化学的アプローチによる高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理機能解析

栗原 達夫,* 川本 純

Chemical Approach to Analyze the Physiological Function of Phospholipids with Polyunsaturated Fatty Acyl Chain

Tatsuo Kurihara* and Jun Kawamoto

Institute for Chemical Research, Kyoto University; Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan.

(Received November 9, 2013)

Polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) occur in biological membranes as acyl groups of phospholipids and exhibit remarkable physiological activities. In human, they have various beneficial effects on health such as protective effects against cardiovascular disease, inflammation, and cancer. We have been studying their physiological functions in bacteria, which have a much simpler membrane structure than eukaryotes. We found that the cell division of a marine bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, is inhibited and shows growth retardation by disruption of its EPA biosynthesis genes. We synthesized a fluorescent analog of EPA-containing phospholipids (EPA-PLs) as a chemical probe to analyze their subcellular distribution and found that it is localized at the center of the cell undergoing cell division. This localization was shown to depend on the structure of the hydrocarbon chain of the phospholipids. We also examined the effects of EPA-PLs on the folding of Omp74, a major membrane protein of this bacterium, by using liposomes and found that EPA-PLs facilitated the folding process. The results imply that EPA-PLs function as a chemical chaperone in the folding of membrane proteins. These findings would contribute to understanding of the physiological function of phospholipids with polyunsaturated fatty acyl chains in various biological membranes.

Key words—polyunsaturated fatty acid; eicosapentaenoic acid; phospholipid; membrane microdomain; cell division; protein folding

1. はじめに

エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) やドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA) などの ω -3 長鎖多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; PUFA) は細菌からヒトにいたる様々な生物の細胞膜やオルガネラ膜にリン脂質のアシル鎖として存在する。これらの脂肪酸には心疾患発症リスク低減作用、抗炎症作用、抗がん作用などがありヒトの健康保持に寄与することから大きな注目を集めてきた。¹⁻³⁾ モデル膜を用いた生物物理学的な研究などから、脂質二重層の流動性や弾性、透過性などの様々な性質が PUFA によって著しく変化することが示されてきた。⁴⁾ しかし、PUFA を

含む脂質二重層の性質に関する知見は多いものの、生細胞における PUFA の生理的役割や分子レベルでの作用機序、それらの動態や局在性については不明な点が多い。⁵⁾

ヒトなどの真核生物に比べて圧倒的に単純な膜系を持つ細菌は、PUFA の生細胞における機能発現機構の解析を進める上で魅力的な研究対象である。低温環境や高圧環境に生息する種々の海洋性グラム陰性細菌 (細胞表層に内膜と外膜の2種類の膜を持つ) が EPA や DHA を膜リン脂質の成分として生産することが知られている。^{6,7)} 本稿では、これらの細菌における PUFA の生理機能や細胞内での動態について、主として筆者のグループで得られた研究成果を紹介する。PUFA 含有リン脂質が膜タンパク質のフォールディングを介助するケミカルシャペロンとして機能し得ることや、細胞分裂部位に集積してマイクロドメインを形成し、細胞分裂に関与することなどを述べる。

The authors declare no conflict of interest.

京都大学化学研究所 (〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄)

*e-mail: kurihara@sci.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム S29-101 で発表した内容を中心に記述したものである。

2. EPA 含有リン脂質の細菌における生合成と機能

PUFA 生産性の細菌には一般に PUFA を *de novo* 合成するための遺伝子クラスターが存在する。この遺伝子クラスターは 5 つの遺伝子から構成され、ポリケチド生合成酵素と類似した酵素群がコードされている。⁸⁾ 真菌や線虫などでは、一般的な脂肪酸合成酵素で生合成されたパルミチン酸やステアリン酸が、鎖長伸長酵素や不飽和化酵素(デサチュラーゼ)によって PUFA に変換されるが、^{9,10)} 細菌では PUFA 生合成は一般的な脂肪酸合成酵素には依存せず、上述のポリケチド生合成酵素と類似した酵素群によりアセチル-CoA とマロニル-CoA から *de novo* 合成される。⁸⁾ 生合成された PUFA は、1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼによってリン脂質の *sn*-2 位に導入され、細胞膜に取り込まれる。¹¹⁾

われわれは、0°C 付近の低温環境下で EPA を全脂肪酸の 5% 程度生産する海洋性低温細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を主な対象として EPA の機能解析を進めている。本菌では EPA はホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルグリセロールの *sn*-2 位のアシル鎖として細胞膜に存在する (Fig. 1)。EPA 生合成遺伝子を破壊することで得られた EPA 欠損株は野生株に比べて 0°C 付近の低温での生育速度が著しく低下した。^{12,13)} 本菌は桿菌(細長い棒状の菌)であるが、EPA 欠損株の細胞は野生株に比べて長軸方向に著しく伸長していた。また、DNA 染色試薬で調べた結果、野生株では 1 つの細胞内に 1 つの核様体が存在するのに対して、EPA 欠損株では 1 つの細胞内に複数の核様体が存在することが見出された。¹²⁾ これらの結果から、EPA 欠損株では、細胞の成長、及び DNA の複製と分配は正常に進行するが、それに引き続いて起こるべき細胞の分離(細胞膜の分離)が正常に進行しないため、細胞が伸長するものと考えられた。同様の細胞分裂異常は、好圧細菌 *Shewanella violacea* DSS12 の EPA 欠損株についても観察された。¹⁴⁾ 一方、*S. livingstonensis* Ac10 の野生株と EPA 欠損株の膜タンパク質の組成を比較した結果、EPA 欠損株では、一部の膜タンパク質の含量が低下していることも明らかとなった。¹²⁾ 以上のことから、EPA 生産性細菌において EPA 含有リン脂質は細胞分裂

Fig. 1. EPA-containing Phospholipids Occurring in *S. livingstonensis* Ac10

Structures of EPA-containing phosphatidylethanolamine (EPA-PE) and EPA-containing phosphatidylglycerol (EPA-PG) are shown. R: hydrocarbon chain.

と膜タンパク質の生合成に関与するものと考えられた。

3. 膜タンパク質フォールディングにおける EPA 含有リン脂質の機能

EPA 含有リン脂質の膜タンパク質生合成への関与をより詳細に調べるため、*S. livingstonensis* Ac10 の主要な外膜タンパク質である Omp74 の *in vitro* リフォールディングに対する EPA 含有リン脂質の効果を調べた。¹⁵⁾ 組換え大腸菌から精製した Omp74 を 8 M 尿素で変性させたのち、リボソームを含む溶液で希釈することで、リボソームの膜内で Omp74 をリフォールディングさせた。リボソームは、本菌の主要なリン脂質である 1,2-ジパルミトレオイル-*sn*-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン (DPPE) と 1,2-ジパルミトレオイル-*sn*-グリセロール-3-ホスホグリセロール (DPPG) を主成分として調製した。DPPE と DPPG を 1:1 で混合することで調製した EPA 非含有リボソーム、及びこれに 1-パルミトレオイル-2-エイコサペンタエノイル-*sn*-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン (PEPE) と 1-パルミトレオイル-2-エイコサペンタエノイル-*sn*-グリセロール-3-ホスホグリセロール (PEPG) をそれぞれ 2.5 mol% 添加することで調製した EPA 含有リボソーム(平均直径はいずれも 50–55 nm)を用い、EPA 含有リン脂質が Omp74 のリフォールディングに及ぼす効果

栗原達夫

京都大学化学研究所教授、博士(工学)。1987 年京都大学工学部工業化学科卒業、1989 年同大学院工学研究科工業化学専攻修士課程修了、1991 年同博士課程中退、同年京都大学化学研究所助手、1996–1998 年カリフォルニア大学バークレー校研究員、2003 年京都大学化学研究所助教授、2007 年同准教授、2012 年より現職。

を検討した。変性した Omp74 とフォールドした Omp74 の非加熱 SDS-PAGE での移動度が異なることを利用して、2 種類のリボソームの存在下におけるフォールディング速度を解析し、比較した。その結果、4°C と 18°C のいずれの温度においても、EPA 含有リボソームを用いたときに、より速やかにフォールディングが進行することが示された (Fig. 2)。

一方、EPA 含有リン脂質が Omp74 の二次構造形成におよぼす影響を CD スペクトル解析によって調べた。Omp74 は大腸菌の外膜タンパク質 OmpA と 44% のアミノ酸相同性を持ち、 β -バレル構造をとることが推定された。実際に Omp74 は β -バレル構造を持つタンパク質に特徴的な CD スペクトルを示した。Omp74 のリフォールディングにおいて、 β -シート構造に特徴的な CD シグナルの経時変化を観測した結果、EPA 含有リボソームの存在下で EPA 非含有リボソームを用いたときよりも、速やかに Omp74 の β -シート構造が形成されることが観察された。

以上の結果から、EPA 含有リン脂質には Omp74 のフォールディングを加速するケミカルシャペロンとしての機能があるものと考えられた。EPA や DHA の非共役二重結合に挟まれたメチレン基炭素原子と隣接炭素原子の結合の回転エネルギー障壁は、飽和脂肪酸中の炭素-炭素結合の回転エネルギー障壁に比べて小さいことが計算機科学的手法によって示されている。¹⁶⁾ 非共役二重結合を多数持つ PUFA の炭化水素鎖は、飽和炭化水素鎖に比べて

多様なコンフォメーションをとり得ると考えられ、このような多様なコンフォメーションをとることが様々な構造の膜タンパク質 (フォールディング過程で生成する中間体を含む) 表面との相互作用を可能にし、膜中でのタンパク質の構造変化を容易にしている可能性が考えられる。

4. EPA 含有リン脂質が形成する生体膜マイクロドメイン

Singer と Nicolson が提出した生体膜の流動モザイクモデルによって、生体膜中の脂質分子やタンパク質分子は側方に自由に拡散し、生体膜の中で均一に分布すると考えられるようになった。¹⁷⁾ しかし、近年、脂質分子やタンパク質分子が生体膜の特定部分に局所的に存在して様々なマイクロドメインを形成する例が報告されるようになり、このモデルを見直す必要が生じてきた。例えば、真核生物細胞ではスフィンゴリン脂質とステロールを主な構成要素とする脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインが存在するものと考えられている。¹⁸⁾ ラフトはシグナル伝達に関与する膜タンパク質などが集積するプラットフォームとして機能するものと推定されている。原核生物においても、脂質組成は真核生物のラフトとは異なるものの、機能的にこれと類似したマイクロドメインが存在することが報告されている。¹⁹⁾ また原核生物については、カルジオリピンが大腸菌や枯草菌などの桿菌細胞の極や細胞分裂部位に濃縮されていることも示されている。^{20,21)} このような知見は、生体膜における個々の脂質分子やタンパク質分子の分布・局在性を明らかにすることが、生体膜に関与する様々な生命現象を理解する上で極めて重要であることを物語っている。そこでわれわれは、EPA 含有リン脂質の蛍光アナログをプローブとして開発し、細菌細胞膜内での局在性を解析した。²²⁾

EPA 含有リン脂質の蛍光アナログの設計・合成においては、アシル鎖の構造に依存した局在性を調べることを目的としたため、アシル鎖への影響を避けるため、極性頭部に蛍光発色団を導入することとした。天然型の EPA 含有リン脂質では EPA が *sn*-2 位にエステル結合しており、*sn*-1 位には別の脂肪酸がエステル結合しているため、これに倣って、*N*-NBD-1-oleoyl-2-eicosapentaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Diacyl-EPA) を合成した (Fig. 3)。コントロールとして *sn*-2 位に EPA の代わりに

Fig. 2. Refolding Kinetics of Omp74 in Liposomes

Omp74 denatured with 8 M urea was refolded by 50-fold dilution in liposome solutions at 4°C and 18°C. The liposomes used were as follows: open symbols, liposomes not containing EPA (DPPE/DPPG (50 : 50 molar ratio)); closed symbols, liposomes containing EPA (DPPE/DPPG/PEPE/PEPG (47.5 : 47.5 : 2.5 : 2.5 molar ratio)). The error bars indicate the S.D. from 3 independent experiments.

Diacyl-EPA

Diacyl-OLA

Acylalkyl-EPA

Acylalkyl-OLA

Dialkyl-EPA

Dialkyl-OLA

Fig. 3. NBD-labeled Phospholipids Used in This Study

These phospholipids were named after the binding mode between the glycerol moiety and the hydrocarbon chains at the *sn*-1 and *sn*-2 positions, as well as the hydrocarbon chain species at the *sn*-2 position.

オレイン酸を含む *N*-NBD-1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Diacyl-OLA) も合成した (Fig. 3). これらの蛍光プローブ分子を *S. livingstonensis* Ac10 に添加して培養し、細胞内リン脂質組成の経時変化を ESI-MS で測定した. その結果, Diacyl-EPA と Diacyl-OLA を添加した細胞それぞれで, EPA とオレイン酸を含むリン脂質 (NBD 基を持たないホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルグリセロール) が増加することが観察された. 添加したプローブ分子から EPA とオレイン酸がそれぞれ切り出されて細胞内のリン脂質に取り込まれるものと考えられた. グラム陰性細菌の外膜には一般にリン脂質のアシル鎖を切断するホスホリパーゼ A が存在しており, 本酵素の作用によって *sn*-2 位のエステル結合が加水分解されたものと推定された. 一方, プローブ分子の極性頭部に導入していた NBD は細胞内のリン脂質には取り込まれなかった. 本菌の蛍光顕微鏡観察においても, 細胞内に NBD の蛍光は観察されなかった. 以上の結果から, Diacyl-EPA は EPA 含有リン脂質の細胞内局在性を解析する蛍光プローブとしては適していないことが明らかとなった.

上述のように Diacyl-EPA では NBD を含むリン

脂質から EPA が遊離してしまい, 蛍光発色を指標とした EPA 含有リン脂質の細胞内局在性解析ができなかった. この問題を克服するため, あらたに *sn*-2 位のエステル結合を非加水分解性のエーテル結合に置換した蛍光プローブ分子 *N*-NBD-1-oleoyl-2-eicosapentaenyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Acylalkyl-EPA) を合成した (Fig. 3). また, コントロールとして *N*-NBD-1-oleoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Acylalkyl-OLA) を合成した (Fig. 3). さらに, *sn*-1 位のエステル結合もエーテル結合に置換した *N*-NBD-1-oleyl-2-eicosapentaenyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Dialkyl-EPA) と *N*-NBD-1,2-dioleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Dialkyl-OLA) も合成した (Fig. 3). これらの蛍光標識プローブを *S. livingstonensis* Ac10 に添加して培養し、細胞内リン脂質組成の経時変化を ESI-MS によって調べた結果, いずれのエーテル型リン脂質を添加した場合でも細胞膜に NBD 標識リン脂質が見い出された. Acylalkyl-EPA と Acylalkyl-OLA を添加したものでは, *sn*-1 位のエステル結合が加水分解されて生成する *N*-NBD-2-eicosapentaenyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Lysoalkyl-EPA) と *N*-NBD-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoetha-

nolamine (Lysoalkyl-OLA) も見い出された。さらにこれらの *sn*-1 位が菌体由来の脂肪酸によって再度アシル化されることで生成するリン脂質も見い出された。一方, Dialkyl-EPA と Dialkyl-OLA に関しては, 菌体内での代謝変換を受けず, Dialkyl-EPA と Dialkyl-OLA のまま, 細胞膜に取り込まれていた。

さらに詳しく調べた結果, Dialkyl-EPA, Dialkyl-OLA を添加した場合, NBD 標識リン脂質は主として外膜に存在し, 内膜内葉には存在しないことが示された。一方, Acylalkyl-EPA と Acylalkyl-OLA を用いた場合, NBD 標識リン脂質の多くは外膜に存在するものの, 約 25% の NBD 標識リン脂質が内膜内葉に存在することが示された。外部から添加したリン脂質が内膜に到達するためには, 外膜と内膜の間に存在する親水性の高いペリプラズム領域を通過する必要がある。Acylalkyl-EPA と Acylalkyl-OLA は, 外膜のホスホリパーゼ A の作用で Lysoalkyl-EPA 及び Lysoalkyl-OLA にそれぞれ変換されて親水性が向上するため, ペリプラズム領域を通過できるものと推定された。

Acylalkyl-EPA, Acylalkyl-OLA, Dialkyl-EPA, Dialkyl-OLA を添加した菌体における NBD 標識リン脂質の局在性を蛍光顕微鏡で観察したところ, Acylalkyl-EPA を添加した菌体においてのみ, 細胞の中央部分に蛍光の局在がみられた (Fig. 4)。さらにこの細胞における DNA の局在性を Hoechst 33342 による蛍光染色で調べた結果, 細胞分裂過程にある細胞内の 2 つの核様体の間, すなわち細胞分裂部位に NBD の蛍光が局在していることが明らかになった。このような局在性は, コントロールである Acylalkyl-OLA を添加した場合には認められなかった (Fig. 4)。以上のことから, 蛍光リン脂質は *sn*-2 位のエイコサペンタエニル基に依存して細胞分裂部位に局在することが示された。

Acylalkyl-EPA を菌体に添加すると *sn*-1 位のエステル結合が加水分解されて Lysoalkyl-EPA に変換され, さらに *sn*-1 位が菌体由来の脂肪酸によって再度アシル化される。したがって, Acylalkyl-EPA を添加した菌体において, 細胞分裂部位に局在していた NBD 標識リン脂質は, 外部添加した Acylalkyl-EPA そのものである可能性のほか, Lysoalkyl-EPA である可能性や, これが再アシル化されたも

Fig. 4. Fluorescence Microscopic Images of *S. livingstonensis* Ac10 Grown in the Presence of Acylalkyl-EPA and Acylalkyl-OLA

The fluorescence microscopic images of the cells stained with Hoechst 33342 (DNA stain) and NBD-labeled phospholipids are shown. Fluorescence intensities in seven equally sized sections of the cells (#1–#7) were quantified for randomly-chosen 15 cells during cell division. Closed symbols, fluorescence of NBD-labeled phospholipids; open symbols, fluorescence of Hoechst 33342.

のである可能性が考えられる。これらの可能性を検討するため, Lysoalkyl-EPA 及び Lysoalkyl-EPA の *sn*-1 位にエーテル結合を介してメチル基を導入した Methylalkyl-EPA (Lysoalkyl-EPA のアナログであり, Lysoalkyl-EPA と同程度の親水性を有するが, *sn*-1 位がアシル化されない点で Lysoalkyl-EPA と異なる) を合成し, 菌体に添加する実験を行った。菌体中に取り込まれた NBD 標識リン脂質の量については Lysoalkyl-EPA と Methylalkyl-EPA で顕著な差がなかった。また, いずれのプロープ分子を用いた場合でも外膜のみならず内膜にも NBD 標識リン脂質が見い出され, その分布は Lysoalkyl-EPA と Methylalkyl-EPA で顕著な差がなかった。一方, Lysoalkyl-EPA については *sn*-1 位に菌体由来の脂肪酸が導入された NBD 標識リン脂質の生成が確認されたが, Methylalkyl-EPA では予想通り,

sn-1 位がアシル化されたリン脂質の生成は認められなかった。これらの菌体の蛍光顕微鏡観察を行った結果、Lysoalkyl-EPA を添加した場合のみ、細胞中央部への NBD 標識リン脂質の局在がみられた。これらの結果から、細胞中央部への局在は *sn*-1 位のアシル化に依存しているものと考えられた。

以上のように Acylalkyl-EPA 又は Lysoalkyl-EPA を添加した菌体で、細胞分裂部位への NBD 蛍光リン脂質の局在がみられ、一方、内膜に到達しない Dialkyl-EPA や、*sn*-1 位がアシル化されない Methylalkyl-EPA については、このような局在がみられなかった。これらの結果は、内膜に到達して *sn*-1 位がアシル化された NBD リン脂質が細胞分裂部位に局在することを示唆している。この推察を裏付ける実験として、Acylalkyl-EPA 又は Lysoalkyl-EPA を添加した細胞の外膜外葉に存在する NBD 含有リン脂質の蛍光を亜ジチオン酸ナトリウムで消光する実験を行った。その結果、細胞中央部への局在性は消失することなく、むしろ、より顕著な局在がみられた。

これらの結果から、細胞に添加した Acylalkyl-EPA は *sn*-1 位のアシル鎖の加水分解をうけて Lysoalkyl-EPA に変換されて内膜に到達し、*sn*-1 位が再アシル化を受けて生成するリン脂質が、*sn*-2 位のエイコサペンタエニル基の構造に依存して細胞分裂部位に濃縮されるものと考えられた。

エイコサペンタエニル基を持つ蛍光リン脂質が細胞分裂部位に局在したという知見は、EPA 含有リン脂質が細胞分裂に重要な役割を果たすという知見¹²⁾とつじつまが合っており、天然型の EPA 含有リン脂質もプローブ分子と同様に細胞分裂部位に局在し、マイクロドメインを形成することが強く示唆される。このようなマイクロドメインが形成されるメカニズムは不明であるが、2つの可能性が考えられる。1つは膜の高い曲率によって EPA 含有リン脂質の局在化がもたらされる可能性である。PUFA 含有リン脂質に富んだ脂質二重層の曲げ剛性は低いことが知られており、²³⁾このような物理化学的特性が、細胞分裂部位のように大きく曲がった膜への濃縮をもたらす可能性が考えられる。もう1つはタンパク質との相互作用による可能性である。細胞分裂関連タンパク質など、細胞分裂部位に集積するタンパク質との相互作用によって、局在化が引き起こさ

れる可能性が考えられる。これらの仮説の妥当性については今後の検討が必要である。

5. おわりに

上述のように、EPA 含有リン脂質に、膜タンパク質のフォールディングを促進する機能や、細菌の細胞分裂部位に集積し、細胞分裂を介助する機能があることが明らかになってきた。膜タンパク質のフォールディングにおけるタンパク質-脂質間相互作用の詳細の解明、EPA 含有リン脂質を含むマイクロドメインが形成されるメカニズムの解明、ここに集積し EPA 含有リン脂質と相互作用するタンパク質の同定、それらの機能に EPA 含有リン脂質がおよぼす影響の解析などは今後の課題である。このように今後解明されるべき点は多く残されているが、本稿で紹介した知見は、生体膜における高度不飽和脂肪酸の機能発現機構を明らかにしていく上で新しい視点を与えるものと考えられる。

謝辞 本稿で紹介した筆者らの研究は主に京都大学化学研究所で行われたものです。京都大学化学研究所の江崎信芳教授、佐藤 翔博士、代 先祝博士、京都大学低温物質科学研究センターの佐藤 智准教授を始めとする共同研究者の方々に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Watts G. F., Mori T. A., *Curr. Opin. Lipidol.*, **22**, 70–71 (2011).
- 2) Wall R., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C., *Nutr. Rev.*, **68**, 280–289 (2010).
- 3) Sato S. B., Sato S., Kawamoto J., Kurihara T., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **84**, 31–37 (2011).
- 4) Stillwell W., Wassall S. R., *Chem. Phys. Lipids*, **126**, 1–27 (2003).
- 5) Shaikh S. R., Teague H., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **87**, 205–208 (2012).
- 6) Yazawa K., *Lipids*, **31**, S297–S300 (1996).
- 7) Kato C., Nogi Y., *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 223–230 (2001).
- 8) Metz J. G., Roessler P., Facciotti D., Levering C., Dittrich F., Lassner M., Valentine R., Lardizabal K., Domergue F., Yamada A., Yazawa K., Knauf V., Browse J., *Science*, **293**, 290–293 (2001).

- 9) Wallis J. G., Watts J. L., Browse J., *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 467–473 (2002).
- 10) Sakuradani E., Ando A., Ogawa J., Shimizu S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1–10 (2009).
- 11) Cho K., Kasai W., Kawamoto J., Esaki N., Kurihara T., *Trace Nutrients Research*, **29**, 92–99 (2012).
- 12) Kawamoto J., Kurihara T., Yamamoto K., Nagayasu M., Tani Y., Mihara H., Hosokawa M., Baba T., Sato S. B., Esaki N., *J. Bacteriol.*, **191**, 632–640 (2009).
- 13) Sato S., Kurihara T., Kawamoto J., Hosokawa M., Sato S. B., Esaki N., *Extremophiles*, **12**, 753–761 (2008).
- 14) Kawamoto J., Sato T., Nakasone K., Kato C., Mihara H., Esaki N., Kurihara T., *Environ. Microbiol.*, **13**, 2293–2298 (2011).
- 15) Dai X. Z., Kawamoto J., Sato S. B., Esaki N., Kurihara T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 363–367 (2012).
- 16) Feller S. E., *Chem. Phys. Lipids*, **153**, 76–80 (2008).
- 17) Singer S. J., Nicolson G. L., *Science*, **175**, 720–731 (1972).
- 18) Lingwood D., Simons K., *Science*, **327**, 46–50 (2010).
- 19) López D., Kolter R., *Genes Dev.*, **24**, 1893–1902 (2010).
- 20) Mileykovskaya E., Dowhan W., *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 2084–2091 (2009).
- 21) Matsumoto K., Kusaka J., Nishibori A., Hara H., *Mol. Microbiol.*, **61**, 1110–1117 (2006).
- 22) Sato S., Kawamoto J., Sato S. B., Watanabe B., Hiratake J., Esaki N., Kurihara T., *J. Biol. Chem.*, **287**, 24113–24121 (2012).
- 23) Rawicz W., Olbrich K. C., McIntosh T., Needham D., Evans E., *Biophys. J.*, **79**, 328–339 (2000).