Einwirkung von Äthylenoxyden auf Lysozym

Von Kazuyuki MAEKAWA und Masahisa KUSHIBE

Institut für biologische Chemie der Landwirtschaftlichen Fakultät, Universität Ehime

Eingegangen am 9. Januar 1956

One mol. of lysozyme combined with 12 mols. of ethylene oxide at 4–5°C, pH 8.7, when magnesium ion existed.

Lysozyme, after having reacted with ethylene oxide so thoroughly that amino groups were no more detectable, still did not alter in the lytic activity and UV-absorption. Only in the ionophoresis a different result appeared. This N-hydroxyethyl derivative of lysozyme behaved also almost equally with the native lysozyme in the oxidation by periodate.

Schroeder berichtete, dass die Aktivität vom Lysozyme fast zurückbleibt, als man dessen Aminogruppe mit 2,4-Dinitrofluorobenzol blockiert¹⁾. D. De Fontaine et al. liessen Phenylisothiocyanat auf Lysozym reagieren, um dessen Amino-Ende zu bestimmen, aber sie beschrieben nichts weiter in Bezug auf die Veränderung seiner Aktivität²⁾. Neuerdings behandelten Dickman et al. das Lysozym mit Xanthidrol und bekamen Xanthyl-lysozyme, welches im geraden Verhältnisse zu der Menge zugesetztes Xanthidrols seine Aktivität verliert, und weiter durch Hydrolyse desselben Monoxanthyltryptophan³⁾.

Hinsichtlich der Reaktion des Äthylenoxyds auf Lysozym gibt es jedoch neuerdings keinen Versuch. Wir beschäftigten uns also mit der Reaktion von Lysozyme mit Äthylenoxyde nach der Weise, wie in vorläufiger Mitteilung vorgestellt ist, um seine Aminogruppe zu blockieren.

Das so zur Genüge verbundene Lysozyme, wie keine freien Aminogruppen mehr erkennbar sind, hat auch gänzliche Aktivität und zeigt im Vergleich mit nativem Lysozyme ganz ähnliches Absorptions-spektrum. Es verhält sich aber verschiedentlich bei der

Papierionophorese; das behandelte Lysozym wandert nämlich bei pH 4.0 nicht, während Lysozyme sich nach Kathode fortbewegt. (Fig. 1)

In dem Versuche von Perjodat-Oxydation des mit Äthylenoxyde blockierten Lysozyme kamen wir zum gleichen Resultate mit den schon von uns berichteten Ergebnissen über das Lysozym⁴⁾.

Aus diesen Tatsachen lässt sich folgern, dass sowohl die am Ende stehenden Amino-

FIG. 1. Elektrophoregramm vom ÄO-Lysozyme.

a) Kontrol (natives Lysozym)

b) ÄO-Lysozym

Michaelis'cher N/10 Tartrate-Puffer (pH 4.0), 500 Volt, 4.8–9.5 mA/4 cm, 3 Srdn. HgCl₂-BPB-Färbung.

gruppe, einschliesslich ϵ -Aminogruppe, als auch die Oxyaminosäure mit lytischer Aktivität keinesfalls zu tun haben.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

(a) Reaktion des Äthylenoxyds auf Lysozym.

Mehrfach umkristallisiertes Lysozym wurde in verdünnter Essigsäure von pH 4.5 derart aufgelöst, dass die Konz. der Enzymlösung bei 5–7 mg/ml blieb

1) W. A. Schroeder; *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5118 (1952).

2) D. De Fontaine und S. W. Fox; ebenda, **76**, 3701 (1954).

3) S. R. Dickman, R. B. Kropf und C. M. Proctor; *J. Biol. Chem.*, **210**, 491 (1954).

4) K. Maekawa und M. Kushibe; *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **19**, 28 (1955).

TABELLE I
 REAKTION DES LYSOZYMS MIT ÄTHYLENOXYDE

(Ansatz der Versuche)					
Versuchs Nr.	Lysozym Lösung*	Zugesetzte ÄO Lösung**	Zugesetztes Mg ⁺⁺	Puffer Lösung (pH 8.7)	
1	10	5	1	—	
2	10	5	—	1	
3	10	—	1	5	
4	—	5	1	10	
5	—	5	—	11	

Versuchs Nr.	Reaktions- dauer	Verbundenes ÄO Mol	Rückbleibende		Absorptionsspektren				Lytische Aktivität ⁴⁾
		Mol Lysozym	NH ₂ - Gruppe#	Tyrosyl-u. Histidyl- Gruppe	λ_{max}	λ_{min}	ϵ_{max}	ϵ_{min}	
1	12 Stdn.	—	86	100	283	250	44.8	17.2	100%
2		—	100	"	"	"	"	"	80
1	2 Tage	9	25	100	"	"	"	18.0	100
2		—	91	"	"	"	"	"	53
1	7 Tage	12	0	95	"	"	"	19.2	100
2		—	76	100	"	"	"	"	7

* Die Enzymlösung enthält 6.42 mg Protein/ml.

** Die Lösung enthält 60 mg ÄO/ml.

Es wurde mittels Ninhydrins bestimmt.

Es wurde dank Folinsches Phenol-reagens bestimmt.

(nach Biuret), dann mit NaOH auf pH 8.7 eingestellt.

Zu 10 ml dieser Lysozymlösung wurde 5 ml des beinahe 40–60 mg/ml Äthylenoxyd (ÄO) haltenden Wassers zugesetzt, dann mit 1 ml von MgCl₂-Lösung versetzt, die 100 mg/ml Mg⁺⁺ enthielt und vorher auf pH 8.7 eingestellt worden war (Tabelle I). Das Reaktionsgemisch wurde bei 4–5 C unter gelegentlicher Pipettierung gelassen. Die ausgezogene Lösung in Gebrauch nehmend, bestimmte man die Menge von verbundenem ÄO, die lytische Aktivität und die freie NH₂-Gruppe.

Wie man aus der Tabelle I erkannt, verbunden 12 Mol von ÄO sich bei pH 8.7 mit 1 Mol vom Lysozyme und wurde die freie NH₂-Gruppe des Lysozyms völlig einwickelt, aber die anfängliche Aktivität blieb unverändert, während ein ziemlich grosser Abstand sich hinsichtlich der Veränderung von der Aktivität im Verlaufe der Zeit zwischen dem mit ÄO behandelten Lysozyme und nativem Lysozyme befand (Figur 2). Bewahrt man es ohne Zusatz von Mg-Verbindung während verhältnismässig längerer Dauer auf, so reagiert ÄO ein wenig auf NH₂-Gruppe und freie NH₂-Gruppe vermindert sich einigermassen, während seine Aktivität bei weitem abnimmt. Also ist Mg-Salz sowohl ein Katalysator bei der Reaktion des ÄO, als auch spielt es für Beständigkeit vom Lysozyme eine wichtige Rolle.

FIG. 2. Veränderung von der Aktivität im Verlaufe der Zeit bei dem mit ÄO behandelten Lysozyme.

1. ÄO-Lysozym (mit Mg⁺⁺) 6.975r Enzym
2. Natives Lysozym (mit Mg⁺⁺) 6.965r "
3. Lysozym und ÄO (ohne Mg⁺⁺) 100r "

Reaktionsgemisch (Lysozym, ÄO und Mg-Salz)

FIG. 3. ÄO-Lysozym (lytische Aktivität 100%, freie NH₂-Gruppe gedeckt).

Isolierung des mit ÄO behandelten Lysozyms.

Die mit ÄO nach oben erwähnter Weise behandelte Lysozymlösung wurde fraktioniert, wie folgendes Schema zeigt, um modifiziertes Lysozym zu isolieren. Schliesslich konnten wir mit geringer Ausbeute das Lysozym-Derivate erhalten.

(b) **Oxydation des mit ÄO behandelten Lysozyms durch NaJO₄.** Das modifizierte Lysozym, in welchem nicht mehr die freie NH₂-Gruppe vorhanden war und welches doch völlige Aktivität besass, wurde der Perjodat-Oxydation unterworfen.

Aus dem genug reagierten Gemische (2 Wochen lang stehen gelassen) wurde das überschüssige ÄO durch Lüftung beseitigt, dann wurde die Lösung mit verd. AcOH wieder auf pH 5.3 eingestellt. Zu 10 ml von dieser Enzymlösung, nach Abkühlen bis 0 C, setzte man die berechnete Menge von abgekühlter 0.05 N NaJO₄ Lösung (0.1 N Acetat-Puffer von pH 5.3) zu. Das Reaktionsgemisch wurde bei 4–5 C stehen gelassen. Nachdem Perjodat, nötigenfalls vermittlels Hinzufügens von wenigem Traubenzucker, reduziert worden war, wurde die Lösung mit Kochsalz, dessen Konzentration bis 5%, dann mit verd. Natronlauge versetzt, um Enzyme niederzuschlagen. Der dabei entstandene Niederschlag wurde centrifugiert und mit der 5% iges Kochsalz enthaltenden, abgekühlten verd. Natronlauge von pH 9.5 wiederholt gewaschen, bis es von Halogen frei wurde, und zuletzt wieder in verd. Essigsäure von pH 5.4 aufgelöst. Mit der dabei erhaltenen Lösung mass man die enzymatische Aktivität und das Absorptionsspektrum.

Die Tabelle II gibt die dabei erhaltenen Ergebnisse an. Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, dass die mit ÄO behandelte Probe sich bei der Oxydation durch NaJO₄ ganz ähnlich mit dem Resultate über natives Lysozym benimmt. Das Verschwinden der Aktivität und die Verschiebung von UV-Absorptionsspektren standen auch jede für sich in näherer Beziehung; es befindet sich nämlich wesentlicher Unterschied nicht.

TABELLE II
OXYDATION DES MIT ÄO BEHANDELTEN LYSOZYMS MIT PERJODATE

Versuchs Nr.	Lysozym od. sein Derivat.	Nach 8 stdg. Oxydation			Nach 22 stdg. Oxydation		
		Verbr. NaJO ₄ Mol	Lytische Aktivität	Extinktion beim Gipfel von 280.5mμ (ε × 10 ⁻⁴)	Verbr. NaJO ₄ Mol	Lytische Aktivität	Extinktion beim Gipfel von 280.5mμ (ε × 10 ⁻⁴)
		Mol Lysozym			Mol Lysozym		
1	ÄO-Lysozym	3.1*	43%	2.5	7.8	3.4%	0.85
3	natives Lysozym	3.3	43%	2.5	7.8	3.8	0.85

* Zunahme von Mol. Gew. wurde in Betracht gezogen.

Man kann also bei der Perjodat-Oxydation keinen Einfluss wegen der Verbindung von $\ddot{O}$ erkennen.

DISKUSSION

Da die Aminogruppe bei pH 8.7 zum Teile als NH_2 vorhanden ist, musste $\ddot{O}$ auf diesem Teile reagieren. Es ist auch offenbar aus der Farb-reaktion mittels Phenol-reagens, dass $\ddot{O}$ zur Oxygruppe von Tyrosine nichts bedeutet. Es lässt sich aus der vorhergehenden Mitteilung folgern, dass $\ddot{O}$ mit aliphatischer Oxygruppe nichts zu tun hat.

Sowohl unser Versuch, dass freie NH_2 -Gruppe nicht mehr erkennbar ist und doch volle Aktivität aufbewahrt worden ist, als auch das Ergebnis von Schroeder¹⁾ liessen uns zu dem Meinung kommen, dass freie NH_2 -Gruppe von Lysozyme mit seiner Aktivität in keiner Beziehung stehe⁵⁾.

Wenn $-CH_2CH_2OH$ anstatt H von NH_2 -

5) H. Neurath und K. Bailey; The Proteins, Vol. II. S. 465 (1954).

Gruppe sich verband, so muss die Glykolsplaltung von den Oxyaminosäuren schwierig sein. Jedoch wurde wirklich das mit $\ddot{O}$ behandelte Lysozym in gleichem Benehmen mit nativem Lysozyme durch $NaJO_4$ oxydiert und seine Aktivität verlor.

Es lässt sich also erkennen, dass nicht nur NH_2 -Gruppe, sondern auch die Oxygruppe von ihrem benachbarten Kohlenstoffe mit der Aktivität nichts zu tun haben.

ZUSAMMENFASSUNG

Lysozym wurde in Anwesenheit von Magnesiumsalz bei pH 8.7 mit $\ddot{O}$ behandelt. Dadurch liess sich angeben, dass 12 Mol von $\ddot{O}$ sich mit pro Mol Lysozyme verbanden, freie NH_2 -Gruppe völlig entwand, aber die Aktivität und das Spektrum die keine merkliche Änderung zeigten. Im Falle, dass das mit $\ddot{O}$ behandelte Lysozym durch $NaJO_4$ oxydiert wurde, verhielt es sich mit dem nativen Lysozyme analogisch.