

角鲨烯藿烷环化酶及其催化产物藿烷类化合物的研究进展

韩景辉^{1,2}, 胡凌雪^{1,2}, 韩黎¹, 陈芳艳^{*1}

1 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071

2 中国医科大学 公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110122

韩景辉, 胡凌雪, 韩黎, 陈芳艳. 角鲨烯藿烷环化酶及其催化产物藿烷类化合物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 4922-4929.

HAN Jinghui, HU Lingxue, HAN Li, CHEN Fangyan. Research advances in squalene-hopene cyclase and its catalytic products hopanoids[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 4922-4929.

摘要: 角鲨烯藿烷环化酶(squalene-hopene cyclase, SHC)是三萜环化酶家族的重要成员之一, 主要催化细胞内重要线性前体分子角鲨烯(squalene)环化生成以藿烯(hopene)为主的一系列五环三萜类化合物——藿烷类化合物(hopanoids)。该类化合物主要在原核生物中存在, 在细菌中较为保守, 其结构与真核细胞细胞膜的甾醇类似, 是细菌细胞膜的重要组成成分, 参与调控膜流动性和渗透性、胁迫应激响应和耐药性等生理过程。本文从角鲨烯藿烷环化酶及催化产物藿烷类化合物的功能、结构等方面对其最新研究进展进行了综述。

关键词: 角鲨烯藿烷环化酶; 藿烷类化合物; 细菌; 功能; 系统发育

Research advances in squalene-hopene cyclase and its catalytic products hopanoids

HAN Jinghui^{1,2}, HU Lingxue^{1,2}, HAN Li¹, CHEN Fangyan^{*1}

1 Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China

2 School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China

Abstract: Squalene-hopene cyclase (SHC) is an important member of the triterpene cyclase family. It mainly catalyzes the cyclogenesis of squalene, an important linear precursor in cells, to generate pentacyclic triterpenoids (hopanoids). These compounds mainly exist in prokaryotes

资助项目: 国家自然科学基金(82372273, 82172293)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82372273, 82172293).

*Corresponding author. E-mail: chenfangyan1986@163.com

Received: 2024-06-26; Accepted: 2024-08-27; Published online: 2024-09-12

and are relatively conserved and widely studied in bacteria. They are important components of bacterial cell membranes and their structures are similar to sterols in eukaryotic cell membranes. Hopanoids participate in physiological processes such as membrane fluidity and permeability, stress responses, and drug resistance. This paper reviews the research advances in SHC and its catalytic products hopanoids in terms of their functions and structures.

Keywords: squalene-hopene cyclase; hopanoids; bacteria; function; phylogeny

角鲨烯藿烷环化酶(squalene-hopene cyclase, SHC)是一种重要的五环三萜环化酶,能够在无氧条件下催化各类细胞内重要线性前体分子角鲨烯(squalene)环化生成以藿烯(hopene)为主的藿烷类化合物(hopanoids),此类物质主要存在于原核生物中,是原核生物等各类细胞质膜的重要组成部分。最近在酵母、丝状真菌、植物等真核生物中也有相关的研究报道^[1]。SHC 及其催化产物 hopanoids 的功能复杂多样,不同菌种中 SHC 在不同应激条件下的功能有明显差异,主要在细胞膜稳态、脂筏形成、外界应激响应、与宿主相互作用及耐药性等方面发挥重要作用。

本课题组前期通过对重要病原真菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的长末端重复序列逆转录转座子 *Afut4* 的研究发现, *Afut4* 可增强细胞磷脂代谢关键酶——磷脂酰肌醇磷酸酶 *sac1* 基因的表达,进而促进烟曲霉对唑类药物的耐药性,而 *sac1* 基因的过表达又使 *shc* 基因的表达显著下调^[2]。为了掌握 SHC 相关研究的最新进展,本文主要综述了国内外在 SHC 及催化产物 hopanoids 的结构、催化反应机制和功能等方面的研究进展。

1 角鲨烯藿烷环化酶的结构及关键催化位点

SHC 结构的解析多来自对酸热脂环酸芽胞杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*) SHC 蛋白

晶体的研究^[3]。该蛋白是一种同型二聚体,由 2 个亚基组成,每个亚基约 70 kDa,由 α 螺旋结构域组成,形成哑铃形结构。第一个亚基由规则的(α/α)桶状结构域组成,而第二个亚基则形成非周期性的 α -桶状结构域。2 个亚基的比较表明,第二个亚基可能是在第一个亚基的基因复制之后进化形成的。SHC 无跨膜区域,其与细胞膜结合部分是一个非极性区域,由带正电的氨基酸包围,使酶锚定在带负电的磷脂膜表面。该区域包含亲脂性通道,可将疏水性的底物角鲨烯引导到 SHC 内部的活性位点腔。SHC 的关键催化位点位于由 α -螺旋组成的桶状的活性位点空腔内。空腔入口位于膜磷脂双分子层内的疏水区,锚定于细胞质膜内侧及革兰氏阴性菌的外膜上。角鲨烯在 SHC 活性位点的取向并不重要,因为底物是对称的^[4-6]。入口通道与催化位点之间有一个由 4 种氨基酸(D376、F166、C435 和 F434)组成的狭窄收缩环,该环的柔韧性可以调控底物和产物的通过性^[3]。

此外,酸热脂环酸芽胞杆菌 SHC 催化位点所在的活性空腔由一个庞大的疏水核心、顶部(D376 附近)和底部(E45 附近)部分的极性区域组成,可以吸收并定位角鲨烯分子^[3],其空间形式对其催化底物的正确折叠至关重要。SHC 上这些氨基酸突变可导致多种替代产物的生成,这些产物是由多环化级联的早期截断和/或异常环化引起的,具有与正常的藿烷类产物相反的立体构型。迄今为止,已知的 SHC 的关键位点是 DXDD 基序,其中 D376 和 D377 对 SHC

活性至关重要,而 D374 的突变只会降低多环化活性^[7]。E45 与其周围的 Q262、E45、E93 和 R127 组成了一个极性氢键网络,其与活性位点空腔底部的一个水分子共同参与了去质子化反应,参与调整反应产物 hopanoids 的性质。另外,在角鲨烯多环化反应过程中,面向腔体的芳香残基可稳定阳离子中间体。对底物的正确折叠至关重要^[8]。

2 SHC 催化生成 hopanoids 的反应过程

线性分子角鲨烯被 SHC 催化生成 hopene 的过程较为复杂,整个催化反应共形成了 5 个环状结构,并伴随 13 个共价键的改变和 9 个立体中心的产生,因此被认为是自然界中最复杂的酶促反应之一^[3]。该反应首先从角鲨烯碳正离子的形成开始,即其末端双键发生质子化反应,而 SHC 中的保守 DXDD 基序和角鲨烯的 C-2 (C-1 和 C-25)或 C-23 (C-24 和 C-30)上 2 个末端甲基的存在对于质子化是至关重要的。研究发现,当角鲨烯的 C-1 和 C-25 端去甲基化或 C-24 和 C-30 端去甲基化,其质子化反应总是从另一端开始,而缺少 2 个末端甲基的角鲨烯则永远不会被 SHC 环化^[9]。一旦碳正离子形成,就会进入多环化反应过程,生成多环体。首先,由 DXDD 基序提供的末端双键被质子攻击形成 A 环,然后第 2 个环闭合得到 B 环,接着第 3 个环闭合得到 5 碳原子 C 环,进而转化为 6 碳原子环,闭合得到 6-6-6-6-5 环体系,最终去质子化引入 hopene 双键^[3]。最终的去质子化反应只发生在角鲨烯的 α -甲基 C-24 上^[9]。如果底物一端缺少末端甲基,则会形成大量的 6-6-6-6-6 融合的五环,但不会产生藿烷。这表明异丙基部分是初始化多环化反应和结束反应所必需的^[6]。

3 角鲨烯藿烷环化酶 SHC 的功能

SHC 及其催化产物 hopanoids 的功能复杂多样,目前研究主要集中在细菌应对外界应激和耐药调控过程中的功能。不同菌种的 SHC 在不同应激条件下的功能有明显差异。SHC 或 hopanoids 的缺失可使沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)对酸、碱、胆盐及某些抗生素的敏感性升高^[10];而疥疮链霉菌 (*Streptomyces scabies*)缺失 SHC 后,对压力胁迫应激表型影响不大^[11]。越来越多的证据表明,SHC 还参与细菌耐药性调控。里白醇处理临床重要病原细菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),可以增加其细胞膜脂质压积,并使 SHC 表达发生下调,进而导致膜渗透性下降使其耐药性增强^[12]。沼泽红假单胞菌的 *shc* 基因缺失导致 74 个参与膜转运的基因表达改变,损害药物的膜转运,致使抗生素耐药性下降^[13]。另外,SHC 参与调控细菌与宿主的相互作用。缓生根瘤菌 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) *shc* 基因敲除株无法对豆科植物根细胞形成持续慢性感染,虽可以成瘤但会过早衰老降解^[14];SHC 缺失还可导致洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)的运动和集群能力严重下降,进而影响致病性^[15]。此外,真菌 *Hornonema carpetanum* 的 EfuA 蛋白与细菌 SHC 高度同源,可催化角鲨烯生成英夫马芬净(enfumafungin,一种三萜糖苷,类 hopanoids),有效抑制真菌细胞壁重要多糖分子 β -1,3-葡聚糖的合成^[16]。但显然在许多细菌、真菌中还具有其他一些特定的功能,其中大部分可能尚未被确定。缺失突变体的构建和表型分析对于表征所研究物种的 SHC 未知特定功能是非常有必要的研究方法。

另外,SHC 功能与活性受多种机制的精细调控,其分子结构、关键位点对 SHC 活性的影

响研究较多。酸热脂环酸芽胞杆菌的 SHC 蛋白晶体结构显示,其催化关键位点 DXDD 区域的突变可显著影响 SHC 功能,比如 D376E 突变可导致酶完全失活, D377C 突变导致底物角鲨烯分子只能生成单环,位于催化空腔入口的 H451F 突变也会使酶失活^[17]。另外,在不同生长状态下,细菌 SHC 表达及 hopanoid 生成也不同,如天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的营养细胞中 SHC 活性很低, hopanoids 检出很少,但在孢子生成时显著上调^[18]。然而,外界应激如何调控 SHC 活性控制 hopanoids 合成,有哪些胞内信号通路参与其中,仍有待阐明。

4 藿烷类化合物的功能

藿烷类化合物 hopene 和相关的 hopanoids 是五环三萜类化合物,广泛存在于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中,大约 50 年前被发现为细菌的成分^[19]。“hopene”这个名字来源于 Hopea 树,树胶中含有五环三萜, hopanoids 是原核生物等各类细胞质膜的重要组成部分^[20]。

Hopanoids 在细菌中可调控膜功能,这与甾醇在真核生物中的功能相似。Hopanoids 能够整合分布在生物膜中,并在高于磷脂双层膜相变温度时增加自身结构顺序。由于其自身具有刚性环状结构, hopanoids 对磷脂双分子层具有缩合作用,并可降低膜的通透性^[6,21-22]。Hopanoids 的生物合成会影响细菌膜的流动性和渗透性,参与调节微生物对酸度、温度和盐胁迫应激反应^[23]。在高温和酸性条件下,酸热脂环酸芽胞杆菌细胞膜中 hopanoids 含量升高;在外界较高乙醇浓度下,运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)细胞膜中藿烷含量升高,这可能与藿烷在不同外界条件下对细菌膜稳定性的调控功能相一致^[24-25]。然而,乙醇浓度与运动发酵单胞菌细胞膜中藿烷浓度之间的关系仍存在争议^[3]。在

沼泽红假单胞菌中,应用 *shc* 基因突变体再次证实了 hopanoids 对膜完整性具有稳定作用的假设^[10]。在沼泽红假单胞菌中,胁迫应激影响 *hpnP* 基因(编码 hopanoids 转运蛋白)的表达,但不影响 *shc* 基因表达^[26];还有, hopanoids 的不同修饰结构对不同胁迫应激的响应力度也不同,比如甲基化的 hopanoids 与细菌的 pH 应激有关,但对其他应激的响应则较小^[27]。还有研究讨论了环状三萜类物质的其他功能,例如弗兰克氏菌属(*Frankia*)的固氮放线菌形成含氮酶的囊泡,这些囊泡被含有 hopanoids 的多层脂质膜包围^[28]。据推测,脂质包膜作为氧气屏障,以保护固氮酶免于暴露在氧气中^[29]。另一个令人关注的发现是天蓝色链霉菌,它在气生菌丝形成过程中合成 hopanoids,通过降低膜的渗透性来减轻气生菌丝体的应激压力^[30]。此外,具有刚性平面环结构的 hopanoids 常位于不溶性或耐去污剂的膜微结构域,使膜具有更高剪切黏度、更慢弯曲动力学和更低的离子渗透性^[31]。比如, hopanoids 在缓生根瘤菌的外膜富集并与脂质 A 共价结合,显著增强了膜的机械完整性,使其对植物根瘤生态位的应激条件变化呈现很强适应性^[14,20,32]。再者, SHC 及 hopanoids 还参与调控细胞膜脂筏形成。在含有磷脂酰胆碱和鞘磷脂的膜囊泡模型中,加入里白烯(diploptene, hopanoids 的一种)可促进形成低流动性的膜微结构域,而且 hopanoids 与脂筏在膜上的位置基本相同^[33]。

Hopanoids 还可通过与脂质 A 的结合,调节革兰氏阴性细菌中重要模式识别分子 LPS 的相对位置,促进宿主对细菌 LPS 的识别与应答^[34]。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)中多环萜类化合物的存在与芽孢对活性氧的抗性增加相关联^[35]。另外, hopanoids 与 SHC 一样,也具有影响细菌耐药性的功能。洋葱伯克霍尔德菌的

hopanoids 合成及跨膜转运直接影响该菌对多种抗生素如 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类和多黏菌素的多重耐药性^[36]；磷霉素抑制 hopanoids 的合成，可有效降低该菌对多黏菌素的耐药性，显著提升治疗效果^[37]；外突甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)的 hopanoids 合成缺陷导致多药转运受损^[32]。

综上所述,在不同的外界条件下, hopanoids 对生物膜的屏障特性有着十分重要的影响。除膜稳定性外,它还影响着细菌的耐药性,参与调节宿主的免疫应答^[38]。

5 角鲨烯藿烷环化酶的进化发育分析

SHC 最早从酸热脂环酸芽胞杆菌中检出^[12,39],随后在其他细菌中也陆续被检出,如慢生根瘤菌科(*Bradyrhizobiaceae*)^[20]、人类致病菌-洋葱伯克霍尔德菌^[22]、与植物和人类相关的杆菌、共生放线菌(*Actinomyces*)、弗兰克亚科细菌(*Frankiaceae*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)、乙酸细菌(*Acetobacter*)和酸性盐杆菌(*Halomonas acidophila*)^[26]等。近年来在酵母、丝状真菌、植物等中也有报道^[33]。Hopanoids 之前通常被认为是原核生物特有的,但许多具有五环结构和藿烷核心甲基化位点的分子已经从多种热带树木、地衣和蕨类植物中分离获得^[30]。

SHC 属于重要的三萜环化酶(triterpene cyclase, TTC)家族,此类酶在原核生物和真核生物中催化的环化反应高度相似,这使得 TTC 可以很好地被用于研究 SHC 的系统发育亲缘关系。对酸热脂环酸芽胞杆菌的 SHC 氨基酸序列进行比对分析,得到数百条相似的 SHC 序列。其中前 100 条 SHC 序列的氨基酸相似性为 39%–64%,覆盖率 $\geq 90%$ ^[40]。大多数 *shc* 基因能够编码

70–75 kDa 的蛋白质。系统发育分析显示,这些蛋白中包括来自真菌和植物等物种的 SHC 蛋白。TTC 家族还有另一个重要酶,即 2,3-氧化角鲨烯环化酶(2,3-oxidosqualene cyclase, OSC)^[3]。该酶是真核细胞甾醇合成通路上的关键酶,可特异性催化 2,3-氧化角鲨烯生成羊毛甾醇,但其基因亲缘关系与 SHC 较远,蛋白结构也有较大差别,OSC 略大于 SHC (78–85 kDa)^[41–42]。

TTC 在进化过程中的亲缘关系相对保守,在蛋白结构上的反应最为明显,如酸热脂环酸芽胞杆菌 SHC 和人类 OSC 的晶体结构。这 2 个蛋白的结构都是由 2 个 α 螺旋结构域组成,并包含一个大的催化空腔,其通道入口定向于酶的膜插入部分,位于活性位点空腔中的 DXDD 基序参与通过质子化而引发的多环化反应,这是所有 SHC 所共有的^[43]。真核生物 OSC 中相应的 XXDCX 基序位于与 SHC 中 DXDD 基序同源的位置,也参与了多环化反应的启动。除了在蛋白质中心存在一个大的催化腔外,这 2 种酶都有 1 个 16 个氨基酸长的非串联重复序列,称为 QW 基序^[3]。Frickey 等^[44]曾提出 TTC 起源于一个共同的祖先,大多数 TTC 从这个祖先进化为 2 个主要群体:一个是细菌群体,其成员大都使用角鲨烯作为底物;另一个是真核生物群体,以环化 2,3-氧化角鲨烯为底物。对于大多数蛋白质来说,基因是从共同祖先垂直转移过来的,然而,在 TTC 的进化发育过程中,也可能发生了一些横向基因转移。例如,真核生物的 OSC 序列存在于黏杆菌的翻译基因组中^[45],而一个典型的细菌 SHC 序列存在于一种古老的盘菌亚门(*Pezizomycotina*)真菌中^[44]。另外,隐球出芽菌(*Gemmata obscuriglobus*)甚至产生甾醇和类甾醇^[46],而甾醇一般存在于真核生物膜中。因此需要进一步研究 SHC 及其他 TTC 的细胞功能,以了解其具体功能及藿烷类或甾醇对宿主的利弊。

已有研究通过宏基因组分析发现了一种普遍存在、可生成 hopanoids 的新微生物群体,其成员也有 SHC,但无可鉴定的近亲^[47]。另外,一些细菌物种仍然不可培养,这反映出目前我们对产生 hopanoids 的细菌表型知之甚少,还需更多的研究来分析 SHC 催化生成 hopanoids 的分布、频率及该酶基因组进化的保守性。

6 总结与展望

SHC 催化生成藿烷类物质是生物体内酶功能及活性严格调控的过程。这种一步反应多环化,有可能是生产新型非天然环状产物的有力工具,成为生物技术过程中一种高效的生物催化过程。迄今为止,人们仍聚焦于破译复杂的多环化反应机理,取得了一些进展,但多环化的具体机理和确切步骤仍未得到完全解析。另外,是否存在角鲨烯以外的 SHC 底物也是人们感兴趣的科学问题。

SHC 及其催化产物 hopanoids 在细菌中的活性调控与功能研究较多,在细胞膜稳态、脂筏形成、外界应激响应、与宿主相互作用及耐药性等方面发挥重要作用,但其参与调控的具体生理学功能与分子机制远未阐明。尽管 hopanoids 与真核生物甾醇的结构大致相似,但来自不同微生物及体外囊泡的数据表明它们在功能上不尽相同。SHC 在真核生物如真核微生物——真菌中的生理特征与功能,其对真菌细胞膜的影响,是否也与细菌一样能调控真菌胁迫应激耐受,这些均是值得深入探讨研究的科学问题。

REFERENCES

- [1] SCHNEIDER A, CURADO C, LYSTBAEK TB, OSUNA S, HAUER B. Harnessing the structure and dynamics of the squalene-hopene cyclase for (-)-ambroxide production[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(22): e202301607.
- [2] HU MD, LI ZW, LI DC, ZHAO JY, CHEN Y, WANG ZL, CHEN FY, HAN L. Long terminal repeat retrotransposon *Afut4* promotes azole resistance of *Aspergillus fumigatus* by enhancing the expression of *sac1* gene[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(12): e0029121.
- [3] SIEDENBURG G, JENDROSSEK D. Squalene-hopene cyclases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(12): 3905-3915.
- [4] HAMMER SC, MARJANOVIC A, DOMINICUS JM, NESTL BM, HAUER B. Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(2): 121-126.
- [5] MOOSMANN P, ECKER F, LEOPOLD-MESSER S, CAHN JKB, DIETERICH CL, GROLL M, PIEL J. A monodomain class II terpene cyclase assembles complex isoprenoid scaffolds[J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(10): 968-972.
- [6] ALVARES DS, CROSIO M, WILKE N. Hopanoid hopene locates in the interior of membranes and affects their properties[J]. *Langmuir*, 2021, 37(40): 11900-11908.
- [7] NAIR IM, KOCHUPURACKAL J. Squalene hopene cyclases and oxido squalene cyclases: potential targets for regulating cyclisation reactions[J]. *Biotechnology Letters*, 2023, 45(5/6): 573-588.
- [8] SYRÉN PO, HENCHE S, EICHLER A, NESTL BM, HAUER B. Squalene-hopene cyclases: evolution, dynamics and catalytic scope[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 41: 73-82.
- [9] HOSHINO T, NAKANO SI, KONDO T, SATO T, MIYOSHI A. Squalene-hopene cyclase: final deprotonation reaction, conformational analysis for the cyclization of (3R,S)-2,3-oxidosqualene and further evidence for the requirement of an isopropylidene moiety both for initiation of the polycyclization cascade and for the formation of the 5-membered E-ring[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, 2(10): 1456-1470.
- [10] WELANDER PV, HUNTER RC, ZHANG LC, SESSIONS AL, SUMMONS RE, NEWMAN DK. Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(19): 6145-6156.
- [11] SEIPKE RF, LORIA R. Hopanoids are not essential for growth of *Streptomyces scabies* 87-22[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(16): 5216-5223.

- [12] MANGIAROTTI A, GENOVESE DM, NAUMANN CA, MONTI MR, WILKE N. Hopanoids, like sterols, modulate dynamics, compaction, phase segregation and permeability of membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2019, 1861(12): 183060.
- [13] LODHA TD, B I, CH S, CH V R. Transcriptome analysis of hopanoid deficient mutant of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1[J]. *Microbiological Research*, 2019, 218: 108-117.
- [14] TOOKMANIAN E, JUNGHANS L, KULKARNI G, LEDERMANN R, SAENZ J, NEWMAN DK. Hopanoids confer robustness to physicochemical variability in the niche of the plant symbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(7): e0044221.
- [15] SCHMERK CL, BERNARDS MA, VALVANO MA. Hopanoid production is required for low-pH tolerance, antimicrobial resistance, and motility in *Burkholderia cenocepacia*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(23): 6712-6723.
- [16] CHOI HS, HAN JY, CHOI YE. Identification of triterpenes and functional characterization of oxidosqualene cyclases involved in triterpene biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*)[J]. *Plant Science*, 2020, 301: 110656.
- [17] IDENO N, UMEYAMA S, WATANABE T, NAKAJIMA M, SATO T, HOSHINO T. *Alicyclobacillus acidocaldarius* squalene-hopene cyclase: the critical role of steric bulk at Ala306 and the first enzymatic synthesis of epoxydammarane from 2, 3-oxidosqualene[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(17): 1873-1886.
- [18] PORALLA K, MUTH G, HÄRTNER T. Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 189(1): 93-95.
- [19] HOSHINO T, SHIMIZU K, SATO T. Deletion of the Gly600 residue of *Alicyclobacillus acidocaldarius* squalene cyclase alters the substrate specificity into that of the eukaryotic-type cyclase specific to (3S)-2,3-oxidosqualene[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(48): 6700-6703.
- [20] VITIELLO G, OLIVA R, PETRACCONI L, del VECCHIO P, HEENAN RK, MOLINARO A, SILIPO A, D'ERRICO G, PADUANO L. Covalently bonded hopanoid-lipid A from *Bradyrhizobium*: the role of unusual molecular structure and calcium ions in regulating the lipid bilayers organization[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 594: 891-901.
- [21] BENÍTEZ-MATEOS AI, SCHNEIDER A, HEGARTY E, HAUER B, PARADISI F. Spheroplasts preparation boosts the catalytic potential of a squalene-hopene cyclase[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6269.
- [22] van AALST EJ, BORCIK CG, WYLIE BJ. Spectroscopic signatures of bilayer ordering in native biological membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2022, 1864(6): 183891.
- [23] BOASE K, GONZÁLEZ C, VERGARA E, NEIRA G, HOLMES D, WATKIN E. Prediction and inferred evolution of acid tolerance genes in the biotechnologically important *Acidithalobacter* genus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 848410.
- [24] OURISSON G, ROHMER M, PORALLA K. Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1987, 41: 301-333.
- [25] SAHM H, ROHMER M, BRINGER-MEYER S, SPRENGER GA, WELLE R. Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1993, 35: 247-273.
- [26] KULKARNI G, WU CH, NEWMAN DK. The general stress response factor EcfG regulates expression of the C-2 hopanoid methylase HpnP in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(11): 2490-2498.
- [27] GARBY TJ, MATYS ED, ONGLEY SE, SALIH A, LARKUM AWD, WALTER MR, SUMMONS RE, NEILAN BA. Lack of methylated hopanoids renders the *Cyanobacterium nostoc punctiforme* sensitive to osmotic and pH stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00777-17.
- [28] BERRY AM, HARRIOTT OT, MOREAU RA, OSMAN SF, BENSON DR, JONES AD. Hopanoid lipids compose the Frankia vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(13): 6091-6094.
- [29] TOOKMANIAN EM, BELIN BJ, SÁENZ JP, NEWMAN DK. The role of hopanoids in fortifying rhizobia against a changing climate[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(6): 2906-2918.
- [30] BELIN BJ, BUSSET N, GIRAUD E, MOLINARO A, SILIPO A, NEWMAN DK. Hopanoid lipids: from membranes to plant-bacteria interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 304-315.
- [31] MANGIAROTTI A, GALASSI VV, PUENTES EN,

- OLIVEIRA RG, del PÓPOLO MG, WILKE N. Hopanoids like sterols form compact but fluid films[J]. *Langmuir*, 2019, 35(30): 9848-9857.
- [32] SÁENZ JP, GROSSER D, BRADLEY AS, LAGNY TJ, LAVRYNENKO O, BRODA M, SIMONS K. Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(38): 11971-11976.
- [33] BOUWKNEGT J, WIERSMA SJ, ORTIZ-MERINO RA, DOORNENBAL ESR, BUITENHUIS P, GIERA M, MÜLLER C, PRONK JT. A squalene-hopene cyclase in *Schizosaccharomyces japonicus* represents a eukaryotic adaptation to sterol-limited anaerobic environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(32): e2105225118.
- [34] LEMBO-FAZIO L, BILLOD JM, Di LORENZO F, PACIELLO I, PALLACH M, VAZ-FRANCISCO S, HOLGADO A, BEYAERT R, FRESNO M, SHIMOYAMA A, LANZETTA R, FUKASE K, GULLY D, GIRAUD E, MARTÍN-SANTAMARÍA S, BERNARDINI ML, SILIPO A. *Bradyrhizobium* lipid A: immunological properties and molecular basis of its binding to the myeloid differentiation protein-2/toll-like receptor 4 complex[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1888.
- [35] BOSAK T, LOSICK RM, PEARSON A. A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(18): 6725-6729.
- [36] KUMAR N, SU CC, CHOU TH, RADHAKRISHNAN A, DELMAR JA, RAJASHANKAR KR, YU EW. Crystal structures of the *Burkholderia multivorans* hopanoid transporter HpnN[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(25): 6557-6562.
- [37] MALOTT RJ, WU CH, LEE TD, HIRD TJ, DALLESKA NF, ZLOSNIK JEA, NEWMAN DK, SPEERT DP. Fosmidomycin decreases membrane hopanoids and potentiates the effects of colistin on *Burkholderia multivorans* clinical isolates[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(9): 5211-5219.
- [38] RICCI JN, MORTON R, KULKARNI G, SUMMERS ML, NEWMAN DK. Hopanoids play a role in stress tolerance and nutrient storage in the *Cyanobacterium Nostoc punctiforme*[J]. *Geobiology*, 2017, 15(1): 173-183.
- [39] NEUMANN S, SIMON H. Purification, partial characterization and substrate specificity of a squalene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*[J]. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1986, 367(8): 723-729.
- [40] RACOLTA S, JUHL PB, SIRIM D, PLEISS J. The triterpene cyclase protein family: a systematic analysis[J]. *Proteins*, 2012, 80(8): 2009-2019.
- [41] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 李春, 吕波. 环氧角鲨烯环化酶在三萜化合物生物合成中的进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 443-459.
- CHEN CY, PANG YR, CHEN QB, LI C, LYU B. Oxidosqualene cyclases in triterpenoids biosynthesis: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(2): 443-459 (in Chinese).
- [42] 秦玉芝, 赵小英, 邓克勤, 李旭, 刘选明. 甾醇生物合成中的关键酶-环氧角鲨烯环化酶的分子生物学研究[J]. *生命科学研究*, 2007, 11(1): 10-15.
- QIN YZ, ZHAO XY, DENG KQ, LI X, LIU XM. Development on the molecular biology of oxidosqualene cyclase-the key enzyme in sterols biosynthesis[J]. *Life Science Research*, 2007, 11(1): 10-15 (in Chinese).
- [43] THOMA R, SCHULZ-GASCH T, D'ARCY B, BENZ J, AEBI J, DEHMLow H, HENNIG M, STIHLE M, RUF A. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase[J]. *Nature*, 2004, 432(7013): 118-122.
- [44] FRICKEY T, KANNENBERG E. Phylogenetic analysis of the triterpene cyclase protein family in prokaryotes and eukaryotes suggests bidirectional lateral gene transfer[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(5): 1224-1241.
- [45] BODE HB, ZEGGEL B, SILAKOWSKI B, WENZEL SC, REICHENBACH H, MÜLLER R. Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(2): 471-481.
- [46] RIVAS-MARIN E, STETTNER S, GOTTSALL EY, SANTANA-MOLINA C, HELLING M, BASILE F, WARD NL, DEVOS DP. Essentiality of sterol synthesis genes in the planctomycete bacterium *Gemmata obscuriglobus*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2916.
- [47] PEARSON A, RUSCH DB. Distribution of microbial terpenoid lipid cyclases in the global ocean metagenome[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(3): 352-363.