

## 定向进化提高人精氨酸酶 1 的催化活性

冯翠月<sup>1</sup>, 王晨宇<sup>1</sup>, 唐梦佳<sup>1</sup>, 樊 帅<sup>2</sup>, 杨兆勇<sup>2\*</sup>, 张志斐<sup>1\*</sup>

(1. 华北理工大学药学院, 河北唐山 063210; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要:** 精氨酸酶 1 缺乏症 (arginase 1 deficiency, ARG1-D) 是一种罕见的遗传性代谢疾病, 导致患者进行性痉挛性瘫痪、认知障碍和癫痫发作。来源于人源的重组人精氨酸酶 1 (recombinant human arginase 1, rhArg1) 是其潜在的治疗药物, 但还存在活性低、半衰期短等缺陷限制了其临床应用。本研究采用定向进化的方法, 通过易错 PCR 构建 rhArg1 的随机突变文库, 经高通量筛选获得活性提高的突变体, 联合点饱和突变探讨了 R21 和 V182 位点对活性的影响。研究发现, 在反应体系中不含  $Mn^{2+}$  的条件下, 突变体 V182D、V182S、V182H 和 R21N 的  $k_{cat}$  值相比于 rhArg1 提高 2.0、1.9、1.7 和 1.3 倍, 突变体 V182D、V182S、R21D 和 R21N 的  $k_{cat}/K_m$  分别是 rhArg1 的 2.1、1.7、1.4 和 1.4 倍。突变体 R21D 和 V182L 对底物的亲和力有所增强。本研究通过定向进化和点饱和突变获得了 rhArg1 活性提高的突变体, 从而提升了其在医疗领域的应用前景。

**关键词:** 精氨酸酶 1 缺乏症; 重组人精氨酸酶 1; 定向进化; 饱和突变

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)12-3402-07

## Directed evolution to enhance the catalytic activity of human arginase 1

FENG Cui-yue<sup>1</sup>, WANG Chen-yu<sup>1</sup>, TANG Meng-jia<sup>1</sup>, FAN Shuai<sup>2</sup>,  
YANG Zhao-yong<sup>2\*</sup>, ZHANG Zhi-fei<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Arginase 1 deficiency (ARG1-D) is a rare genetic metabolic disorder that leads to progressive spastic paralysis, cognitive impairment, and seizures. Recombinant human arginase 1 (rhArg1) is a potential therapeutic agent for this condition, but its clinical application is limited by low activity and short half-life. In this study, we employed directed evolution to address these issues. A random mutation library of rhArg1 was constructed using error-prone PCR, and high-throughput screening was used to identify mutants with enhanced activity. Site-saturation mutagenesis was also performed to investigate the effects of residues R21 and V182 on enzyme activity. Our findings revealed that under reaction conditions devoid of  $Mn^{2+}$ , the  $k_{cat}$  values of the mutants V182D, V182S, V182H, and R21N increased by 2.0, 1.9, 1.7, and 1.3 times respectively, compared to rhArg1. The  $k_{cat}/K_m$  values of mutants V182D, V182S, R21D, and R21N were 2.1, 1.7, 1.4, and 1.4 times higher than those of rhArg1, respectively. Additionally, mutants R21D and V182L showed enhanced substrate affinity. Through directed evolution and site-saturation mutagenesis, we successfully obtained rhArg1 mutants with improved activity, thereby enhancing its potential for clinical application.

**Key words:** arginase 1 deficiency; recombinant human arginase 1; directed evolution; site-saturation mutagenesis

收稿日期: 2024-05-21; 修回日期: 2024-07-30.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82373767); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-055).

\*通讯作者 E-mail: zhangzhifeifei7208@163.com; zhaoyong@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0489

精氨酸酶1缺乏症 (arginase 1 deficiency, ARG1-D) 是一种因精氨酸酶1 (arginase 1, Arg1) 基因突变导致的常染色体隐性遗传病<sup>[1]</sup>, Arg1的失活会导致精氨酸和其他胍类化合物在血液中过度积累, 影响肝脏尿素循环, 导致尿素生成功能受损<sup>[2]</sup>。标准治疗包括限制饮食疗法和对症治疗<sup>[3,4]</sup>, 但均无法解决精氨酸在体内的积累, 且患者依从性差。rhArg1已被证实可以将血液精氨酸水平降低到可接受的范围内, 并显著减少胍类化合物的积累<sup>[5-7]</sup>。2023年12月, 欧盟正式批准Loargys (pegzilarginase) 用于治疗成人、青少年和2岁及以上儿童的ARG1-D。Loargys是人源的精氨酸酶1, 通过催化精氨酸生成尿素和鸟氨酸来降低患者血浆中精氨酸的浓度。但令人遗憾的是该药物并未引入国内。同时, 人源精氨酸酶1 (human arginase 1, hArg1) 还是药物靶点, 其涉及30多种严重疾病<sup>[8,9]</sup>, 从严重的心血管疾病到癌症和罕见的代谢性疾病<sup>[10-15]</sup>。hArg1已被进一步提出作为治疗肝细胞癌和黑色素瘤的潜在药物<sup>[16]</sup>, 并作为治疗精氨酸营养不良肿瘤的潜在癌症治疗剂进入临床试验<sup>[17]</sup>。

Arg1是一种含双核锰离子的水解酶, 可催化精氨酸转化为鸟氨酸和尿素, 从而在氮代谢中起关键作用<sup>[18,19]</sup>。它存在于细菌、酵母、植物、无脊椎动物和脊椎动物中, 于1904年在哺乳动物肝脏中被发现<sup>[20]</sup>。在人和哺乳动物的各种组织器官中, Arg有两种亚型, 分别是Arg1和Arg2。其中Arg1 (EC3.5.3.1) 是一种主要表达于肝脏的胞浆异构体, 它调节尿素生成, 而Arg2是一种主要存在于肠道、肾脏和前列腺的线粒体异构体<sup>[21-23]</sup>。Arg1是一种同源三聚体金属酶, 长度为322个氨基酸残基, 每个单体在其催化核心内配以一个氢氧离子桥接的双核Mn<sup>2+</sup>簇, 呈 $\alpha/\beta$ -折叠<sup>[24]</sup>。Arg1的活性会受到精氨酸以及Mn<sup>2+</sup>的影响, 这使得它区别于尿素循环里的另四种酶 (氨甲酰磷酸合成酶、鸟氨酸转氨甲酰基酶、精氨酸琥珀酸合酶和精氨酸琥珀酸裂解酶), 进而会对尿素循环产生重要的影响。

虽然hArg1具有免疫原性低的优点, 但其与精氨酸的亲合力较低, 在体内的半衰期较短, 且hArg1能发挥最佳活性的反应条件与生理条件相差很多<sup>[15,25]</sup>, 限制了其在ARG1-D和癌症治疗中的临床有效性, 因此需要对其进行改造, 从而满足临床应用的需求。本研究采用定向进化的方法提高rhArg1的活性, 通过易错PCR构建rhArg1的随机突变文库, 利用高通量筛选方法筛选活性提高的突变体, 再针对此位点进行点饱和和突变进行优化, 对突变体进行活性、酶动力学和热力学参数评价, 期望获得活性和稳定性提高的突变体, 提升rhArg1的成药潜力。

## 材料与方法

**菌株与试剂** 克隆菌株Trans1-T1和表达菌株BL21 (DE3) 均购自北京全式金生物技术有限公司; 表达质粒pET-21a (+) 购自北京安诺伦生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、PCR纯化试剂盒、内切酶购自北京康润诚业生物科技有限公司; 氨苄青霉素 (批号: 9314102111)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 批号: 0487083131) 购自北京兰博利德商贸有限公司; Co<sup>2+</sup>-NTA 填料 (批号: 2301151A) 购自日本TaKaRa公司; 30 kDa超滤浓缩管购自美国Millipore公司, 其余试剂均为国产分析纯。

**构建随机突变文库和定点突变** 人源的Arg1 (NCBI: P05089.2) 经密码子优化后由华大基因合成, 经酶切连接得到表达质粒pET-21a-rhArg1, 以此为模板, 采用QuickMutation™基因随机突变试剂盒 (碧云天, 中国) 构建随机突变文库。点饱和突变由反向PCR完成, 突变引物见表1, 扩增反应体系为: 模板DNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L, KOD One™ PCR Master Mix 25  $\mu$ L, 上下游引物各1.5  $\mu$ L。PCR条件为: 98 °C预变性2 min; 98 °C变性10 s, 60 °C退火15 s, 68 °C延伸50 s, 30个循环; 最后68 °C延伸5 min。

**突变文库筛选** 将突变体接种在96孔板上, 37 °C, 200 r·min<sup>-1</sup>摇至OD<sub>600</sub>达到0.6~0.8, 然后添加终浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG, 在20 °C、200 r·min<sup>-1</sup>条件下发酵12 h, 然后添加细菌裂解酶在37 °C孵育30 min, 通过3次冻融破碎菌体, 离心吸取上清测定活性。

**rhArg1及其突变体的表达与纯化** 将测序正确的菌株取1.5 mL菌液提取质粒, 转化至表达菌株大肠杆菌BL21 (DE3) 制备重组表达菌株。按2.5%的接种量接种, 在37 °C、200 r·min<sup>-1</sup>培养至OD<sub>600</sub>为0.6~0.8时加入终浓度为0.2 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG, 然后在16 °C、200 r·min<sup>-1</sup>继续培养14~16 h, 将培养物于4 °C、6 000 r·min<sup>-1</sup>下离心6 min, 将收集好的菌体用裂解液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑, pH 8.0) 进行重悬, 破碎前加入终浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup>的PMSF溶液。用高压均质器进行菌体破碎, 破碎后的菌体在4 °C、11 000 r·min<sup>-1</sup>下离心45 min, 离心后的上清液用0.45  $\mu$ m滤膜过滤, 取适量Co<sup>2+</sup>填料装于亲和层析柱中, 用5倍柱体积去离子水清洗两遍, 再加入5倍柱体积裂解液预平衡, 将过滤后的上清液与平衡好的Co<sup>2+</sup>亲和层析填料混匀, 并在混悬仪上于4 °C孵育1 h, 将孵育后的填料置于层析柱中, 用10倍柱体积清洗液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 20 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑, pH 7.4) 冲洗杂蛋白, 再用5倍柱体积洗脱液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl,

**Table 1** Primers used in this study. Underline means mutation sites

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Primer name	Primer sequence (5'-3')
rhArg1-F	GAAGGAGATATACATATGAGCGCAAAAAGCCGTACCA	V182A-F	GGCCTGCGCGAT <u>GCG</u> GATCCGGGTGAA
rhArg1-R	GTGGTGGTGGTCTCGAGTTTCGGCGGGTTCAGATAAT	V182A-R	<u>CGC</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21A-F	AAAGGCCAGCCGGC <u>T</u> GGTGGTGTG	V182C-F	GGCCTGCGCGAT <u>TGC</u> GATCCGGGTGAA
R21A-R	<u>AGC</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182C-R	<u>GCA</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21C-F	AAAGGCCAGCCG <u>TGT</u> GGTGGTGTG	V182D-F	GGCCTGCGCGAT <u>GAC</u> GATCCGGGTGAA
R21C-R	<u>ACA</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182D-R	<u>GTC</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21D-F	AAAGGCCAGCCGGATGGTGGTGTG	V182E-F	GGCCTGCGCGAT <u>GAG</u> GATCCGGGTGAA
R21D-R	<u>ATC</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182E-R	<u>CTC</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21E-F	AAAGGCCAGCCGGAAGTGGTGTG	V182F-F	GGCCTGCGCGAT <u>TTC</u> GATCCGGGTGAA
R21E-R	<u>TTC</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182F-R	<u>GAA</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21F-F	AAAGGCCAGCCG <u>TTT</u> GGTGGTGTG	V182G-F	GGCCTGCGCGAT <u>GGG</u> GATCCGGGTGAA
R21F-R	<u>AAAC</u> GGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182G-R	<u>CCC</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21G-F	AAAGGCCAGCCGGG <u>T</u> GGTGGTGTG	V182H-F	GGCCTGCGCGAT <u>CAC</u> GATCCGGGTGAA
R21G-R	<u>ACC</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182H-R	<u>GTG</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21H-F	AAAGGCCAGCCGATGGTGGTGTG	V182I-F	GGCCTGCGCGAT <u>ATC</u> GATCCGGGTGAA
R21H-R	<u>ATG</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182I-R	<u>GAT</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21I-F	AAAGGCCAGCCGATGGTGGTGTG	V182K-F	GGCCTGCGCGAT <u>AA</u> GATCCGGGTGAA
R21I-R	<u>AAT</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182K-R	<u>CTT</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21K-F	AAAGGCCAGCCGAAAGTGGTGTG	V182L-F	GGCCTGCGCGAT <u>CTG</u> GATCCGGGTGAA
R21K-R	<u>TTT</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182L-R	<u>CAG</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21L-F	AAAGGCCAGCCGCTGGTGGTGTG	V182M-F	GGCCTGCGCGAT <u>ATG</u> GATCCGGGTGAA
R21L-R	<u>AAG</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182M-R	<u>CAT</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21M-F	AAAGGCCAGCCGATGGTGGTGTG	V182N-F	GGCCTGCGCGAT <u>AAC</u> GATCCGGGTGAA
R21M-R	<u>CAT</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182N-R	<u>GTT</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21N-F	AAAGGCCAGCCGATGGTGGTGTG	V182P-F	GGCCTGCGCGAT <u>CCG</u> GATCCGGGTGAA
R21N-R	<u>ATI</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182P-R	<u>CGG</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21P-F	AAAGGCCAGCCGCTGGTGGTGTG	V182Q-F	GGCCTGCGCGAT <u>CAG</u> GATCCGGGTGAA
R21P-R	<u>AGG</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182Q-R	<u>CTG</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21Q-F	AAAGGCCAGCCGCAAGTGGTGTG	V182R-F	GGCCTGCGCGAT <u>CGG</u> GATCCGGGTGAA
R21Q-R	<u>TTG</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182R-R	<u>CCG</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21S-F	AAAGGCCAGCCGAGTGGTGGTGTG	V182S-F	GGCCTGCGCGAT <u>TCC</u> GATCCGGGTGAA
R21S-R	<u>ACT</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182S-R	<u>CGA</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21T-F	AAAGGCCAGCCGACTGGTGGTGTG	V182T-F	GGCCTGCGCGAT <u>ACG</u> GATCCGGGTGAA
R21T-R	<u>AGT</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182T-R	<u>CGT</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21V-F	AAAGGCCAGCCGTTGGTGGTGTG	V182W-F	GGCCTGCGCGAT <u>TGG</u> GATCCGGGTGAA
R21V-R	<u>AAC</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182W-R	<u>CCA</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21W-F	AAAGGCCAGCCGIGGGTGGTGTG	V182Y-F	GGCCTGCGCGAT <u>TAC</u> GATCCGGGTGAA
R21W-R	<u>CCAC</u> GGCTGGCCTTTGCTAAACGGT	V182Y-R	<u>GTA</u> ATCGCGCAGGCCGATATAACAAT
R21Y-F	AAAGGCCAGCCGATGGTGGTGTG		
R21Y-R	<u>ATAC</u> CGCTGGCCTTTGCTAAACGGT		

250 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑, pH 8.0) 将目的蛋白洗脱下来。使用超滤浓缩管将含有目的蛋白 rhArg1 的组分汇集并浓缩至适宜浓度。所有突变体的纯度通过 12.5% 的 SDS-PAGE 电泳分析, 并采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

**rhArg1 及其突变体酶活性测定** 酶催化总反应体系为 200 μL, 将 1.4 μmol·L<sup>-1</sup> 蛋白加入到含有 10 mmol·L<sup>-1</sup> L-精氨酸, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.4) 和 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> Mn<sup>2+</sup> 中 37 °C 反应 5 min [不含 Mn<sup>2+</sup> 的反应体系是将 5.8 μmol·L<sup>-1</sup> 蛋白加入到含有 10 mmol·L<sup>-1</sup> L-精氨酸和 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.4) 中 37 °C 反应 5 min], 加入 30 μL 含 2-异亚硝基苯丙酮的酸混合物终止反应, 然后 100 °C 反应 45 min, 置于冰上冷却后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 在紫外分光光度计下 540 nm 处测量吸光度, 并通过标准曲线确定生成尿素的量, 计算 rhArg1

的酶活。每秒钟催化生成 1 mmol 尿素所需要的 rhArg1 量定义为 1 U。

**rhArg1 及其突变体酶动力学测定** 为评估酶的动力学参数  $K_m$  和  $k_{cat}$ , 以溶于 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.4) 的 0.2~100 mmol·L<sup>-1</sup> L-精氨酸 (或含 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> Mn<sup>2+</sup>) 作为底物, 分别与适当稀释的酶液反应, 测定酶活性, 利用 GraphPad Prism 8.0 中 Michaelis-Menten 非线性拟合作图法计算  $K_m$  和  $V_{max}$  值, 并通过测定的蛋白浓度计算出对应的  $k_{cat}$ 。

**rhArg1 及其突变体最适反应温度与最适 pH 值** 配制 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠缓冲液, 7.0、7.5、8.0、8.5 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液, 9.0、9.5、10.0 和 10.5 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> 碳酸钠缓冲液, 在 37 °C、不同 pH 条件下反应 5 min, 以最高活性为 100%, 计算相对酶活性以确定酶的最适反应 pH。将

适量酶液与底物在不同温度 (30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85 和 90 °C) 反应 5 min, 以最高活性为 100%, 测定相对酶活, 以确定酶反应的最适温度。

**统计学分析** 统计学处理采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析, 组间对比采用单因素方差分析。数据表示为平均值  $\pm$  标准差, 当  $P < 0.05$  时具有统计显著性。

## 结果与讨论

### 1 突变体库的建立和筛选

利用基因随机突变试剂盒构建 rhArg1 的随机突变文库, 随机挑取 20 个转化子进行测序, 发现大部分转化子包含 2~5 个碱基突变, 证明随机突变文库构建成功。利用 96 孔板在 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养转化子并利用 IPTG 诱导表达, 然后添加溶菌酶并反复冻融三次裂解细胞, 96 孔板离心后吸取上清, 加入包含底物尿素的 96 孔板中, 反应 45 min, 然后与 2-异亚硝基苯丙酮显色从而测定活性, 颜色越深表示活性越高。结果如图 1 所示, 调取颜色最深的孔对应的转化子进行测序, 确定突变位点的信息, 经过 5 000 个转化子左右的筛选和测序, 获得了活性提高的突变体 R21C 和 V182Q。

### 2 rhArg1 及其突变体的表达与酶活测定

为了进一步确认筛选突变体的酶学性质, 利用 BL21 (DE3) 异源表达 rhArg1 及其突变体, 经 IPTG 诱导表达收集菌体、高压破碎离心后, 上清液经 Co<sup>2+</sup>亲和层析纯化 (图 2A), 对 rhArg1 及其突变体进行了酶活测定, Mn<sup>2+</sup> 是 rhArg1 重要的辅因子<sup>[26]</sup>, 可明显提高蛋白的活性 (图 2B), 但 rhArg1 作为潜在的治疗精氨酸酶 1 缺乏症的药物, 由于治疗需要长期注射, 而 Mn<sup>2+</sup> 对人体有害, 所以在研发过程中需要降低 rhArg1 对 Mn<sup>2+</sup> 的依赖, 所以考察上述突变体时应考量没有额外添加

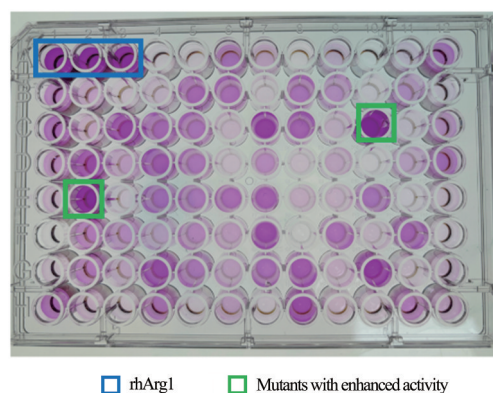


Figure 1 Mutation library screening

Mn<sup>2+</sup> 条件下的活性。实验结果显示, 在反应体系添加 Mn<sup>2+</sup> 的条件下, rhArg1 的活性是无添加 Mn<sup>2+</sup> 的 6 倍。突变体 R21C 和 V182Q 在无添加 Mn<sup>2+</sup> 的条件下, 反应活性分别较 rhArg1 提高了 15% 和 10%, 在添加 Mn<sup>2+</sup> 的条件下, 反应活性分别提高了 6% 和 32%。

### 3 R21 和 V182 位点的点饱和突变研究

鉴于 R21C 和 V182Q 的活性增加, 为了探究 21 和 182 位点对活性的影响, 继续采用点饱和突变来研究突变体对活性的影响, 通过反向 PCR 分别获得 R21 和 V182 位点突变为其余 18 种氨基酸的突变体, 并测量其活性数据, 如图 3A 所示, 在添加 Mn<sup>2+</sup> 的条件下, 对于 21 位点, 突变体 R21L 和 R21S 的活性相较于 rhArg1 分别提高了 22% 和 30%。在 182 位点, 除 V182R 外, V182 位点其余突变体的活性均能保持在 60% 以上, 其中突变体 V182I、V182K、V182P、V182Q 和 V182T 的活性相较于 rhArg1 分别提高了 92%、29%、71%、32% 和 76%。在无添加 Mn<sup>2+</sup> 的条件下, 结果如图 3B 所示, 对于第 21 位精氨酸, 突变体 R21N 的催化活性最高, 是 WT 的 1.4 倍, 突变体 R21C 和 R21N 的活性相较于 rhArg1 分别提高了 15% 和 37%。在 V182 位点, 突变体的活性提高较为

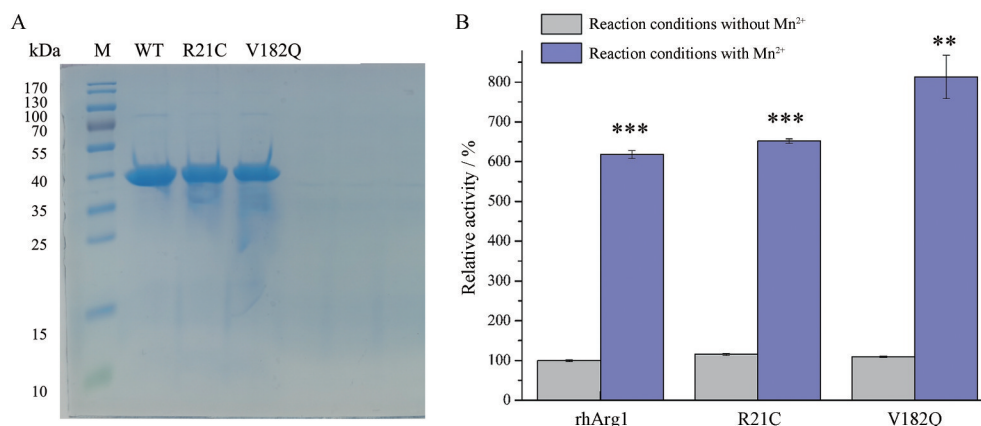


Figure 2 Expression (A) and enzyme activity determination (B) of rhArg1 and its mutants in *E. coli*.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs reaction conditions without Mn<sup>2+</sup> group

明显, 其中突变体 V182A、V182D、V182H、V182I、V182P、V182S 和 V182T 的活性相较于 rhArg1 分别提高了 28%、54%、30%、40%、26%、59% 和 36%。

#### 4 rhArg1 及其突变体酶学性质研究

酶动力学实验结果见表 2, 含  $Mn^{2+}$  突变体在酶的催化常数方面, 突变体 V182P 最高, 达到  $484.53 s^{-1}$ ; 突变体 R21N、R21S、V182A、V182I、V182K、V182P、V182Q、V182T 和 V182Y 的  $k_{cat}$  值分别是 rhArg1 的 1.1、1.2、1.6、1.6、2.4、2.4、1.4、2.3 和 1.4 倍。对于米氏常数,

R21I 较野生型降低 14%, 表明突变体对精氨酸的亲合力增大, 而其余突变体的  $K_m$  值均有不同程度的提高, 表示突变体对底物的亲和力有所下降。在酶的专一性常数方面, 突变体 V182T 为  $32.98 s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot L$ , 较野生型增大 1.6 倍, 突变体 V182A 和 V182I 的  $k_{cat}/K_m$  分别是 rhArg1 的 1.2 和 1.1 倍。

不含  $Mn^{2+}$  突变体 V182D 和 V182S 的催化活性表现最佳, 其  $k_{cat}$  分别为  $127.12$  和  $123.16 s^{-1}$ , 其中突变体 V182D 在额外添加  $Mn^{2+}$  条件下, 活性并没有提高; 突

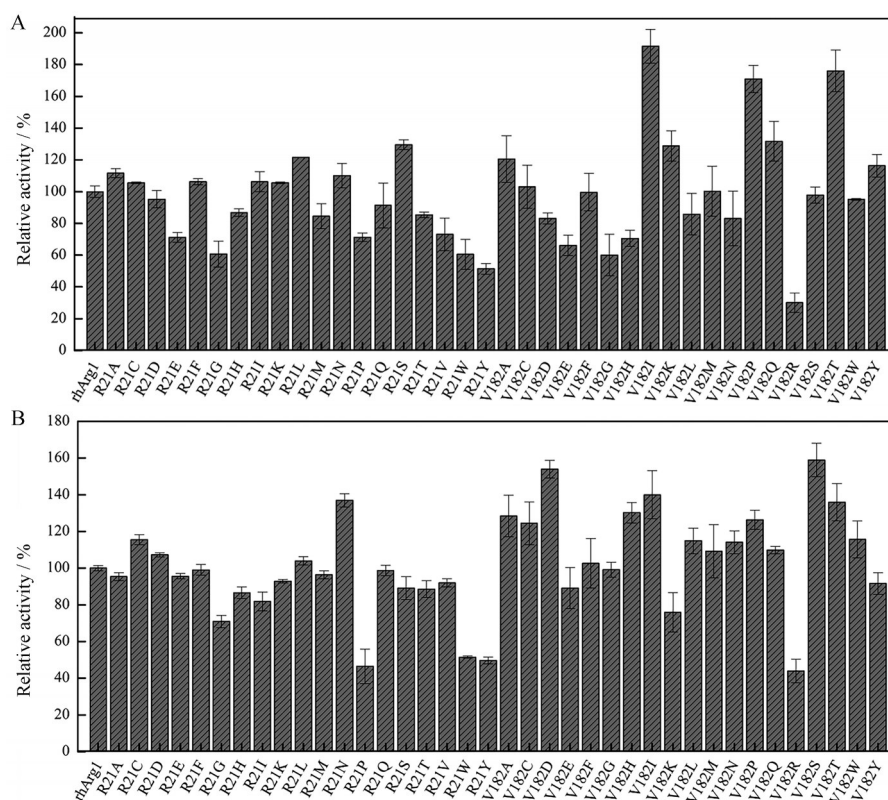


Figure 3 The activity of mutants of R21 and V182.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . Reaction conditions with  $0.2 mmol \cdot L^{-1} Mn^{2+}$  (A), and without  $Mn^{2+}$  (B)

Table 2 Kinetic parameters of rhArg1 and its mutants

Enzyme	Reaction conditions with $Mn^{2+}$			Enzyme	Without $Mn^{2+}$		
	$k_{cat}/s^{-1}$	$K_m/mmole \cdot L^{-1}$	$k_{cat}/K_m/s^{-1} \cdot mmole^{-1} \cdot L$		$k_{cat}/s^{-1}$	$K_m/mmole \cdot L^{-1}$	$k_{cat}/K_m/s^{-1} \cdot mmole^{-1} \cdot L$
rhArg1	$198.22 \pm 13.33$	$9.32 \pm 2.11$	21.27	rhArg1	$63.34 \pm 1.81$	$11.94 \pm 1.09$	5.3
R21N	$210.84 \pm 6.73$	$11.17 \pm 1.15$	18.88	R21N	$85.13 \pm 1.39$	$11.14 \pm 0.59$	7.64
V182A	$311.53 \pm 43.91$	$11.72 \pm 5.28$	26.57	V182A	$67.44 \pm 1.31$	$24.05 \pm 1.26$	2.8
V182I	$306.30 \pm 18.42$	$12.77 \pm 2.42$	23.98	V182I	$89.26 \pm 2.05$	$16.45 \pm 1.11$	5.43
V182P	$484.53 \pm 26.22$	$24.95 \pm 3.64$	19.42	V182P	$53.21 \pm 1.28$	$9.69 \pm 0.77$	5.49
V182Q	$271.34 \pm 14.75$	$14.66 \pm 2.43$	18.51	V182Q	$70.08 \pm 2.28$	$15.18 \pm 1.49$	4.62
V182T	$457.33 \pm 37.29$	$13.87 \pm 3.49$	32.98	V182T	$80.68 \pm 2.02$	$14.27 \pm 1.09$	5.66
R21I	$172.75 \pm 17.68$	$8.02 \pm 2.86$	21.55	R21C	$61.94 \pm 2.43$	$10.10 \pm 1.31$	6.14
R21L	$163.40 \pm 11.06$	$10.37 \pm 2.31$	15.75	R21D	$63.44 \pm 1.51$	$8.80 \pm 0.71$	7.21
R21S	$234.86 \pm 18.67$	$10.98 \pm 2.83$	21.38	V182C	$55.72 \pm 1.26$	$10.13 \pm 0.76$	5.5
V182K	$465.90 \pm 32.56$	$44.27 \pm 7.16$	10.53	V182D	$127.12 \pm 4.93$	$11.26 \pm 1.36$	11.29
V182Y	$279.54 \pm 62.63$	$15.04 \pm 10.14$	18.59	V182H	$109.78 \pm 3.48$	$16.64 \pm 1.54$	6.6
/	/	/	/	V182L	$61.50 \pm 2.72$	$9.08 \pm 1.37$	6.77
/	/	/	/	V182M	$82.01 \pm 2.25$	$15.46 \pm 1.27$	5.31
/	/	/	/	V182N	$53.76 \pm 2.28$	$8.33 \pm 1.23$	6.45
/	/	/	/	V182S	$123.16 \pm 2.64$	$13.63 \pm 0.90$	9.04
/	/	/	/	V182W	$60.71 \pm 2.34$	$10.75 \pm 1.35$	5.65

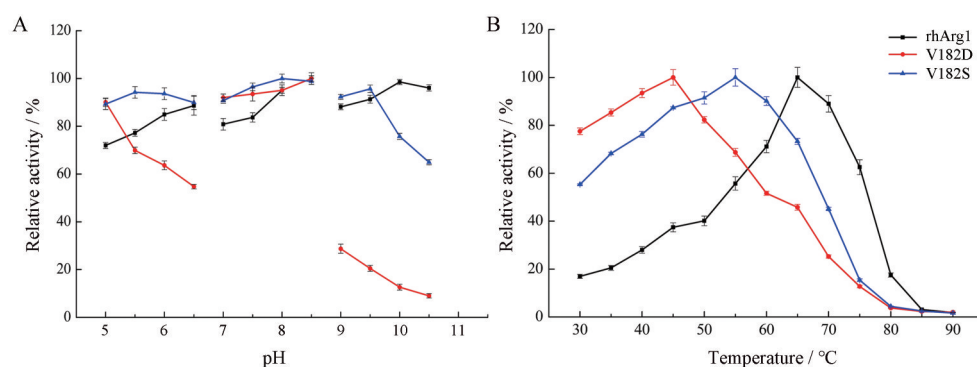


Figure 4 Effects of pH (A) and temperature (B) on rhArg1 and its mutants.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

变体 R21N、V182A、V182H、V182I、V182M、V182Q 和 V182T 的  $k_{\text{cat}}$  值分别是 rhArg1 的 1.3、1.1、1.7、1.4、1.3、1.1 和 1.3 倍。在底物亲和力方面, 突变体 R21D、V182L、V182N 和 V182P 均有不同程度的降低, 其中突变体 V182N 的  $K_{\text{m}}$  值最低, 为  $8.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 表现出结合精氨酸的能力最强, 而其他突变体的  $K_{\text{m}}$  值均有不同程度的提高, 表示突变体对底物的亲和力有所下降。最终突变体 R21D、R21N、V182D、V182L 和 V182S 的  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  分别是 rhArg1 的 1.4、1.4、2.1、1.3 和 1.7 倍。另外还测定了 V182D 和 V182S 的最佳反应 pH 和温度, 结果如图 4 所示, rhArg1 和突变体 V182D 的最适 pH 为 8.5, 而突变体 V182S 的最适 pH 为 8, 与人体血液 pH 7.4~7.6 最为接近; rhArg1 的最适反应温度为  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 突变体 V182D 的最适反应温度为  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 突变体 V182S 的最适反应温度为  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。虽最适温度有所降低, 但均高于人体温度。

## 结论

本研究成功构建重组表达质粒 pET-21a-rhArg1, 并利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 成功异源表达获得可溶性的 rhArg1 蛋白。利用易错 PCR 构建 rhArg1 随机突变文库, 结合高通量筛选的方法筛选获得了 2 个对 rhArg1 活性提高的阳性突变体, 随即对这两个位点进行了点饱和突变, 通过测定酶活性和酶动力学性质来评价突变体, 结果显示在额外添加  $\text{Mn}^{2+}$  的条件下, 突变体 V182K、V182P 和 V182T 的  $k_{\text{cat}}$  值分别为 rhArg1 的 2.4、2.4 和 2.3 倍, 而不额外添加  $\text{Mn}^{2+}$  的条件下, 突变体 V182D 和 V182S 的  $k_{\text{cat}}$  值分别为 rhArg1 的 2.0 和 1.9 倍。本研究获得了活性提高的突变体, 并着重研究了有无额外添加  $\text{Mn}^{2+}$  的酶动力学参数, 为进一步提高 rhArg1 的成药潜力提供了有力支撑。

**作者贡献:** 冯翠月撰写了论文; 冯翠月、王晨宇、唐梦佳完成了实验; 冯翠月、樊帅分析了实验数据; 杨兆勇、张志斐

负责设计本项实验; 全部作者均阅读并参与修改了本文。

**利益冲突:** 本文的作者无任何利益冲突。

## References

- [1] Dorum S, Havaei C. Case series of arginase 1 deficiency: expanding the spectrum in hyperargininemia [J]. *Pediatr Int*, 2022, 64: e14945.
- [2] Sin YY, Baron G, Schulze A, et al. Arginase-1 deficiency [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93: 1287-1296.
- [3] Häberle J, Burlina A, Chakrapani A, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: first revision [J]. *J Inher Metab Dis*, 2019, 42: 1192-1230.
- [4] Uchino T, Snyderman SE, Lambert M, et al. Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia [J]. *Hum Genet*, 1995, 96: 255-260.
- [5] Diaz GA, Schulze A, McNutt MC, et al. Clinical effect and safety profile of pegzilarginase in patients with arginase 1 deficiency [J]. *J Inher Metab Dis*, 2021, 44: 847-856.
- [6] Enns GM, Russo RS, Bradford E, et al. Pegzilarginase in arginase 1 deficiency: results of the PEACE pivotal phase 3 clinical trial [J]. *Mol Genet Metab*, 2022, 135: 269.
- [7] Russo RS, Gasperini S, Bubb G, et al. Efficacy and safety of pegzilarginase in arginase 1 deficiency (PEACE): a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre trial [J]. *EClinicalMedicine*, 2024, 68: 102405.
- [8] Clemente GS, Waarde AV, Antunes IF, et al. Arginase as a potential biomarker of disease progression: a molecular imaging perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5291.
- [9] Fouda AY, Xu Z, Shosha E, et al. Arginase 1 promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1001.
- [10] Wang ZH, Zhang WC, Huang JY, et al. Mechanism of rhein inhibition of colorectal cancer through arginine metabolism based on protein chip [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2378-2387.
- [11] Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Gemperle C, et al. Mutations

- and common variants in the human arginase 1 (ARG1) gene: impact on patients, diagnostics, and protein structure considerations [J]. *Hum Mutat*, 2018, 39: 1029-1050.
- [12] Wei X, Chow HY, Chong HC, et al. Arginine is a novel drug target for arginine decarboxylase in human colorectal cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 13741.
- [13] Gerner EW, Bruckheimer E, Cohen A. Cancer pharmacoprevention: targeting polyamine metabolism to manage risk factors for colon cancer [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293: 18770-18778.
- [14] Cervelli M, Pietropaoli S, Signore F, et al. Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148: 233-248.
- [15] Kuo MT, Savaraj N, Feun LG. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes [J]. *Oncotarget*, 2010, 1: 246-251.
- [16] Chan SL, Cheng PNM, Liu AM, et al. A phase II clinical study on the efficacy and predictive biomarker of pegylated recombinant arginase on hepatocellular carcinoma [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39: 1375-1382.
- [17] Wang Z, Xie Q, Zhou H, et al. Amino acid degrading enzymes and autophagy in cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582587.
- [18] Tommasi S, Elliot DJ, Da Boit M, et al. Homoarginine and inhibition of human arginase activity: kinetic characterization and biological relevance [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 3697.
- [19] Christianson DW. Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal [J]. *Acc Chem Res*, 2005, 38: 191-201.
- [20] Kossel A, Dakin HD. Über die arginase [J]. *Z Physiol Chem*, 1904, 41: 321-331.
- [21] Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain [J]. *Science*, 2020, 367: eaay5947.
- [22] Srivastava S, Ratha BK. Unique hepatic cytosolic arginase evolved independently in ureogenic freshwater air-breathing teleost, *Heteropneustes fossilis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e66057.
- [23] Burrage LC, Sun Q, Elsea SH, et al. Human recombinant arginase enzyme reduces plasma arginine in mouse models of arginase deficiency [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 6417-6427.
- [24] Sparkes RS, Dizikes GJ, Klisak I, et al. The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23 [J]. *Am J Hum Genet*, 1986, 39: 186-193.
- [25] Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-sensitive control of arginase by Mn (II) ions at submicromolar concentrations [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 286: 217-221.
- [26] Nyarko-Danquah I, Pajarillo E, Digman A, et al. Manganese accumulation in the brain *via* various transporters and its neurotoxicity mechanisms [J]. *Molecules*, 2020, 25: 5880.