



D-氨基酸在细菌生理中的结构性能和调节功能的研究进展

纪芳¹, 陈博磊², 梁勇^{3*}

¹江汉大学医学院, 湖北 武汉 430056

²江汉大学交叉学科研究院, 湖北 武汉 430056

³江汉大学环境与健康研究院, 湖北 武汉 430056

摘要:除最小的甘氨酸外,所有的氨基酸(amino acid, AA)都有手性,以 D-氨基酸(DAA)或 L-氨基酸(LAA)形式存在。DAA 广泛存在于各类生物中,尤其是细菌。DAA 虽没有参与蛋白质合成,但 DAA 尤其是非典型 DAA 在细菌生理中具有很多特殊功能。在结构性能方面, DAA 是细菌细胞壁肽聚糖的重要组分,并参与组成某些非核糖体合成途径产生的生物多肽,少数细菌能产生含有 D-Glu 的 γ -聚谷氨酸。对细胞个体而言, DAA 能调节细菌表面电荷和自溶素活性,抑制细菌芽胞萌发,调节稳定期细胞壁的重塑及调节病原菌的毒力等。对细菌群落而言, DAA 对生物膜的解聚和细菌生态也具有调控作用。此外,某些 DAA 还能直接作为营养支持某些细菌的生长,而有的 DAA 则具有抑菌作用。本文主要综述了 DAA 在细菌生理过程中发挥多项功能的研究进展。

关键词: D-氨基酸, 非典型 D 型氨基酸, 细菌细胞壁, 生物膜, 细菌生理活动的调节

手性是一种不对称性,具有手性的一对物体互为镜像但不能重叠,简称为对映体,如人的左手和右手。在分子水平,不能与其镜像重叠的分子称为手性分子,如氨基酸(其中最小的甘氨酸没有手性)。手性分子具有旋光性,也因而具有两种构型:一个可以把偏振光向左旋,称为 L-构型;其对映体则把偏振光向右旋,称为 D-构型。一对手性分子虽然看起来相似,但生物化学性质很不一样,因为酶通常只能识别其中一种构型。比如

生物体就只选择 L-构型的氨基酸(L-amino acid, LAA)来合成千变万化的蛋白质。

大约半世纪之前,人们普遍认为与 LAA 相比, DAA 在生物过程中作用不大。但是越来越多的证据显示 DAA 普遍存在于微生物、植物、动物和人体,并且功能多样^[1]。在 DAA 的代谢中涉及两类酶:与 DAA 的合成有关的氨基酸消旋酶(amino acid racemase)和与降解有关的 DAA 氧化酶(D-amino acid oxidase)^[2]。消旋酶主要存在于细菌,

基金项目:武汉市青年科技晨光计划(201271031394)

*通信作者。Tel: +86-27-84238886; E-mail: ly76@263.net

收稿日期: 2018-02-17; 修回日期: 2018-04-11; 网络出版日期: 2018-04-19

分析显示真核生物的消旋酶是从细菌水平转移而来^[3]。细菌的消旋酶能催化 LAA 和 DAA 之间相互转变, 在土壤和沉积物等微生物大量存在的环境, 通常能检测出大量 DAA^[4-5]。几乎所有的细菌都能生产和利用 DAA, DAA 在多种生理结构和功能调节方面发挥了特殊的作用。

本文将主要围绕 DAA 在细菌生理中的结构性和调节功能, 对近期的一些研究结果进行综述。

1 DAA 的结构性能

1.1 D-Ala 和 D-Glu 是肽聚糖的主要成分

关于 DAA, 人们最熟知的是 DAA 是细菌细胞壁的主要成分。细菌细胞壁在细胞最外层, 坚韧而有一定弹性, 对维持细菌基本形状和渗透稳定性至关重要。根据细胞壁结构的不同, 细菌可分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。细胞壁的主体结构是肽聚糖(peptidoglycan, PG)。PG 呈网状, 由 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine, GlcNAc)和 N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, MurNAc)双糖单位形成的糖链与短肽链共价交联形成。PG 短肽包含 L-和 D-两种构型的氨基酸, 其中最常见的是 D-Ala 和 D-Glu^[6]。由于蛋白酶无法识别 DAA 残基, 所以 DAA 的存在可保护细菌 PG 免受蛋白酶的破坏。

值得一提的是, 人们把除了 D-Ala 和 D-Glu 以外的 DAA 称为非典型 D 型氨基酸(non-canonical D-amino acids, NCDAA)^[7], 它们在细菌其他生理活动中发挥多种作用, 如调节细胞壁重塑, 影响生物膜形成等, 将在后文阐述。

1.2 DAA 参与组成多种小分子生物多肽

从细菌、真菌到高等动物都能通过非核糖体

合成途径产生小分子的生物多肽。这些多肽往往含有 DAA, 种类繁多、功能多样, 统称为非核糖体肽(non-ribosomal peptides, NRPs)。除了以下介绍的几种和其余已知的种类, 推测自然界中还有许多含有 DAA 的肽类物质有待发现。

细菌中常见的非核糖体肽是一些抗生素和毒素, 如 *Bacillus polymyxa*、*Paenibacillus polymyxa* 产生的多粘菌素类抗生素(polymyxin)含有 D-Phe 和 D-Leu^[8]; *Streptomyces roseosporus* 产生的达普霉素(daptomycin)含有 D-Ala、D-Ser 和 D-Asn^[9]; 腊状芽胞杆菌群 *Bacillus cereus* group 产生的呕吐毒素(cereulide)中含有 D-Leu 和 D-Ala^[10]; *Amycolatopsis orientalis* 产生的万古霉素(vancomycin)含有 D-Leu 和 D-pHPG 等等^[1]。

细菌的铁载体(Siderophore)也多属于非核糖体肽, 通常同时含有 LAA 和 DAA。铁载体是绝大多数微生物、真菌和植物从环境中获取 Fe 这种必需元素的最常见的方式。其对 Fe(III)具有高度亲和力和选择性, 且因其含有 DAA 还可免于被蛋白酶裂解^[11]。

1.3 DAA 参与 γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamate, γ -PGA)的组成

γ -PGA 是仅由 L-Glu 或仅由 D-Glu 或两者的重复单元通过 γ -氨基连接形成的大分子聚合物。不同于通过 α -氨基连接的蛋白质, γ -PGA 不能被蛋白酶降解。目前仅发现少量生物种类能生产 γ -PGA, 包括细菌(多为革兰氏阳性菌)、古细菌和真核生物^[12]。细菌产生的 γ -PGA 可以分为锚定型和释放型。锚定型 γ -PGA 锚定在细胞壁上, 是一种细菌毒力因子(如组成炭疽杆菌 *Bacillus anthracis* 荚膜的 PGA), 可保护病原免受免疫系统攻击; 也可作为细菌在平台晚期饥饿状态下的谷

氨酸来源^[13]。释放型 γ -PGA 可帮助增强细菌对不利环境的抵抗(如土壤细菌可利用释放型 PGA 螯合有毒金属离子或降低盐分浓度等)^[12]。另有一项研究发现, γ -PGA在 *Bacillus amyloliquefaciens* C06 的生物膜形成、表面粘附和群集能力方面也有帮助。由于 PGA 具有水溶性、阴离子活性、生物可降解性和可食用性,是一种很有应用前景的生物基化学品,可广泛应用于工业领域,例如食品、化妆品和医药^[14]。

2 DAA 对细菌细胞的调节

2.1 抑制芽胞萌发

某些细菌如芽胞杆菌属(*Bacillus*)或梭菌属(*Clostridium*)在面对营养缺乏或其他生存压力时能产生具有休眠性质的芽胞。芽胞能耐受热、极端 pH 值、辐射以及一些有毒化学物质等,可等待数年直到条件适宜时被诱导萌发,重新开始正常的新陈代谢^[15]。L-Ala 能有效诱导多种芽胞萌发,而 D-Ala 却相反,通常阻止芽胞萌发^[16]。在芽胞形成期或低营养条件时,芽胞杆菌会通过丙氨酸消旋酶将 L-Ala 转变为 D-Ala 从而阻止自身不适宜的萌发,称为自抑制(autoinhibition)^[17]。

2.2 磷壁酸的 D-Ala 酯化程度能调节细菌表面电荷和自溶素活性

在革兰氏阳性菌的细胞壁中除了 PG 还有大量的磷壁酸(teichoic acid, TA)分子。TA 与细菌的生长、生物膜的形成、粘附作用和毒力有关。TA 的结构因细菌种类而异,但主干部分通常是含有电负性的磷酸和醇类物质首尾相连形成多聚体,通过共价键锚定在 PG 或细胞膜脂上,分别称为壁磷壁酸(wall teichoic acid, WTA)和脂磷壁酸(lipid

teichoic acid, LTA)。在 TA 分子的主干上常以支链形式在醇羟基上共价连接带正电荷的 D-Ala。添加 D-Ala 这一酯化过程主要通过 *dlt* 基因簇编码的多个 Dlt 蛋白共同完成^[18]。细菌种类不同或者同一种细菌但生活条件不同都可以导致 D-Ala 酯化程度的不同^[19]。通过突变或控制实验条件减少或者消除 TA 的 D-Ala 能提高细胞对 Mg^{2+} 或带正电的细胞色素 C 的结合能力,说明调节 D-Ala 的数量可以改变细胞表面的电荷状态^[18,20]。

自溶素也称为肽聚糖水解酶(PG hydrolases),其活性受到精密调节,在细菌的生长、分裂过程中发挥重要作用。对 *Streptococcus gordonii*、*Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis*、*Streptococcus pneumoniae*、*S. aureus* 等多种细菌的研究显示,*dlt* 基因缺陷能增加细胞对阳离子抗菌肽(cationic antimicrobial peptides, CAMPs)和一些抗生素的敏感性,同时增强细胞的自溶作用^[21-23]。反过来,用 CAMP 处理正常的菌株能诱导 *dlt* 表达上调^[24-26];而多种从临床上分离的具达普霉素(dapamicin, DAP)抗性的 *S. aureus* 菌株的抗性机制也与 *dlt* 过表达有关,并且均伴随自溶素活性的降低^[27-28]。

研究者认为 *dlt* 过表达的结果是增加了细胞表面的净正电荷,导致细胞对带正电荷的抗菌肽及其他抗菌物质如 Ca^{2+} -DAP 的静电排斥,反过来 *dlt* 缺陷则导致细胞表面的净正电荷不足,于是对带正电荷的抗菌物质更加敏感。同时,研究者也发现 *dlt* 基因在控制自溶素活性方面也发挥重要作用。由于阳离子抗菌肽和自溶素均带正电荷,而且都结合在细胞表面,所以研究者认为细胞表面电荷的变化对它们的结合和活性产生了影响。

我们最近发表的一项研究成果与此功能有关^[29]。我们首次发现四溴双酚 A(TBBPA)具有杀菌活性

并对其杀菌性质和机制进行了深入研究,发现这种杀菌活性特异针对革兰氏阳性菌,电镜结果显示枯草芽胞杆菌 Bs168 由于细胞壁裂解而死亡。该细菌全基因组表达图谱分析显示,在 TBBPA 暴露下, *dlt* 基因簇和自溶素基因的表达都大幅升高(2-6 倍)。我们据此对 TBBPA 的抗菌机制作了初步推测。TBBPA 的暴露影响了 Dlt 蛋白的正常功能,使 D-Ala 无法正常添加到 TA 上造成细胞表面正电荷缺乏;随后细胞为了弥补 D-Ala 的不足通过反馈调节提高 *dlt* 基因的表达,但没有起效。而另一方面,由于细胞表面始终缺少 D-Ala 制衡,负电荷相对增多,大大刺激了带正电荷的自溶素的表达和结合;于是,过量的自溶素导致了细菌的裂解。当然确切的机制还需要我们进一步的研究和证实。

除了上述功能,TA 上酯化的 D-Ala 还能影响细胞的形态,影响生物膜形成,影响细胞对宿主的粘附能力和毒力以及影响低营养条件下宿主的生长等^[19,30]。

2.3 在稳定期对细胞壁形成和重塑的影响

细菌细胞在生长分裂以及应对外界环境压力时,需要精密协调细胞壁的合成和重塑。研究表明即使生长进入平台稳定期,细菌细胞壁仍处于不断合成与降解的动态平衡,分析认为细菌平均每世代重塑的细胞壁可高达 50%^[31]。但目前人们对于主导细菌细胞壁重塑的因素还知之甚少。

近来发现多种细菌生长进入平台期后能产生高达 mol/L 级的 NCDAA 并释放到胞外,例如 *Vibrio cholerae*、*B. subtilis*、*S. aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Deinococcus radiodurans* 等,但释放的 DAA 种类不尽相同^[32-33]。例如 *V. cholerae* 在平台期主要释放 D-Met 和 D-Leu,它们由位于周质

的广谱消旋酶 BsrV 产生。与 *bsrV* 缺陷突变株相比,野生型菌株细胞壁 PG 的糖链缩短了约 20%,短肽也减少了约 50%,说明 DAA 对平台期 PG 的合成有负调控的作用。野生型菌株的 PG 量虽然较突变株少,但抗环境渗透压的能力增强。研究认为 DAA 在平台期的释放能够在种群密度达到饱和时同步化细胞的生长和抑制 PG 合成,在资源稀缺时减少 PG 和细胞质成分的合成,使生长停滞在稳定期^[33]。

NCDAA 可以通过两种途径影响 PG 的组成、数量和强度: NCDAA 通过直接掺入到 PG 来改变其结构组成,而强度或弹性也会随之改变;调节 PG 合成和修饰相关酶的功能。研究认为 NCDAA 能直接与 PG 合成的关键酶 PBP 结合,调控 PG 的合成,使细胞在 PG 代谢的活性和非活性状态之间迅速转换^[33]。

2.4 调节病原菌的毒力

近期研究发现宿主体内的 D-Ser 能调节大肠杆菌(*Escherichia coli*)的毒力^[34-35]。DAA 在动物和人体内也广泛存在,如 D-Ser 在尿道、大脑等处大量存在(肠道中含量很低),担任不同的生物学功能^[36]。寄生在人体内的 *E. coli* 多种多样,遗传背景各异,不同种类特异分布于体内不同部位,如肠道、尿道等,其中的病原型则可引发疾病。研究发现 D-Ser 能调控引发尿道感染的尿路致病性大肠杆菌(uropathogenic *E. coli*, UPEC)的毒力基因表达进而影响其毒力^[34]。值得一提的是,因该菌能将 D-Ser 作为碳源加以利用(DAA 的营养作用,后文会提到),减轻了 D-Ser 对细菌的毒性效应(后文会提到),所以该菌能存活于 D-Ser 含量很高的尿道^[34]。与之相比,另一类寄生在肠道的肠出血性大肠杆菌(enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC)

由于缺乏相关基因,不能代谢 D-Ser 将其作为碳源利用,研究者认为这是 EHEC 选择避开高浓度 D-Ser 的环境而在 D-Ser 浓度相对很低的肠道定殖的原因^[36]。研究显示,肠道的 D-Ser 对其毒力也有调节作用,能抑制用于吸附宿主细胞的 3 型分泌系统(type 3 secretion system, T3SS)的表达^[36]。

3 DAA 对细菌群落的调节

3.1 NCDAAs 对生物膜(biofilm)的负调控作用

为了更好地适应环境,许多细菌有两种不同的生活方式,单个细胞的浮游生活方式和表现为生物膜的群落生活方式。生物膜的基质成分主要包括多糖、蛋白质、脂类和细胞外 DNA 等,它们以聚合体形式存在,能对包裹在其中的细菌起保护作用。细菌在这两种生活方式间的转换受到环境和生理因子的调节,比如种群密度、营养的获得等。

近期研究发现多种 NCDAAs 如 D-Leu、D-Met、D-Trp、D-Tyr 和 D-Phe 等,单独或混合存在时能阻止 *S. aureus*、*P. aeruginosa* 和 *B. subtilis* 等多种细菌生物膜的形成,并解聚已经形成的生物膜;D-Tyr 还能阻止 *E. coli* 形成生物膜。分析其中的机制主要包括以下几个方面:①DAA 能减少细菌和固体表面形成的氢键的数量,降低附着力,进而遏制细菌附着到固体表面,阻止形成生物膜^[37];②DAA 能抑制粘附蛋白定位到细菌细胞表面,从而使相邻的细胞无法通过该蛋白联结进而大片聚集形成生物膜^[38-39];③前文已经述及,在平台期 NCDAAs 能掺入进细胞壁肽聚糖分子的合成进而调节细胞壁重塑,而在生物膜形成期该过程可引发另一结果:由于肽聚糖中短肽的 D-Ala 被 NCDAAs 取代,细胞壁的结构和性质发生改变,使

得细胞外由 TasA 蛋白组成的淀粉样纤维失去锚定位点而释放,而该纤维是生物膜中将细胞联结在一起的重要组分,于是生物膜也因此解散^[39]。考虑到许多细菌都能产生并释放 NCDAAs,而成熟的生物膜最终都会解聚,则 NCDAAs 可能作为生物膜解聚的信号分子起调控作用。

3.2 NCDAAs 可能对细菌生态分布具有调节作用

在自然环境中各种微生物混杂存在,生活位置邻近的不同细菌种群之间有着严酷的生存竞争,很多细菌往往通过分泌一些有毒物质来遏制竞争者,调节周围的生态环境。在近十年人们才意识到 DAA 也是其中一类“有毒物质”^[40]。最新研究发现除了 D-Met 和 D-Leu, *V. cholerae* 还能大量合成并分泌之前没报道过的 D-Arg。进一步研究发现如下有趣的结果:①与 D-Met 和 D-Leu 不同, D-Arg 不能调节细菌自身细胞壁的合成,但能广泛抑制多种细菌的生长;②几乎整个 *Vibrio* 属的细菌都能耐受 D-Arg;③ *Vibrio* 属中仅有几个种能生产 D-Arg;④不同种的 *Vibrio* 菌通常共存于同一环境。基于以上发现, Alvarez 等据此推测 *Vibrio* 属的不同细菌能够通过 D-Arg 的生产者和非生产者之间的合作策略遏制竞争者,由 D-Arg 的生产者产生的 D-Arg 对整个 *Vibrio* 属起到了保护作用^[41],从而调节细菌生态种群的分布,影响周围生态环境^[41]。

由于发现多种细菌都能产生 NCDAAs,推测在 *Vibrio* 属之外的其他种类细菌群落也有类似现象和调节机制。

除了上述功能,人们还发现 DAA 具有其他功能。

DAA 具有营养功能。某些细菌具有特殊的代谢途径,能将某些 DAA 作为碳源和氮源加以利

用。例如前文提到 *E. coli* 能将 D-Ser 作为碳源加以利用, 此外还有 *Pseudomonas aeruginosa* 可以代谢 D-Arg, *Alphaproteobacteria*, *Gammmaproteobacteria* 和 *Bacilli* 能代谢多种 DAA 等^[42-44]。

DAA 具有抑菌功能。人们发现多种外源添加的高浓度 NCDAA 对不同的测试菌株具有抑菌作用^[45-47]。主要原因是 DAA 能通过抑制 PG 合成过程中所需的 PBP 蛋白进而抑制细胞壁的合成^[48]。另外, 细胞内蛋白质合成系统主要依靠 L-立体专一性氨基酰-tRNA 合成酶 (L-stereospecific aminoacyl-tRNA synthetases) 来区分 LAA 和 DAA, 并将 LAA 掺入到合成中的蛋白质链中。然而酪胺酰-tRNA 合成酶 (TyrRS) 无法有效区分 L-Tyr 和 D-Tyr, 使 D-Tyr 对细菌细胞有潜在的毒性^[49]。实际上前面提到的宿主体内的 D-Ser 能调节病原菌的毒力和 *Vibrio* 属产生的 D-Arg 可能对细菌生态分布具有调节作用也与此功能相关。

4 总结和展望

长期以来, 人们认为 DAA 的生物学功能很有限, 主要是参与一些非蛋白质分子的组成, 如肽聚糖、磷壁酸、非核糖体肽等, 以及诱导芽胞萌发等。后来人们逐渐认识到有些特殊 DAA 对细菌具有毒性, 而有些 DAA 则可作为某些细菌的特殊营养来源。尤其让人感兴趣的是, 近几年人们意外发现许多细菌在平台期能合成并分泌浓度高达 mol/L 级的、种类各异的 NCDAA。这一大量消耗能量的行为必然具有重要的生理学功能, 研究揭示 NCDAA 在平台期细菌细胞壁的重塑过程中起到重要的调节作用。对临床病原菌的研究发现细菌的毒力也受到宿主体内 DAA 的影响。此后又发现在生物膜的解聚甚至生态种群的分布中

NCDAA 也发挥了重要的调节功能。人们推测, 在高密度的细菌群体中 DAA 很可能具有信号分子的作用, 参与调节多项生理活动。

目前人们对 DAA 尤其是 NCDAA 功能的研究还在扩展和深入, 还有许多问题有待解答。比如还有哪些细菌生理活动是受 DAA 调控? 调控的机制如何? 不同的 DAA 是否表示不同的信号? 各自包含什么信息? 研究这些有助于人们理解细菌生物学的基本问题, 因而具有一定的理论价值。

另一方面, 目前细菌的耐药性现象非常严重, 而新型抗生素开发滞后, 造成临床上几乎无药可用的严峻形势。同时, 细菌生物膜一旦形成也很难清除。研究发现 80% 的人类细菌感染都与生物膜有关^[50], 而且生物膜普遍存在于自然环境、工业以及医院的设施环境, 对我们的健康和生产生活带来严重的影响。于是具有负性调节细菌细胞壁和生物膜功能的 DAA 引起了人们的浓厚兴趣。已有研究初见成效: DAA 在增强抗生素对抗从伤口分离的生物膜活性方面有显著的效果^[51]; 经过 DAA 灌注的医疗器械也减少了生物膜的形成^[38]; 在石油天然气、化工工业等领域, 微生物常常引起设施腐蚀, 在处理过程中将 DAA 和杀菌剂一起使用能起到很好的清洗效果^[52-54]。由此可见, 深入研究 DAA 尤其是 NCDAA 的调控机制将有助于人们解决细菌相关的临床和环境问题, 因此也具有重大的应用价值。

参考文献

- [1] Genchi G. An overview on D-amino acids. *Amino Acids*, 2017, 49(9): 1521-1533.
- [2] Takahashi S, Abe K, Kera Y. Bacterial d-amino acid oxidases: recent findings and future perspectives. *Bioengineered*, 2015, 6(4): 237-241.
- [3] Naranjo-Ortiz MA, Brock M, Brunke S, Hube B,

- Marcet-Houben M, Gabaldón T. Widespread inter- and intra-domain horizontal gene transfer of D-amino acid metabolism enzymes in eukaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 2001.
- [4] Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7(6): 1491–1530.
- [5] Mutaguchi Y, Ohmori T, Wakamatsu T, Doi K, Ohshima T. Identification, purification, and characterization of a novel amino acid racemase, isoleucine 2-epimerase, from *Lactobacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(22): 5207–5215.
- [6] Hernández SB, Cava F. Environmental roles of microbial amino acid racemases. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1673–1685.
- [7] Alvarez L, Espaillet A, Hermoso JA, de Pedro MA, Cava F. Peptidoglycan remodeling by the coordinated action of multispecific enzymes. *Microbial Drug Resistance*, 2014, 20(3): 190–198.
- [8] Kim SY, Park SY, Choi SK, Park SH. Biosynthesis of polymyxins B, E, and P using genetically engineered polymyxin synthetases in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(7): 1015–1025.
- [9] Baltz RH. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13(2): 144–151.
- [10] Tempelaars MH, Rodrigues S, Abee T. Comparative analysis of antimicrobial activities of valinomycin and cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2755–2762.
- [11] Hider RC, Kong XL. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 2010, 27(5): 637–657.
- [12] Ogunleye A, Bhat A, Irorere VU, Hill D, Williams C, Radecka I. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*, 2015, 161(Pt 1): 1–17.
- [13] Candela T, Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(5): 1091–1098.
- [14] Luo ZT, Guo Y, Liu JD, Qiu H, Zhao MM, Zou W, Li SB. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 134.
- [15] Moir A, Cooper G. Spore germination. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(6), doi: 10.1128/microbiolspec.
- [16] Shrestha R, Lockless SW, Sorg JA. A *Clostridium difficile* alanine racemase affects spore germination and accommodates serine as a substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(25): 10735–10742.
- [17] McKeivitt MT, Bryant KM, Shakir SM, Larabee JL, Blanke SR, Lovchik J, Lyons CR, Ballard JD. Effects of endogenous D-alanine synthesis and autoinhibition of *Bacillus anthracis* germination on *in vitro* and *in vivo* infections. *Infection and Immunity*, 2007, 75(12): 5726–5734.
- [18] Reichmann NT, Cassona CP, Gründling A. Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 9): 1868–1877.
- [19] Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2003, 67(4): 686–723.
- [20] Rice KC, Bayles KW. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2008, 72(1): 85–109.
- [21] Chan KG, Mayer M, Davis EM, Halperin SA, Lin TJ, Lee SF. Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *Infection and Immunity*, 2007, 75(6): 3033–3042.
- [22] Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(13): 8405–8410.
- [23] Wecke J, Madela K, Fischer W. The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 1997, 143(9): 2953–2960.
- [24] McBride SM, Sonenshein AL. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 5): 1457–1465.
- [25] Woods EC, Nawrocki KL, Suárez JM, McBride SM. The *Clostridium difficile* *dlt* pathway is controlled by the extracytoplasmic function sigma factor σ^V in response to lysozyme. *Infection and Immunity*, 2016, 84(6): 1902–1916.
- [26] McCormick NE, Halperin SA, Lee SF. Regulation of D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 8): 2248–2256.
- [27] Cafiso V, Bertuccio T, Purrello S, Campanile F, Mammina C, Sartor A, Raglio A, Stefani S. *dltA* overexpression: A strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, 43(1): 26–31.
- [28] Mishra NN, Yang SJ, Sawa A, Rubio A, Nast CC, Yeaman MR, Bayer AS. Analysis of cell membrane characteristics of *in vitro* selected daptomycin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(6): 2312–2318.
- [29] Ji F, Wang C, Wang HM, Liu GL, Chen BL, Hu LG, Jiang GB,

- Song MY, Liang Y. Tetrabromobisphenol A (TBBPA) exhibits specific antimicrobial activity against Gram-positive bacteria without detectable resistance. *Chemical Communications*, 2017, 53(25): 3512–3515.
- [30] Matos RC, Schwarzer M, Gervais H, Courtin P, Joncour P, Gillet B, Ma DL, Bulteau AL, Martino ME, Hughes S, Chapot-Chartier MP, Leulier F. D-Alanylation of teichoic acids contributes to *Lactobacillus plantarum*-mediated *Drosophila* growth during chronic undernutrition. *Nature Microbiology*, 2017, 2(12): 1635–1647.
- [31] Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1277(1): 54–75.
- [32] Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(5): 817–831.
- [33] Lam H, Oh DC, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA, Waldor MK. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science*, 2009, 325(5947): 1552–1555.
- [34] Anfora AT, Haugen BJ, Roesch P, Redford P, Welch RA. Roles of serine accumulation and catabolism in the colonization of the murine urinary tract by *Escherichia coli* CFT073. *Infection and Immunity*, 2007, 75(11): 5298–5304.
- [35] Connolly JP, Gabrielsen M, Goldstone RJ, Grinter R, Wang D, Cogdell RJ, Walker D, Smith DG, Roe AJ. A highly conserved bacterial D-serine uptake system links host metabolism and virulence. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(1): e1005359.
- [36] Connolly JP, Goldstone RJ, Burgess K, Cogdell RJ, Beatson SA, Vollmer W, Smith DGE, Roe AJ. The host metabolite D-serine contributes to bacterial niche specificity through gene selection. *ISME Journal*, 2015, 9(4): 1039–1051.
- [37] Xing SF, Sun XF, Taylor AA, Walker SL, Wang YF, Wang SG. D-amino acids inhibit initial bacterial adhesion: thermodynamic evidence. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(4): 696–704.
- [38] Hochbaum AI, Kolodkin-Gal I, Foulston L, Kolter R, Aizenberg J, Losick R. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(20): 5616–5622.
- [39] Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao SG, Clardy J, Kolter R, Losick R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 2010, 328(5978): 627–629.
- [40] Cava F. Divergent functional roles of D-amino acids secreted by *Vibrio cholerae*. *International Microbiology*, 2017, 20(3): 149–150.
- [41] Alvarez L, Aliashkevich A, De Pedro MA, Cava F. Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity. *ISME Journal*, 2018, 12(2): 438–450.
- [42] Kubota T, Kobayashi T, Nunoura T, Maruyama F, Deguchi S. Enantioselective utilization of D-amino acids by deep-sea microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 511.
- [43] Radkov AD, Moe LA. Amino acid racemization in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(22): 5016–5024.
- [44] Li CR, Lu CD. Arginine racemization by coupled catabolic and anabolic dehydrogenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(3): 906–911.
- [45] Bopp M. Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* by D-amino acids. *Zeitschrift fur Naturforschung Section B*, 1965, 20(9): 899–905.
- [46] Yabu K, Huempfer HR. Inhibition of growth of *Mycobacterium smegmatis* and of cell wall synthesis by D-serine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1974, 6(1): 1–10.
- [47] Fox SW, Fling M, Bollenback GN. Inhibition of bacterial growth by D-Leucine. *Journal of Biological Chemistry*, 1944, 155(2): 465–468.
- [48] Caparrós M, Pisabarro AG, De Pedro MA. Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(17): 5549–5559.
- [49] Nandi N. Chirality in biological nanospaces: reactions in active sites. Boca Raton: *CRC Press*, 2011.
- [50] Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*, 2017, 5(2): E15.
- [51] Sanchez CJ, Jr, Akers KS, Romano DR, Woodbury RL, Hardy SK, Murray CK, Wenke JC. D-amino acids enhance the activity of antimicrobials against biofilms of clinical wound isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(8): 4353–4361.
- [52] Li YC, Jia R, Al-Mahamedh HH, Xu DK, Gu TY. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 896.
- [53] Wang SY, Sun XF, Gao WJ, Wang YF, Jiang BB, Afzal MZ, Song C, Wang SG. Mitigation of membrane biofouling by D-amino acids: effect of bacterial cell-wall property and D-amino acid type. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 164: 20–26.
- [54] Jia R, Li Y, Al-Mahamedh HH, Gu TY. Enhanced biocide treatments with D-amino acid mixtures against a biofilm consortium from a water cooling tower. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1538.

Roles of D-amino acids on the physiological structure and regulatory function of bacteria

Fang Ji¹, Bolei Chen², Yong Liang^{3*}

¹ School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

² Institute for Interdisciplinary Research, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

³ Institute of Environment and Health, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Abstract: All amino acids (AAs) other than glycine are chiral, existing in the forms of D-amino acids (DAAs) or L-amino acids (LAAs). Compared to widely studied LAAs, our knowledge about DAAs is still very limited. Herein, we review the advances in studying the physiological roles and functions of DAAs in bacteria. Though DAAs are not involved in protein synthesis, they are found in a wide range of organisms, especially bacteria. It is known that DAAs, especially non-canonical D-amino acids (NCDAAs), have a wide variety of special functions in bacterial physiology. As building blocks, DAAs are important components of peptidoglycan in bacterial cell wall, non-ribosomal peptides and poly- γ -glutamate. At the individual cell level, DAAs regulate bacterial surface charges and autolysin activity, inhibit the germination of bacterial spores, regulate cell wall remodeling during stationary phases and virulence of pathogenic bacteria. While at the population level, DAAs play important roles in biofilm development and bacterial ecology. Additionally, certain DAAs can support the growth of certain bacteria directly as nutrients, though some others act as inhibitors of bacterial growth.

Keywords: D-amino acids, non-canonical D-amino acids, bacterial cell wall, biofilm, regulation of bacterial physiological activities

(本文责编: 张晓丽)

Supported by The Youth Chenguang Project of Science and Technology of Wuhan City of China (201271031394)

*Corresponding author. Tel: +86-27-84238886; E-mail: ly76@263.net

Received: 17 February 2018; Revised: 11 April 2018; Published online: 19 April 2018