

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.04.012

· 综述 ·

D-丙氨酸在细菌中的功能和代谢研究进展

郭笑, 杜信眉, 程磊, 周学东, 李凌云

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院, 四川 成都(610041)

【摘要】 D-丙氨酸是L-丙氨酸的手性分子,在细菌个体中参与细胞壁肽聚糖和磷壁酸等的构成以及孢子的出芽和呼吸代谢等过程;在细菌群落中,D-丙氨酸参与生物膜的形成与调节。D-丙氨酸在细菌中的功能和代谢存在特异性,其代谢通路中的酶和基因可作为药物的靶向位点。本文对D-丙氨酸的合成,在细菌中的代谢及功能等方面的作用进行综述,探讨D-丙氨酸与变异链球菌致病性的关系,以期抗龋药物候选靶向位点提供理论基础。通过现有研究表明,D-丙氨酸代谢过程中的酶及相关基因在对变异链球菌的生长及生物膜形成具有重要作用,有望作为靶点设计抗龋药物。

【关键词】 D-丙氨酸; 细菌; 功能; 代谢; 龋病; 靶向治疗

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)04-0264-04

【引用著录格式】 郭笑,杜信眉,程磊,等. D-丙氨酸在细菌中的功能和代谢研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(4): 264-267.

Research progress on the function and metabolism of d-alanine in bacteria GUO Xiao, DU Xinmei, CHENG Lei, ZHOU Xuedong, LI Mingyun. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Stomatology Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: LI Mingyun, Email: limingyun@scu.edu.cn, Tel: 0086- 28-85501232

【Abstract】 D-alanine is a chiral molecule of L-alanine that participates in the formation and regulation of cell wall peptidoglycans, phosphoteichoic acid, spore germination and respiratory metabolism in individual bacteria. D-alanine participates in the formation and regulation of biofilm in bacterial communities. The function and metabolism of D-alanine in bacteria are specific, and the enzymes and genes in its metabolic pathway can be used as drug targeting sites. In this paper, the synthesis, metabolism and function of D-alanine in bacteria were reviewed, and the relationship between D-alanine and pathogenicity of *Streptococcus mutans* was discussed to provide a theoretical basis for candidate targeting sites of anti-carries drugs. According to existing research results, the enzymes and related genes involved in D-alanine metabolism play important roles in the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*, and D-alanine is expected to be a target for the design of anti-carries drugs.

【Key words】 D-alanine; Bacteria; Function; Metabolism; Dental caries; Targeted therapy

自然界中组成生命体的氨基酸几乎都是左旋氨基酸(L-氨基酸),近年来在动植物、微生物和人体内发现也存在右旋氨基酸(D-氨基酸)。L-氨基酸是构成核糖体合成蛋白质的基本单位,在生物

体的构成和功能中占主导地位,而D-氨基酸可在非核糖体合成的蛋白质中被发现,并且在生物代谢过程中发挥作用。D-丝氨酸作为哺乳动物中N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)的共同激动剂,参与大脑涉及记忆形成和学习等各种功能^[1],在精神分裂症患者中可观察到D-丝氨酸浓度下降^[2]。D-天冬氨酸存在于哺乳动物中枢神经系统和生殖系统中,具有促进催乳素的分泌、促黄体酮释放、抑制褪黑素的分泌和刺激睾酮的合成等作用^[3]。在细菌细胞壁肽聚糖上,存在着大量的D-丙氨酸和D-谷氨酸^[4]。D-丙

【收稿日期】 2018-05-27; **【修回日期】** 2018-12-22

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81400501、81430011);口腔疾病研究国家重点实验室专项经费(SKLOD201525)

【作者简介】 郭笑,在读硕士研究生,Email: smileguo@163.com

【通信作者】 李凌云,副教授,博士,Email: imingyun@scu.edu.cn, Tel: 0086-28-85501232

氨酸作为L-丙氨酸的手性分子,参与组成细菌的细胞壁肽聚糖以及革兰阳性菌磷壁酸的构成。同时D-丙氨酸在细菌孢子的出芽、呼吸代谢及生物膜形成等过程中都起到不同程度的作用。

1 D-丙氨酸的合成与分解

自然界中,游离的D-丙氨酸几乎不存在。生物体中存在的丙氨酸主要为L-丙氨酸,它通常是产生D-丙氨酸的底物。经丙氨酸消旋酶(alanine racemase, Alr)的催化,L-丙氨酸的手性 α -碳原子的立体化学结构改变,转化为D-丙氨酸^[5]。Alr属于5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5' phosphate, PLP)依赖型异构酶,能够催化L型和D型丙氨酸间相互转化。D-丙氨酸的分解则是通过D-丙氨酸脱氢酶和氧化酶的作用生成丙酮酸盐进入代谢循环^[6-7]。这些相关的酶及其编码基因主导着D-丙氨酸的合成和代谢。

1.1 D-丙氨酸的合成机制

丙氨酸消旋酶采用PLP依赖性机制,使丙氨酸去质子化,脱去 α -氢,产生阴离子中间体,PLP通过形成醌类化合物起到稳定负电荷的作用,中间体的 α -碳经过外消旋化,在与脱去的氢离子在另一侧重新质子化产生对映体丙氨酸^[8]。关于丙氨酸消旋酶的 α 位加氢与脱氢,现在认为有两种不同机制:一种是单碱基机制,另一种是双碱基机制。在单碱基机制中,D-丙氨酸和L-丙氨酸的 α -氢被脱去并加入单个催化残余物。相比之下,在双碱基机制中,D-丙氨酸或L-丙氨酸的 α -氢是由不同的催化残余物提取和添加。Watanabe等^[9-11]通过对嗜热脂肪芽孢杆菌丙氨酸消旋酶的研究发现,Alr主要是由与PLP结合的Lys39和另1个亚基上的Tyr265c参与D-丙氨酸和L-丙氨酸的相互转化,Lys39参与D-丙氨酸脱氢与加氢的过程,而Tyr265c作为L-丙氨酸特异性的碱基催化剂。

在细菌中,丙氨酸消旋酶可分为2种:一种是由alr编码的生物合成型消旋酶,另一种是由dadX/B编码的分解代谢型消旋酶。目前已知的几乎所有原核细菌中都具有生物合成型alr基因,一些细菌具有分解代谢dadX/B基因。alr编码的丙氨酸消旋酶在细胞中以组成型存在,参与细菌细胞壁肽聚糖的合成等过程。dadX/B编码的丙氨酸消旋酶是L-丙氨酸分解代谢所必需的,dadX/B受L-丙氨酸的诱导而表达,当L-丙氨酸充裕时,该酶将L-丙氨酸转化为D-丙氨酸。

1.2 D-丙氨酸的分解

D-丙氨酸会在D-丙氨酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸和氨,丙酮酸可作为底物参与到细菌的呼吸代谢中。He等^[7]发现在铜绿假单胞菌中,编码D-氨基酸脱氢酶DadA和氨基酸消旋酶DadX的dadAX操纵子对D-和L-丙氨酸分解代谢至关重要,其表达需要转录调节因子DadR的作用。D-丙氨酸会在D-丙氨酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸和氨,丙酮酸可作为底物参与到细菌的呼吸代谢中。Nagata等^[12]发现在幽门螺旋杆菌中,细胞表现出L-丝氨酸和L-脯氨酸作为呼吸基质的高氧利用率,而D-丙氨酸和D-脯氨酸也表现出略低的氧利用率。这些呼吸活动可被低浓度的呼吸链抑制剂鱼藤酮和抗霉素A所抑制。Tanigawa等^[13]进一步研究发现,幽门螺旋杆菌中,dadA编码的D-氨基酸脱氢酶作用下分解D-氨基酸。

2 D-丙氨酸参与细胞壁肽聚糖及磷壁酸的合成

细菌的细胞壁主要是由肽聚糖(peptidoglycan, PG)构成,肽聚糖给予细胞壁一定的机械强度,并能使细胞保持一定的形状并抵抗低渗透压的环境,帮助细菌抵御外界环境中的各种不利因素^[14]。肽聚糖是由N-乙酰葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine, GlcNAc)和N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, MurNAc)两种氨基糖经 β -1,4糖苷键连接间隔排列形成的多糖支架。在N-乙酰胞壁酸分子上有四肽侧链,不同菌种四肽侧链的组成及其连接方式各异,但其肽聚糖支架结构均相同。肽聚糖合成途径的相关蛋白在大多数细菌中高度保守。

肽聚糖在细菌中合成大致分为3个阶段,D-丙氨酸主要通过参加第一阶段的合成添加至肽聚糖上。第一阶段是在细胞质中合成N-乙酰胞壁酸五肽。底物二磷酸尿苷-N-乙酰葡萄糖胺(uridine diphosphate N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc)在MurA酶的催化下与磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)反应生成UDP-GluNAc-PEP,在还原酶MurB的催化下被还原成二磷酸尿苷-N-乙酰胞壁酸(uridine diphosphate N-acetylmuramic acid, UDP-MurNAc),两步氧化还原反应后一系列氨基酸连接酶(MurC, MurD, MurE, MurF)通过ATP提供能量依次将L-丙氨酸、D-谷氨酸-内消旋二氨基庚二酸(革兰氏阴性菌)或L-赖氨酸(革兰氏阳性菌)、D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽连接到UDP-MurNAc

上形成肽聚糖的前体胞壁酸。D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽(D-Alanyl-D-alanine, D-Ala-D-Ala)是以D-丙氨酸为底物,在D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(D-Ala-D-Ala Ligase, Ddl)的作用下形成的,最后在D-丙氨酸添加酶MurF的催化下连接到胞壁酸上^[15]。

磷壁酸(teichoic-acid, TAs)是革兰阳性菌细胞壁的组成成分,在保护细胞、调节细菌细胞壁中阳离子的浓度、参与细胞分裂及作为革兰氏阳性菌的表面抗原等多方面起到重要作用^[16-17]。TAs是由重复的糖醇磷酸酯和糖类相连形成的阴离子聚合物,其链上羟基大多由D-丙氨酸或N-乙酰葡萄糖胺修饰。D-丙氨酸酰化的过程由操纵子的四到五种基因dlt(X)ABCD调控,这些基因在几乎所有的革兰氏阳性细菌中高度保守^[12]。变异链球菌编码D-丙氨酰载体蛋白的dltC基因的失活导致突变型对酸敏感性增加。与野生型相比,突变型不能在pH值低于6.5时生长^[18]。Kamar等^[19]通过构建苏云金芽孢杆菌的dltX的缺失株,dltX基因的缺失影响了苏云金芽孢杆菌对阳离子抗微生物肽的抗性。在高效液相色谱分析中发现dltX突变体缺乏D-丙氨酸,且细胞表面携带更多负电荷,因此对阳离子抗微生物肽的敏感性增加。

3 D-丙氨酸参与孢子出芽

D-丙氨酸不仅参与细菌细胞壁的合成,也参与芽孢细菌孢子的出芽过程。芽孢是某些特殊种群的细菌——主要是芽孢杆菌属与梭菌属中细菌产生的特殊休眠体。这些孢子处于代谢休眠状态,对热、辐射、干燥、pH极值和有毒化学物质具有强耐受性^[20]。

早在1949年,Hills^[21]就发现D-丙氨酸是许多芽孢杆菌中孢子萌发的有效抑制剂。Atluri等^[22]发现负责识别L-丙氨酸的营养受体,可被D-丙氨酸与已和该受体产生结合的L-丙氨酸发生拮抗。Venir等^[23]发现,在蜡样芽孢杆菌中L-丙氨酸可以有效地促进孢子出芽,Alr生成的D-丙氨酸则会对出芽产生抑制作用,从而使孢子继续处于休眠状态;使用Alr抑制剂D-环丝氨酸(D-Cycloserine, DCS)处理后的细菌,则出现促进孢子出芽现象。

4 D-丙氨酸参与生物膜的形成与调节

在口腔中,牙菌斑生物膜是细菌在牙面代谢和致病的微生态环境,为细菌致病和酸在牙齿表面停留提供了条件,在龋病的发生中具有决定性

作用。Qiu^[24]发现D-丙氨酸代谢在变异链球菌生长及生物膜形成中起到重要作用,添加Alr抑制剂DCS显著抑制了变异链球菌的生物膜形成,而外源性加入D-丙氨酸后将缓解DCS的抑制作用,从而证明了D-丙氨酸参与变异链球菌生物膜形成,且在原子力显微镜下可观察到抑制D-丙氨酸代谢后变异链球菌的黏附能力下降。在枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌中,加入D-氨基酸(主要为D-酪氨酸)会引起生物膜的分解,D-氨基酸主要是通过置换生物膜形成过程中细胞壁肽聚糖侧链的D-丙氨酸起作用,加入D-丙氨酸则会抑制生物膜分解,表明D-氨基酸对牙菌斑生物膜的稳定起着关键的作用。

5 应用

D-丙氨酸所参与肽聚糖和磷壁酸合成等过程在真核生物中并不存在,因此可以作为理想的药物靶向位点。DCS是抗结核杆菌的二线药物,Halouska等^[25]发现:DCS具有抗结核分支杆菌的作用,是一种针对肽聚糖生物合成途径内的多种酶的抑制剂,其作用位点不仅仅是之前已证明的Alr,也包括Ddl,且D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶作为主要作用靶点被DCS抑制酶活性而破坏细胞壁形成,从而起到抑制分支杆菌的效果。由于DCS能够作用于人的NMDAR受体,在神经系统方面产生较大的副作用。Moscoso等^[26]通过构建金黄色葡萄球菌D-丙氨酸营养缺陷株,发现其致病毒力可大大减弱,并且诱导小鼠体内产生抗金黄色葡萄球菌抗体,有望作为疫苗使用。

6 在口腔医学应用的展望

变异链球菌是主要致龋菌,主要是由于它具有产酸耐酸性、合成细胞内外多糖和黏附作用等致龋毒力。Alr、Ddl等D-丙氨酸合成代谢相关酶仅存在于细菌中,并不存在于人体细胞中,因此可作为抗菌药物治疗疾病的新的靶向位点。Wei等^[27]通过构建变异链球菌alr突变株并与野生型菌株对比发现,alr基因缺失对变异链球菌是致死的,必须依赖外源性D-丙氨酸才能存活,并且alr突变株在双菌种生物膜中种间竞争力下降。Liu等^[28]进一步探究了变异链球菌alr突变株的生理活性和致龋性,发现生物膜的形成与细胞外多糖的产生呈现出D-丙氨酸剂量依赖性,并且alr突变株的耐酸性下降。且在体内研究发现alr突变株致龋活性

下降,证明了Alr在变异链球菌的生长及致龋等多方面发挥重要作用。D-丙氨酸的代谢过程仅存在于细菌中,因此研究D-丙氨酸在细菌中的代谢相关酶类及调控基因,将为后期设计防龋靶向药物提供理论基础。但是龋病的发生发展是由多细菌参与的共同结果,仅针对变异链球菌的杀菌药物是否会造成菌斑生物膜的稳态发生变化是设计防龋靶向药物时需考虑的问题。能否将菌斑生物膜由致龋菌占主导优势的状态转向更为健康的菌斑生物膜仍是未来防龋药物研究的重要方向。

参考文献

- [1] Papouin T, Dunphy JM, Tolman M, et al. Septal cholinergic neuromodulation tunes the astrocyte-dependent gating of hippocampal NMDA receptors to wakefulness[J]. *Neuron*, 2017, 94(4): 840.
- [2] Alt J, Rojas C, Wozniak K, et al. Development of a high-throughput method for the determination of pharmacological levels of plasma D-serine[J]. *Anal Biochem*, 2011, 419(2): 106-109.
- [3] Santillo A, Falvo S, Chieffi P, et al. D-Aspartate induces proliferative pathways in spermatogonial GC-1 cells[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(2): 490-495.
- [4] Alvarez L, Espaillat A, Hermoso JA, et al. Peptidoglycan remodeling by the coordinated action of multispecific enzymes[J]. *Microb Drug Resist*, 2014, 20(3): 190-198.
- [5] Tanner ME. Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization[J]. *Acc Chem Res*, 2002, 35(4): 237-246.
- [6] Liu JL, Liu XQ, Shi YW. Expression, purification, and characterization of alanine racemase from *Pseudomonas putida* YZ-26[J]. *World J of Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(1): 267-274.
- [7] He W, Li C, Lu CD. Regulation and characterization of the dadRAX locus for D-amino acid catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *J Bacteriol Mycol*, 2011, 193(9): 2107.
- [8] Rossignoli G, Phillips RS, Astegno A, et al. Phosphorylation of pyridoxal 5'-phosphate enzymes: an intriguing and neglected topic [J]. *Amino Acids*, 2017, 50(1): 205-215.
- [9] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, et al. Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: x-ray crystallographic studies of the enzyme bound with N-(5'-phosphopyridoxyl)alanine[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 19166-19172.
- [10] Watanabe A, Kurokawa Y, Yoshimura T, et al. Role of lysine 39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(7): 4189-4194.
- [11] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, et al. Tyrosine 265 of Alanine Racemase serves as a base abstracting α -hydrogen from L-Alanine: the counterpart residue to Lysine 39 Specific to D-Alanine [J]. *J Biochem*, 1999, 126(4): 781-786.
- [12] Nagata K, Nagata Y, Sato T, et al. L-Serine, D- and L-proline and alanine as respiratory substrates of *Helicobacter pylori*: correlation between in vitro and in vivo amino acid levels[J]. *Microbiology*, 2003, 149(8): 2023-2030.
- [13] Tanigawa M, Shinohara T, Saito M, et al. D-Amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(1): 247-255.
- [14] Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(2): 149-167.
- [15] Typas A, Banzhaf M, Gross CA, et al. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(2): 123-136.
- [16] Schneewind O, Missiakas D. Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria[J]. *J Bacteriol*, 2014, 196(6): 1133-1142.
- [17] Auer GK, Weibel DB. Bacterial cell mechanics[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(29): 3710-3724.
- [18] Boyd DA, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, et al. Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(21): 6055-6065.
- [19] Kamar R, Réjasse A, Jéhanno I, et al. DltX of *Bacillus thuringiensis* is essential for D-Alanylation of teichoic acids and resistance to antimicrobial response in insects [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1437.
- [20] Zhu D, Sorg JA, Sun X. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 29.
- [21] Hills GM. Chemical factors in the germination of spore-bearing aerobes; the effect of yeast extract on the germination of *Bacillus anthracis* and its replacement by adenosine[J]. *Biochem J*, 1949, 45(3): 353-362.
- [22] Atluri S, Ragkousi K, Cortezzo DE, et al. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(1): 28-36.
- [23] Venir E, Del Torre M, Cunsolo V, et al. Involvement of alanine racemase in germination of *Bacillus cereus* spores lacking an intact exosporium[J]. *Arch Microbiol*, 2014, 196(2): 79-85.
- [24] Qiu W, Zheng X, Wei Y, et al. d-Alanine metabolism is essential for growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*[J]. *Mol Oral Microbiol*, 2016, 31(5): 435-444.
- [25] Halouska S, Fenton RJ, Zinniel DK, et al. Metabolomics analysis identifies d-Alanine-d-Alanine ligase as the primary lethal target of d-Cycloserine in mycobacteria[J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(2): 1065-1076.
- [26] Moscoso M, García P, Cabral MP, et al. A D-Alanine auxotrophic live vaccine is effective against lethal infection caused by *Staphylococcus aureus*[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 604-620.
- [27] Wei Y, Qiu W, Zhou XD, et al. Alanine racemase is essential for the growth and interspecies competitiveness of *Streptococcus mutans*[J]. *Int J Oral Sci*, 2016, 8(4): 231-238.
- [28] Liu S, Wei Y, Zhou X, et al. Function of alanine racemase in the physiological activity and cariogenicity of *Streptococcus mutans* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5984.

(编辑 罗燕鸿,童方丽)