

古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究

東京工業大学大学院 理工学研究科物質科学専攻

江 口 正

Archaeal membrane lipids are structurally unique and are consisted of isoprenoid chains linked to glycerol with ether bond in contrast to the ester linkage of eubacterial and eukaryotic membrane lipids. The most striking feature of archaeal membrane lipids is the presence of macrocyclic structures as large as 36-membered rings of methanogens.

An objective of this research is to develop synthetic methodology of these extreme macrocycles and the unique archaeal ether lipid, which are useful for studies on physico-chemical properties as membrane lipid and to develop new materials with intriguing properties.

For this purpose, we have successfully synthesized archaeal 36-membered macrocyclic membrane lipids and its acyclic congener. Described in this report is the biophysical significance of the archaeal 36-membered macrocyclic diether phospholipid 36MPC as a function of temperature, which was studied by measuring of membrane fluidity, liposomal proton permeability, and liposomal thermostability in comparison with its acyclic counterpart, DPhyPC, egg yolk lecithin eggPC, and a mixed lipid of DMPC-cholesterol (2:1). Fluorescence anisotropy measurements indicated that the macrocyclic structure led to a decrease in the fluidity in the inter-membrane hydrophobic part more than in the membrane surface by limiting the motional freedom of the alkyl chains. The proton permeability was also significantly reduced by introducing a macrocyclic structure. Liposomal thermostability measurements using 6-carboxyfluorescein (CF) suggested that 36MPC formed liposomes with greater thermal stability than these of DPhyPC. The presence of glycolipids to the corresponding phospholipids greatly reduced the CF leakage from liposomes. Most importantly, DMPC-cholesterol liposome showed less leakage than 36MPC at 40°C. However, by raising the temperature, this situation was completely reversed. This suggested that the cyclic structure contributed to the formation of stable liposomes, especially at higher temperatures. These findings clearly demonstrate that the 36-membered macrocyclic lipid membrane plays an important role for the thermophilic archaea to adapt to extreme environments.

1. 緒 言

すべての細胞は細胞膜によって外界から自己を確立し、生命活動を営む。すなわち細胞膜こそ「生きている」ことの証である。微生物・動物・植物を問わず、大部分の細胞膜は脂肪酸とグリセロールを主構成要素とするリン脂質の集合体から成る脂質二重膜によって作られている。細胞膜脂質は生命の根幹ともいえる生体成分であるので、地球上の生物すべてに構造的に普遍的なものと考えられてきた。ところが、通常の生物の生育環境とは大きく異なった、温泉、海底火山、塩湖などのように高温、高圧、高酸性、または高塩濃度等の苛酷な環境下で棲息している古細菌と命名された微生物の一群が存在し¹⁾、自己と外界を分ける細胞膜が特異であることが明らかとなってきた。古細菌の細胞膜はイソプレノイド鎖とグリセロールがエーテル結合し

た構造を持っている (Figure 1、化合物 1、2)²⁾。その中でも極めて特徴的なものとして、イソプレノイド鎖の末端が結合し、36 員環を形成した大環状エーテル型脂質の存在が挙げられる²⁾。古細菌は過酷な生息環境にこれらの特異な膜脂質によって、適応していると考えられているが、その機能は明確にはされていない。

一方、レシチンに代表されるリン脂質は、界面活性機能に優れ、保水剤、乳化剤、乳化安定剤やリボソーム剤として使用されている。しかしながら、安定性の面で問題点があり、熱や酸化、加水分解などに不安定である。この不安定性の原因は化学構造的に見るとレシチンが脂肪酸とエステル結合しており、また、不飽和脂肪酸が存在していることに基因している。これらの古細菌の脂質の化学的な構造の特徴及びその生育環境を考えると、高温や乾燥など厳しい下で安定した機能を保持する化粧品基剤として注目すべき新素材であると考えられる。

本研究では、古細菌の膜脂質、特に大環状膜脂質の機能を解明することを目的として研究を進めている。そこで、培養等の手段では純粋に得ることが難しい古細菌の大環状脂質を、合成によって純粋かつ十分量得て、それから調製される脂質膜の性質について種々の測定法を用いて検討することとした。既に我々は、McMurry 反応およびオレフィンメタセシス反応による環化を鍵とした至適生育温



Functional Role of Archaeal Ethereal Phospholipids

Tadashi Eguchi

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology

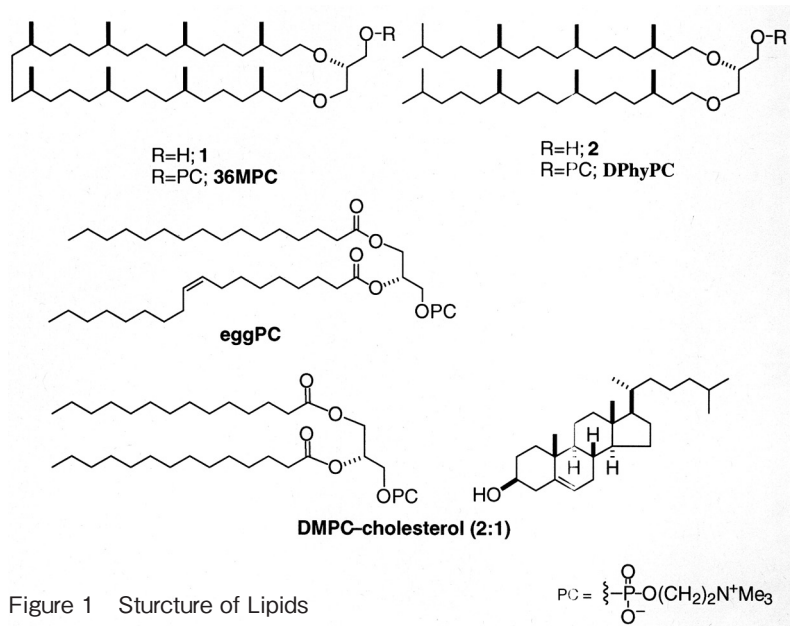
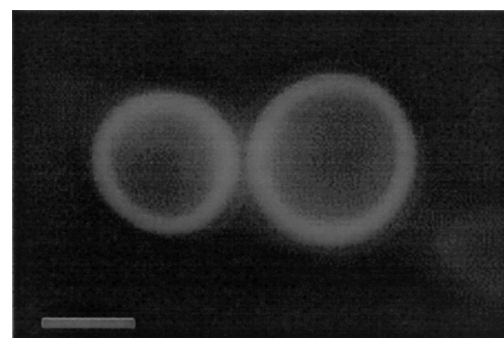


Figure 1 Structure of Lipids

Figure 2 Image by differential interference contrast fluorescence optical microscopy of 36MPC ($T = 298\text{ K}$, $\text{pH} = 7.0$, $I = 551\text{ nm}$, Nile Red 1% mol.). Scale bar 10 μm .

度 85℃ のメタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* が有する 36 員環脂質 **2** の全合成に成功している³⁾。それら研究の成果は既に総説として発表した³⁾ので、本報告書では詳細を省略させていただき、それらの膜脂質の性質を中心として述べさせていただく。

2 実験、結果および考察

2.1 実験で使用した脂質

古細菌ジエーテル型リン脂質の膜としての性質を検討するにあたり、通常生物のエステル型脂質との比較も行った。本研究で用いた脂質は Figure 1 に示した我々が合成した 36 員環脂質 **2** およびその非環状類縁体 **1** のホスホコリン誘導体 (DiPhyPC および 36MPC) を用いた³⁾。また、エステル型脂質はニワトリの卵黄レシチン (eggPC) 及びジミリスティル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンとコレステロール (2 : 1) の混合脂質 (DMPC-cholesterol) の二種類である。

2.2 光学顕微鏡によるリポソームの観察⁴⁾

【実験】GUV は静置水和法を用いて調製した。まず脂質 1 mg をクロロホルム-メタノール 360 μL (2 : 1) に溶解し、そのうちの 1.5 μL をカバーガラス上に滴下する。10 分間乾燥させて得たラメラ状のサンプルを顕微鏡上に載せ、50 μL の緩衝液で希釈する。そうするとサンプルが緩衝液に浸ったところから巨大ベシクルの形成がみられるようになる。なお、染色剤には脂質二重膜に取り込まれる蛍光物質 Nile Red を用い、脂質二重膜の発光イメージを逐一観察した (励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm)。

【結果】36 員環リン脂質 36MPC の蛍光顕微鏡像の写真を Figure 2 に示す。明らかに 36MPC は単独で巨大リポ

ソーム (GUV) を形成していることが分かる。これは大環状脂質が単独でリポソームを形成することが分かった初めての例である。

2.3 熱分析 (DSC)

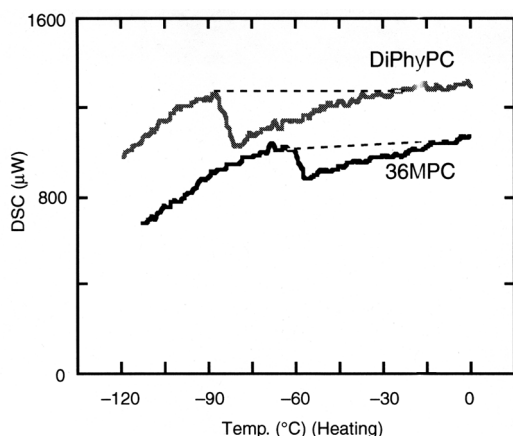
古細菌型リン脂質 36MPC、DiPhyPC の水分散液及びコア脂質 **1**、**2** の乾燥試料の DSC を測定した。

【実験】リン脂質分散液: 脂質 (7 mg) をエチレングリコール-水 (50 mg ; 4 : 1 v/v) に溶かし、70 μL のアルミニウム製パンに入れ、何度か昇温、降温を繰り返した後 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で走査した ($-40 \sim 60^{\circ}\text{C}$)。

コア脂質乾燥試料: 脂質 (ca. 10 mg) をそのまま 20 μL のパンに入れ、何度か昇温、降温を繰り返した後 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で走査した ($-120 \sim 0^{\circ}\text{C}$)。

【結果】古細菌型リン脂質 36MPC、DiPhyPC の DSC を水-エチレングリコール (4 : 1) 中に分散して測定した。両方の脂質とも測定温度範囲では相転移の存在は見出せなかった。従って、常温では液晶状態をとっていることがわかる。

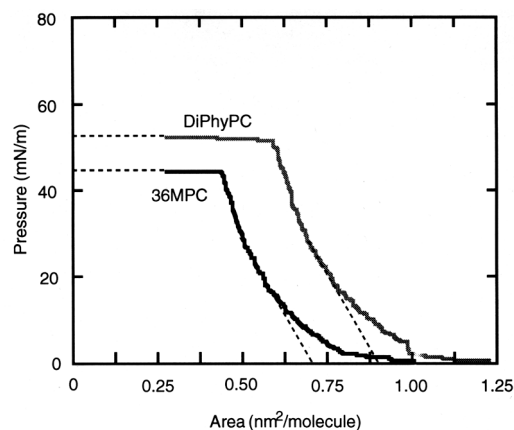
一方、古細菌型コア脂質 **2**、**1** の DSC を Figure 3 に示す。古細菌 72 員環テトラエーテル型コア脂質の乾燥試料では -53°C 付近にラメラ相の融解と思われる吸熱ピークが観測されたが、ジエーテル型コア脂質でも同様に低温領域に吸熱ピークが観測された。その熱力学的データについて、環状脂質 **2** の方が非環状脂質 **1** に比べて T_c は高く、 ΔH_c 、 ΔS_c は小さいことが分かった。この傾向はリン酸ジエステル型モデル化合物⁵⁾ 及び Menger らのジエーテル型モデル化合物⁶⁾ での結果と同じものであった。すなわち環状脂質における T_c の上昇は相転移により大きな熱運動を必要としたためであり、 ΔH_c 及び ΔS_c の低下は各々相転移



	T_c (°C)	ΔH_c (kcal/mol)	ΔS_c (cal/mol·K)
36MPC	-56.5	0.72	3.3
DiPhyPC	-78.8	1.5	7.7

Scanning rate; 2 °C/min

Figure 3 DSC thermograms of archaeal core lipids 1 and 2, and the kinetic parameters of phase-transition.



	Limiting area (nm²/molecule)	Collapse pressure (mN/m)
36MPC	0.70	44
DiPhyPC	0.92	52

0.32 mm/sec at 20 °C

Figure 4 The π -A isotherms of 36MPC and DiPhyPC, and the characteristic data derived from π -A isotherms.

前後でのトランス-ゴーシュ変化が生じる部位の減少，炭化水素鎖の自由運動の抑制に起因すると考えられる。これら観測された相転移は層状に重なったラメラ相の融解によるものと考えられる。

2.4 単分子膜の分子占有面積⁷⁾

【実験】20°Cの蒸留水上に脂質溶液を滴下して10分間静置した後、0.32mm/secの一定速度で可動バリアを押していき π -A 曲線を得た。

【結果】測定結果を Figure4 に示す。常温で液晶状態にある古細菌型脂質 36MPC、DiPhyPC の分子占有面積は、分岐メチル基を有さない脂質と比較して大きな値をとっていた⁵⁾。これは一概には比較できないが、古細菌型脂質での大きな値はイソブレン鎖のかさ高さに起因するものといえる。環状脂質 36MPC と非環状脂質 DiPhyPC との比較では 36MPC の方が分子占有面積が小さいことが分かった。すなわち炭化水素鎖末端が結合していることにより単分子膜面での広がりが DiPhyPC よりも抑制されていると考えられ、環状脂質は非環状脂質よりも密なパッキングを有した単分子膜を形成することが分かった。

2.5 蛍光偏光解消⁷⁾

脂質二重膜に垂直に取り込まれた蛍光プローブが、膜の流動化によりその配向が乱され蛍光偏光の解消が生じ、その結果蛍光偏光度 P 及び蛍光の異方性パラメーター r 値が低下するので、間接的に脂質膜の流動性を見出すことが出来る。これらは以下の式で求められる。

$$P = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp})$$

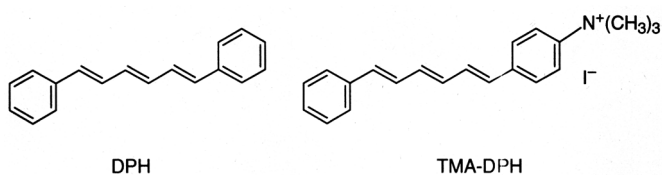


Figure 5 Structure of DPH and TMA-DPH.

$$r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$$

ここで $F_{\parallel}$ は励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分であり、 $F_{\perp}$ は励起光の振動方向と直角に振動する偏光強度成分である。

蛍光プローブは DPH (ジフェニルヘキサトリエン) と、DPH にカチオン性極性基を有した TMA-DPH (1-[4-(トリメチルアミノ)-フェニル]-6-フェニルヘキサ-1,3,5-トリエン) を用いた (Figure 5)。DPH は脂質分子の疎水基末端から中央部分の流動性、TMA-DPH は脂質分子の極性基付近の流動性を求めるのに各々利用した。

【実験】脂質 3~4mg に緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH7.5) 9 mL を加え、超音波処理法で SUV 分散液を調製した。得られた分散液 3mL に 3μL の DPH 及び TMA-DPH (ともに 0.5mM in DMF) を各々加えた。励起側、蛍光側に各々偏光板を取り付けた蛍光光度計により蛍光強度 (励起波長 350nm、蛍光波長 460nm) を測定した。

【結果】測定結果を Figure6 に示す。ほとんどのサンプルについて温度が上昇するにつれて r 値が減少、すなわち流動性が向上している。環状脂質 36MPC は非環状脂質 DiPhyPC と比べてあらゆる温度で流動性が低かった。疎

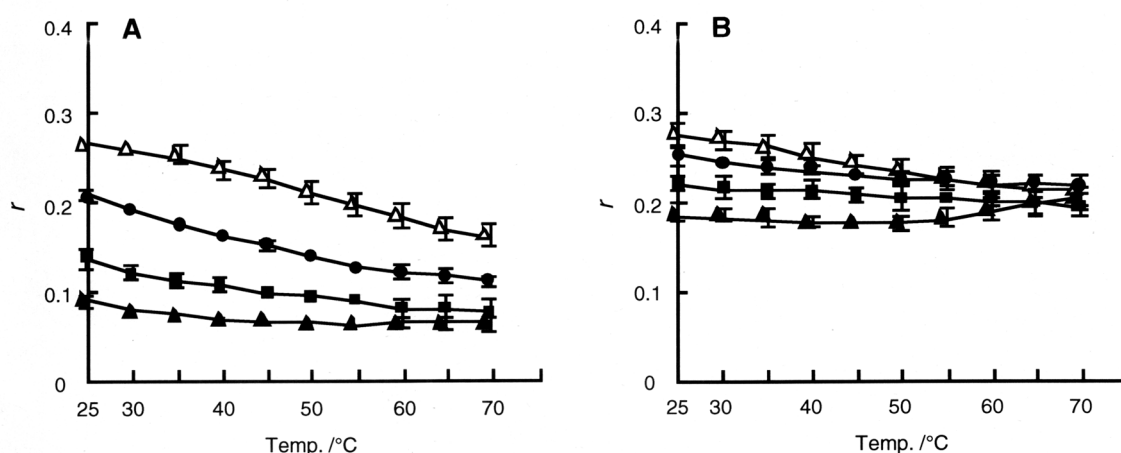


Figure 6 Temperature dependence of the fluorescence anisotropy of A, DPH; B; tma-DPH incorporated in the bilayers of the lipids; 36MPC, ●; DiPhyPC, ■; eggPC, ▲; DMPC-cholesterol (2:1); △. The concentrations of lipid and probe were 0.5 mM and 0.5 M, respectively.

水部でその差が大きかったことを考えると、炭化水素鎖末端の結合が脂質二重膜の流動性低下に大きく寄与していることを示しているといえる。また親水部でもその傾向がみられたことは、環状構造が疎水部のみでなく脂質分子全体の流動性、運動性を低下させていることを示している。eggPC はこれらの中でもっとも流動性が高かった。屈曲した炭化水素鎖を有する eggPC では脂質分子の間隔が疎となっていて、そのために蛍光プローブが活発なブラウン運動をすることが出来たと考えられる。コレステロールで膜を補強したリポソームは逆にもっとも流動性が低かった。エステル脂質とコレステロールとが強固に疎水性相互作用をしていることで蛍光プローブの運動が抑制されたと考えられる。以上のことを考えると古細菌型脂質はイソプレノ鎖の分岐メチル基により分子同士で適度に疎水性相互作用をし、その結果 eggPC よりも流動性が低くなったと考えられる。

以上より環状脂質は非環状脂質と比べて流動性が低いことが分かった。疎水部、親水部の両方で同様の傾向を示したことにより、環状構造をとることで脂質分子全体の運動性、流動性が低下することを明らかに出来た。

2.6 リポソームのプロトン透過性⁸⁾

小型の水溶性物質である 6-カルボキシフルオレセイン (CF) (Figure7) は 490 nm 付近に励起波長を、520 nm 付近に蛍光波長をもつ蛍光色素である。これは低濃度でも蛍光を検出可能なだけでなく、pH 感受性であり、pH が低下するにつれてその蛍光強度も減少する。そこでこの性質を利用し、リポソームのイオン透過性について検討した。pH 7～8 付近で調製したリポソーム分散液を酸性緩衝液に浸すとリポソーム内にプロトンが流入する。その結果内水相に封入された CF の蛍光強度が減少するので、その減

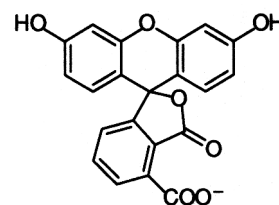


Figure 7 Structure of CF.

少の割合を見積もることでリポソームのプロトン透過性を検討した。

【実験】 脂質 3～4mg に 1 mL の CF 含有緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸、150 mM NaCl、4 mM CF、pH 7.5) を加えて凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液は現段階では外水相にも CF を含んでいるため、セファデックス G-50 (1.5 × 30～45 cm) 担体を用い、緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸、150 mM NaCl、pH 7.5) で溶出してゲル濾過をし、外水相の CF を除去した。

アッセイは次のようにして行った。すなわち、蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3 mL の酸性緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸、150 mM NaCl、pH 2.5) 中に CF 含有 LUV 懸濁液 (20 μL) を加えたとき ($t = 0$) の蛍光強度を F_0 とし、各時間 t での蛍光強度 F_t を逐次測定した (励起波長; 480 nm、蛍光波長; 520 nm)。このとき得られる蛍光強度相対比 F_t/F_0 の減少割合はプロトン透過速度を示す。すなわち F_t/F_0 の減少率が高ければプロトン透過速度の高いリポソームであるといえる。

【結果】 各温度での測定結果を Figure8 に示す。リポソームへのプロトン透過は非常に速く、数分以内で平衡に達した。

まず古細菌型脂質の比較で、環状脂質 36MPC は非環状脂質 DiPhyPC と比べてあらゆる温度で F_t/F_0 の減少率が

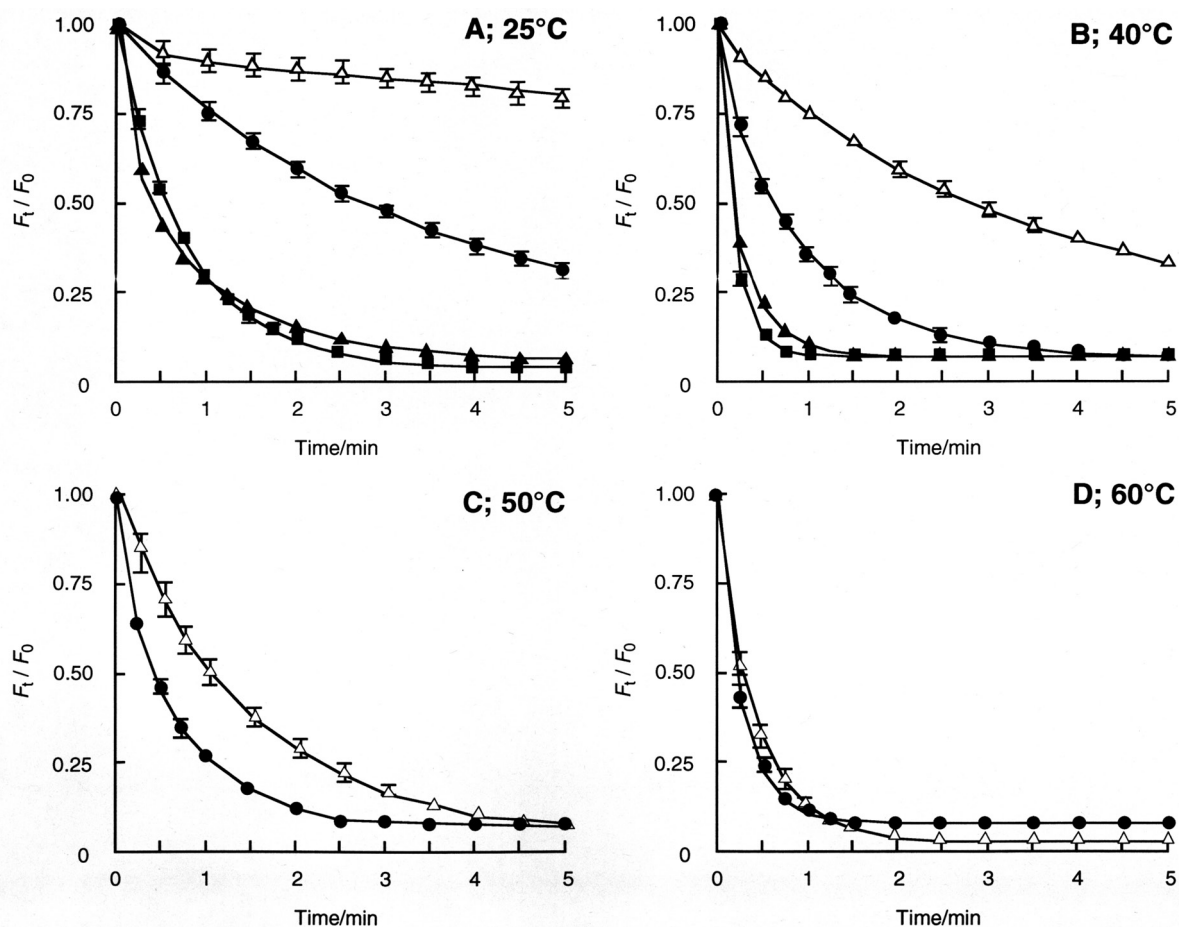


Figure 8 Proton permeability of large unilamellar vesicles of the phospholipids (36MPC, DPhyPC, eggPC, DMPC-cholesterol). Plots of fluorescence intensity of CF F_t/F_0 vs. incubation time t . A, at 25°C; B, at 40°C; C, at 50°C; D, at 60°C; 36MPC, ●; DPhyPC, ▲; eggPC, ■; DMPC $\ddot{\text{m}}$ cholesterol (2:1), △. Initial pH gradient; pH 7.5 (inner), pH 2.5 (outer).

小さい、すなわちプロトン透過速度が遅いリポソームを形成することが分かった。DMPC-cholesterol は特に低温・中温領域において、プロトン流入に強い抵抗性を示した。高温領域 (>60°C) では 36MPC 及び DMPC-cholesterol とともに瞬間的にプロトン流入が進行した。

また DiPhyPC は eggPC リポソームに匹敵するプロトン透過速度を有しており、この結果プロトン透過にイソプレレン鎖はほとんど影響しないことが分かった。つまり 36MPC におけるプロトン流入速度の低下は環状構造によるものが大きいといえる。

2.6 リポソームの熱安定性⁹⁾

蛍光物質はその濃度が 100 mM 以上になると自己消光で蛍光強度は著しく減少する。つまり、リポソーム内に高濃度に封入した CF が温度変化により外水相へ漏れ出してくることで希釈されてはじめて蛍光が検出されるようになるので、この性質を利用して蛍光強度を測定すれば漏れしてきた蛍光物質の量を見積もることが出来る。

【実験】脂質 3～4mg に 1 mL の CF 含有緩衝液 (20mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 200 mM CF, pH 7.5) を加え

て凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液に対しセファデックス G-50 (1.5×30～45cm) 担体を用い、緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.5) で溶出してゲル濾過を行い、外水相の CF を除去した。

アッセイは次のようにして行った。すなわち、蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3mL の同じ緩衝液中に CF 含有 LUV 懸濁液 (5～20 μL) を加えたとき ($t = 0$) の蛍光強度を F_0 とし、各時間 t での蛍光強度 F_t を逐次測定した (励起波長: 480nm、蛍光波長: 520nm)。一定時間測定した後、非イオン性界面活性剤 10% Triton X-100 を 10 μL 加え、蛍光物質の全強度 F_{max} を測定した。リポソームからの CF の漏出量は次式から算出できる。

$$\text{Leakage extent of CF [\%]} = (F_t - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0) \times 100$$

測定したサンプルは 36 員環リン脂質 36MPC、非環状リン脂質 DiPhyPC、DMPC-cholesterol (2:1)、eggPC の計 4 種類であり、各々 40、50、60、70°C で測定した。

【結果】各温度における測定結果を Figure 9 に示す。まず古細菌型リン脂質の比較で、環状脂質 36MPC は非環状脂質 DiPhyPC と比べてあらゆる温度で蛍光物質の漏出量

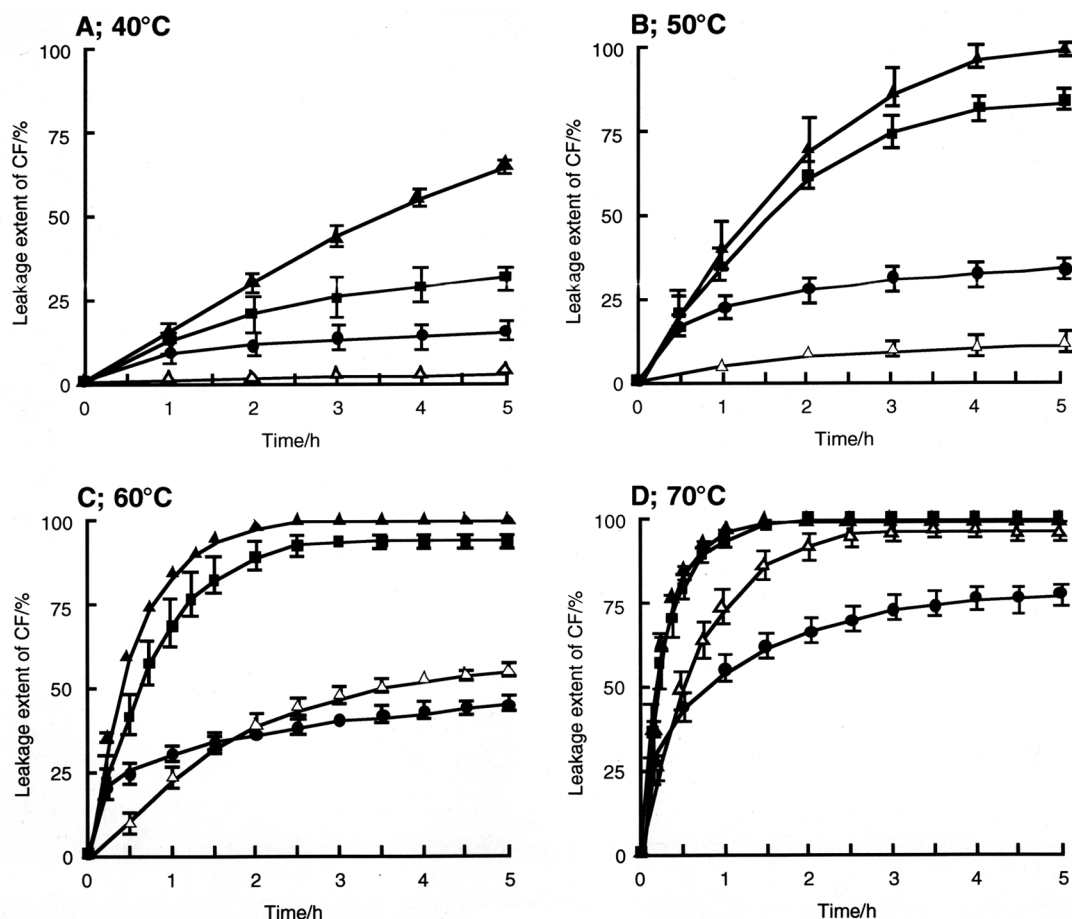


Figure 9 Thermostability of large unilamellar vesicles of the lipids (36MPC, DPhyPC, eggPC, DMPC-cholesterol). Plots of the leakage extent of CF vs. incubation time *t*. A, at 40°C; B, at 50°C; C, at 60°C; D, at 70°C; 36MPC, ●; DPhyPC, ■; eggPC, ▲; DMPC $\ddot{=}$ cholesterol (2:1), △.

が少ない、物質保持能に優れたリポソームを形成することが分かった。一方、エステル型脂質において、eggPCは測定サンプル中で最も蛍光物質の漏出速度が高いことが分かった。コレステロールで膜を補強したDMPC-cholesterolリポソームは中温領域では非常に高いバリアー能を有していたが、高温になるにつれて蛍光物質の漏出速度が上昇し、36MPCよりも物質保持能は低下した。36MPCはDMPC-cholesterolと比べて、温度変化による漏出速度の変化量が小さく、高温でも高バリアー能リポソームを形成することが示唆された。古細菌型脂質は中温領域でも測定初期に若干CFを放出するのだが、これは古細菌型脂質リポソームの高い膜流動性により放出されたものであろうと考えている。

従って、環状脂質は非環状脂質と比べて非常に物質保持能に優れたリポソームを形成することが分かった。また、高温ではコレステロールで補強したリポソームをも凌駕するバリアー能を有することも見出すことが出来た。よって、大環状脂質が好熱性古細菌の高温環境への適応に寄与していることを明らかにすることが出来た。

3. 結 論

古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の脂質膜の性質について得られた知見を総合すると以下のようにまとめられる。

- 1) 様々な形状に変化する、流動性に富んだリポソームの形成が観察された。
- 2) リン脂質の相転移温度は-40°C以下である。
- 3) コア脂質は低温領域に相転移温度を有し、非環状脂質と比べて高い相転移温度、小さい相転移エンタルピー及びエントロピー値をとる。
- 4) 密なパッキングを有した単分子膜を形成する。
- 5) 脂質膜の流動性が低い。
- 6) プロトン透過速度が遅いリポソームを形成する。
- 7) 高温でも安定なリポソームを形成する。

以上の結果、古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の脂質膜の性質については、モデル化合物での知見及び非環状脂質との比較から環状構造のもたらす影響を総合的に評価できたと考えている。運動性、流動性、充填度、リポソームのプロトン透過性・熱安定性といった諸性質が密接に絡み合うことで、古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の興味深い膜

機能を発現していることが明らかとなった。

第一に脂質分子における環状構造が、膜機能へ多大な影響を与えていることを明らかに出来た。環状構造が脂質分子の運動性を低下させることで膜流動性の低下が生じ、その結果物質透過・熱に対する高いバリアーを発現したと考えられる。

第二に古細菌脂質に特徴的なイソプレレン鎖は、リボソームの熱安定性に直接的にはそれほど関与せず、古細菌 36 員環脂質からなるリボソームの安定性が環状構造に由来することを強く示唆するものである。

メタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* において培養温度が上昇するにつれて環状脂質の割合が増加すること¹⁰⁾、好熱性古細菌において培養温度が上昇するにつれてシクロペンタン環の数が増大すること¹¹⁾、絶対嫌気性真正細菌の脂質膜においても温度及び有機溶媒・抗生物質の添加などの外的ストレスで橋かけ構造をした脂質や大環状脂質が生成すること¹²⁾などを考え合わせると、古細菌大環状脂質が好熱性古細菌の高温環境への適応に大きな役割を果たしているといえる。

このように高バリアー能かつ安定なリボソームを形成する古細菌 36 員環脂質は、機能的リボソームへの応用も期待できる。単純なイソプレレン鎖より更なる高バリアー能かつ膜安定化作用を有する古細菌 36 員環脂質についても、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や生理作用のあるペプチド、糖鎖で修飾した機能的リボソームの開発など、将来的に医学・材料科学分野への幅広い利用価値を見出すことが出来よう。

(参考文献)

- 1) (a) Woese, C. R.; Fox, G. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1977**, 74, 5088. (b) Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1990**, 87, 4576. (c) Delong, E. F. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1992**, 89, 5685.
- 2) (a) 古賀 洋介, 亀倉 正博, 「古細菌の生物学」, 東京大学出版会 (1998). (b) Takashina, T.; Hamamoto, T.; Otozai, K.; Grant, W. D.; Horikoshi, K. Syst. Appl. Microbiol. **1990**, 13, 177.
- 3) Eguchi, T.; Arakawa, K.; Terachi, T.; Kakinuma, K. J. Org. Chem. **1997**, 62, 1924.
- 4) Pozzi, G.; Birault, V.; Werner, B.; Dannenmuller, O.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Terakawa, S. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1996**, 35, 177.
- 5) Taguchi, K.; Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. New J. Chem. **1998**, 22, 63.
- 6) Menger, F. M.; Chen, X. Y.; Brocchini, S.; Hopkins, H. P.; Hamilton, D. J. Am. Chem. Soc. **1993**, 115, 6600.
- 7) (a) 寺田 弘, 吉村 哲郎, 「ライフサイエンスにおけるリボソーム 実験マニュアル」, シュプリンガー・フェアラーク東京 (1992). (b) 村上 幸人, 「超分子化学の基礎と応用」, エス・ティー・エス (1996).
- 8) Komatsu, H.; Chong, L. -G. Biochemistry **1998**, 37, 107.
- 9) Yamauchi, K.; Doi, K.; Kinoshita, M.; Kii, F.; Fukuda, H. Biochim. Biophys. Acta **1992**, 1110, 171.
- 10) Choquet, C. G.; Patel, G. B.; Beveridge, T. J.; Sprott, G. D. Appl. Microbiol. Biotechnol. **1994**, 42, 375.
- 11) De Rosa, M.; Esposito, E.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B.; Bu'Lock, J. D. Phytochemistry **1980**, 19, 827.
- 12) (a) Clarke, N. G.; Hazlewood, G. P.; Dawson, R. M. Biochem. J. **1980**, 191, 561. (b) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Huber, R.; Lanzotti, V.; Nicolaus, B.; Stetter, K. O.; Trincone, A. J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1988**, 1300. (c) Carballeira, N. M.; Reyes, M.; Sostre, A.; Huang, H.; Verhagen, M. F. J. M.; Adams, M. W. W. J. Bacteriol. **1997**, 179, 2766. (d) Lee, J.; Jung, S.; Lowe, S.; Zeikus, J. G.; Hollingsworth, R. I. J. Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 5855.