entière. L'identification de la caséine  $\kappa$  a été faite sur la base de sa sensibilité à la chymosine: 2 aliquotes de chaque fraction de la caséine entière, dont l'une incubée en présence de chymosine dans les conditions de Kim et al. [2], étaient examinées par électrophorèse en gel d'amidon-urée-2-mercaptoéthanol à pH 8.6 selon Schmidt [3]. Dans l'hydrolysât 'chymosine' de toute fraction contenant de la caséine  $\kappa$ , cette dernière doit en principe disparaître et un constituant neutre ou électropositif correspondant à la paracaséine  $\kappa$  doit apparaître. Le CMP n'est généralement pas ou très peu visible.

#### 2.1. Préparation de la caséine $\kappa$ brute de truie

Le lait qui provenait d'une truie de race 'Large White' a été écrémé, dilué au tiers, puis acidifié à pH 4.6 par addition de HCl N. Le précipité de caséine entière, séparé par centrifugation, a été fractionné selon Aschaffenburg [4]. Le précipité obtenu en milieu urée 3.3 M à pH 4.6 a ensuite été traité par le calcium selon Thompson et Kiddy [5]. Le nouveau précipité obtenu a été éliminé et la caséine  $\kappa$  présente dans le surnageant a été chromatographiée sur DEAE-cellulose en milieu urée et 2-mercaptoéthanol, en utilisant un gradient linéaire en concentration de

NaCl [6]. La fraction éluée par le NaCl à la concentration de 0.15 M était constituée de caséine  $\kappa$  presque pure d'après le test de la sensibilité à la chymosine. C'est cette fraction qui a été utilisée pour la préparation du CMP porcin.

### 2.2. Préparation de la caséine $\kappa$ brute de femme

Du lait humain de mélange préalablement écrémé a été acidifié à pH 4.6 puis dialysé contre l'eau distillée jusqu'à obtention d'un précipité. Ce précipité de caséine entière a été purifié par dissolutions et précipitation successives [6]. Après dégraissage à l'éther éthylique dans un appareil de Soxhlet, la caséine entière a été fractionnée sur DEAE-cellulose en milieu urée et 2-mercaptoéthanol, l'élution se faisant par un gradient linéaire en concentration de NaCl [6]. La fraction non retenue sur la colonne, caractérisée par sa sensibilité à la chymosine, a été carboxyméthylée selon Woychik et al. [7], puis rechromatographiée sur DEAE-cellulose dans les mêmes conditions que précédemment. La fraction non retenue sur la colonne était très enrichie en caséine  $\kappa$  et le CMP humain a été préparé à partir de celle-ci.

### 2.3. Préparation des caséinomacropéptides

Les CMPs porcin et humain ont été préparés en hydrolysant les caséines  $\kappa$  brutes porcine et humaine par la chymosine, dans les conditions de Kim et al. [2] le pH mis à part: celui-ci était de 5.3. Chaque CMP a été isolé de l'hydrolysat par chromatographie sur Dowex 50 W-X2 puis sur Sephadex G-50 'fine', selon des techniques précédemment décrites [8].

### 2.4. Hydrolyses enzymatiques et purification des peptides

L'hydrolyse des CMPs par la trypsine et la thermolysine a été effectuée à pH 8.5 et à 40°C pendant 3 h en utilisant respectivement des rapports molaires enzyme/substrat de 1/50 et 1/100. Les peptides ont été isolés, selon des techniques précédemment décrites [9], par chromatographie sur Dowex 50 W-X2 et Sephadex G-50, G-25 ou G-15, suivie si nécessaire d'une repurification sur papier par électrophorèse à pH 1.9.

### 2.5. Détermination de la séquence des acides aminés

La composition en acides aminés a été établie avec

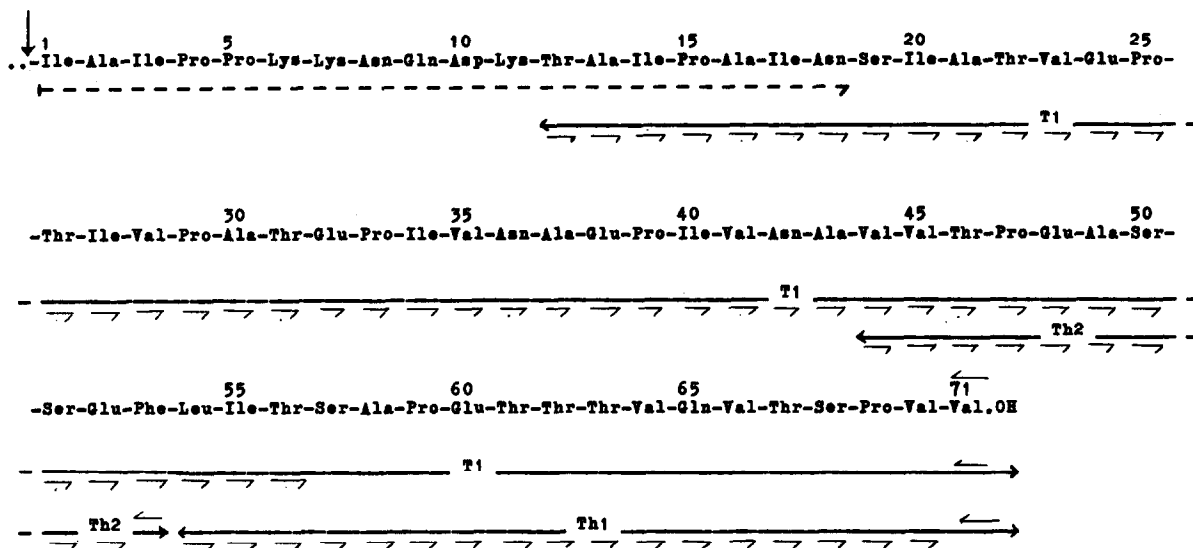
un analyseur Beckman 'Multichrom' selon une méthode dérivée de celle de Spackmann et al. [10] (une seule colonne, 3 tampons d'élution). Le phosphore a été dosé selon la méthode de Hess et Derr [11]. La séquence N-terminale des CMPs porcin et humain a été établie automatiquement avec un séquenceur Beckman 890 B en utilisant un programme 'diméthylbenzylamine' [12]. La séquence complète ou partielle des peptides tryptiques et 'thermolysine' a été établie manuellement par dégradation récurrente d'Edman [13]. Les dérivés phénylthiohydantoïne des acides aminés ont été identifiés par chromatographie sur couche mince de gel de silice [14] et chromatographie en phase gazeuse après silylation [15,16].

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Etude du CMP porcin

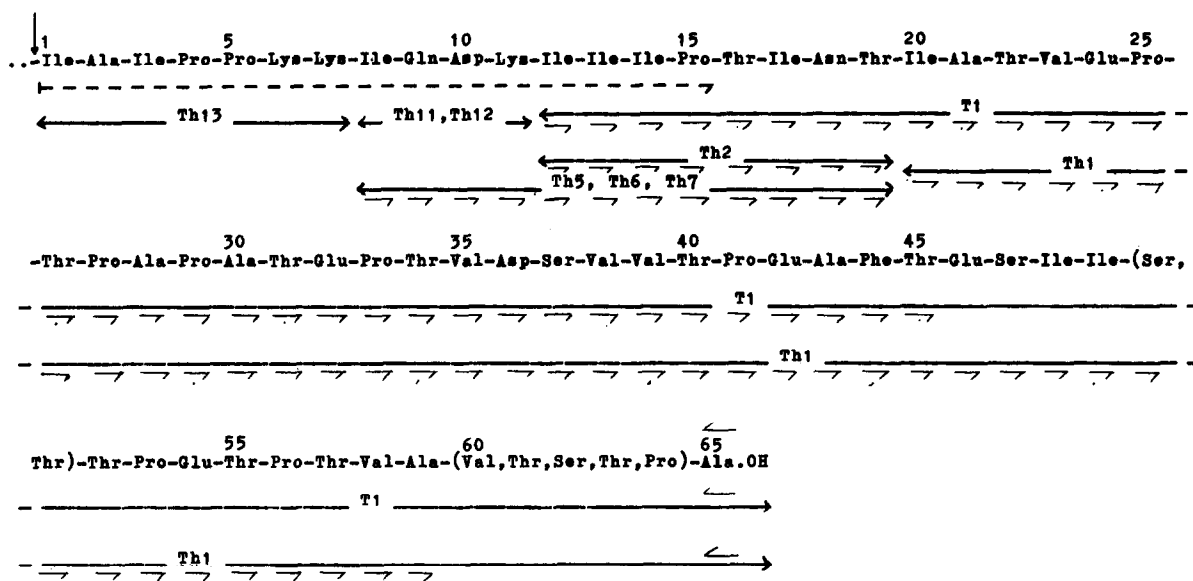
Les résultats de l'analyse directe de la composition en acides aminés du CMP porcin (tableau 1) suggèrent la présence de 70 résidus d'acides aminés, dont 9 résidus valyle, dans la chaîne peptidique. En fait, l'analyse séquentielle devait montrer que le nombre de résidus valyle avait été sous-estimé d'une unité et que le CMP porcin comportait en réalité 71 résidus d'acides aminés (fig.1). Cet exemple illustre bien la difficulté de la détermination du nombre exact de résidus valyle et isoleucyle dans les peptides contenant de nombreux doublets de ces acides aminés (3 liaisons Ile-Val et 2 liaisons Val-Val dans le cas du CMP porcin), en raison de la résistance de ce type de liaison à l'hydrolyse acide. D'autre part, le CMP porcin analysé ne comportait aucun groupement phosphate.

La structure primaire complète du CMP porcin a été établie en 3 étapes. L'enchaînement de 18 résidus de l'extrémité N-terminale et le résidu C-terminal ont été déterminés respectivement avec le séquenceur et la carboxypeptidase A. Ensuite, nous avons étudié le peptide tryptique C-terminal T1, qui correspond au CMP amputé des 11 premiers résidus, qui a été séparé de l'hydrolysat tryptique du CMP par chromatographie sur Sephadex G-50 'fine'. La séquence des 45 premiers résidus du peptide T1 a été établie manuellement par dégradation récurrente d'Edman. Ceci nous a permis de localiser l'unique résidu phénylalanyle et l'unique résidu leucyle du CMP. La dernière étape a consisté à étudier quelques fragments 'thermolysine' du CMP, en



**Fig. 1 - Détermination de la séquence des acides aminés du caséinomacropепptide de truie.**

Symboles: ← acides aminés libérés par la carboxypeptidase A. Séquence établie: --, avec un séquenceur; → par la méthode d'Edman manuelle. ← T → peptide tryptique; ← Th → peptide "thermolysine". ↓ Liaison peptidique hydrolysée par la chymosine.



**Fig. 2 - Détermination de la séquence partielle des acides aminés du caséinomacropепptide de la caséine X humaine.**

Symboles: ← acides aminés libérés par la carboxypeptidase A. Séquence établie: --, avec un séquenceur; → par la méthode d'Edman manuelle. ← T → peptide tryptique; ← Th → peptide "thermolysine". ↓ Liaison hydrolysée par la chymosine.

particulier les peptides Th1 et Th2. L'hydrolysat 'thermolysine' du CMP a été fractionné sur Sephadex G-50 puis G-25: le peptide Th1 a été obtenu pur; le peptide Th2 a été repurifié sur papier par électrophorèse à pH 1.9. L'analyse de la composition en acides aminés du peptide Th1, qui est dépourvu de phénylalanine et qui comporte 18 résidus d'acides aminés, dont l'unique résidu leucyle localisé en position 54 de la chaîne peptidique du CMP, suggérait que le peptide Th1 était le fragment C-terminal du CMP. Effectivement, nous avons vérifié que la carboxypeptidase A libérait, comme dans le cas du CMP, un résidu valyle. L'enchaînement complet des 18 résidus d'acides aminés du peptide Th1 a été établi d'après les résultats de 17 cycles de la dégradation d'Edman. L'analyse du peptide Th2, qui représente le fragment 44–53 de la chaîne peptidique du CMP, a permis de confirmer les résultats de l'analyse séquentielle du peptide Th1 dans cette zone. Il est intéressant de noter que nous avons obtenu par électrophorèse sur papier à pH 1.9, 3 fractions corres-

pondant au peptide Th2 d'après leur composition en acides aminés et leur séquence. L'analyse qualitative ayant montré que ces 3 fractions contenaient des sucres, il est vraisemblable que leurs mobilités électrophorétiques différentes résultaient de variations dans la teneur en sucres chargés.

### 3.2. Etude du CMP humain

D'après les résultats de l'analyse directe de sa composition en acides aminés, et en tenant compte du nombre de résidus isoleucyle trouvés ultérieurement lors de l'étude de la séquence, le CMP humain (tableau 1 et fig.2) comporterait entre 67 et 65 résidus d'acides aminés, ce dernier nombre étant le plus probable d'après les résultats de l'analyse ultérieure des peptides T1 et Th1. La sous-estimation du nombre de résidus isoleucyle résulte de la présence de 3 liaisons Ile–Ile difficilement hydrolysables. Quant à l'incertitude sur le nombre de résidus thréonyle et séryle, elle pourrait être due, entre autres, à une hétérogénéité d'ordre

Tableau 1  
Composition en acides aminés et teneur en phosphore des caséinomacropéptides porcins et humains, et de quelques fragments tryptiques et 'thermolysine'

Acide aminé	Truie CMP <sup>a</sup>	Th1	Th2	Femme CMP <sup>a</sup>	T1	Th1
moles d'acides aminés par mole de peptide						
Asp	5.04 (5)	—	—	3.30 (3)	2.09 (2)	1.39 (1)
Thr	9.79 <sup>c</sup> (10)	4.67 (5)	0.93 (1)	14.57 <sup>c</sup> (14–15)	14.26 <sup>c</sup> (14)	12.84 <sup>c</sup> (13)
Ser	4.84 <sup>c</sup> (5)	1.82 (2)	1.76 (2)	4.55 <sup>c</sup> (4–5)	4.05 <sup>c</sup> (4)	3.71 <sup>c</sup> (4)
Glu	8.19 (8)	2.11 (2)	1.99 (2)	6.03 (6)	5.49 (5)	5.38 (5)
Pro	10.18 (10)	1.65 (2)	1.02 (1)	11.17 (11)	8.62 (9)	8.18 (8)
Ala	8.80 (9)	1.08 (1)	1.00 (1)	6.72 (7)	5.92 (6)	6.27 (6)
Val	9.12 <sup>b</sup> (10) <sup>d</sup>	3.62 <sup>b</sup> (4)	1.68 <sup>b</sup> (2)	6.12 <sup>b</sup> (6)	5.61 (6)	6.11 <sup>b</sup> (6)
Ile	8.41 <sup>b</sup> (9)	0.92 <sup>b</sup> (1)	—	8.02 <sup>b</sup> (10) <sup>d</sup>	4.96 (7) <sup>d</sup>	3.05 <sup>b</sup> (3)
Leu	0.94 (1)	0.87 (1)	—	—	—	—
Phe	1.06 (1)	—	0.90 (1)	1.07 (1)	1.21 (1)	1.13 (1)
Lys	2.95 (3)	—	—	3.11 (3)	—	—
Total	71	18	10	65–67	54	47
Phosphore	0.20 (0)	—	—	0.11 (0)	—	—

Entre parenthèses: nombre de résidus proposé par mole de peptide.

Sauf indication contraire, les valeurs indiquées correspondent à une hydrolyse de 24 h.

<sup>a</sup> Valeurs correspondant à la moyenne de 3 temps d'hydrolyse, respectivement 24, 48 et 96 h

<sup>b</sup> Valeurs correspondant à une hydrolyse de 96 h

<sup>c</sup> Valeurs extrapolées linéairement au temps zéro

<sup>d</sup> Nombre déduit de l'analyse séquentielle

génétique de l'échantillon de CMP humain étudié. Celui-ci, rappelons-le, a été préparé à partir d'un lait de mélange. Le CMP humain analysé ne contenait aucun groupement phosphate.

L'étude de la structure primaire du CMP humain a été faite en 3 étapes comme dans le cas du CMP porcin. Après avoir déterminé avec un séquenceur l'enchaînement de 15 résidus d'acides aminés de l'extrémité N-terminale et montré la présence d'un résidu alanyl en position C-terminale avec la carboxypeptidase A, nous avons analysé le fragment tryptique C-terminal T1 qui correspond au CMP amputé des 11 premiers résidus. L'enchaînement des 34 premiers résidus du peptide T1 a été établi manuellement par dégradation récurrente d'Edman. Dans un dernier temps, nous avons étudié les fragments résultant de l'hydrolyse du CMP par la thermolysine et notamment le peptide Th1 qui représente un long fragment C-terminal. Les résultats de 40 cycles de dégradation d'Edman ont permis d'élucider la majeure partie de la structure primaire de ce peptide. Au total, nous avons établi la séquence de 60 résidus d'acides aminés sur les 65 que comporterait la chaîne peptidique du CMP humain. Malheureusement, la faible quantité de CMP humain dont nous disposions au départ (3  $\mu$ mol) ne nous a pas permis d'achever son étude.

#### 4. Conclusion

Le caseinomacropéptide de porc analysé (*Sus scrofa*) est constitué de 71 résidus d'acides aminés, Asp<sub>1</sub>, Asn<sub>4</sub>, Thr<sub>10</sub>, Ser<sub>5</sub>, Glu<sub>6</sub>, Gln<sub>2</sub>, Pro<sub>10</sub>, Ala<sub>9</sub>, Val<sub>10</sub>, Ile<sub>9</sub>, Leu<sub>1</sub>, Phe<sub>1</sub>, Lys<sub>3</sub>. Il est caractérisé par la présence d'une séquence répétitive de 6 résidus, Glu-Pro-Ile-Val-Asn-Ala localisée en positions 32-37 et 38-43 de la chaîne peptidique. Ceci suggère qu'une duplication, ayant affecté la matrice d'ADN codant le segment 32-37 de la chaîne peptidique du CMP, s'est produite dans le gène de structure de la caséine  $\kappa$  de porc.

Le caseinomacropéptide de la caséine  $\kappa$  humaine (*Homo sapiens*) comporterait 65 résidus d'acides aminés, Asp<sub>2</sub>, Asn<sub>1</sub>, Thr<sub>14</sub>, Ser<sub>4</sub>, Glu<sub>5</sub>, Gln<sub>1</sub>, Pro<sub>11</sub>, Ala<sub>7</sub>, Val<sub>6</sub>, Ile<sub>10</sub>, Phe<sub>1</sub>, Lys<sub>3</sub>.

Comme leurs homologues bovin [8], caprin [13], ovin [17], de zébu [18] et de buffle [19], les CMPs porcin et humain présentent une teneur élevée en hydroxyamino acides et sont relativement riches en

proline et acides aminés chargés. Ils s'en différencient par de nombreuses substitutions d'acides aminés et notamment la nature du résidu N-terminal. Alors que dans les espèces citées plus haut la liaison labile de la caséine  $\kappa$ , hydrolysée préférentiellement par la chymosine, est du type X-Met, chez le porc et la femme elle est du type X-Ile. L'absence de phosphate dans les CMPs porcin et humain étudiés ici ne permet pas d'affirmer que tout CMP de ces 2 espèces est dépourvu de groupement phosphate car les échantillons analysés ont été préparés à partir d'une fraction de la caséine  $\kappa$ .

#### Remerciements

Nous remercions vivement Mr Rousseau, du Domaine Expérimental de la Minière, pour la collecte du lait de truie.

#### References

- [1] Malpress, F. H. et Seid-Akhavan, M. (1966) *Biochem. J.* 101, 764-773.
- [2] Kim, Y. K., Yaguchi, M. et Rose, D. (1969) *J. Dairy Sci.* 52, 316-320.
- [3] Schmidt, D. G. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 90, 411-414.
- [4] Aschaffenburg, R. (1963) *J. Dairy Res.* 30, 259-260.
- [5] Thompson, M. P. et Kiddy, C. A. (1964) *J. Dairy Sci.* 47, 626-632.
- [6] Mercier, J.-C., Maubois, J.-L., Poznanski, S. et Ribadeau-Dumas, B. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 521-530.
- [7] Woychik, J. H. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 542-547.
- [8] Mercier, J.-C., Uro, J., Ribadeau-Dumas, B. et Grosclaude, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 535-547.
- [9] Grosclaude, F., Mercier, J.-C. et Ribadeau-Dumas, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 98-107.
- [10] Spackmann, D. H., Stein, W. H. et Moore, S. (1958) *Ann. Chem.* 30, 1190-1206.
- [11] Hess, H. H. et Derr, J. E. (1975) *Anal. Biochem.* 63, 607-613.
- [12] Hermanson, M. A., Ericsson, L. H., Titani, K., Neurath, H. et Walsh, K. A. (1972) *Biochemistry* 11, 4493-4502.
- [13] Mercier, J.-C., Addeo, F. et Pélissier, J.-P. (1976) *Biochimie*, sous presse.

- [14] Cohen-Solal, M. C. et Bernard, J.-L. (1973) *J. Chromatogr.* 80, 140–143.
- [15] Pisano, J. J. et Bronzert, T. J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5597–5607.
- [16] Pisano, J. J., Bronzert, T. J. et Brewer, H. Jr. (1972) *Anal. Biochem.* 45, 43–59.
- [17] Jollès, J., Fiat, A.-M., Schoentgen, F., Alais, C. et Jollès, P. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 365, 335–343.
- [18] Grosclaude, F., Mahé, M.-F. et Mercier, J.-C. (1974) *Ann. Génét. Sél. anim.* 6 (3) 305–329.
- [19] Addeo, F. et Mercier, J.-C. (1976) Résultats à publier.