人类甾类激素加工酶CYP7B1的纯化制备与互作网络

简立艳¹, 张庆², 陈阳¹, 曹禹^{1*}

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院, 上海 200125;

2. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031

* 联系人, E-mail: yu.cao@shsmu.edu.cn

2021-01-20 收稿, 2021-02-26 修回, 2021-03-01 接受, 2021-03-02 网络版发表

国家自然科学基金(82072468)和上海高水平地方高校创新团队(SSMU-ZLCX20180600)资助

摘要 细胞色素P450单加氧酶CYP7B1是位于内质网上的跨膜蛋白, 其重要功能是催化胆固醇骨架7位的羟化反应, 产生多种重要甾类分子, 包括7 α -羟基-脱氢表雄酮和7 α -羟基孕烯醇酮等. CYP7B1基因突变造成的功能异常可引起多种疾病, 如遗传性痉挛性截瘫和先天性胆汁酸合成障碍等. 为了解人类CYP7B1蛋白的结构与功能, 我们对其进行了重组表达与纯化, 发现其在去垢剂DDM、DM、NM、OM中均能稳定存在并结合有氧化还原辅因子铁卟啉. 利用纯化CYP7B1进行的亲和介质拉取-质谱分析发现, CYP7B1可以与另一种还原酶CYPOR发生相互作用, 随后的体外互作分析证实了这一发现. 在此基础上, 通过重组共表达体系和体外组装方式的筛选实现了CYP7B1-CYPOR蛋白质复合物的纯化制备. 本研究成功地进行了跨膜单加氧酶CYP7B1的纯化, 并且发现内质网可能存在一个涉及CYP7B1和其他氧化还原酶的催化复合物, 还进一步实现了CYP7B1-CYPOR复合物的纯化制备.

关键词 细胞色素P450单加氧酶, 内质网, 膜蛋白, 甾类合成, 氧化还原酶复合物

内质网是细胞内生物合成与加工的主要场所, 其不仅是蛋白质合成的核心细胞器, 同时也是大量生物小分子的生物合成位点, 尤其是疏水性的生物分子. 诸如胆固醇、甾类、甘油磷脂、鞘磷脂这类分子的生物合成都是从内质网启动, 并通过由位于内质网与其他细胞器多种酶类构成的联合催化网络来完成的. 甾类化合物的生物合成与加工是由多种酶协调完成的生化反应网络, 涉及甾类分子骨架各个位置上的氢化、脱氢、羟化等化学修饰. 属于细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)家族的细胞色素P450 7B1(cytochrome P450 7B1, CYP7B1)主要负责甾类分子的胆固醇骨架7 α 位置的羟化反应. 这一反应主要通过其结合的铁原子和黄素单核苷酸辅因子将电子传递给氧气分子, 随后氧分子质子化并释放一分子水, 同时形成铁氧中间体, 并最终将氧原子转移至甾类骨架的7 α 位形成羟

基^[1]. 人体中催化这一反应的酶类主要包括2种蛋白质: 细胞色素P450 7A1(cytochrome P450 7A1, CYP7A1)与CYP7B1, 其中CYP7A1主要在肝脏中特异表达, 而CYP7B1则全身广泛分布, 特别是神经系统与骨骼. CYP7A1是单跨膜的细胞色素P450家族蛋白, 其催化功能的结构基础已经通过X射线晶体学得到阐明^[2], 而CYP7B1尽管同属细胞色素P450家族, 但是其存在多个跨膜区域, 此前尚未有全长蛋白的纯化报道.

CYP7B1基因最初在海马组织中被发现^[3], 其通过催化胆固醇分子骨架7 α 碳的羟化来调节多种重要甾类分子的水平, 从而影响组织器官的正常运转^[4]. CYP7B1可催化脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)的羟化从而生成7 α -羟基-脱氢表雄酮(7 α -hydroxydehydroepiandrosterone, 7 α -OH-DHEA), 后者是 β 型雌激素受体(estrogen receptor β , ER β)的特异性激动

引用格式: 简立艳, 张庆, 陈阳, 等. 人类甾类激素加工酶CYP7B1的纯化制备与互作网络. 科学通报, 2021, 66: 2878–2886

Jian L Y, Zhang Q, Chen Y, et al. The expression and purification of human steroid hormone processing enzyme CYP7B1 and the characterization of its interactive network (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 2878–2886, doi: [10.1360/TB-2021-0087](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0087)

剂^[5],可影响多种雌激素相关的细胞信号通路.除激活ER β 通路外,对另一种ER β 配基,5 α 雄烷-3 β ,17 β -二醇(5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, 3 β Adiol), CYP7B1还可通过对该分子羟化来降低其水平,从而使ER β 通路失活^[6].动物实验显示, CYP7B1的活性丧失可在小鼠中引起前列腺过小与卵巢发育异常^[6,7],因此是生殖发育的重要调控酶类.此外, CYP7B1可催化25-羟基胆固醇(25-hydroxycholesterol, 25-HC)形成7 α ,25-羟基胆固醇(7 α ,25-dihydroxycholesterol, 7 α ,25-HC).这一酶促活性在关节组织中的异常升高可导致骨关节炎,提示CYP7B1可作为治疗该疾病的药物靶点^[8].更进一步,大脑中CYP7B1的活性丧失将破坏神经系统中的胆固醇代谢平衡,引起多种CYP7B1催化底物的积累,包括25-HC以及26-羟基胆固醇(26-hydroxycholesterol, 26-HC)、24S,25-环氧固醇(24S,25-epoxycholesterol, 24S,25-EC)等,这可能是CYP7B1基因突变导致人类遗传性痉挛性截瘫的原因^[9,10].同时,大脑中CYP7B1蛋白活性的下降还会导致具有神经保护特性的DHEA活性随着年龄的增长而丧失,以及其具有神经毒性的代谢底物27-羟基胆固醇(27-hydroxycholesterol, 27-HC)在大脑中的积累,从而加速神经元变性.这些均与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发生发展密切相关^[11~13].

CYP7B1与同源蛋白CYP7A1尽管在氨基酸序列上具有约37.6%的一致性,但与仅具有单次跨膜螺旋的CYP7A1不同, CYP7B1据预测属于多次跨膜蛋白,其重组表达与纯化制备具有相当大的难度.这妨碍了对CYP7B1酶促机制以及对其活性调控机制进行分子水平的研究.为进行CYP7B1的理化性质表征并探索其所处的蛋白质互作网络,我们使用多种重组表达体系和纯化方法对其进行了表达纯化尝试,并利用质谱方法与生物大分子互作技术研究了其与其他内质网酶类形成的复合物,并对所发现的复合物进行了制备.

1 材料与方法

(i) 材料与试剂. pFastBac Dual载体、pcDNA3.4载体和pCAG载体(ThermoFisher, 美国, 经实验室改造保存); HEK 293细胞、Hi5细胞、Sf9细胞、大肠杆菌DH5 α 、大肠杆菌DH10 Bac(实验室保存); 分子克隆工具酶AscI (SgsI), NotI, T4 DNA Ligase等(ThermoFisher, 美国); 蛋白酶抑制剂Cocktail(MCE, 美国), 超声细胞破碎仪(SONICS, 美国), 高压均质机(永联生物科技公司,

中国), 快速蛋白液相色谱FPLC AKTA Pure、Superdex 200 Increase 10/300 G(GE Healthcare, 美国), TALON Metal Affinity Resin(Clontech, 美国), Anti-FLAG M2 Affinity Gel(Sigma, 美国)、Strep-Tactin Superflow(IBA GmbH, 德国); HRP-conjugated anti-Strep抗体(IBA GmbH, 德国), HRP-conjugated anti-Flag抗体(Protein-tech, 美国), 去垢剂十二烷基- β -D-麦芽糖苷(*n*-dodecyl β -D-maltoside, DDM)、癸基- α -D-麦芽糖苷(*n*-decyl β -D-maltoside, DM)、壬基- β -D-麦芽糖苷(*n*-nonyl β -D-maltoside, NM)、辛基- β -D-麦芽糖苷(*n*-octyl β -D-maltoside, OM)、辛基- β -D-葡萄糖苷(*n*-octyl β -D-glucoside, OG)(Anatrace, 美国).

(ii) 引物合成和DNA测序. 由上海铂尚生物技术有限公司和生工生物工程有限公司完成.

(iii) 重组质粒的构建. 人源的CYP7B1基因cDNA(UniProt ID O75881)购自维真生物科技有限公司, CYP7B1全长(氨基酸残基1~506)分别插入氨基末端或羧基末端具有8 $\times$ 组氨酸标签、Flag标签以及TEV蛋白酶识别位点的pFastBac Dual载体以及氨基末端或羧基末端具有2 $\times$ Strep标签和HRV 3C蛋白酶识别位点的pFastBac Dual载体用于在昆虫细胞中表达(图1(a)). 同时分别克隆进入在氨基末端具有8 $\times$ 组氨酸标签、Flag标签以及TEV蛋白酶识别位点或者在羧基末端具有2 $\times$ Strep标签和HRV 3C蛋白酶识别位点的pCAG载体用于在哺乳细胞中表达(图1(a)). 利用PCR技术从人源细胞的cDNA文库扩增获得人类细胞色素P450氧化还原酶(NADPH-cytochrome P450 reductase, CYPOR)的基因(UniProt ID P16435)后, 将CYPOR全长读码框架(氨基酸残基1~680)插入羧基末端具有8 $\times$ 组氨酸标签、Flag标签以及TEV蛋白酶识别位点的pFastBac Dual载体用于在昆虫细胞中表达.

(iv) 重组蛋白的表达. 使用携带CYP7B1和CYPOR表达构建体的pFastBac Dual质粒分别转化大肠杆菌DH10 Bac感受态菌株以制备重组杆状病毒质粒, 转染草地贪夜蛾昆虫细胞Sf9以获得初代杆状病毒. 初代杆状病毒经过2代扩增后离心收集并在4 $^{\circ}$ C保存以备后续实验. 制备好的用于过表达CYP7B1以及CYPOR的重组杆状病毒以1:100(体积比)的接种浓度分别感染Sf9细胞或者粉纹夜蛾High Five细胞(Hi5)培养物. 当CYP7B1和CYPOR共表达时, 用于CYP7B1表达的病毒和用于CYPOR表达的病毒按照3:1的比例预先混合后用同样的方式感染昆虫细胞. 感染后的昆虫细胞在

图1 CYP7B1全长蛋白的表达与纯化。(a) CYP7B1表达构建体的主要元件示意图。1, pFast-HC-CYP7B1; 2, pFast-HN-CYP7B1; 3, pFast-HCS-CYP7B1; 4, pFast-HNS-CYP7B1; 5, pCAG-HCS-CYP7B1; 6, pCAG-HN-CYP7B1。(b), (c) 纯化蛋白的SDS-PAGE分析。1、2用TALON金属亲和树脂纯化, 3、4、5用Strep-Tactin Superflow亲和树脂纯化, 6用Anti-FLAG M2亲和树脂纯化。+T表示使用TEV蛋白酶处理, +C表示使用3C蛋白酶处理, 反应条件均为室温下处理30 min

Figure 1 The expression construct design and the purification of CYP7B1. (a) Schematic diagrams of the designs of CYP7B1 expression construct. 1, pFast-HC-CYP7B1; 2, pFast-HN-CYP7B1; 3, pFast-HCS-CYP7B1; 4, pFast-HNS-CYP7B1; 5, pCAG-HCS-CYP7B1; 6, pCAG-HN-CYP7B1. (b), (c) SDS-PAGE analysis of purified protein. Samples 1 and 2 are purified using TALON Metal Affinity Resin; Samples 3, 4, and 5 are purified using Strep-Tactin Superflow Resin; Sample 6 is purified using Anti-FLAG M2 Affinity Resin. +T indicates the treatment with TEV protease, while +C indicates the treatment with 3C protease. All the protease treatments are conducted at room temperature for 30 min

27°C继续培养48~72 h, 测定细胞活率 $\leq 80\%$ 时离心收取细胞用于后续蛋白纯化。分别将携带CYP7B1和CYPOR表达构建体的pCAG重组质粒或PEI(polyethylenimine, 聚乙烯亚胺)与Gibco Opti-MEM Medium室温孵育5 min之后, 将两者等体积混合, 室温孵育25 min之后加入HEK293F细胞培养物中。转染后的哺乳细胞在37°C继续培养60~80 h, 之后低温离心(3000 r/min, 15 min)收集细胞用于蛋白纯化。

(v) 重组蛋白纯化。过表达目的蛋白的细胞在冰上用包含20 mmol/L HEPES pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL DNase I, 5 mmol/L MgCl₂和1 mmol/L PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, 苯基磺酰氟)的缓冲液A充分重悬, 采用高压均质机破碎细胞(600~800 bar, 5.5°C, 1 min)。超速离心收取细胞膜碎片(30000 r/min, 4°C, 45 min), 用加入了蛋白酶抑制剂的缓冲液A充分重悬此沉淀, 加入1%(w/v)的DDM在4°C

进行2 h增溶。高速离心收取上清(19500 r/min, 4°C, 45 min)。重组蛋白根据所带标签用对应的亲和树脂进行亲和柱层析纯化。再使用经缓冲液预平衡后的Superdex 200 10/300 Gel色谱柱通过分子筛凝胶过滤法进一步将蛋白分离纯化。

(vi) 免疫印迹法。将蛋白样品进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 再用半干转法将蛋白转移至PVDF膜上。配制5%的脱脂奶粉, 将PVDF膜完全浸润, 摇床室温封闭2 h或4°C封闭过夜。倒掉封闭液, 将HRP偶联抗体加入2.5%的脱脂奶粉中摇床室温孵育2 h或4°C孵育过夜。倒掉孵育液, 用Western杂交膜清洗液(TBST溶液, 包含20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20)清洗PVDF膜, 每次15 min, 重复3次。最后用化学发光成像法进行显色。

(vii) 蛋白质相互作用质谱分析. 将未转染的HEK 293F细胞离心收集之后, 用Buffer A加蛋白酶抑制剂充分重悬, 用超声破碎仪在冰上将其破碎, 再加入1%(w/v)的DDM在4°C旋转混悬仪上增溶2 h. 其后高速离心(19500 r/min, 4°C, 45 min)收取上清得到HEK全蛋白溶液. 将带Strep tag的CYP7B1与Strep-Tactin Superflow亲和树脂柱结合, 以未结合的空载树脂柱为对照, 将HEK全蛋白溶液平均分成2份, 分别低速加载至树脂柱, 充分洗涤后洗脱. 各取100 μ L洗脱液进行质谱分析, 用UniProt数据库中人源(*Homo sapiens*)蛋白质数据库进行分析.

(viii) 分子互做分析. 将CYP7B1和CYPOR之间的相互作用关系用Octet分子互作仪(ForteBio Octet RED96, ForteBio Inc, 美国)进行分析. 使用包含20 mmol/L HEPES pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L DDM的缓冲盐溶液在室温下活化Streptavidin(SA)生物传感器, 随后将C端携带Strep标签的纯化CYP7B1蛋白固化到传感器上, 用不同浓度的CYPOR蛋白作为分析物进行结合和解离实验. 使用ANABEL的kods线性分析法对原始数据进行整理分析^[14].

2 实验结果

2.1 CYP7B1表达系统的筛选

为了得到纯化的CYP7B1蛋白, 将全长的CYP7B1基因克隆构建成为6种不同的重组质粒并尝试了昆虫细胞和哺乳细胞2个不同的表达系统(图1(a)). 表达纯化的蛋白经SDS-PAGE凝胶电泳后, 用考马斯亮蓝染液染色检测, 结果显示, 在昆虫细胞体系中, 使用表达构建体3(pFast-HCS-CYP7B1)所表达的人源CYP7B1在产量、纯度和状态方面均优于其他表达构建体(图1(b), (c)). 此外, 利用表达构建体3进行的进一步筛选显示, 使用Hi5细胞系进行表达每升细胞培养物可获得约0.8 mg纯化的CYP7B1蛋白, 而使用Sf9细胞系则每升仅可获得约0.2 mg, 前者的产量明显高于后者.

2.2 CYP7B1的纯化

使用通过pFast-HCS-CYP7B1质粒制备的杆状病毒感染Hi5细胞并进行亲和层析纯化, 并通过凝胶过滤分子筛层析进一步纯化可以得到进一步富集的CYP7B1蛋白. 由于细胞色素P450家族蛋白结合有辅因子铁卟啉, 因此同时监测418 nm的吸光值可以直接对

洗脱级分中与CYP7B1结合的辅因子进行测量, 结合280 nm下对蛋白质的监测可更准确地对分子筛凝胶色谱洗脱中的CYP7B1蛋白性质进行评估. 图2(a)显示, 在分子筛凝胶色谱分离过程中, CYP7B1蛋白在外水体积(约8.5 mL)之后, 在约13~13.5 mL附近可洗脱出单一的对称洗脱峰, 并且该洗脱峰同时显示波长280和418 nm下的最大吸收值, 提示所纯化的蛋白具备辅因子结合能力.

在膜蛋白纯化和结构与功能分析中, 蛋白质样品稳定性和活性依赖于去垢剂形成的两亲性微团, 因此优化去垢剂对后续的结构解析或功能分析工作都至关重要. 通过比较蛋白在不同去垢剂(DDM、DM、NM、OM和OG)中的分子筛凝胶色谱特征发现, CYP7B1在以麦芽糖基团为亲水头部的去垢剂家族中表现良好, 在疏水侧链为C9、C11和C12长度的去垢剂(DDM、DM、NM)中保持稳定, 但当疏水侧链缩短至C8的OM时有较大的回收率损失. 与之对比, 当将亲水头部替换为葡萄糖基团时, 去垢剂OG中的色谱图中几乎无法检出CYP7B1蛋白, 提示其无法维持正常的折叠.

2.3 CYP7B1互作蛋白的发现

使用固定化于Strep Tactin Superflow亲和树脂的CYP7B1, 针对人类细胞总蛋白制备物进行的拉取-质谱分析方法(具体实验步骤见第1节), 分析了与CYP7B1具有潜在互作能力的蛋白质. 质谱结果提示, CYP7B1可能与共定位于内质网中的多种具备氧化还原能力的蛋白存在相互作用, 包括CYPOR、细胞色素b5(Cytochrome b5, CYB5A)、血红素加氧酶2(Heme oxygenase 2, HMOX2)和膜相关孕激素受体组分1(membrane-associated progesterone receptor component 1, PGRMC1)等(表1). 表1中列出使用固定化有CYP7B1的Strep树脂所结合的蛋白质样品质谱分析结果, 结果经筛选显示出定位于内质网的互作蛋白候选物.

2.4 CYP7B1-CYPOR的分子互做分析

为了进一步鉴定全长的CYP7B1和全长的CYPOR之间的相互作用关系, 使用ForteBio Octet对蛋白进行结合分析. 将3个浓度(0.5、5、10 mmol/L)的CYPOR以及不含蛋白的缓冲盐溶液作为空白对照分别与固化后的CYP7B1进行结合及解离. 如图3(a)所示, 当CYPOR的浓度为10 mmol/L时, 与CYP7B1蛋白之间的相互作

图2 CYP7B1的进一步纯化和去垢剂筛选。(a) CYP7B1的分子筛凝胶过滤色谱图, 插图为使用SDS-PAGE对主峰进一步分析的结果。(b) CYP7B1的去垢剂筛选。显示的为CYP7B1在使用包含DDM、DM、NM、OM、OG作为去垢剂的流动相中进行的分子筛凝胶过滤色谱图, 不同去垢剂的化学结构式在右上角示出

Figure 2 Further purification of CYP7B1 and detergent screening. (a) FPLC diagram of CYP7B1. The inset shows the SDS-PAGE analysis of the peak fractions indicated by arrows. (b) Detergent screen of purified CYP7B1. The chromatograms show the FPLC profiles of CYP7B1 conducted in various detergents (DDM, DM, NM, OM, OG), with the chemical structural formulas of different detergents are shown in the upper right

用最强。对原始数据进行整理, 分析CYP7B1和CYPOR蛋白的结合亲和力, 其 K_D 值为 1.12×10^{-5} mol/L。

2.5 CYP7B1-CYPOR复合物的纯化制备

使用分别能够过表达携带多组氨酸-Flag纯化标签的CYPOR和携带Strep纯化标签的CYP7B1的重组杆状病毒共感染Hi5细胞, 通过Strep-Tactin Superflow亲和树脂和Anti-Flag M2亲和树脂2步纯化和洗脱, 最终可以得到同时包含2种蛋白的洗脱级分(图3(b)), 提示CY-

POR与CYP7B1在共表达过程中形成复合物。另一方面, 通过将CYPOR和CYP7B1蛋白分别表达后纯化获得蛋白质样品(图3(d)), 随后将两者进行体外混合孵育, 再进行使用分子筛凝胶色谱方法进行分析, 在洗脱组分中发现, 除在13~13.5 mL处的CYP7B1的主洗脱峰, 还在10~12 mL处存在多个高分子量的洗脱峰。电泳鉴定发现, 该洗脱峰包含CYPOR和CYP7B1共2种组分, 因此其对应于CYPOR-CYP7B1形成的高分子聚合物(图3(c), (e))。

表 1 纯化的CYP7B1所捕获的潜在互作蛋白

Table 1 Potential interacting proteins captured by purified CYP7B1

具体描述			PEP得分总值	覆盖度	肽段数	PSMs	独特肽段数
蛋白名称	物种	基因名					
25-hydroxycholesterol 7- α -hydroxylase (捕获诱饵蛋白)	9606	<i>CYP7B1</i>	357.929	88	62	464	62
NADH-cytochrome b5 reductase	9606	<i>CYB5R3</i>	5.117	6	1	1	1
Membrane-associated progesterone receptor component 1	9606	<i>PGRMC1</i>	32.681	45	7	11	7
Cytochrome b5	9606	<i>CYB5A</i>	27.377	47	5	6	5
NADPH-cytochrome P450 reductase	9606	<i>POR</i>	44.08	28	17	17	17
Heme oxygenase 1	9606	<i>HMOX1</i>	7.774	13	4	5	4
Heme oxygenase 2	9606	<i>HMOX2</i>	21.895	25	7	8	7
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	9606	<i>ASPH</i>	35.738	21	9	9	9
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	9606	<i>ATP2A3</i>	30.011	11	9	10	2
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	9606	<i>ATP2A2</i>	128.67	39	34	40	27
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48-k subunit	9606	<i>DDOST</i>	7.462	6	3	4	3
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	9606	<i>HACD3</i>	11.521	12	4	4	4
Serine palmitoyltransferase 1	9606	<i>SPTLC1</i>	9.371	9	3	4	3
Protein cornichon homolog 4	9606	<i>CNIH4</i>	7.139	14	1	1	1

3 讨论

人类细胞色素P450蛋白是由约57个成员组成的超家族, 根据序列相似性可分为18个家族以及超过40个亚家族. 约20种人类细胞色素P450蛋白被预测为跨膜蛋白, 其中绝大部分定位于内质网膜之上. CYP7B1是定位于内质网的跨膜蛋白质分子, 据预测具有个跨膜螺旋(氨基酸17~37和289~309). 我们的表达纯化工作显示, 这一蛋白可以由杆状病毒/昆虫细胞体系实现高水平的重组表达和纯化, 并且所纯化的蛋白具有辅因子结合能力, 提示其具有催化氧化还原反应的生物学功能. 同时, 对去垢剂种类的敏感也证实, 这一蛋白具有较为完整的疏水表面, 具有脂膜结合能力. 去垢剂是膜蛋白纯化与稳定维持的关键试剂, 其重要作用在于模拟膜蛋白所处的磷脂环境. 对不同的膜蛋白而言, 不同去垢剂可导致其稳定性与生物活性出现差异, 从而在结晶、电子显微镜分析中表现不同, 而最佳去垢剂的选择是膜蛋白结构与功能研究的关键^[15]. 我们的研究提供了CYP7B1在常用去垢剂中的基本性质, 并发现其对于疏水侧链短于8个碳原子的去垢剂趋于不稳定.

这为以后进行的CYP7B1生化与结构生物学研究提供了重要的蛋白质理化性质信息.

CYP7B1蛋白与多种人类疾病密切相关, 但在临床上以此为药物靶点的应用却比较有限, 这与人类细胞色素P450基因家族中的变异谱范围非常广泛有关. CYP家族蛋白中的单核苷酸位点变异(single nucleotide variants, SNV)是个体出现遗传性疾病及个体之间在治疗效果和药物不良反应方面存在差异的主要原因, 造成现象的原因很可能与突变干扰了蛋白与蛋白之间的相互作用有关^[16]. 与其他细胞色素家族类似, 细胞色素P450家族通常并非独立地发挥生物学功能, 而是可能存在于一个由多种氧化还原酶类及调控蛋白组成的生物分子互作网络之中, 其生物学功能受到多方面互作蛋白调节. 因此, 将CYP7B1置于其所处的代谢网络中进行研究才能准确地反映其在体内的真实作用. 生物体的线粒体中存在严密调控的电子传递链系统, 主要由多种细胞色素与氧化还原酶组成^[17]. 与之相比, 内质网中尚未发现能维持稳定超大复合物的电子传递系统, 然而, 众多细胞色素分子以及相关的氧化还原酶类在内质网中的集中分布提示, 可能存在承担电子传递任

图3 CYP7B1和CYPOR相互作用的分析鉴定及复合物的制备。(a) 固定于传感器上的CYP7B1和不同浓度的CYPOR结合解离的传感图, 缓冲盐溶液的空白对照作为背景已扣除。(b) CYP7B1和CYPOR共表达后进行的双标签纯化结果, 洗脱样品通过SDS-PAGE和Western Blot对复合物进行显色鉴定。(c) CYP7B1和CYPOR共表达后使用Anti-Flag M2亲和树脂和Strep-Tactin Superflow亲和树脂进行两步亲和纯化, 并通过SDS-PAGE和Western Blot对洗脱样品进行鉴定分析。(d) 用于体外复合物形成的CYP7B1和CYPOR蛋白样品。(e) SDS-PAGE和蛋白免疫印迹的样品来自(c)图FPLC中所对应的洗脱级分

Figure 3 Analysis on the interaction between CYP7B1 and CYPOR and preparation of the complex. (a) The binding and dissociation analysis between the CYP7B1 and CYPOR at different concentrations, with the baselines of buffer-only samples deducted from sensorgrams. (b) Co-expressed CYP7B1-CYPOR were purified with 2-step tandem affinity chromatograph using Anti-Flag M2 Affinity Resin and Strep-Tactin Superflow Resin and analyzed with SDS-PAGE and Western Blot. (c) The *in vitro* assembly of CYP7B1-CYPOR complex using the two proteins purified separately. The purified CYP7B1 and CYPOR were incubated, and then subjected to FPLC to analyze complex formation. (d) The separately purified CYP7B1 and CYPOR used for assembly *in vitro*. (e) The SDS-PAGE and Western Blot analysis on the fractions from FPLC in (c)

务的蛋白质互作网络。我们利用内质网上富集的细胞色素P450蛋白CYP7B1成功地捕获了多种具备电子传递能力的蛋白, 包括向细胞色素P450传递电子的还原酶CYPOR、同样可接受来自CYPOR的电子并与之形成复合物的血红素氧合酶HMOX1及其同家族蛋白HMOX2^[18]、细胞色素b5家族蛋白CYB5A和PGRMC1, 以及向细胞色素b5传递电子的CYB5R3等^[19,20]。这些功

能相关蛋白在CYP7B1捕获组分中的富集提示, 内质网中可能存在一个物理互作网络, 上述分子可能作为这一网络中的成员形成功能与组成尚未得到充分表征的电子传递体系, 用于内质网中的多种生物活性分子的合成与代谢。通过共表达和体外装配2种实验路线, 均可以获得CYP7B1-CYPOR的复合物蛋白, 提示该复合物蛋白较为稳定, 并且可能是内质网电子传递网络中

的组分之一。因此有可能以这一异源复合物为起点进一步捕获到分子量更大、成分更复杂的功能性超大复合物。这为此后的内质网电子传递系统的表征以及结构与功能分析奠定了基础。

综上所述,我们报道了人类细胞色素P450家族重要蛋白CYP7B1的全长蛋白重组表达与纯化,对蛋白进行的去垢剂筛选显示,其在常用的基于麦芽糖的去垢剂中基本保持稳定(DDM、DM、NM)。进一步的蛋白质互作分析显示,CYP7B1可能与多种共定位于内质网的细胞色素蛋白或氧化还原酶类形成功能性复合物,

而共表达和体外装配这两种纯化路线均可获得CYP7B1-CYPOR的稳定蛋白质复合物。CYP7B1-CYPOR复合物的制备提示,内质网上存在一个较为复杂的未知互作网络,我们所提出的复合物制备方法为以后对这一网络的具体组织结构进行详细的测绘分析提供了良好的出发点,为制备包含多组分的氧化还原反应复合物提供了核心组分的装配信息。沿着这一思路继续进行下去,有可能逐步厘清内质网电子传递的链条走向,进一步加深对细胞器参与氧化还原反应分子机制的了解。

参考文献

- 1 Denisov I G, Makris T M, Sligar S G, et al. Structure and chemistry of cytochrome p450. *Chem Rev*, 2005, 105: 2253–2278
- 2 Tempel W, Grabovec I, MacKenzie F, et al. Structural characterization of human cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res*, 2014, 55: 1925–1932
- 3 Stapleton G, Steel M, Richardson M, et al. A novel cytochrome p450 expressed primarily in brain. *J Biol Chem*, 1995, 270: 29739–29745
- 4 Stiles A R, McDonald J G, Bauman D R, et al. CYP7B1: One cytochrome p450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *J Biol Chem*, 2009, 284: 28485–28489
- 5 Martin C, Ross M, Chapman K E, et al. CYP7B generates a selective estrogen receptor β agonist in human prostate. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 2928–2935
- 6 Weihua Z, Lathe R, Warner M, et al. An endocrine pathway in the prostate, ER, AR, 5-androstane-3,17-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13589–13594
- 7 Omoto Y, Lathe R, Warner M, et al. Early onset of puberty and early ovarian failure in CYP7B1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2814–2819
- 8 Choi W S, Lee G, Song W H, et al. The CH25H-CYP7B1-ROR α axis of cholesterol metabolism regulates osteoarthritis. *Nature*, 2019, 566: 254–258
- 9 Goizet C, Boukhris A, Durr A, et al. *CYP7B1* mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5. *Brain*, 2009, 132: 1589–1600
- 10 Meljon A, Crick P J, Yutuc E, et al. Mining for oxysterols in *CYP7B1*^{-/-} mouse brain and plasma: Relevance to spastic paraplegia type 5. *Biomolecules*, 2019, 9: 149–170
- 11 Yau J L W, Rasmuson S, Andrew R, et al. Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: Predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2003, 121: 307–314
- 12 Zhang X, Lv C, An Y, et al. Increased levels of 27-hydroxycholesterol induced by dietary cholesterol in brain contribute to learning and memory impairment in rats. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62: 1700531
- 13 Shafaati M, Marutle A, Pettersson H, et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. *J Lipid Res*, 2011, 52: 1004–1010
- 14 Kramer S D, Wohrle J, Rath C, et al. Anabel: An online tool for the real-time kinetic analysis of binding events. *Bioinform Biol Insights*, 2019, 13: 1–10
- 15 Zhou F, Yao D, Rao B, et al. Crystal structure of a bacterial homolog to human lysosomal transporter, spinster. *Sci Bull*, 2019, 64: 1310–1317
- 16 Fujikura K, Ingelman-Sundberg M, Lauschke V M. Genetic variation in the human cytochrome p450 supergene family. *Pharmacogenet Genomics*, 2015, 25: 584–594
- 17 Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 2000, 19: 1777–1783
- 18 Sugishima M, Sato H, Wada K, et al. Crystal structure of a NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (CYPOR) and heme oxygenase 1 fusion protein implies a conformational change in CYPOR upon NADPH/NADP⁺ binding. *FEBS Lett*, 2019, 593: 868–875
- 19 Elahian F, Sepehrizadeh Z, Moghimi B, et al. Human cytochrome b5 reductase: Structure, function, and potential applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, 34: 134–143
- 20 Amdahl M B, Sparacino-Watkins C E, Corti P, et al. Efficient reduction of vertebrate cytoglobins by the cytochrome b₅/cytochrome b₅ reductase/NADH system. *Biochemistry*, 2017, 56: 3993–4004

Summary for “人类甾类激素加工酶CYP7B1的纯化制备与互作网络”

The expression and purification of human steroid hormone processing enzyme CYP7B1 and the characterization of its interactive network

Liyan Jian¹, Qing Zhang², Yang Chen¹ & Yu Cao^{1*}¹ Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China;² Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China* Corresponding author, E-mail: yu.cao@shsmu.edu.cn

The cytochrome P450 monooxygenase CYP7B1 is an integral membrane protein at the endoplasmic reticulum (ER) membrane and catalyzes the hydroxylation of 7- α position of the steroid backbone, generating a series of important steroids such as 7 α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy pregnenolone. The disruption of CYP7B1 function could lead to abnormal oxysterols levels in neurons and the liver, and thus result in diseases such as hereditary spastic paraplegia and congenital bile acid synthesis defect. CYP7B1 was found to play a critical role in the biochemical network for biosynthesis/modification of steroids which involves hydrogenation/dehydrogenation, hydroxylation, oxygenation reaction at various carbon positions of the steroid backbone. Although a biologically-related enzyme, CYP7A1, has been successfully purified and structurally characterized, little was known about the structure and catalyzing mechanism for CYP7B1. To understand the structural basis of CYP7B1 functions, recombinant expression systems were screened for high-level expression and purification. Humans CYP7B1 was successfully expressed in the baculovirus/insect cell system and purified with its redox cofactor, indicating a natural folding for CYP7B1 samples. When challenged with detergents of various lengths of hydrophobic side chains, purified CYP7B1 proteins showed moderate stability but failed to maintain the natural folding upon the “harsh” detergent such as octyl glucoside. To explore the interactive proteins for CYP7B1, a pulldown-mass spectrometry assay using purified CYP7B1 was conducted and identified multiple ER-resident enzymes including cytochrome P450 reductase CYPOR as interactive proteins for CYP7B1, as well as other redox enzymes such as cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 family members, indicating the existence of a physical interactive network at ER compromising cytochrome P450 and b5 family members and their reductases.

Further efforts were conducted to confirm molecular interaction from mass-spectral assay and the *in vitro* macromolecular interaction assay showed the association between CYP7B1 and CYPOR. The CYP7B1-CYPOR protein complex was purified upon the optimization of co-expression system and *in vitro* assembly protocols, implying a catalytic complex might exist in ER membrane comprising CYP7B1, CYPOR, and other redox enzymes. Our results showed that human cytochrome P450 protein CYP7B1 could be purified in its cofactor-bound form and bind to cytochrome P450 reductase CYPOR to form a stable complex resistant to solubilization by detergent. Further studies should be conducted to map the components and interactions in the redox-enzyme complex at ER and determine the structural basis for the electron transfer therein.

cytochrome P450 monooxygenase, endoplasmic reticulum, membrane protein, steroid synthesis, oxidoreductase complex

doi: [10.1360/TB-2021-0087](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0087)