

# 新規酵素蛍光法による細胞内全主要リン脂質クラスの高感度ハイスループット定量分析

## Novel Enzymatic Fluorometric Methods for High-throughput and Sensitive Measurements of All Major Phospholipid Classes in Cells



森田 真也

滋賀医科大学医学部附属病院 薬剤部

〒520-2192

滋賀県大津市瀬田月輪町

Shin-ya MORITA

Department of Pharmacy, Shiga University of Medical Science Hospital

Seta Tsukinowa-cho, Otsu City, Shiga 520-2192, Japan

論文要旨：リン脂質は、動物・植物・真菌・細菌を含む全ての生物における細胞膜の必須成分である。分子構造に基づいて、リン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)・ホスファチジリエタノールアミン (PE)・ホスファチジルセリン (PS)・ホスファチジン酸 (PA)・ホスファチジリンイノシトール (PI)・ホスファチジルグリセロール (PG)・カルジオリピン (CL)・スフィンゴミエリン (SM) などのクラスに分けられる。しかし、これまで、リン脂質クラスを定量するための適切な方法が無かった。そこで、筆者は最近、全主要リン脂質クラス PC・PE・PS・PA・PI・PG・CL・SM を定量する酵素蛍光定量法を開発した。本方法により、短時間の簡便な操作で、高感度かつハイスループットなリン脂質クラスの定量を行えるようになった。そして、これまでに、リン脂質代謝に関連する酵素やトランスポーターの機能を調べるために、本定量法を用いて培養細胞ならびに細胞内小器官のリン脂質クラス組成を評価してきている。本酵素蛍光定量法は、幅広い生命科学全般において、リン脂質の生化学的・生理学的役割を解明する重要な技術となることを期待している。

**Abstract:** Phospholipids are essential components of cell membranes in all organisms including animals, plants, fungi, and bacteria. Based on their molecular structures, phospholipids are classified into phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL), sphingomyelin (SM), and so on. However, there has been no appropriate method for quantifying phospholipid classes. Therefore, I have recently developed the enzymatic fluorometric assays to quantify all major phospholipid classes including PC, PE, PS, PA, PI, PG, CL, SM. These assays are simple, sensitive and high-throughput, but not time-consuming. These assays have been applied for the evaluation of the phospholipid class compositions in cultured cells and their intracellular organelles to investigate the functions of enzymes and transporters. These enzymatic fluorometric assays will become key technologies for elucidating the biochemical and physiological roles of phospholipids in many fields of life sciences.

**Key words:** phospholipid class, enzymatic fluorometric assay, cell membrane, intracellular organelle

1 はじめに

太古の地球の海で生命が誕生するさいに、外界から独立した閉じた反応の場を作り出すためには、隔壁としての膜構造が必要であったと考えられる。初めて誕生した生命の膜が何からできていたのかは不明であるが、「リン脂質」は、現在の地球上に存在する全ての動物細胞・植物細胞・真菌細胞・細菌において、膜を構成するための必須の成分となっている。また、一部のウイルス（新型コロナウイルス SARS-CoV-2 を含む）に存在するエンベロープは、宿主細胞に由来するリン脂質で形成されている。

リン脂質とは、分子内に親水性のリン酸頭部基と疎水性のアシル鎖領域を併せ持つ両親媒性化合物の総称であり、水溶液中で自発的にリン酸頭部基を外側に、アシル鎖領域を内側に向けて二分子膜を形成する性質を有している。その性質により、リン脂質はステロール類（哺乳類ではコレステロール）とともに、細胞膜を形成している (Fig. 1)<sup>1)</sup>。真核細胞では、細胞表面膜に加えて、小胞体やミトコンドリア、核膜、ゴルジ体、リソソーム、エンドソーム、ペルオキシソームなどの細胞内小器官も、リン脂質二分子膜により形成している。脂肪細胞に存在する脂肪滴では、リン脂質単分子膜がトリグリセリドを包んでいる。また、哺乳類の血漿中に存在する高密度リポタンパク (HDL)・低密度リポタンパク (LDL)・超低密度リポタンパク (VLDL)・カイロミクロンなどのリポタンパク粒子は、リン脂質とコレステロールの表面膜がトリグリセリドやコレステリルエステル疎水性コアを包み込む構造をしている (Fig. 2)<sup>2)</sup>。リン脂質は、胆汁に含まれる主な脂質成分の一つであり、胆汁酸やコレステロールとともに混合ミセルやベシクルを形成している (Fig. 3)<sup>3)</sup>。その他に、哺乳類体内においてリン脂質は、細胞外小胞や肺サーファクタントなどの主要成分となっている<sup>1)</sup>。本総説では、各リン脂質クラスの構造や生化

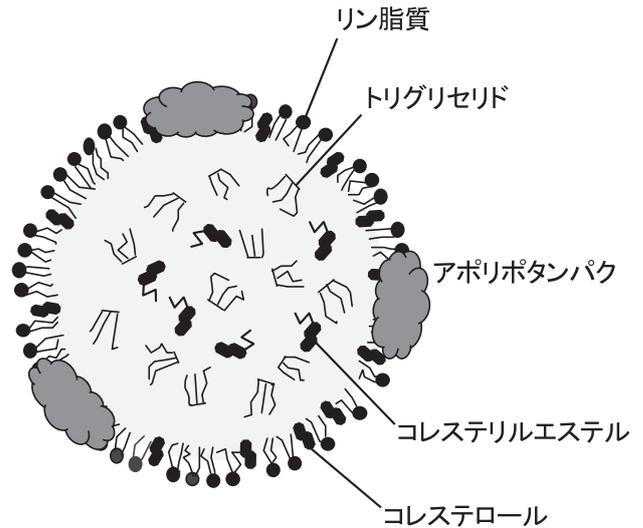


Fig. 2 血漿リポタンパク (HDL・LDL・VLDL・カイロミクロン) の構造。トリグリセリドやコレステリルエステルの疎水性コアを、リン脂質とコレステロールの表面単分子膜が包み込み、アポリポタンパクが結合している。

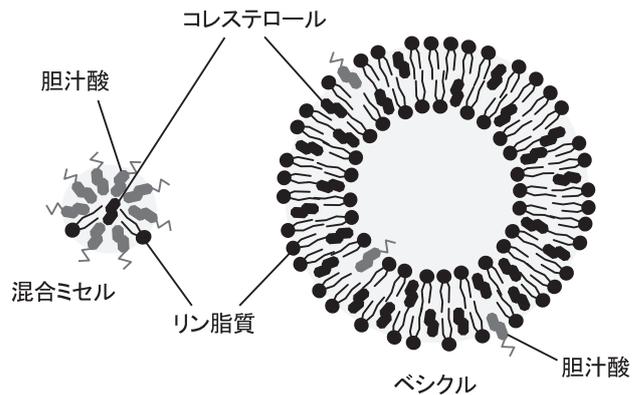


Fig. 3 胆汁混合ミセルとベシクルの構造。胆汁酸の割合が大きいと混合ミセルを形成し、リン脂質とコレステロールの割合が大きくなるとベシクルを形成する。混合ミセルとベシクルは、平衡状態で存在する。

学的・生理学的役割を概説するとともに、筆者が開発した全主要リン脂質クラスに対する新規酵素蛍光定量法の

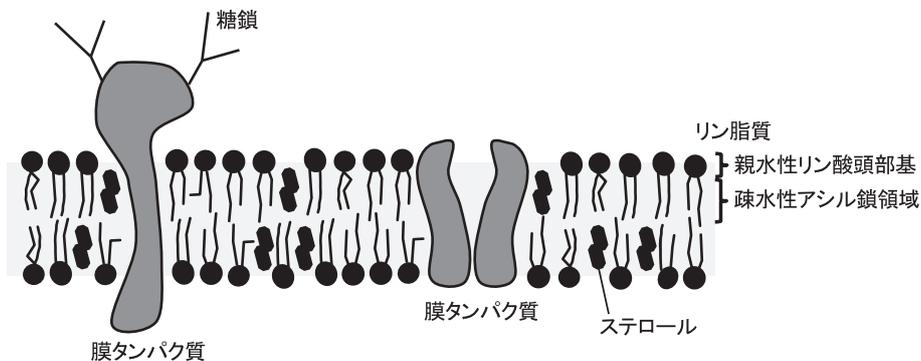


Fig. 1 細胞膜の構造。リン脂質は、親水性リン酸頭部基を外側に、疎水性アシル鎖領域を内側に向け、ステロール（哺乳類ではコレステロール）とともに二分子膜を形成し、膜タンパク質が組み込まれている。

特徴ならびに細胞実験への応用について紹介する。

## 2 リン脂質クラスの構造

リン脂質は、分子構造からグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質の2種類に大きく分けられる<sup>1)</sup>。グリセロリン脂質は、グリセロール骨格にリン酸頭部基とアシル鎖(脂肪酸鎖)が結合した構造をしており、さらに頭部基の構造により、ホスファチジルコリン(PC)・ホスファチジルエタノールアミン(PE)・ホスファチジルセリン(PS)・ホスファチジン酸(PA)・ホスファチジルイノシトール(PI)・ホスファチジルグリセロール(PG)・カルジオリピン(CL)などのクラスに分けられる(Fig. 4)。一方、スフィンゴリン脂質は、スフィンゴシン骨格にリン酸頭部基とアシル鎖が結合している構造であり、その中でスフィンゴミエリン(SM)は頭部基にコリンを有

している。さらに、これらのリン脂質クラスは、骨格にエステル結合している2本の様々な鎖長と不飽和度のアシル鎖の組み合わせにより、分子種は数千種にもなる。エステル結合しているアシル鎖が1本だけのリゾホスファチジルコリン(LPC)・リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)・リゾホスファチジルセリン(LPS)・リゾホスファチジン酸(LPA)・リゾホスファチジルイノシトール(LPI)・リゾホスファチジルグリセロール(LPG)など各種リゾリン脂質も存在している。また、グリセロール骨格にアルキル鎖やアルケニル鎖がエーテル結合したエーテル結合型リン脂質も存在している。

## 3 細胞におけるリン脂質クラスの生化学的・生理学的役割

各リン脂質クラスは、細胞膜を形成する構造的役割や

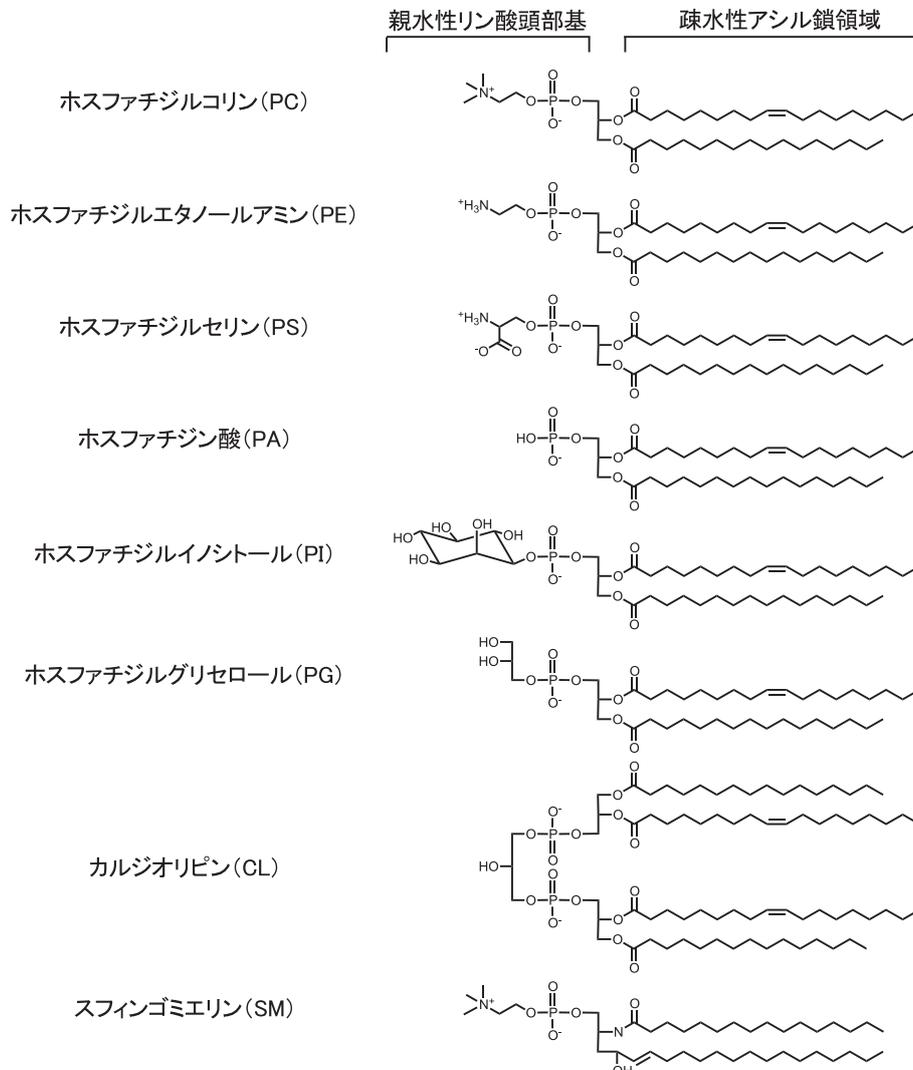


Fig. 4 哺乳類における主要リン脂質クラスの構造。骨格構造によりグリセロリン脂質(PC・PE・PS・PA・PI・PG・CL)とスフィンゴリン脂質(SM)に分けられ、さらに頭部基の構造により各クラスに分けられる。アシル鎖の種類は様々であり、分子種は数千種にもなる。

脂肪酸を供給するエネルギー源としての役割に加えて、様々な膜タンパク質（チャネル・トランスポーター・レセプター・酵素等）の活性や局在を調節する役割や、細胞内小胞輸送・細胞内シグナル伝達・細胞増殖・細胞分化・細胞移動・アポトーシス・オートファジー等において重要な役割をしている。

哺乳類の細胞膜では、リン脂質クラスとしてPCが最も多く（40～50%）、次いでPEが多い（20～50%）とされている<sup>4)</sup>。PS・PA・PI・PGは、それぞれ細胞膜リン脂質の数%を構成している。細胞表面膜の内側（内葉）と外側（外葉）でリン脂質クラス組成が異なることが知られており、PEやPSは内葉に多く、SMは外葉に多く存在するとされている。CLは、主にミトコンドリアの内葉に存在しており、その他の細胞内小器官膜や細胞表面膜にはほとんど存在していない<sup>5)</sup>。PCやSMは、頭部基とアシル鎖領域が同程度の幅となるシリンダー形の分子のため、平面二分子膜構造を形成する。一方、PE・PA・CLは、アシル鎖領域と比べて頭部基が小さいコーン形の分子であるため、負の曲率を有する膜構造の形成を促す<sup>6)</sup>。細胞表面膜において、SMはコレステロールとともに密集することで、脂質ラフトと呼ばれる膜マイクロドメインを形成している<sup>7)</sup>。脂質ラフトでは、SMとコレステロールが密にパッキングしているため膜流動性が低下しているにもかかわらず、ある種の膜タンパク質が特異的に局在し、細胞機能の調節に関わっていることが知られている。

細胞内のリサイクルシステムであるオートファジーにおいて、PEは細胞質タンパクLC3-Iと共有結合することによりLC3-IIとなり、オートファゴソーム形成で重要な役割をする<sup>8)</sup>。PSは細胞表面膜において主に内葉に存在しているが、アポトーシスが起ると外葉に移行し、食細胞に認識されるためのシグナルとして働く<sup>9)</sup>。血小板表面に露出したPSは、第VIIa因子-組織因子複合体のタンパク分解活性を促進し、血液凝固を導く。PSは、プロテインキナーゼC・中性スフィンゴミエリナーゼ・Raf-1キナーゼ・ダイナミン-1などのシグナルタンパクを活性化することが報告されている。PAは、細胞周期進行や細胞成長を制御する哺乳類ラパマイシン標的タンパク(mTOR)に対し、直接結合することで機能を正に調節している<sup>10)</sup>。PAは、II型PI(4)P5キナーゼ・Raf-1キナーゼ・スフィンゴシンキナーゼ1・cAMPホスホジエステラーゼ4A1・プロテインキナーゼC・チロシンホスファターゼSHP-1・ホスホリパーゼC・グアニンヌクレオチド交換因子SOSなどの局在や活性化の調節にも関わる。PGも、プロテインキナーゼCの活性化因子である。ミトコンドリアにおいて、CLは、

ADP/ATPキャリアーや呼吸鎖複合体IIIとIVの構成成分として、電子伝達およびATP産生を促進する<sup>11)</sup>。ミトコンドリア内膜の外葉で、CLはシトクロムcと密接に結合しており、CLの過酸化がシトクロムcの膜からの解離に重要となる。また、CLは、ミトコンドリアのアポトーシスプログラムのスイッチとしても働き、ミトコンドリア外膜の透過性上昇に直接的に関わる。PIは、さらにリン酸化を受けてPI(4)P・PI(5)P・PI(3)P・PI(4,5)P<sub>2</sub>・PI(3,4)P<sub>2</sub>・PI(3,5)P<sub>2</sub>・PI(3,4,5)P<sub>3</sub>となり、多種多様な細胞機能において重要な役目を果たす<sup>12)</sup>。このように、各リン脂質クラスと細胞機能との関係が次々と明らかになってきているが、それらの定量的な解析については、適切な分析法がなかったためにほとんど行われていない。

#### 4 リン脂質定量分析法

リピドミクスとは、生体組織サンプル中の脂質分子を網羅的に分析する研究分野であり、近年、技術革新が進み、活発に行われている。リン脂質クラスのための定量分析法として、従来、最も広く利用されてきたのは、薄層クロマトグラフィー(TLC)とリン酸定量を組み合わせる方法である。TLCで展開したリン脂質のおおよその量は、それぞれのスポットの大きさと濃さから評価できるが、正確な量については、スパーテル等を用いてスポットを厳密に回収した後、リン酸定量を行って求めなければならない。TLC-リン酸定量法で各リン脂質クラスの量を正確に求めるには、熟練の技術が必要となり、測定誤差も生じやすい。また、感度が低いため、多量のサンプルより抽出した脂質をTLC上で展開しなければならず、培養細胞実験では測定が困難となることが多々ある。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)でリン脂質クラスを分離し、紫外分光検出器(UVD)もしくは蒸発光散乱検出器(ELSD)を利用して定量する方法もある。UVDでは、リン脂質アシル鎖の二重結合の紫外吸収により検出するため、アシル鎖の種類による影響を強く受け、ステアロイル鎖やパルミトイル鎖など飽和アシル鎖のみを分子内に有するリン脂質は検出されず、定量値に反映されない。また、ELSDでは、全てのリン脂質分子を検出できるが、その検出されるピークの大きさはアシル鎖の種類に依存する。このため、各リン脂質クラスのモル濃度は、HPLC-UVDあるいはHPLC-ELSDでは正確に求めることができない。

現在、リピドミクスは、質量分析を中心に行われている。質量分析では、リン脂質アシル鎖の種類を区別した分子種ごとに極めて高感度に検出するため、アシル鎖組

成の評価には非常に有効である。一方で、リン脂質クラス単位での定量や比較には不向きである。細胞内の各リン脂質クラスについて、2本のアシル鎖の組み合わせにより数十種類の分子種が存在する。質量分析では、それぞれの分子種がイオン化効率の異なるピークとして検出されるため、正確な定量にはそれぞれの検量線が必要となり、リン脂質クラス単位で量を正確に求めることは極めて困難である。

### 5 全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法の開発

上記のように、いずれの方法でも、微量の生体由来サンプルに含まれているリン脂質をクラスごとに定量分析するのは困難であった。そこで、筆者は、高感度・高精度かつハイスループットに各リン脂質クラスを定量できる方法を構築することで、脂質研究分野のみならず生命科学全般を飛躍的に加速させることができるのではないかと考え、各リン脂質クラスに対する酵素蛍光定量法の開発に着手した。酵素蛍光定量法とは、複数の酵素反応と化合物を組み合わせ、測定対象分子に特異的な蛍光強度の増加を導くことにより、その量を求める方法で

ある。そして、リン脂質クラスとしてPA・PC・PE・PS・SM・PG+CL・PIの酵素蛍光定量法を順番に約10年かけて開発し、主要リン脂質クラスに対する高感度ハイスループット定量法を完成させた (Table 1)<sup>1, 13-18)</sup>。これらの酵素蛍光定量法の主な操作はピペットによるサンプルと反応液の分注のため、特別な技術が必要でなく簡便に行え、マイクロプレートを用いることでハイスループット測定が可能である。

開発したリン脂質クラス酵素蛍光定量法の例として、PIに対する定量法について紹介する<sup>18)</sup>。PI酵素蛍光定量法は、4段階の酵素反応で構成されている (Fig. 5)。まず、PIをホスホリパーゼDにより加水分解し、イノシトールを遊離させる。次に、イノシトールデヒドロゲナーゼを作用させることにより、イノシトールとNAD<sup>+</sup>からNADHを産生させる。そして、NADHオキシダーゼの作用によりNADHから過酸化水素を生成させ、続いてペルオキシダーゼにより過酸化水素をアンプレックスレッド (10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン) と反応させ、蛍光化合物レゾルフィン (最大励起波長 571 nm・最大蛍光波長 585 nm) を生成させる。この

Table 1 リン脂質クラス酵素蛍光定量法の使用酵素と特徴

定量法	使用酵素	検出感度 (pmol)	検出リン脂質クラス
PC	グリセロリン脂質特異的ホスホリパーゼ D	10	PC
	コリンオキシダーゼ		エーテル結合型 PC
	ペルオキシダーゼ		
PE	ホスホリパーゼ D	10	PE
	アミノオキシダーゼ		エーテル結合型 PE
	ペルオキシダーゼ		LPE
PS	ホスホリパーゼ D	50	PS
	L-アミノ酸オキシダーゼ		LPS
	ペルオキシダーゼ		
PA	リパーゼ	50	PA
	グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ		LPA
	ペルオキシダーゼ		
PI	ホスホリパーゼ D	20	PI
	イノシトールデヒドロゲナーゼ		LPI
	NADH オキシダーゼ		PI(4)P
	ペルオキシダーゼ		PI(5)P
PG+CL	ホスホリパーゼ D	10	PG
	グリセロールキナーゼ		CL
	グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ		LPG
	ペルオキシダーゼ		
SM	スフィンゴミエリナーゼ	5	SM
	アルカリホスファターゼ		
	コリンオキシダーゼ		
	ペルオキシダーゼ		

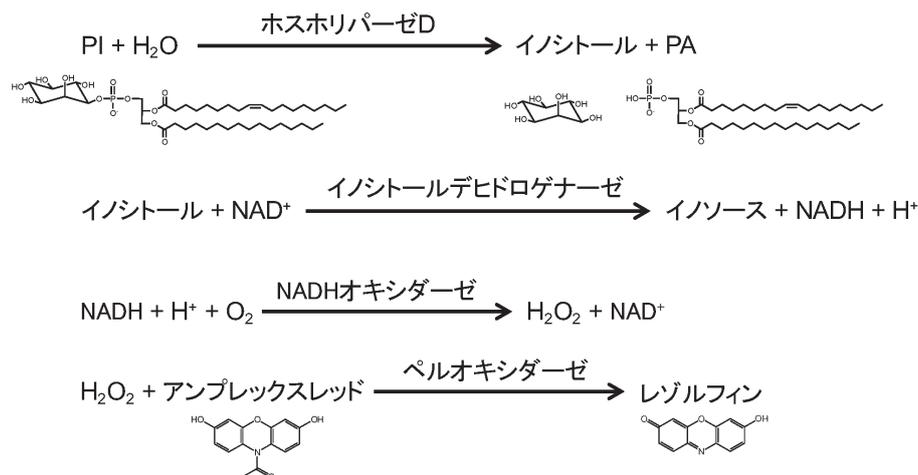


Fig. 5 PI 酵素蛍光定量法の反応経路。PI から4段階の酵素反応を経て生成するレゾルフィンの蛍光強度を測定することにより、PI の量を求めることができる。

- ① 10  $\mu$ L サンプル溶液またはスタンダード溶液(1% トリトンX-100)  
+ 10  $\mu$ L 反応液I1  $\left[ \begin{array}{l} 200 \text{ U/mL ホスホリパーゼD, 2.4 \text{ mM } \text{CaCl}_2 \\ 50 \text{ mM } \text{NaCl, 50 \text{ mM } \text{Tris-HCl (pH 7.4)} \end{array} \right]$   
(37°C, 60分)
- ② 加熱(96°C, 3分), 遠心(7200 g, 5分)
- ③ 10  $\mu$ L 上清  
+ 10  $\mu$ L 反応液I2  $\left[ \begin{array}{l} 25 \text{ U/mL イノシトールデヒドロゲナーゼ, 10 \text{ mM } \text{NAD}^+ \\ 150 \text{ mM } \text{NaCl, 150 \text{ mM } \text{Tris-HCl (pH 7.4)} \end{array} \right]$   
(25°C, 120分)
- ④ + 80  $\mu$ L 反応液I3  $\left[ \begin{array}{l} 1 \text{ U/mL NADHオキシダーゼ, 6.25 \text{ U/mL ペルオキシダーゼ} \\ 187.5 \text{ } \mu\text{M アンプレックスレッド, 0.125\% \text{ トリトンX-100} \\ 50 \text{ mM } \text{NaCl, 50 \text{ mM } \text{Tris-HCl (pH 7.4)} \end{array} \right]$   
(45°C, 60分)
- ⑤ + 20  $\mu$ L 反応停止液
- ⑥ 蛍光測定 (マイクロプレートリーダー)

Fig. 6 PI 酵素蛍光定量法操作手順。最後に蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定する。

PI 定量法の測定操作手順として、1% トリトン X-100 を含むサンプル溶液あるいはスタンダード溶液に、ホスホリパーゼ D を含む反応液 I1 を加えて 37°C で 60 分間インキュベートし、加熱処理 (96°C) と遠心処理をした後、上清にイノシトールデヒドロゲナーゼと NAD<sup>+</sup> を含む反応液 I2 を加えて 25°C で 120 分間インキュベートし、さらに NADH オキシダーゼとペルオキシダーゼならびにアンプレックスレッドを含む反応液 I3 を加えて 45°C で 60 分間インキュベートすることでレゾルフィンが産生する (Fig. 6)。そして、反応を停止させ、この溶液の蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定することで、PI の量を求めることができる。この PI 酵素蛍光定量法の検出限界は 20 pmol であり、TLC や HPLC を利用した従来法と比べて高感度かつ高精度である。この PI 定量法では、様々なアシル鎖の PI と LPI、さらに PI(4)P と PI(5)P を同様に定量する。しかし、PI(3)P・PI(4,5)P<sub>2</sub>・PI(3,4)P<sub>2</sub>・PI(3,5)P<sub>2</sub>・PI(3,4,5)P<sub>3</sub> について

は検出しない。

## 6 全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法の細胞実験への応用

これまでに、筆者らは、開発した各リン脂質クラスに対する酵素蛍光定量法を培養細胞実験に応用してきており、各種リン脂質合成関連酵素やリン脂質トランスポーターの機能や役割の解明を進めている<sup>15, 17-20)</sup>。その中で、最近、ヒト肝芽腫由来 HepG2 細胞における細胞成長と細胞内リン脂質クラス組成の関係についての検討を行ったので紹介する<sup>21)</sup>。

HepG2 細胞は、肝臓モデル細胞として様々な目的で幅広く利用されている。1 細胞ずつ分散するように播種した HepG2 細胞は、成長するにつれて細胞が密に集まったコンフルエントな状態を経て、さらに多層に重なった状態となり、細胞の形態も変化する。この細胞形態の変化から、細胞成長に伴い細胞膜リン脂質クラス組成が変

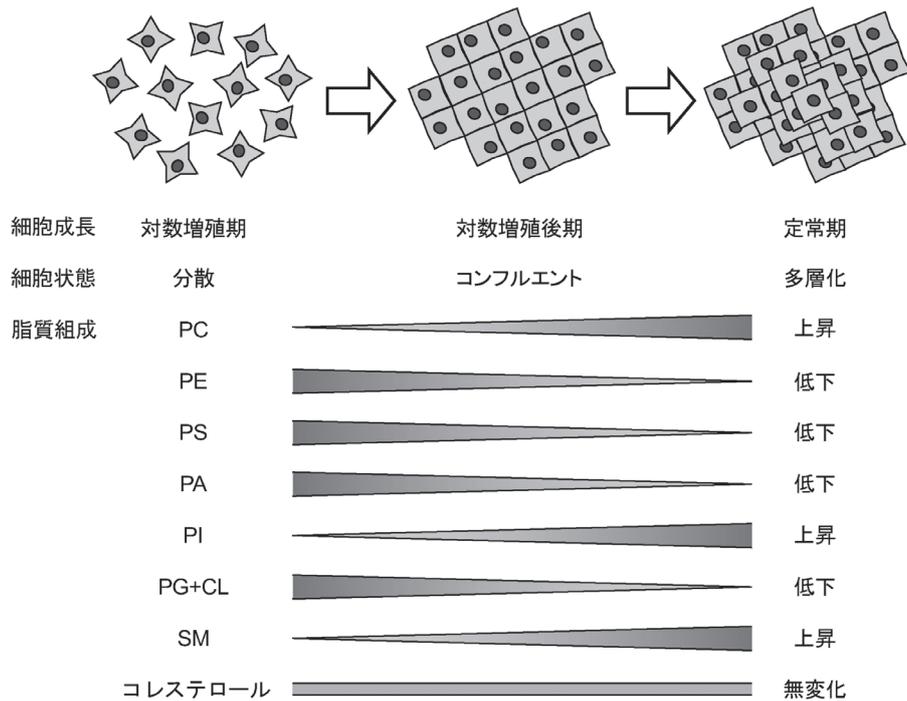


Fig. 7 HepG2 細胞の成長とリン脂質クラス・コレステロール組成の関係

化し、細胞機能に影響していることが予想される。しかし、そのリン脂質クラス組成変化については測定の高感度リン脂質クラス酵素蛍光定量法により、分散状態の少ない細胞に対するリン脂質クラス組成評価が容易になった。酵素蛍光定量法を用いて細胞全体のリン脂質クラス組成の分析を行ったところ、細胞が分散状態で存在する対数増殖期に比べ、細胞が多層化した定常期では、細胞内の PC・PI・SM の割合が上昇する一方で、PE・PS・PA・PG+CL の割合が低下することが示された (Fig. 7)。さらに、細胞内小器官の分画を超速心法により行い、核膜・ミクロソーム・ミトコンドリアのリン脂質クラス組成を評価した。その結果、対数増殖期から定常期にかけて、核膜における PA 増加と PC 減少、ミクロソームにおける SM 増加と PC 減少、ミトコンドリアにおける PE 増加と PS 減少が生じていることが判明した。また、リン脂質の生合成に関わる酵素の mRNA 発現変化について調べたところ、細胞成長に伴って、シチジル基転位酵素・コリンリン酸転位酵素・PS 脱炭酸酵素・PS 合成酵素・ジアシルグリセロールキナーゼ・CDP-ジアシルグリセロール合成酵素・CL 合成酵素・SM 合成酵素の発現が低下するが、PE メチル基転位酵素・ホスホリパーゼ D の発現は上昇することが明らかとなった。一方で、HepG2 細胞において、細胞全体および細胞内小器官でそれぞれコレステロールの割合は異なるが、細胞成長による変化はなく、一定に維持されていたことから、小胞

体の SREBP/SCAP 複合体だけでなく、ミトコンドリアや核膜にもコレステロールの割合を感知するシステムがある可能性が示唆された。これらの結果は、がん細胞成長に伴う脂質代謝調節のメカニズムを解明していくうえで重要な基盤的知見となることを見込まれる。

### 7 おわりに

ディッシュ上で培養した細胞におけるリン脂質クラス組成分析は、従来、細胞が密集したコンフルエントな状態でのみ行われていた。しかし、筆者による高感度な酵素蛍光定量法の開発により、細胞が分散した状態さらには細胞内小器官レベルでのリン脂質クラス組成分析が可能となった。また、最近では、臨床研究として、血漿リポタンパク (HDL・LDL・VLDL) に含まれている各リン脂質クラスの測定も進めている。この酵素蛍光定量法での各リン脂質クラスごとの定量分析に加えて、さらに質量分析によりアシル鎖分子種を網羅的に評価することで、リン脂質組成に関する情報がほぼ全て得られることになる<sup>6, 14)</sup>。

この全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法は、動物・植物・微生物実験を行う生化学・分子生物学分野や生物工学分野、生理学・薬理学分野、栄養科学分野など生命科学全般で役立つ分析技術となり、各種疾患の治療や予防にも貢献できることを期待する。

## 文献

- 1) Morita, S.Y.; Tsuji, T.; Terada, T. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1032 (2020).
- 2) Morita, S.Y. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1-24 (2016).
- 3) Morita, S.Y.; Ikeda, Y.; Tsuji, T.; Terada, T. *Chem. Pharm. Bull.* **67**, 333-340 (2019).
- 4) Vance, J.E. *J. Lipid Res.* **49**, 1377-1387 (2008).
- 5) Horvath, S.E.; Daum, G. *Prog. Lipid Res.* **52**, 590-614 (2013).
- 6) Morita, S.Y.; Ikeda, N.; Horikami, M.; Soda, K.; Ishihara, K.; Teraoka, R.; Terada, T.; Kitagawa, S. *FEBS J.* **278**, 4768-4781 (2011).
- 7) Ramstedt, B.; Slotte, J.P. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1945-1956 (2006).
- 8) Zhu, J.; Wang, K.Z.; Chu, C.T. *Autophagy* **9**, 1663-1676 (2013).
- 9) Segawa, K.; Nagata, S. *Trends Cell Biol.* **25**, 639-650 (2015).
- 10) Avila-Flores, A.; Santos, T.; Rincon, E.; Merida, I. *J. Biol. Chem.* **280**, 10091-10099 (2005).
- 11) Scherer, M.; Schmitz, G. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 556-562 (2011).
- 12) Epanand, R.M. *J. Membr. Biol.* **250**, 353-366 (2017).
- 13) Morita, S.Y.; Ueda, K.; Kitagawa, S. *J. Lipid Res.* **50**, 1945-1952 (2009).
- 14) Morita, S.Y.; Takeuchi, A.; Kitagawa, S. *Biochem. J.* **432**, 387-398 (2010).
- 15) Morita, S.Y.; Shirakawa, S.; Kobayashi, Y.; Nakamura, K.; Teraoka, R.; Kitagawa, S.; Terada, T. *J. Lipid Res.* **53**, 325-330 (2012).
- 16) Morita, S.Y.; Soda, K.; Teraoka, R.; Kitagawa, S.; Terada, T. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 571-576 (2012).
- 17) Morita, S.Y.; Terada, T. *Sci. Rep.* **5**, 11737 (2015).
- 18) Tsuji, T.; Morita, S. Y.; Ikeda, Y.; Terada, T. *Sci. Rep.* **9**, 8607 (2019).
- 19) Morita, S.Y.; Tsuda, T.; Horikami, M.; Teraoka, R.; Kitagawa, S.; Terada, T. *J. Lipid Res.* **54**, 1221-1230 (2013).
- 20) Ikeda, Y.; Morita, S.Y.; Hatano, R.; Tsuji, T.; Terada, T. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**, 1495-1502 (2019).
- 21) Tsuji, T.; Morita, S.Y.; Nakamura, Y.; Ikeda, Y.; Kambe, T.; Terada, T. *Sci. Rep.* **11**, 2731 (2021).