Res. Org. Geochem. **23/24,** 123−130 (2008)

論文

好塩性アーキアに特有な C_{25}-C_{20} ジエーテルの ESI-MS と GC-MS による分析：高塩分環境指標としての検討*

山内敬明**

（2008 年 8 月 27 日受付，2008 年 10 月 21 日受理）

Abstract

Many halophilic archaea produce a characteristic C_{25}-C_{20} isoprenoidal diether as a lipid-core portion of their body. This compound has a possibility for the biomarker to indicate a hypersaline environment. However, there have been a few experiments were performed for this compound in natural samples. In the present study, analytical methods of isoprenoidal lipid-core produced by an "ordinal" halophilic archaea *Natrinema pallidum* were established by ESI-MS and GC-MS. Furthermore, the compositional change for the C_{25}-C_{20} diether and C_{20}-C_{20} diether (archaeol), which simultaneously produced by the microorganism, was investigated. In higher temperature and higher salt concentration, C_{25}-C_{20} diether tends to produce more than lower temperature and concentration. This may be adaptation to extreme environment of this microorganism.

1. はじめに

好塩性アーキア（古細菌または始原細菌）*Natrinema pallidum* JCM 8980 は，イソプレノイドジエーテル脂質を持ち，海水の pH に近い条件（pH 7.5 前後）の至適 pH と飽和食塩濃度に近い高塩分濃度（25% NaCl）で生育する高度好塩性アーキアであり、もともと好塩性アーキアの代表株である *Halobacterium halobium* とされていた菌株である。その成分にはイソプレノイド鎖の鎖長を添字で示すとすると，Fig.1 のような C_{25}-C_{20} 脂質（**1**）と C_{20}-C_{20} 脂質（アーキオール，**2**）が約 2：3 の比で存在する。一方 C_{25}-C_{20} 脂質と C_{20}-C_{20} 脂質の存在比は好塩性アーキアの種によって様々であり，*Halobacterium salinarum*（JCM 9120）では C_{20}-C_{20} 脂質のみである一方，多くの菌では C_{25}-C_{20} 脂質が存在し，また C_{25}-C_{20} 脂質の割合が多い菌も存在する。さらに一部の好塩性アーキアにおいてはさらにイソプレノイド鎖の多い C_{25}-C_{25} 脂質が存在する。（De Rosa *et al*. 1982, Kates 1997, Koga and Morii 2005）。

好熱好酸性アーキアのテトラエーテル脂質 glyceroldialkylglycerol tetraether（GDGT）は，五員環化合物がイソプレノイド鎖中に複数存在する成分があり，生育温度が高くなるにつれて五員環化合物の数と，五員環化合物を多く持つ成分の割合が多くなるように変化し，高温でも膜を安定に保っている（De Rosa *et al*. 1980, Gliozzi *et al*. 1983）。ジエーテル脂質でも，疎水基成分の役割は膜の性質にとって重要であるはずで，C_{25}-C_{20} 脂質と C_{20}-C_{20} 脂質の存在は極限環境への適応である可能性がある。しかし，その存在と成分比が種に

*ESI-MS and GC-MS Analyses of C_{25}-C_{20} Isoprenoidal Diether, Originated from Halophilic Archaea with Reference to an Indicator for Hypersaline Environment

**九州大学大学院理学研究院地球惑星科学部門　〒812-8581　福岡市東区箱崎 6-10-1
e-mail: nyama@geo.kyushu-u.ac.jp, Tel&Fax: 092-642-4174
Noriaki Yamauchi: Department of Earth and Planetary Sciences, Faculty of Sciences, Kyushu University 6-10-1 Higashi-ku Hakozaki, Fukuoka city, 812-8581 Japan

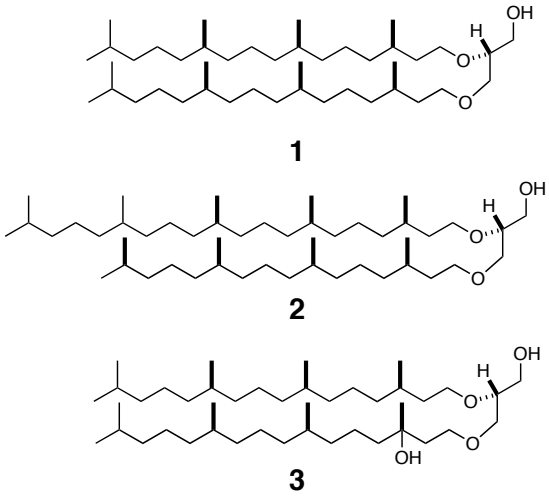

Fig. 1. Structure of C_{20}-C_{20} and C_{20}-C_{25} diether lipid core of archaea

よって多様である C_{25}-C_{20} 脂質と C_{20}-C_{20} 脂質はなぜ存在し，種によって成分比が異なるのかはよくわかっていない。そこで好塩性アーキアの脂質成分の多様性を与える生理学的要因を明らかにするために，いくつかの生育条件下で，その脂質成分比の変化を検討する実験を企画した。本論文ではその第一段階として C_{25}-C_{20} 脂質を簡便かつ的確に分析する方法を示し，生育条件による脂質成分の違いの基礎実験の結果を示した。

アーキア脂質由来化合物はバイオマーカーとして環境復元等に用いられるが，特にアーキオールはアーキアのバイオマーカーとして用いられている。また，ヒドロキシアーキオール（**3**，Fig. 1）がメタン菌由来のバイオマーカーとして，海洋の無酸素環境指示指標としてよく用いられている（Kates 1997，Ferrante *et al*. 1998, Koga and Nishihara 1991, Hinrichs *et al.* 1999, 2000, Pancost *et al.* 2000, Oba *et al.*2006）。沿岸環境や高塩濃度の塩性湿地の指標は，別の視点から観察可能なものではあるが，有機物を用いると炭素や水素の同位体という，異なる軸での環境解析に展開が広がる可能性を持っている。これまでに C_{25}-C_{20} 脂質の分析に関して Teixidor らが C_{20}-C_{20} 脂質とともに C_{25}-C_{20} 脂質が存在するかについてメタン菌，好塩菌の数種のアーキア培養液と，スペイン産岩塩や高塩性湿地表層堆積物などから抽出した有機物のアルコール成分を TMS 化後分析し，好塩菌培養液と岩塩中に C_{25}-C_{20} 脂質が存在することを示している（Teixidor and Grimalt 1992, Teixidor *et al*. 1993）。しかし，彼らの実験では C_{25}-C_{20} 脂質を通常の分析と異なる短いカラムを用いて分析しており，操作は煩雑で，なおかつ C_{25}-C_{20} 脂質の質量分析スペクトルがアーキオールと比較して不鮮明であるなど，若干の問題を含んでいる。このような問題にも関わらず，この文献がアーキオールの GC-MS 分析の引用文献の元となっている．これは，おそらく，他の研究では，C_{25}-C_{20} 脂質の存在が示されていないためであると思われる。

本研究ではアーキオールの簡便な分析法を作成した。今後このデータをもとに C_{25}-C_{20} 脂質がバイオマーカーとして積極的に利用されることを期待している。

さてエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）は，化合物を気化させることなくイオン化し，分子イオンを生成する“ソフトイオン化”の有力な方法で，試料溶液をキャピラリーより導入し，キャピラリーの先端に 3 kV 程度の高電圧をかけ溶液ごとイオン化し，液滴が大気圧下で蒸発してゆき，その後高真空の質量分析系へ導入するというもので，タンパク質やオリゴヌクレオチド，金属錯体のような極性物質のイオン化に適している（Chapman, 1995, Achcroft, 1999）。従来の方法ではアーキオールや C_{25}-C_{20} 脂質は，トリメチルシリル（TMS）化の後に GC-MS 分析を行っている。一方，脂質成分は簡単に精製され，ジエーテルしか含まないのでその混合物を直接分析できればより簡便な分析法になる。C_{25}-C_{20} 脂質は必ずしも高極性分子ではないが，条件を選ぶと容易にイオン化し分解せずに分子イオンが検出されるので，化合物を同定しながら定量できると思われる。そこで本論文ではジエーテルの ESI-MS による分析方法を検討した。一方 C_{25}-C_{20} 脂質の分析を，より一般的である TMS 化後の GC-MS 分析についても，簡便な方法となるように条件を出来る限り簡略化し，C_{25}-C_{20} 脂質 TMS 化体の分析法を検討し，フラグメンテーションを解析した。

2. 試料の調製

好塩性アーキア *N. pallidum* JCM 8980（RIKEN）を以下の培地 300 ml（NaCl 75 g（25 % NaCl）ま

たは 45 g（15% NaCl）, Casamino acid 2.25 g, yeast extract 3.0 g, sodium citrate 0.9 g, potassium chloride 0.6 g, Magnesium sulfate heptahydrate 6.0 g, water 300 ml, pH 7.4）にて 7 日間 37℃もしく 42℃で培養し，遠心分離（3,000g×30 min）にて集菌した。7 日め濁度と遠心分離後の菌体湿重量はこの培養条件の変化（温度および塩濃度）でほぼ変化はなく（±10%），生育はほぼ同等と考えられる。その後菌体は Bligh-Dyer 法にて（25% NaCl-MeOH-$CHCl_3$（8 ml - 10 ml - 10 ml）を加え，1 時間撹拌後，25% NaCl-water（10 ml - 10 ml）を加え，分液ロートに移し，$CHCl_3$ 層を分離）脂質抽出の後溶媒を除いて，3% HCl-MeOH 10 ml を加え 2 時間，80℃にて加熱，引き続き 7 M NaOH 5 ml を加えて 8 時間加水分解した。得られた脂質コア化合物（**1** と **2** の混合物を含む）はシリカゲルカラムにて hexane, hexane-ethyl acetate（10:1）, hexane-ethyl acetate（2:1）で精製，hexane-ethyl acetate（10:1）溶出分を得た。溶媒を減圧下除いた後 1.0～1.5 mg の脂質混合物を得た。試料は薄層クロマトグラフィー（Wako-gel，hexane-ethyl acetate（10:1）にて展開後，3% リンモリブデン酸-EtOH 溶液に浸出後，加熱して発色，Rf 0.62）で確認した。

3. 分　　析

試料はまずESI-MS（Applied Biosystems Mariner）にて分析した。分析試料は $CHCl_3$-MeOH（1 ml - 3 ml）に溶解し，その 5 μl をシリンジポンプにて（2 μl/min）infusion 導入し ESI-MS（Negative Mode）で分析した。なお ESI の条件は以下の通りであった（Nozzle temp. 140℃, Nozzle potential 90 V, Spray Tip Potential 3000 V）。分析は通常 5 回繰り返し，各イオンのイオン強度を平均した。通常 ESI-MS は水溶性（メタノールに溶解する程度）の物質のイオン化に適しているが，この条件（MeOH に少量のクロロホルム（10～25%）を含む）では水酸基やアミノ基をもつ脂溶性な物質でも（分子イオン＋Cl^-）付加イオンが生成し，比較的高感度で簡便に観測可能である（Cole and Zhu 1999, Cech 2001, Murae *et al*. 2002）。

GC 分析条件の再検討として以下の実験を行った。上記試料を ESI-MS 分析後，半量を分取し，pyridine-chlorotrimethylsilane（TMSCl）（1 ml - 0.1 ml）を加えて 60℃にて数分加熱後，水を加えヘキサンで抽出，ヘキサン層を乾燥後，溶媒を除いて 1 ml ヘキサンに再溶解し，1μl を GC-MS（島津製作所 QP-5000（+GC-17A））にて分析した。なお GC-MS の条件は以下の通りであった（気化室 300℃，カラム 180° から 3℃/min にて 320℃まで昇温し，その後 320℃を維持，MS インターフェース 260℃，カラムは GL サイエンス Inert Cap 5（OV-5 相当）0.4 μm df, 0.25 mm I. D. X 30 m, キャリアガス 100 kPa, 全流量 50 ml/min, カラム流量 1 ml/min）。

通常堆積物中の有機物のアルコール画分中の C_{20}-C_{30} のアルコール（の TMS 化体）とアーキオールやヒドロキシアーキオール（いずれも炭素数は C_{43} のアルコール）の分析では，アーキオール検出後も充分長時間（20 分以上）クロマトグラフィーを追跡し，他の分子種が存在しないことを示している場合が多い。本実験でも通常の 25 m キャピラリカラムで分析を行い，アーキオール検出後も GC-MS 分析を継続し，より高分子の C_{25}-C_{20} 脂質 TMS 化体の分析を検討した。

4. 結　　果

4.1. ESI-MS による C_{25}-C_{20} 脂質の分析

Fig. 2 に 37℃，25% NaCl（通常の好塩性アーキア培養条件）での加水分解後の脂質コアの ESI-MS 分析結果を示す。ESI-MS による少数の官能基を持った比較的非極性の物質の分析には，官能基を足がかりにする極性化合物への誘導体化と溶媒構成などを工夫し直接分析する方法との 2 つの方法がある。特に後者は極性溶媒（メタノールなど）に少量のクロロホルムを添加することで塩化物イオンとし分析する方法が既に報告されている。本分析では infusion 分析で最低 0.2 μg/ml 程度の濃度の試料を 10 μl 程度持っていれば分析可能であった。地球化学試料としては決して高感度ではないものの，ESI-MS システムは通常高分解能 MS と直結しているので，水酸基を持っている化合物が塩化物イオンとして観測されることも用いると，組成式の確認が同時に可能であるという利点がある。

本試料の測定においては C_{20}-C_{20} 脂質，すなわちアーキオールの分子イオンに相当する $(M+Cl)^-$

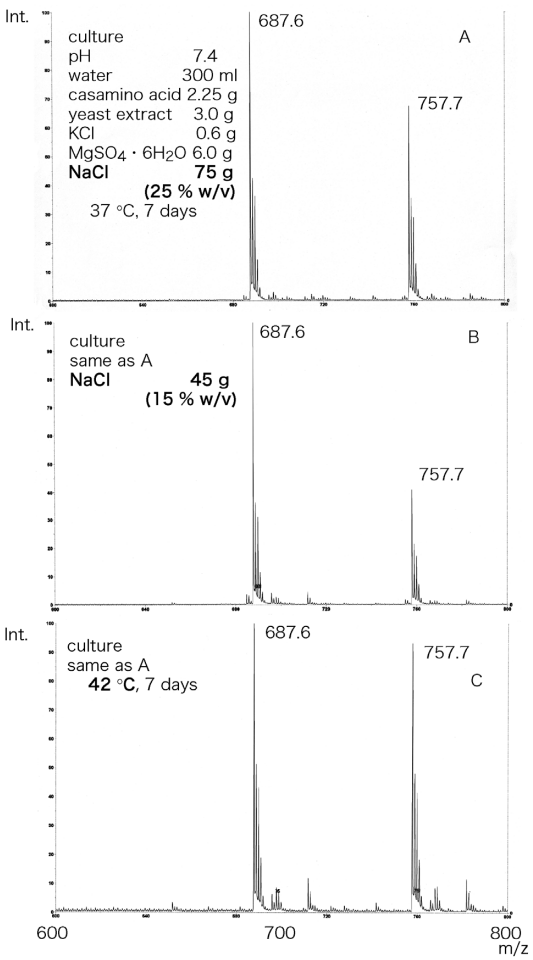

Fig. 2. ESI-MS spectra of the lipid core of *Natrinema pallidum* for several incubation conditions. A: 37℃, 25% NaCl (normal), B: 37℃, 15% NaCl (salt depleted), C: 42℃, 25% NaCl.

イオンである *m*/z 687.64175（Calcd. 687.64220 for $C_{43}H_{88}O_3Cl$）と C_{25}-C_{20} 脂質の分子イオンに相当する（M＋Cl）$^-$イオンである *m*/z 757.72026（Calcd. 757.72045 for $C_{48}H_{98}O_3Cl$）が同時に観測できた。その強度比は測定間における誤差は小さく（Table 1），例として，37℃，25％ NaCl 培養での試料に対し，*m*/z 687.6 を 100 とした時の *m*/z 757.7 の値は培養 1 回め，2 回目に対し，5 回の測定の間で 70.32±3.78，71.61±2.23 であった。今回の実験の目的である C_{20}-C_{20} 脂質と C_{25}-C_{20} 脂質の存在比の簡便分析という点ではその目的にあった分析方法であるといえる。また有意なフラグメンテーションは観測されず，組成式の推定が容易であった。同位体比分析や生合成研究における重水素を用いた標識実験を考えると，^{35}Cl と ^{37}Cl の塩素同位体が存在するので分子イオン領域に広い同位体分布を持ったピーク群を生じることから，脂質そのものの炭素，水素同位体比や標識実験での標識化合物の取り込む割合を正確に決定することはやや困難である。その様な若干の問題はあるものの，脂質コア画分中の C_{25}-C_{20} 脂質と C_{20}-C_{20} 脂質の割合を簡便に分析する方法を確立する，という初期の目的を達することができた。

4.2. 培養条件による，脂質成分の変化

バイオマーカーとしての C_{25}-C_{20} 脂質について，培養条件によって変わらず好塩性アーキアが C_{25}-C_{20} 脂質を生合成しているのかということが問題になると思われる。実験室での培養条件として一般的である 37℃，25％ NaCl での脂質コアの分析結果から，それぞれ塩濃度を 15％まで下げた条件と温度を 5℃あげた条件について，C_{20}-C_{20} 脂質と C_{25}-C_{20} 脂質の存在比を比較した（Fig. 2）。なお 37℃において塩濃度を 15％にしても有意な生育阻害が見られなかったが，10％にすると生育阻害がしばしばみられ，再現性ある実験が出来なかった。結果を Table 1 に示す。通常培養の 25％ NaCl 濃度では C_{20}-C_{20} 脂質（1）のイオン *m*/z 687.6（M＋Cl）$^-$と C_{25}-C_{20} 脂質（2）のイオン *m*/z 757.7 の比は 100 : 70.32±3.78, 100 : 71.6±2.2（培養 1 回目と 2 回め）であった（Fig. 2A）のに比し，塩濃度を 15 ％まで下げた場合では 100 : 41.04±0.48, 100 : 38.71±0.78（培養 1 回目 と 2 回め）まで 2 が減少した（Fig. 2B）。一方温度を通常培養より高い 42° で培養するとこの比が 100 : 94.87±2.51 とほぼ 1:1 となるように 2 が増加した（Fig. 2C）。この結果から *N. pallidum* においては，高温で C_{25}-C_{20} 脂質が明らかに増加し，低塩濃度では C_{25}-C_{20} 脂質が減少する，言い換えていうなら現在の条件の範囲内では，高温ないし高塩濃度で C_{25}-C_{20} 脂質が増加するという結果を得た。

4.3. GC-MS における C_{25}-C_{20} 脂質の挙動

前述したように Teixidor らが C_{25}-C_{20} 脂質の TMS 化後の分析方法を報告しているが（Teixidor and Grimalt 1992, Teixidor *et al*. 1993），質量分析スペ

Table 1. The ratio of C_{20}-C_{20} and C_{20}-C_{25} diether lipid core at several incubation conditions. Intensitiy of ion peak at *m/z* 687.6 was settled at 100. Analyses were performed for 5 times for each run (incubation) and experimental errors were calculated.

Conditions		Int. of ion peak at *m/z* 687.6 (for compound 1)	Int. of ion peak at *m/z* 757.7 (for compound 2)
37℃, 25% NaCl	Run 1	100	70.32 ± 3.78
	Run 2	100	71.61 ± 2.23
37℃, 15% NaCl	Run 1	100	41.04 ± 0.48
	Run 2	100	38.71 ± 3.78
42℃, 25% NaCl	Run 1	100	94.87 ± 2.51

クトルがアーキオールと比較して不鮮明であるなどの問題があった。今回，試料の分析を行った質量分析のスペクトルを Fig. 3 に示す。C_{25}-C_{20} 脂質の TMS 化体は C_{20}-C_{20} 脂質にくらべかなり長い保持時間を示した（Fig. 3A）。本条件で C_{20}-C_{20} 脂質 TMS 化体が 64.9 分，C_{25}-C_{20} 脂質の TMS 化体が 89.7 分で検出された。なお同一条件で C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38} Hydrocarbon 標準物質を測定しており，それぞれの保持時間は，30.2, 35.1, 39.8, 44.2, 48.3, 52.5, 57.9 分であった。フラグメントイオンは Teixidor の示すものと若干異なり，*m/z* 600 以下において最大の質量となる強いピークは *m/z* 482 にあった（Fig. 3C）。これは C_{20}-C_{20} 脂質（アーキオール）での *m/z* 412（$(M-C_{20}H_{41}OCH_3)^+$）に対応し（Fig. 3B），これより C_5H_{10} すなわち分子量で 70（$=C_5H_{10}$）大きいものであると考えられる。その他フラグメントは *m/z* 200 以上では 278, 369, 426 の 3 つが顕著であり，これらは C_{20}-C_{20} 脂質と C_{25}-C_{20} 脂質で共通であった。Teixidor らの研究と同様に，これらはそれぞれ $C_{20}H_{38}^+$，$(C_{20}H_{41}O+Si(CH_3)_3-H)^+$, $(M-C_{20}H_{41}OH)^+$ であると思われる。そして C_{25}-C_{20} 脂質として特徴的で，しかも十分な強度をもつものはごく少なかった。ここで示したフラグメンテーションイオンの生成の予想図を Fig. 4 に示した。これは C-2 位エーテル周りでの切断（a, b）では，生じるフラグメントイオンが共鳴安定化され，それぞれのイオンが観測されやすい一方，C-3 位エーテルは C-O 結合の単純切断に優先して，6 員環遷移状態をとるトリメチルシリル基の転位反応が進行し（c），元々イソプレノイド鎖とエーテル結合はしていないトリメチルシリル基を持つ 369 のフラグメントイオンが生じ，さらにこれより 278 のフラグメントイオンが生じるものと考えると C_{25}-C_{20} 脂質に特徴的なイオンが少ないことが理解できる。Teixidor らは C_{25}-C_{20} 脂質の C_{25} イソプレノイドがグリセロール C-3 位に結合した構造式が示されているがこれは誤りで，実際は C-2 位に結合している。彼らの記述には C_{25}-C_{20} 脂質に特徴的なピークが必要以上に挙げられていると思われ，これは構造式の誤解より生じる問題かもしれない。いずれにせよ本実験の結果より *m/z* 482 が本化合物検出の鍵になると思われる。

一方，GC 分析での定量性は Teixidor らの指摘にもあるように，通常のカラムにおいて C_{20}-C_{20} 脂質が十分な強度で分析できる場合でも C_{25}-C_{20} 脂質の強度は十分ではなく広幅化も見られた。Fig. 3A のピークは *N. pallidum* の通常培養条件での脂質組成のものであり本来 C_{20}-C_{20} 脂質と C_{25}-C_{20} 脂質は約 3：2 で見られるはずだが，C_{25}-C_{20} 脂質が実際は少なく見積もられてしまう（ピーク強度で約 3：1）。これは ESI-MS の結果が誤りであるというわけではない。*N. pallidum* の C_{20}-C_{20} 脂質と C_{25}-C_{20} 脂質混合物は直接導入の EI スペクトルで分子イオンを検出することが可能であり，さらにこのとき通常培養条件で得られる脂質混合物中の各脂質コア成分の比は，ESI-MS 分析の結果に同様で C_{20}-C_{20} 脂質と C_{25}-C_{20} 脂質の比がおおよそ 3：2 であった（Yamauchi *et al.*, 2000）。これはアーキオール分析と同じ条件では C_{25}-C_{20} 脂質は見過ごしてしまう可能性があり，この化合物を分析するために GC 条件等（気化器や検出器温度をあげるなど）を最適化する必要があると思われる。しかし，本実験条件においても，もしアーキオールの 1/3 程度の C_{25}-C_{20} 脂質が存在すれば検出が可能であると思われ，フィールド試料で本化合物を見

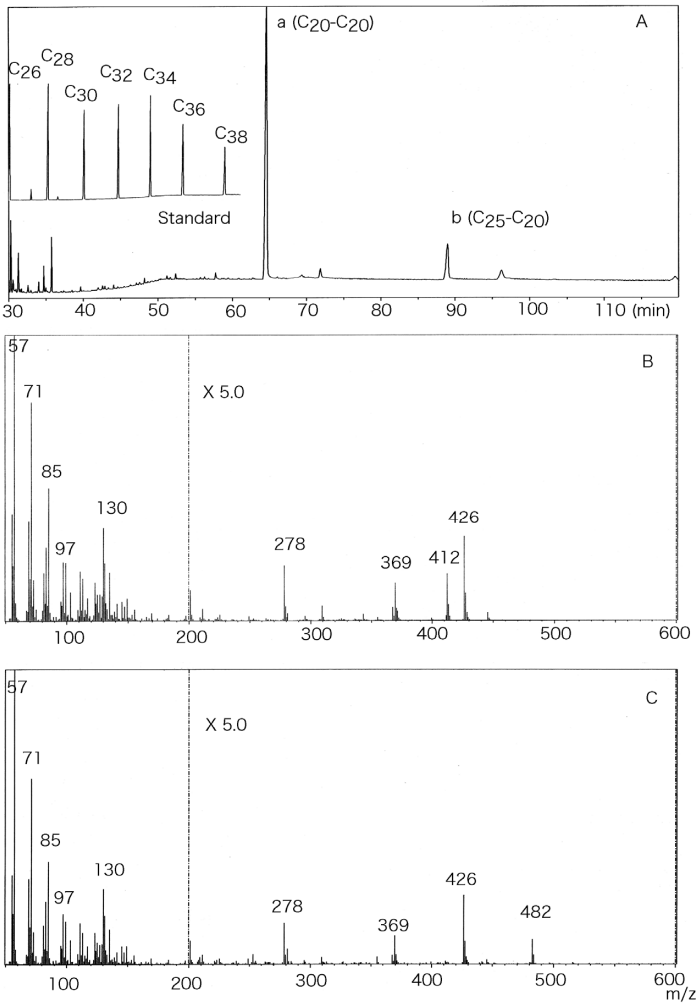

Fig. 3. GC and GC-MS spectra of the trimethylsilyl (TMS) ether of C_{20}-C_{20} and C_{20}-C_{25} diether lipid core. A: GC profile (with a part of chromatographic chart of hydrocarbon standards (upper)), B: Mass spectrum of C_{20}-C_{20} diether lipid core-OTMS, C: Mass spectrum of C_{25}-C_{20} diether lipid core-OTMS.

るには十分（アーキオール TMS 化体検出後 30 分以上）時間を待って，*m*/z 482（C_{25}-C_{20} 脂質に特徴的）と *m*/z 426（アーキオールと C_{25}-C_{20} 脂質両方に特徴的）を指標に探索すれば検出できる可能性があることを示している。

5. 考　　察

好塩性アーキアは高塩濃度環境にはしばしば見られ，環境中に一般的に存在、生育している。C_{25}-C_{20} 脂質の割合が変化するという結果は，他の菌株ではどうなるか，より低温側，また今回の条件を補完する条件，pH 変化の影響などの実験が必要と思われる。しかし，本実験で見る限り，その中の代表的な一菌株においては，どんな条件でも C_{25}-C_{20} 脂質は生産される。海水の pH を考えると，沿岸域等で，高塩濃度環境となる場所で，より C_{25}-C_{20} 脂質の割合の多いとされる好アルカリ性好塩性アーキアの存在も十分に考えられる。好塩性アーキアのバイオマスにおける寄与の割合は未知であり，TMS 化体の GC 分析の感度には難があるものの，高塩濃度環境の指標として好塩性アーキアに特徴的な C_{25}-C_{20} 脂質を少し注目して

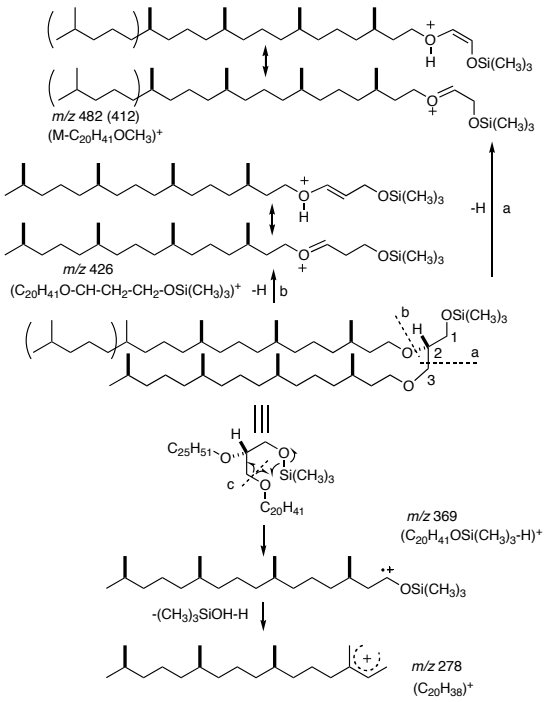

Fig. 4. Proposed fragmentation of the trimethylsilyl (TMS) ether of C_{20}-C_{20} and C_{20}-C_{25} diether lipid core.

よいのではと考えられる。近年，好冷性アーキアが南極圏の塩湖より発見され，その低温耐性は注目度が高く，詳しく研究が行われている（Nichols *et al.,* 2004, Cavicchioli, 2006）。極性脂質の主成分が，低温（4℃）で不飽和イソプレノイド脂質を多く生産し，高温（23℃）では飽和イソプレノイド脂質を多く生産することより，脂質成分比変化が，本菌での直接的な低温耐性の一つとしてあげられている。今後 C_{25}-C_{20} 脂質の成分比変化が高塩濃度での耐性機構として注目される可能性も十分にあると思われる。

謝　辞

この論文に際し，様々なご教示とご指摘をいただきました ROG 編集委員の山本正伸先生ならびに匿名の査読者の方々に深謝いたします。

引用文献

Ashcroft A. E. 著　土屋，横山　訳（1999）有機質量分析イオン化法　第 2 章　大気圧イオン化法：エレクトロスプレーイオンかと大気圧化学イオン化　30-67 丸善

Cavicchioli R. (2006) Cold-adapted archeae *Nature* **441**, 331-343.

Cech N. B. and Enke C. G. (2001) Practical implications of some recent studies in electrosplay ionization fundamentals *Mass Spectrometry Reviews*. **20**, 362-387.

Chapman J. R. 著　土屋，田島，平岡，小林　訳（1995）有機質量分析法　第6章　不安定物質のイオン化法（その 2）181-216 丸善

Cole R. B. and Zhu J. (1999) Chloride anion attachment in negative ion electrospray ionization mass spectrometry *Rapid Comm. Mass Spectrom*. **13**, 607-611.

De Rosa M., Esposito E., Gambacorta A., Nicholaus B., and Bu'Lock J. D. (1980) Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella acidophilla*. *Phytochemistry* **19**, 827-831.

De Rosa M., Gambacorta A., Nicolaus B., Ross H. N. M., Grant W. D. and Bu'Lock J. D. (1982) An asymmetric archaebacterial diether lipid from alkaliphilic halophiles. *J. Gen. Microbiol*. **128**, 343-348.

Ferrante M., Ekeil I, Girishchandra B. P. and Sprott G. D., (1998) A novel core lipid isolated from the acetilastic methanogen, *Methranithrix concilii* GP6. *Biochim. Biophys Acta* **963**, 173-182.

Gliozzi A., Paoli G., De Rosa M. and Gambacorta A. (1983) Effect on isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaebacteria. *Biochim. Biophys. Acta*. **735**, 234-242.

Hinrichs K-W., Hayes J. M., Sylva S. P., Brewer P. G. and Delong E. F. (1999) Methane-consuming archaebacteria in marine sediments. *Nature* **398**, 802-805.

Hinrichs K-W., Summons R. E., Orphans V., Sylva S. P. and Hayes J. M. (2000) Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Organic Geochemistry* **31**, 1685-1701.

Kates M. (1997) Diether and tetraether phospholipids and glycolipids as moleculae markers for archaebacteria

(archeae) in *ACS Symposium Series 671. Molecular Markers in Envionmental Geochemistry.* Kobert P. Eganhouse Ed.American Chemical Society Washington D. C. 35-49.

Koga Y., and Nishihara M. (1991) Hydroxy-archaetidylserine and hydroxyarchaetidyl-myo-inositol in *Methanosarcina barker*i- polar lipids with a new ether core portion. *Biochim. Biophys. Acta*. **1082**, 211-217.

Koga Y. and Morii H. (2005) Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physioligical aspects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69,** 2019-2034.

Murae T., Takamatsu Y., Muraoka R., Endoh S. and Yamauchi N. (2002) Facile distinction of neutral and acidic tetraether lipids in archaea membrane by halogen atom adduct ions in electrospray ionization mass spectrometry *J. Mass Spectrom*. **37**, 209-215.

Nichols D. S., Miller M. R., Davies N. W., Goodchild A., Raftery M. and Cavicchioli, R. (2004) Cold adaptation in the antarctic archaeron *Methanococcolides burtonii* involves membrane lipid unsaturation. *J. Bacteriol*. **186**, 8508-8515.

Oba M., Sakata S. and Tsunogai U. (2006) Polar and neutral isopranyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry* **37**, 1643–1654.

Pancost R. D., Hopmans E. C. and Sinnighe Damsté, J. S., The MEDINAUT shipboard Scientific Party. (2000) Archaeal lipids in Mediterranean Cold Seeps: Molecular proxies for anaerobic methane oxidation. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **65**, 1611-1627.

Teixidor P. and Grimalt J. O. (1992) Gas chromatographic determination of isoprenoid alkylglycerol diethers in archaebacterial cultures and environmental samples *J. Cheromatography*. **607**, 253-259.

Teixidor P., Grimalt J. O., Pueto J. J. and Rodriguez-Valera F., (1993) Isopranylglycerol diethers in non-alkaline evaporitic environments *Geochim. Cosmochim. Acta*. **57**, 4479-4489.

Yamauchi N, Natsubori Y. and Murae T. (2000) Practical synthesis of [3-($^{2}H_{3}$) methyl] mevalonolactone and incorporation experiment of [3-($^{2}H_{3}$) methyl] mevalonolactone and [^{13}C] labeled acetate in the biosynthesis of isoprenoidal diether lipids of halophilic archaea. *Bull. Chem. Soc. Jpn*. **73,** 2513-2519.