



专论与综述

抗菌药物靶标丙氨酸消旋酶及其抑制剂研究进展

杨金茹¹ 范琴¹ 韩楠玉^{1,2,3} 黄遵锡^{1,2,3} 吴倩^{1,2,3} 许波^{*1,2,3}

1 云南师范大学生命科学学院 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500

摘要: 抗生素的滥用和人口的大量流动使得病原菌耐药性增强并与其他病原体产生共感染等问题, 严重威胁人类的生命安全, 因此, 研发新型抗菌药物成为人类亟待解决的问题。丙氨酸消旋酶是以磷酸吡哆醛为辅酶催化 L-丙氨酸与 D-丙氨酸旋光结构互换的一类异构酶, 其消旋产物 D-丙氨酸对细菌细胞壁的形成具有决定性作用, 与细菌性疾病密切相关。抑制丙氨酸消旋酶的活性会影响细菌的生存, 近年来成为设计抗菌药物的一个理想靶位, 其抑制剂的开发已成为抗菌药物研究的热点。本文从丙氨酸消旋酶的来源、结构、功能、应用及抑制剂等方面进行系统阐述, 并对丙氨酸消旋酶的研究提出新的策略, 为进一步研究丙氨酸消旋酶与致病菌的关系及抗菌药物候选靶标的研究提供理论基础。

关键词: D-丙氨酸, 丙氨酸消旋酶, 抗菌药物靶点, 抑制剂

Research progress of antibacterial drug target alanine racemase and its inhibitors

YANG Jinru¹ FAN Qin¹ HAN Nanyu^{1,2,3} HUANG Zunxi^{1,2,3}
WU Qian^{1,2,3} XU Bo^{*1,2,3}

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China

3 Key Laboratory of Yunnan Province for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: The abuse of antibiotics and the massive migration of population make pathogenic bacteria resistant to drugs and co-infect with other pathogens, which have posed a serious threat to human life safety. Therefore, the development of new antibacterial drugs has become an urgent problem to be solved. Alanine racemase is a type of isomerases that uses pyridoxal phosphate as the coenzyme to catalyze the optical structure interchange of L-alanine and D-alanine. Its racemic product D-alanine plays a decisive role in the formation of bacterial cell wall, which is closely related to bacterial diseases. Inhibition of the

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31860299)

***Corresponding author:** Tel: 86-871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

Received: 16-04-2021; **Accepted:** 11-06-2021; **Published online:** 20-07-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31860299)

*通信作者: Tel: 0871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

收稿日期: 2021-04-16; 接受日期: 2021-06-11; 网络首发日期: 2021-07-20

activity of alanine racemase will affect the survival of bacteria. In recent years, it has become an ideal target for the design of antibacterial drugs. The development of inhibitors has become a hot topic in the research and development of antibacterial drugs. This paper systematically elaborated the source, structure, function, application and inhibitor of alanine racemase, and proposed a new strategy for the research of alanine racemase, which would provide a theoretical basis for further research on the relationship between alanine racemase and pathogenic bacteria and the candidate targets of antibacterial drugs.

Keywords: D-alanine, alanine racemase, antibacterial target sites, inhibitor

细胞壁是细菌维持固有形态、抵抗外界压力、表达细菌毒力因子和阻止或延缓抗生素渗入的结构,对细菌生命活动至关重要^[1]。因此,在寻找有效的抗菌药物时,细胞壁成为理想的药物作用靶点。

D-丙氨酸(D-Alanine, D-Ala)是细菌细胞壁和芽孢菌芽孢皮层肽聚糖生物合成的重要成分,以D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽的形式参与肽聚糖单位的交联,可调控细菌细胞壁的化学性质和物理结构,广泛存在于细菌细胞壁中^[2-3],但自然界不存在游离的D-Ala。丙氨酸消旋酶(Alanine Racemase, ALR, EC 5.1.1.1)是一种以磷酸吡哆醛(Pyridoxal Phosphate, PLP)为辅因子催化L-丙氨酸(L-Ala)和D-Ala相互转化的酶类^[4-5],可将自然界存在的L-Ala转变成细菌生命活动不可或缺的D-Ala。抑制ALR的活性,细菌细胞内D-Ala含量降低,进而阻止细菌细胞壁形成,使细胞裂解死亡^[6-7],因此ALR与细菌引起的疾病密切相关。

研究发现,ALR广泛存在于原核生物和部分真核生物中,尚未在人体内发现。目前报道的微生物来源ALR多来源于致病菌,限制了其研究的广泛性。当前测序技术快速发展,宏基因组学、蛋白组学和代谢组学被广泛应用于环境微生物及其酶资源的研究,但尚未见多组学技术在ALR方面的研究。由于不同来源的原核生物ALR在一级结构、底物通道和动力学参数等方面存在差异^[4],因此,以ALR为靶标,基于其分子机制及结构特性寻找新型抗菌药物即ALR抑制剂,已成为抗生素药物研制的主要策略^[8-11]。此外,ALR的消旋化产物D-Ala是合成农用化学品和药物化合物的中间

体^[12-13],因此,ALR在食品、药品和化妆品等领域也具有潜在的应用价值。

1 丙氨酸消旋酶

1.1 丙氨酸消旋酶的来源

ALR普遍存在于原核生物中,真核生物来源较少。目前细菌来源的ALR主要来自链球菌属(*Streptococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和梭菌属(*Clostridium*)等。真菌和植物来源的ALR较少,仅在膨大弯颈霉(*Tolyposcladium inflatum*)^[14]、*Cochliobolus carbonum*^[15]、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)^[16]及植物紫花苜蓿幼苗(*Medicago sativa* L.)^[17]中发现。水生动物如日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[18]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[19]和日本蚬(*Corbicula japonica*)^[20]等虾、贝类中均发现ALR。

1.2 丙氨酸消旋酶的分类

目前发现的ALR包括2种类型,即生物合成型(*alr*编码的ALR,用于细胞壁的合成)和分解代谢型(*Dad X*编码的ALR,用于D-Ala的分解代谢)^[21-22]。然而并不是所有的生物都存在于这2种类型,只有一些革兰氏阴性细菌可以同时编码2种ALR,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1^[21-22];大多数革兰氏阳性细菌则只编码其中一种^[23],如假坚强芽孢杆菌(*Bacillus pseudofirmus*) OF4^[24],只含编码分解代谢的*Dad X*基因,而天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)^[4]只含编码生物合成的*alr*基因。

1.3 丙氨酸消旋酶及其基因研究策略

目前,微生物来源的ALR及其基因的研究策

略主要有 2 种：(1) 分离培养获得产酶菌株^[6,25]，如 Israr 等^[25]从感染了海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)的中华鲟中分离纯化出 *S. iniae* 并得到 ALR。该方法工作量大，容易接触致病菌，但自然界中 99% 的微生物不能通过纯培养获得；(2) 单菌株基因组测序(最常用策略)^[26-27]，分析菌株基因组并克隆表达 ALR，需要有纯培养的菌株，来源有限。

本实验室长期从事胃肠道微生物宏基因组学研究，利用宏基因组学技术开发动物胃肠道微生物及其酶资源，已从动物胃肠道中挖掘到 6-磷酸海藻糖水解酶^[28]、 β -半乳糖苷酶^[29]和邻苯二酚 1,2-双加氧酶^[30]等多种新型酶类，为基于宏基因组学技术的 ALR 研究提供可能。

1.4 丙氨酸消旋酶的结构

由于真核生物来源的 ALR 含量较低且性质不稳定，因此，目前对 ALR 结构的研究主要集中在

原核生物。研究表明，不同细菌来源 ALR 的氨基酸序列、高级结构、动力学参数、底物通道和酶学性质等方面存在差异(表 1)，对比研究酶构象的差异及其对酶活性的影响，为合理设计抑制剂提供了理论依据。

ALR 的一级结构由 350–390 个氨基酸残基组成，高级结构有单体、同源二聚体和三聚体 3 种类型。多数 ALR 的构型为同源二聚体，如腾冲嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*) MB4^[31]和 *S. iniae*^[32]等来源的 ALR，具有 2 个活性中心，由一个单体的 N 端结构域与另一个单体的 C 端结构域组成^[33]。N 端结构域主要由 8 个 α 螺旋(α 1–8)和 8 个 β 折叠(β 2–9)盘曲折叠成一个 α/β 桶状结构，并含有与 PLP 结合的赖氨酸残基；C 端结构域主要由 β 折叠股组成，形成一个底物与酶结合的通道^[2,31]。

表 1 不同细菌来源丙氨酸消旋酶的结构和性质

Table 1 Structures and characteristics of alanine racemases from different bacteria

Source	<i>B. pseudofirmus</i> OF4 ^[24]	<i>C. perfringens</i> ^[25]	<i>T. tengcongensis</i> MB4 ^[10,31]	<i>S. coelicolor</i> A3(2) ^[4]	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 ^[21-22]	<i>S. iniae</i> ^[32]	
Native conformation	These enzymes are homodimeric						
Two active sites	The homodimer is formed by residues from both the N- and C-terminal domains. Each monomer is composed of two domains, an eight-stranded α/β -barrel at the N-terminus and a C-terminal domain essentially composed of β -strands						
PLP binding residues	Lys41	Lys38	Lys40	Lys46	Lys34	Lys40	
Conserved residues in substrate entryway	Inner layer Tyr269, Tyr352, Tyr 288 and Ala173	Tyr267, Tyr286 and Tyr359	Two non-conserved residues (Tt Alr:S173, Q360)		Ala163, Tyr254, Tyr273 and Tyr342	Ala174, Tyr 273, Tyr282 and Tyr366	
	Middle layer Arg294, Ile350, Arg314 and Asp174	Asp171, Arg292, Arg312 and Ile357	(Tt Dad X:S171, H359)		Asp164, Arg279 and Arg299	Asp166, Arg298, Arg318 and Ile364	
	Outer layer Asn175, Leu239, Gly270 and Glu345						
Kinetic parameters	L-Ala K_m (mmol/L)	56.17	19.10	780.20	6.30	4.10	33.11
	V_{max} (mmol/(L·min))	24.18				0.21	24.26
	D-Ala K_m (mmol/L)	20.78	10.50	381.22	8.90	5.60	14.36
	V_{max} (mmol/(L·min))	8.37				0.14	9.64
Optimum temperature (°C)	40	40	65		40	35	
Opt pH	10.50	8.00	10.38		10.00	9.50	

1.5 细菌来源的丙氨酸消旋酶的作用机制

细菌来源的 ALR 是研究较多的氨基酸消旋酶之一, 对其结构与功能关系的研究由来已久, 但尚无准确的定义。基于前人研究被普遍接受的 ALR 催化机理^[11,34-36]是: (1) 与 PLP 结合的 Lys39 和 L-Ala 的氨基之间发生转氨基作用产生外部醛亚胺; (2) Tyr265 的酚羟基从 L-Ala 与 PLP 复合物中的 L-Ala 上移去 α 位上的氢, 产生共振稳定的醌类中间体; (3) Lys39 从相反侧对平面碳负离子中间体进行再转移, 产生 D-对映体; (4) Lys39 与辅因子 PLP 重新连接, 取代 D-Ala 与 PLP 的共价键, D-Ala 从活性位点解离后恢复催化循环。总体来讲, 其催化反应就是底物 L-Ala 的 α 位点的脱氢与加氢反应, 然后产生与底物构型相反的 D-Ala, 其中 PLP 通过形成醌型中间体来稳定阴离子中间体^[37]。

2 丙氨酸消旋酶的功能及应用

2.1 丙氨酸消旋酶的生理功能

2.1.1 参与细胞壁肽聚糖的合成

在低等生物中, D-Ala 作为能量存储和细菌细胞壁的组成成分, 以 D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽的形式直接参与肽聚糖单位的交联^[3-4]。在交联过程中 D-Ala 可能被其他 D-氨基酸取代而引发生物膜基质蛋白组成部分的释放^[38], 因此通过抑制 ALR 的活性影响细菌细胞壁的合成, 从而起到抑菌抗菌的作用。研究表明, 不添加 D-Ala 补充剂的情况下, ALR 缺失对病原体存活至关重要^[39]。

2.1.2 参与产芽孢菌孢子的出芽

ALR 与孢子的发育和发芽有关。在许多产芽孢菌如炭疽杆菌(*B. anthracis*)^[40]、艰难梭菌(*C. difficile*)^[41]及蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)^[42]等的外生孢子中发现了 ALR, 并发现 L-Ala 有效促进孢子出芽, 但 ALR 催化合成的 D-Ala 使孢子处于休眠状态^[41-42]。从而推断产芽孢菌的 ALR 通过调节 L-Ala 和 D-Ala 的比例控制孢子出芽, 可能对宿主抵御外界不良环境和促进自身生长发挥重要功能, 促进菌体在不利环境下生存^[43]。

2.1.3 参与水生无脊椎动物渗透压的调节

随着分析技术的发展, 在高盐、低温、溶氧量极低深海环境中生活的水生无脊椎动物体内也检测到几种微量的 D-Ala^[44], 其可能与水生无脊椎动物适应高渗透胁迫有关。Emiko 等^[45]和 Abe 等^[46]对甲壳动物和双壳贝类软体动物进行高盐度驯化试验, 发现在高盐度驯化过程中, D-Ala 和 L-Ala 的组织水平都增加, 表明由 ALR 催化 L-Ala 生成的 D-Ala 是甲壳动物细胞内渗透调节的主要渗透调节物。

2.2 丙氨酸消旋酶作为抗菌药物靶点的应用

2.2.1 丙氨酸消旋酶与结核病

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染引起的慢性传染病, 全世界约 1/3 的人受其危害。研究发现, *M. tuberculosis* 只有一种 ALR^[47], 全基因组转座子插入^[48]和基因敲除^[49]实验证实, ALR 是 *M. tuberculosis* 生长所必需但人体内不存在的, 所以目前治疗结核病的药物主要是一些 ALR 抑制剂。研究人员还发现 ALR 是 *M. smegmatis* 细胞壁合成所需 D-Ala 的单一限制酶, 因此 ALR 可作为治疗结核病及研发新型抗结核药物的靶标。

2.2.2 丙氨酸消旋酶与中耳炎

中耳炎由肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)引起, D-Ala 是 *S. pneumoniae* 肽聚糖层形成的重要前体物, 是交联多糖链四肽的重要组成部分, 由胞质中的 ALR 对 L-Ala 消旋而成^[4]。因此, 目前通过抑制 *S. pneumoniae* 肽聚糖层前体的形成来治疗中耳炎。

2.2.3 丙氨酸消旋酶与龋病

龋病由牙菌斑中的变异链球菌(*Streptococcus mutans*)引起, 其致龋毒力主要体现在产酸性^[50]、耐酸性、对牙面的粘附能力^[51]及合成细胞内多糖^[52]的能力上。研究发现, ALR 对 *S. mutans* 的致龋性至关重要, 通过检测 *S. mutans* ALR 突变株^[52-53]的细胞壁完整性、生物膜生物量和胞外多糖合成等指标, 发现 ALR 突变菌株引起的龋齿发病率和严

重程度降低。因此, ALR 是预防和治疗龋齿的潜在靶点。

2.2.4 丙氨酸消旋酶与炭疽热

炭疽热是一种人畜共患传染病,会对皮肤、肺、肠和脑膜等造成严重损伤。其致病性取决于感染早期 *B. anthracis* 的存在形式,若其以孢子形式存在,孢囊保护 *B. anthracis* 长期存活,使生物体致病;若以出芽形式存在,则早期就被机体的免疫系统消灭。对 *B. anthracis* ALR 基因进行缺失突变研究^[49],发现 ALR 抑制了出芽。因此,抑制 ALR 的活性可以提高 *B. anthracis* 出芽率,从而有助于机体在感染早期就杀死 *B. anthracis*。

3 丙氨酸消旋酶抑制剂

抗菌药物的滥用导致病原菌耐药性增强,抗生素剂量不断增加,给临床治疗带来严峻考验。因此,寻找新的抗菌药物成了亟待解决的问题。ALR 是被广泛关注的新型抗菌药物作用靶点,其抑制剂的开发已成为研究的重点。根据作用机制的不同,ALR 抑制剂可分为底物类似物、非底物类似物(别构抑制剂)和中草药抑制剂 3 种类型。

3.1 底物类似物抑制剂

底物类似物属于不可逆性抑制剂,其结构具有与底物相似的基团,能够竞争酶结合位点,从而影响酶和底物的正常结合,也是目前用于临床治疗的主要抑制剂类型,如常用的抗结核药物 D-环丝氨酸^[54]和氟氧丙氨酸^[55]。该抑制剂存在两方面不足:(1) 抑制剂与酶的辅因子 PLP 相互作用并干扰酶的活性;(2) 缺乏目标特异性,会灭活其他不相关的 PLP 依赖性酶,导致细胞毒性^[56],因此一般用作二线抗菌药物使用。常见的底物类似物抑制剂有环丙肾上腺素、O-Carbamyl-D-Serine、丙氨酸磷酸酯^[57]、层粘连环丙磷酸酯和 β 氯丙氨酸等^[58]。最近,Kondacs 等^[59]以丙氨酸类似物 1-氨基乙基四唑为基点,通过固相肽偶联技术合成了含二肽和寡肽的 C 端 1-氨基乙基四唑文库,并对合成的化合物抗菌活性进行了研究,发现了几种临床上适用的选

择性抑制剂。尽管如此,这类抑制剂在临床使用上仍然受限。因此,研发可以克服 PLP 相关的非靶效应、专一性强、低毒性的抑制剂成为研究的重点。

3.2 非底物类似物抑制剂

非底物类似物抑制剂又称别构抑制剂,其能与酶蛋白分子活性中心以外的某一部位(别构位点)特异结合,是引起酶蛋白分子构象变化导致酶活性降低的一类小分子化合物。因其可以克服 PLP 相关的非靶效应,是一类前景较好的 ALR 抑制剂。目前,非底物类似物抑制剂的研究方法有 2 种:(1) 高通量筛选。利用高通量筛选平台,Anthony 等^[58]与周爽等^[60]分别筛选了 53 000 和 70 000 种小分子化合物作为酶特异性抑制剂,共获得 23 种新的非底物 ALR 抑制剂,其中 7 种对哺乳动物细胞的毒性作用最小。Ciustea 等^[61]也用此方法获得一种新的 ALR 抑制剂噻二唑烷酮 41,并对其作用方式和哺乳动物细胞毒性等进行了探究。(2) 实验和计算机筛选相结合的方法。通过筛选 2 100 个小分子物质,获得了 10 种新型非底物 ALR 抑制剂^[56]。非底物类似物抑制剂虽然克服了 PLP 相关的非靶效应,但研究发现此类抑制剂对哺乳动物细胞存在一定毒性,有待进一步优化。传统底物类似物(靶向于活性中心结合位点)基本上都具有典型的相似性化学骨架,而基于不同构象的别构位点,ALR 别构抑制剂则呈现出化学结构的多样性,更适合新药的研发,为临床耐药细菌抗菌药物的研发提供了广阔的前景。

3.3 中草药抑制剂

中药在我国有几千年的历史,在现代预防和控制细菌性感染疾病方面发挥了积极作用。中药作为抗菌药物以其不良反应小、不产生耐药性的特性而备受关注。王敏兰等^[62]以 ALR 为靶标,从 89 种中草药中初步筛选获得 6 种对 ALR 具有明显抑制作用(抑制率大于 35%)的中草药。Kumari 等^[63]利用气相色谱质谱(Gas Chromatography Mass Spectrometry, GCMS)和分子对接分析了小豆蔻提

取物的 85 种代谢物成分, 得到 3 种(1,8-桉树脑、庚酸和芳樟醇)与粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ALR 结合能力高于其底物的植物化学成分。目前从中草药中找到了许多 ALR 抑制剂, 但由于中草药提取物中的成分较为复杂, 存在许多已知和未知成分, 究竟是哪些成分在发挥抗菌功效, 以及是否存在毒副作用, 还有待于进一步对中药提取物中的成分进行分离和活性测定来评价确定, 因此这类抑制剂的研究还处于实验室阶段。

4 结语与展望

ALR 广泛存在于原核及部分真核生物中, 是催化 L-Ala 和 D-Ala 相互转化的一类酶^[2], 其酶活力与 *M. tuberculosis*^[47]、*S. mutans* 及 *B. anthracis*^[49] 等众多致病菌的生长密切相关。抑制 D-Ala 的合成会抑制细菌细胞壁形成, 进而影响细菌存活, 因此 ALR 被认为是设计抗菌药物的一个潜在靶标。本文从 ALR 的来源、结构、功能及抑制剂类型等方面进行综述, 发现对于 ALR 的研究仍有许多问题需要解决。

4.1 酶的微生物来源有限

目前, 不同微生物尤其是真菌来源的 ALR 研究较少, 而且均来源于可培养的致病微生物, 使得性质优良的 ALR 及基因的开发受到限制。宏基因组学主要以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象, 采用高通量测序和生物信息学分析手段对特定环境样品中的微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、代谢通路、相互协作关系及与环境之间的关系进行分析研究, 避开了微生物分离培养的问题, 使得从环境中获得大量未培养微生物的基因资源成为现实, 极大地扩展了微生物酶及基因资源的利用空间, 已被广泛应用于海洋、土壤、热液口、热泉、人体口腔及胃肠道等多种环境微生物的研究中, 因此, 采取宏基因组学结合生物信息学分析的方法, 可直接从不同环境样品中挖掘和鉴定更多的新酶, 期望进一步丰富 ALR 的来源, 为其抑制剂的筛选提供新靶标。

4.2 酶的催化机理不明晰

虽然 ALR 是目前研究较多的氨基酸消旋酶之一, 但其催化机理及其在细菌细胞壁和生物膜形成等方面的具体作用机制仍不明确。主要原因可能归结于 ALR 多来源于致病菌, 能够开展相关研究的实验平台有限。此外, 目前利用 X 射线晶体衍射技术解析所得的细菌 ALR 三维结构仅有 39 个, 晶体结构的稀缺也限制了对其催化机制的深入挖掘。未来对其催化机理的研究可以从以下 3 个方面开展: (1) 采用宏基因组学等技术获得更多不同来源的 ALR, 并通过 X 射线晶体衍射、核磁共振或冷冻电镜等技术对 ALR 的空间结构进行解析; (2) 通过理性设计, 如定点(饱和)突变等技术确定影响其催化活性的关键氨基酸位点; (3) 利用计算机辅助设计方法, 如分子对接或量子力学/分子力学(Quantum Mechanics/Molecular Mechanics, QM/MM)相结合的方法来模拟并探究 ALR 的催化机理。

4.3 酶的抑制剂多有毒性

目前虽已发现 60 多种 ALR 抑制剂, 但由于其毒性使其临床应用受到限制。因此, 对 ALR 抑制剂的研究可着眼于两方面: (1) 对酶自身进行改造。可采用以 PLP 依赖性低的 ALR 为酶源寻找抑制剂; 也可阻止 ALR 二聚化的形成; 在底物通道入口处放置抑制剂, 阻止底物进入; 改变酶活性中心的关键氨基酸残基, 改变其构象等^[64-65]。(2) 对抑制剂进行筛选。通过高通量筛选平台结合分子对接技术对小分子物质进行筛选, 找到更多的抑制剂, 也可将多种中草药进行合理配比寻找有效的抑制剂, 并进行动物实验验证, 以期获得更多对人类毒性低或无毒性的抑制剂, 为疾病的治疗带来福音。

4.4 酶的催化活性较低

目前已报道的微生物 ALR 催化活性低、稳定性差, 不利于酶的应用, 而且关于 ALR 酶学特性改造方面的研究较少, 因此可通过以下策略对其进行改造: (1) 通过定向进化引入随机突变, 构建高

容量和高质量的酶突变文库,利用高通量筛选技术获得酶活性提高或底物偏好性改变(如扩展新底物)的优良酶分子。如郑豆豆等^[66]通过易错 PCR 提高鼠伤寒沙门氏菌 ALR 催化活性,最终获得了 3 个催化活性提高的突变体。(2) 通过基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学和基因工程技术解析酶的表达调控机制,筛选影响酶活的关键调控因子。(3) 将酶分子、酶活调控因子和各种表达元件(如信号肽、启动子、终止子等)进行系统组合和动态优化,获得高效的 ALR 基因工程菌株。

REFERENCES

- [1] Wang HL, Qi H, Li BS, Cai Q, Quan X, Xu TT, Cui YX, Meng WY. Research progress in inhibitory effects of non-canonical D-amino acids on bacterial biofilm[J]. Journal of Jilin University: Medicine Edition, 2019, 45(2): 445-449 (in Chinese)
王鹤龄, 齐华, 李保胜, 蔡青, 全旭, 许彤彤, 崔云霞, 孟维艳. 非标准 D-氨基酸对细菌生物膜抑制作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(2): 445-449
- [2] Qiu W, Zhou XD, Li MY. Research progress on alanine racemase[J]. International Journal of Stomatology, 2016, 43(2): 228-232 (in Chinese)
邱伟, 周学东, 李明云. 丙氨酸消旋酶的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(2): 228-232
- [3] Liu XQ, Shi YW. New targets for antibacterial agent: alanine racemase[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 26(2): 104-108 (in Chinese)
刘晓琴, 石亚伟. 抗菌药物治疗疾病的新靶位: 丙氨酸消旋酶[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(2): 104-108
- [4] Tassoni R, Van Der Aart LT, Ubbink M, Van Wezel GP, Pannu NS. Structural and functional characterization of the alanine racemase from *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 483(1): 122-128
- [5] Cava F, Lam H, Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(5): 817-831
- [6] Niu XP, Han QQ, He GZ, Ju JS, Xu SJ. Enzymatic characterization of alanine racemase from *Pseudomonas aeruginosa* and strain detection of *P. aeruginosa*[J]. Journal of Hebei Normal University: Natural Science Edition, 2019, 43(1): 67-75 (in Chinese)
牛晓平, 韩卿卿, 何广正, 鞠建松, 徐书景. 铜绿假单胞菌中丙氨酸消旋酶的酶学特性及菌株检测[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2019, 43(1): 67-75
- [7] Tripathi SM, Ramachandran R. Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of Rv2780 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2008, 64(5): 367-370
- [8] Couñago RM, Davlieva M, Strych U, Hill RE, Krause KL. Biochemical and structural characterization of alanine racemase from *Bacillus anthracis* (Ames)[J]. BMC Structural Biology, 2009, 9(1): 1-15
- [9] Im H, Sharpe ML, Strych U, Davlieva M, Krause KL. The crystal structure of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*, a target for structure-based drug design[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 116
- [10] He GZ, Han QQ, Xu SJ, Zhao BH, Ju JS. Function of amino acid sites in the substrate entryway of alanine racemase TtAlr from *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(8): 1397-1406 (in Chinese)
何广正, 韩卿卿, 徐书景, 赵宝华, 鞠建松. 嗜热厌氧菌丙氨酸消旋酶底物通道氨基酸位点的功能[J]. 微生物学报, 2018, 58(8): 1397-1406
- [11] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, Hayashi H, Kagamiyama H, Esaki N. Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: X-ray crystallographic studies of the enzyme bound with N-(5'-phosphopyridoxyl) alanine[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(21): 19166-19172
- [12] Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids[J]. Chemistry & Biodiversity, 2010, 7(6): 1491-1530
- [13] Wang Y, Li YZ. Application and preparation methods of D-alanine[J]. Liaoning Chemical Industry, 2003, 32(2): 58-60 (in Chinese)
王颖, 李云政. D-丙氨酸的用途及制备方法[J]. 辽宁化工, 2003, 32(2): 58-60
- [14] Di Salvo ML, Florio R, Paiardini A, Vivoli M, D'Aguanno S, Contestabile R. Alanine racemase from *Tolypocladium inflatum*: a key PLP-dependent enzyme in cyclosporin biosynthesis and a model of catalytic promiscuity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2013, 529(2): 55-65
- [15] Cheng YQ, Walton JD. A eukaryotic alanine racemase gene involved in cyclic peptide biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(7): 4906-4911
- [16] Uo T, Yoshimura T, Tanaka N, Takegawa K, Esaki N. Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(7): 2226-2233
- [17] Ono K, Yanagida K, Oikawa T, Ogawa T, Soda K. Alanine

- racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(9): 856-860
- [18] Yoshikawa N, Ashida W, Hamase K, Abe H. HPLC determination of the distribution of D-amino acids and effects of ecdysis on alanine racemase activity in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(29): 3283-3288
- [19] Yoshikawa N, Dhomae N, Takio K, Abe H. Purification, properties, and partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of the black tiger prawn *Penaeus monodon*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 133(3): 445-453
- [20] Nomura T, Yamamoto I, Morishita F, Furukawa Y, Matsushima O. Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*[J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 2001, 289(1): 1-9
- [21] He WQ, Li CR, Lu CD. Regulation and characterization of the dadRAX locus for D-amino acid catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(9): 2107-2115
- [22] Dong H, Han QQ, Guo Y, Ju JS, Wang SS, Yuan C, Long W, He X, Xu SJ, Li S. Enzymatic characterization and crystal structure of biosynthetic alanine racemase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(4): 2319-2325
- [23] Hernández SB, Cava F. Environmental roles of microbial amino acid racemases[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1673-1685
- [24] Dong H, Hu TT, He GZ, Lu DR, Qi JX, Dou YS, Long W, He X, Ju JS, Su D. Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Bacillus pseudofirmus* OF₄[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 497(1): 139-145
- [25] Israr M, Lü G, Xu SJ, Li YH, Ding ST, Zhao BH, Ju JS. Biochemical characterization and mutational analysis of alanine racemase from *Clostridium perfringens*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 149-155
- [26] Moore BC, Leigh JA. Markerless mutagenesis in *Methanococcus marisaludis* demonstrates roles for alanine dehydrogenase, alanine racemase, and alanine permease[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(3): 972-979
- [27] Guo X, Qiu W, Zhou XD, Cheng L, Li MY. Gene expression, purification, and activity determination of alanine racemase from *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Oral Science Research*, 2018, 34(6): 597-600 (in Chinese)
郭笑, 邱伟, 周学东, 程磊, 李明云. 变异链球菌丙氨酸消旋酶基因表达纯化及活性测定[J]. *口腔医学研究*, 2018, 34(6): 597-600
- [28] Yang YX, Yang YJ, Fan Q, Huang ZX, Li JJ, Wu Q, Tang XH, Ding JM, Han NY, Xu B. Molecular and biochemical characterization of salt-tolerant trehalose-6-phosphate hydrolases identified by screening and sequencing salt-tolerant clones from the metagenomic library of the gastrointestinal tract[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1466
- [29] Zhang WH, Yang YX, Yang ZF, Huang ZX, Li JJ, Tang XH, Yang YJ, Wu Q, Mu YL, Han NY, et al. Expression and characterization of β -galactosidase from fecal microbes of *Rhinopithecus bieti*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1561-1575 (in Chinese)
张文洪, 杨雁霞, 杨正凤, 黄遵锡, 李俊俊, 唐湘华, 杨云娟, 吴倩, 慕跃林, 韩楠玉, 等. 滇金丝猴粪便微生物来源的 β -半乳糖苷酶基因的表达及酶学性质[J]. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1561-1575
- [30] Deng M, Yang ZF, Huang ZX, Dai LM, Shen JD, Li JJ, Tang XH, Mu YL, Zhou JP, Ding JM, et al. Expression and characterization of thermostable catechol 1,2-dioxygenase from a fecal microbial metagenome of *Nycticebus pygmaeus*[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1947-1957 (in Chinese)
邓梦, 杨正凤, 黄遵锡, 戴利铭, 沈骥冬, 李俊俊, 唐湘华, 慕跃林, 周峻沛, 丁俊美, 等. 粪便微生物宏基因组来源的热稳定性邻苯二酚 1,2-双加氧酶异源表达及酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1947-1957
- [31] Sun XL, He GZ, Wang XY, Xu SJ, Ju JS, Xu XL. Crystal structure of a thermostable alanine racemase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 reveals the role of Gln360 in substrate selection[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133516
- [32] Muhammad M, Li YY, Gong SY, Shi YM, Ju JS, Zhao BH, Liu D. Purification, characterization and inhibition of alanine racemase from a pathogenic strain of *Streptococcus iniae*[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2019, 68(3): 331-341
- [33] Scaletti ER, Luckner SR, Krause KL. Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Staphylococcus aureus* (Mu50)[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2012, 68(Pt 1): 82-92
- [34] Major DT, Gao JL. A combined quantum mechanical and molecular mechanical study of the reaction mechanism and α -amino acidity in alanine racemase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(50): 16345-16357
- [35] Watababe A, Kurokawa Y, Yoshimura T, Kurihara T, Soda K, Esaki N. Role of lysine 39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate: chemical rescue studies of Lys39 \rightarrow Ala mutant[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(7): 4189-4194
- [36] Yoshimura T, Goto M. D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid

- racemases[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(14): 3527-3537
- [37] Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations[J]. Annual Review of Biochemistry, 2004, 73: 383-415
- [38] Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao SG, Clardy J, Kolter R, Losick R. D-amino acids trigger biofilm disassembly[J]. Science, 2010, 328(5978): 627-629
- [39] Ray S, Das S, Panda PK, Suar M. Identification of a new alanine racemase in *Salmonella* Enteritidis and its contribution to pathogenesis[J]. Gut Pathogens, 2018, 10: 30
- [40] 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[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(12): 5726-5734
- [41] Shrestha R, Lockless SW, Sorg JA. A *Clostridium difficile* alanine racemase affects spore germination and accommodates serine as a substrate[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(25): 10735-10742
- [42] Venir E, Torre M, Cunsolo V, Saletti R, Musetti R, Stecchini ML. Involvement of alanine racemase in germination of *Bacillus cereus* spores lacking an intact *Exosporium*[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(2): 79-85
- [43] Yan XH, Gai YL, Liang L, Liu G, Tan HR. A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis*[J]. Archives of Microbiology, 2007, 187(5): 371-378
- [44] Abe H, Yoshikawa N, Sarower MG, Okada S. Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(9): 1571-1577
- [45] Emiko O, Hiroki A. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1994, 109(1): 191-197
- [46] Abe H, Okuma E, Amano H, Noda H, Watanabe K. Role of free D- and L-alanine in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* to intracellular osmoregulation during downstream spawning migration[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1999, 123(1): 55-59
- [47] Strych U, Penland RL, Jimenez M, Krause KL, Benedik MJ. Characterization of the alanine racemases from two *Mycobacteria*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 196(2): 93-98
- [48] Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(1): 77-84
- [49] Milligan DL, Tran SL, Strych U, Cook GM, Krause KL. The alanine racemase of *Mycobacterium smegmatis* is essential for growth in the absence of D-alanine[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(22): 8381-8386
- [50] De Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci[J]. Caries Research, 2000, 34(6): 486-490
- [51] Wang SP, Ge Y, Zhou XD, Xu HH, Weir MD, Zhang KK, Wang HH, Hannig M, Rupf S, Li Q, et al. Effect of anti-biofilm glass-ionomer cement on *Streptococcus mutans* biofilms[J]. International Journal of Oral Science, 2016, 8(2): 76-83
- [52] Liu SY, Wei Y, Zhou XD, Zhang KK, Peng X, Ren B, Chen V, Cheng L, Li MY. Function of alanine racemase in the physiological activity and cariogenicity of *Streptococcus mutans*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 5984
- [53] Wei Y, Qiu W, Zhou XD, Zheng X, Zhang KK, Wang SD, Li YQ, Cheng L, Li JY, Xu X, et al. Alanine racemase is essential for the growth and interspecies competitiveness of *Streptococcus mutans*[J]. International Journal of Oral Science, 2016, 8(4): 231-238
- [54] Ma JJ, Zhang GF, Chen S, Yao LN, Liu X. Anti-tuberculosis drug screening of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* and its co-crystallized with D-cycloserine[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1613-1620 (in Chinese)
马娟娟, 张国防, 陈帅, 姚丽娜, 刘祥. 以结核分枝杆菌丙氨酸消旋酶为靶点的抗结核药物筛选及其与 D-环丝氨酸的共结晶[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1613-1620
- [55] Tripathi RP, Tripathi R, Tiwari VK, Bala L, Sinha S, Srivastava A, Srivastava R, Srivastava BS. Synthesis of glycosylated β -amino acids as new class of antitubercular agents[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2002, 37(9): 773-781
- [56] Wang YP, Yang C, Xue W, Zhang T, Liu XP, Ju JS, Zhao BH, Liu D. Selection and characterization of alanine racemase inhibitors against *Aeromonas hydrophila*[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 122
- [57] Nayyar A, Jain R. Recent advances in new structural classes of anti-tuberculosis agents[J]. Current Medicinal Chemistry, 2005, 12(16): 1873-1886
- [58] Anthony KG, Strych U, Yeung KR, Shoen CS, Perez O, Krause KL, Cynamon MH, Aristoff PA, Koski RA. New classes of alanine racemase inhibitors identified by high-throughput screening show antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20374
- [59] Kondacs LA, Orenge S, Anderson RJ, Marrs ECL, Perry JD, Gray M. C-terminal L-aminoethyltetrazole-containing oligopeptides as novel alanine racemase inhibitors[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1315
- [60] Zhou S, Meng JZ, Guan Y, Hu XX, Si SY, Xiao CL. Establishment and application of a novel high throughput screening model targeting alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. Chinese Medicinal

- Biotechnology, 2014, 9(2): 116-123 (in Chinese)
周爽, 蒙建洲, 关艳, 胡辛欣, 司书毅, 肖春玲. 以丙氨酸消旋酶为靶点的高通量抗结核药物筛选模型的建立及应用[J]. 中国医药生物技术, 2014, 9(2): 116-123
- [61] Ciustea M, Mootien S, Rosato AE, Perez O, Cirillo P, Yeung KR, Ledizet M, Cynamon MH, Aristoff PA, Koski RA, et al. Thiadiazolidinones: a new class of alanine racemase inhibitors with antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 83(3): 368-377
- [62] Wang ML, Shi YW. Primary screening of antibacterial components with alanine racemase as target in traditional Chinese medicines[J]. Modern Medicine & Health, 2013, 29(7): 966-967,970 (in Chinese)
王敏兰, 石亚伟. 以丙氨酸消旋酶为靶标的中药抗菌成分的初步筛选[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(7): 966-967,970
- [63] Kumari R, Mishra RC, Yadav S, Yadav JP. Exploring molecular docking studies of alanine racemase inhibitors from *Elettaria cardamomum*[J]. Current Enzyme Inhibition, 2019, 15(2): 91-102
- [64] Azam MA, Jayaram U. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016, 31(4): 517-526
- [65] Priyadarshi A, Lee EH, Sung MW, Nam KH, Lee WH, Kim EE, Hwang KY. Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics, 2009, 1794(7): 1030-1040
- [66] Zheng DD, Luo SY, Du MH, He GZ, Xu SJ, Ju JS. Improving catalytic activity of alanine racemase from *Salmonella typhimurium* by error-prone PCR[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(11): 2475-2486 (in Chinese)
郑豆豆, 罗素亚, 杜穆花, 何广正, 徐书景, 鞠建松. 通过易错 PCR 提高鼠伤寒沙门氏菌丙氨酸消旋酶催化活性[J]. 微生物学报, 2020, 60(11): 2475-2486