

一个特殊的丝氨酸蛋白酶

——B 因子的功能和结构

曾 一 鸥

(南京医学院分子免疫学研究室)

1959 年, Blum 等在研究酵母多糖灭活 C3 (补体第三成分)的过程中,发现血清中存在一种“不耐热的因子”,是酵母多糖灭活 C3 的必须成分,并将其命名为 B 因子(Factor B)^[1]。由于对 B 因子的深入研究,导致发现了补体活化的 C3 旁路(又称替代通路, alternative pathway)。这些发现引起了众多学者的注意。七十年代以后,已有不少实验室分离到了这个“不耐热的因子”;并先后被称为 C3PA (C3 Proactivator)^[2]、 β_2 II (β_2 II globulin)^[3]、GBG (glycine-rich β -globulin)^[4]、HLF (heat labile factor)^[5]。为开展对补体 C3 旁路的研究,本室也于 1983 年提纯了这个补体成分,并制备了抗血清^[6]。这些名称不同的成分实际上是同一种物质,国际免疫学会联合会 (IUIS) 已将其名称统一,称为 B 因子 (Factor B)^[7]。

一、B 因子的生物学功能

补体 C3 旁路成分 B 因子是一个沉降系数为 5.9S 的糖蛋白,碳水化合物的含量约 7%;血浆浓度约 200 μ g/ml;等电点 5.9;整个分子由单一多肽链构成,分子量为 93,000 道尔顿。B 因子是一个不耐热成分,50℃30 分钟,将使其丧失溶血活性^[8]。

在 Mg^{++} 或 Ni^{++} 存在时, B 与 C3b (C3 的裂解片段) 以等分子结合成一个稳定的复合物 (C3bB), 随后 D 因子 (补体 C3 旁路的另一个成分) 裂解 B 因子分子中靠近 N 端的一个 Arg-Lys 肽键, 释放出 N-端的 Ba 片段而成为 C3 转

化酶 (C3b, Bb), 其催化单位存在于 Bb 片段中。C3b, Bb 可将 C3 裂解为 C3b 和 C3a 两个片段;在有多数 C3b 存在的条件下形成 C3bn, Bb (C5 转化酶), 能将 C5 (补体第 5 成分) 裂解为 C5a 和 C5b 两个片段^[9]。B 因子还可与眼镜蛇毒因子 (CVF) 结合 (成为 CVF-B), 经 D 因子裂解出 Ba 片段后成为 CVF-Bb 复合物, 这个复合物亦具有裂解 C3 和 C5 的功能。

B 因子一旦被激活, Ba 即离解; C3b, Bb 复合物很不稳定, 在 37℃ 迅速衰变 (半衰期 1.5 分); CVF-Bb 比 C3b, Bb 稳定; P (备解素, 补体 C3 旁路成分) 对 C3b, Bb 有稳定作用。Bb 一旦从复合物中离解 (成为 Bbi), 即失去了参与形成 C3 转化酶的能力;但在 B、D、 Mg^{++} 存在时, C3b 又可重新形成 C3 转化酶^[9]。最近有报告指出, Bb 衰变后仍残留一部分溶血活性和蛋白酶解活性, 但只有衰变前的 1%^[10]。

B 因子除参与构成 C3/C5 转化酶外, 还具有另外一些生物学功能。Bb 具有使巨噬细胞铺开的作用^[11]; 刺激单核细胞对金黄色葡萄球菌的杀灭作用^[12]; 参与不依赖抗体的单核细胞对异体红细胞的溶解^[13]; 并诱导淋巴细胞母细胞化^[14]。最近报告, 液相 Bb 能裂解 C3, 在 CVF 存在时还能裂解 C5^[10]。

二、B 因子的分子结构

B 因子是由单一多肽链构成的糖蛋白。透射电镜的研究证明 B 因子的分子由三个大小近似的球状区域 (domain) 组成, 其中的两个球状

区域是 Bb 片段。在电镜下可见 Bb 由两个球形区域构成的哑铃状外形,两个球形区之间有一个短的杆连接,其中每一个球形区的直径约 40 Å^[16]。在 C3 转化酶 (C3b,Bb) 复合物中,Bb 只通过其中一个球形区域和 C3b 结合,说明这是结合区;而另一区域则从复合物中自由突出,这可能是催化区域。由于 Bb 片段中 C-末端的一半已证明在结构上与其他丝氨酸蛋白酶一致,这里可能包含催化部位;Bb 与 C3b 的结合区域可能是片段组成中靠近 N-末端的部分^[17]。

最近,Lambris 和 Müller-Eberhard 用猪弹性蛋白酶消化 B 因子,从 5 个消化片段中分离到一个 33,000 道尔顿的片段。这个片段能结合至 C3b,且与 C3b 的亲合力大于 B 因子与 C3b 的亲合力。这个片段具有 B 因子的 1/60 的溶血活性,以及和 Bb 相似的酯酶活性。这个片段的 N-末端分析表明,它含有 Bb 片段中第 211 位至 505 位氨基酸残基的顺序。由于这个片段具有 Bb 的酶活性部位以及和 C3b 的强力结合部位,于是提出 Bb 与 C3b 的结合部位位于或接近催化区域^[18]。

通过对 B 因子的氨基酸分析及 B 因子基因的 DNA 顺序的测定,已完成了 B 因子全部一级结构的分析。用此两种方法分析所得 B 因子的氨基酸顺序完全相同,B 因子共由 739 个氨基酸构成,N-末端是苏氨酸。整个分子中有 4 个可能是天冬酰胺连接的 N-乙酰-氨基葡萄糖,分别位于第 97、117、260、353 位的天冬酰胺残基。特别令人感兴趣的是在 Ba 片段中含有

三个顺序一致的区域。Ba 片段中含有 12 个半胱氨酸残基,Bb 片段含有 11 个半胱氨酸残基;在整个分子中只在 Bb 的 N-端附近发现一个游离的-SH 基。B 因子一级结构的主要特征可表示如图 1^[19]。

三、B 因子是一个特殊的丝氨酸蛋白酶

Medicus 等报告,补体 C3 旁路的 C3 转化酶 (C3b,Bb) 和 C5 转化酶 (C3bn,Bb) 都可被 DFP 抑制,而且 DFP 可掺入 Bb 片段中,所以提出 B 因子是一个丝氨酸蛋白酶^[9]。但 B 因子的活化方式和结构特征都与其他典型的丝氨酸蛋白酶不同。对已知的任一个脊椎动物的丝氨酸蛋白酶(C2 除外,C2 也是一个与 B 因子类似的特殊的丝氨酸蛋白酶)来说,酶原活化后产生的具有水解活性的酶,其活性部位都局限于一个 M_r 25,000 的肽段内;而且此活性酶片段总是来自每一个酶原的 C-末端。相反,B 因子的活化都必须在其分子与 C3b 结合以后;而且具有溶血活性的、具酶活性的片段 (Bb) 的分子量为 63,000(超过上述肽段一倍多)^[20]。

最近,在研究 B 因子的一级结构中,找到了 B 因子是丝氨酸蛋白酶以及与其他典型的丝氨酸蛋白酶不同的结构证据。以溴化氰处理 B 因子可得到 5 个片段,其中一个片段 (CB2, M_r 34,000) 在还原剂存在的情况下会解离成一个 M_r 28,000 的片段 (CB2-2) 和一个 M_r < 6,000 的小片段 (CB2-3)。并证明 CB2-2 片段中含有与其他丝氨酸蛋白酶相同的区域 (-Val-Leu-

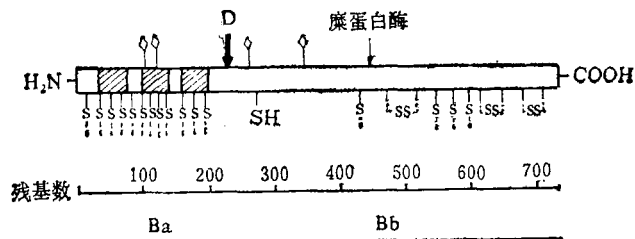


图 1 B 因子一级结构的主要特征

三个暗区表示顺序相似的部分;S 和 SS 分别表示可能的自由巯基和二硫键部位;◊与→分别表示 D 因子和糜蛋白酶裂解 B 因子的可能部位;◊表示连接 N-乙酰-氨基葡萄糖部位

Thr-Ala-Ala-His-Cys-7 残基顺序), 在这个区域中含有水解酶活性中心必须的组氨酸残基。CB2-2 的稀酸水解产物 CB2-2,A3 的一级结构是: Pro-Asn-Thr-Cys(x)Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Ile-Val, 其中第 8 位的 Ser 相当于糜蛋白酶原第 195 位的 Ser; 而且 CB2-2,A3 的 N-末端顺序几乎与其他丝氨酸蛋白酶相应部位的顺序一致。从这些资料可以得出结论, B 因子也是一个丝氨酸蛋白酶。然而 CB2-3 的 N-末端结构与其他丝氨酸蛋白酶的结构无关, 而是代之以一连串高度极性的氨基酸; 在 CB2-3 N-末端的 13 个氨基酸中, 只有第 11 位的组氨酸为其他丝氨酸蛋白酶所共有^[20]。

在测定了 B 因子的一级结构以后, 用电子计算机研究了 B 因子的 N-末端和其他已知的丝氨酸蛋白酶的 N-末端 (至 452 个氨基酸残基), 但 B 因子与它们之间没有顺序的一致性^[19]。

所有典型的丝氨酸蛋白酶都共有的 29 个不变的氨基酸残基中, 有 9 个是甘氨酸残基; 有趣的是, 这 9 个甘氨酸残基中有 4 个 (糜蛋白酶的第 19、43、140 和 142 位残基) 都恰在丝氨酸蛋白酶的绞链点 (hinge points); 但这 4 个甘氨酸残基在 B 因子中都不存在。位于糜蛋白酶自动裂解环起始部位的 Gly (140)-Try (141)-Gly (142)-几个残基顺序, 在使易弯曲的酶原结构转化成具刚性结构的活化酶中起着关键作用^[19]; B 因子在这些相应部位缺乏甘氨酸残基,

说明 B 因子活化时不要求这些部位的柔性结构^[19]。

参 考 文 献

- [1] Blum, L. et al.: *Z. Immunitätsforsch. Allerg. Klin. Immunol.*, **118**, 349, 1959.
- [2] Gotse, O. and Muller-Eberhard, H. J.: *J. Exp. Med.*, **134**, 90s, 1971.
- [3] Hunsicker, L. G. et al.: *J. Immunol.*, **110**, 128, 1973.
- [4] Boenish, T. and Alper, C. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 529, 1970.
- [5] Brode, V. et al.: *J. Immunol.*, **109**, 1174, 1972.
- [6] 曾一鸥, 徐愤: 《中华微生物学和免疫学杂志》, **5**(1), 24, 1985.
- [7] IUIS: *Bull. WHO*, **59**(3), 489, 1981.
- [8] Curman, B. et al.: *Biochemistry*, **16**, 5368, 1977.
- [9] Reid, K. B. M. and Porter, R. R.: *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 433, 1981.
- [10] Fishelson, Z. and Muller-Eberhard, H. J.: *J. Immunol.*, **132**, 1425, 1984.
- [11] Gotze, O. et al.: *J. Exp. Med.*, **149**, 372, 1979.
- [12] Leijh, P. C. J. et al.: *J. Immunol.*, **129**, 332, 1982.
- [13] Hall, R. E. et al.: *J. Exp. Med.*, **156**, 834, 1982.
- [14] Sundsmo, J. S.: *J. Immunol.*, **131**, 886, 1983.
- [15] Fehlhammer, H. et al.: *J. Mol. Biol.*, **111**, 415, 1977.
- [16] Smith, C. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 9879, 1982.
- [17] Campbell, R. D. and Porter, R. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4464, 1983.
- [18] Lambris, J. D. and Muller-Eberhard, H. J.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 12685, 1984.
- [19] Mole, J. E. et al.: *ibid.*, **259**, 3407, 1984.
- [20] ———: *ibid.*, **255**, 8472, 1980.

[本文 1985 年 9 月 28 日收到]