



Title	二次代謝物で探るホヤのケミカルコミュニケーション
Author(s)	宮古, 圭
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14760号
Issue Date	2022-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14760">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14760</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/88266">https://hdl.handle.net/2115/88266</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Kei_Miyako.pdf



二次代謝物で探るホヤのケミカルコミュニケーション  
(Research on the functions of ascidian-derived secondary  
metabolites: Toward understanding of chemical  
communication in ascidians)

北海道大学大学院水産科学院

海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences

Division of Marine Life Science

宮古 圭

Kei Miyako

2022 年

# 目次

序論 .....	2
1. ホヤの生態 .....	2
2. ホヤのバナジウム濃縮 .....	5
3. ホヤ由来の二次代謝物 .....	11
一般実験項 .....	14
1. 機器分析 .....	14
2. 分離・精製 .....	16
3. 生理活性試験 .....	18
第1章 .....	23
蛍光血液を持つシロボヤモドキ <i>Cnemidocarpa irene</i> より得られた芳香族化合物 .....	23
1. 実験材料・方法 .....	26
2. 結果 .....	29
2-1. 抽出および化合物 <b>6-20</b> の分離・精製 .....	29
2-2. 化合物 <b>6-20</b> の構造決定 .....	37
2-3. 生理活性試験 .....	103
2-4. ホヤ血液およびライフステージ別ホヤの二次代謝物プロファイル .....	109
3. 考察 .....	112
第2章 .....	117
有害外来種ヨーロッパザラボヤ <i>Ascidella aspersa</i> に含まれる脂肪族硫酸エステル化合物 .....	117
1. 実験材料・方法 .....	121
2. 結果 .....	127
2-1. ヨーロッパザラボヤ組織別抽出物のメタボロミクス解析 .....	127
2-2. 抽出および化合物 <b>21-28</b> の分離・精製 .....	129
2-3. 化合物 <b>21-28</b> の構造決定 .....	133
2-4. ヨーロッパザラボヤにおける脂肪族硫酸エステル化合物の挙動 .....	166
2-5. 生理活性試験 .....	177
3. 考察 .....	180
総合考察 .....	184
謝辞 .....	187
参考文献 .....	188

## 序論

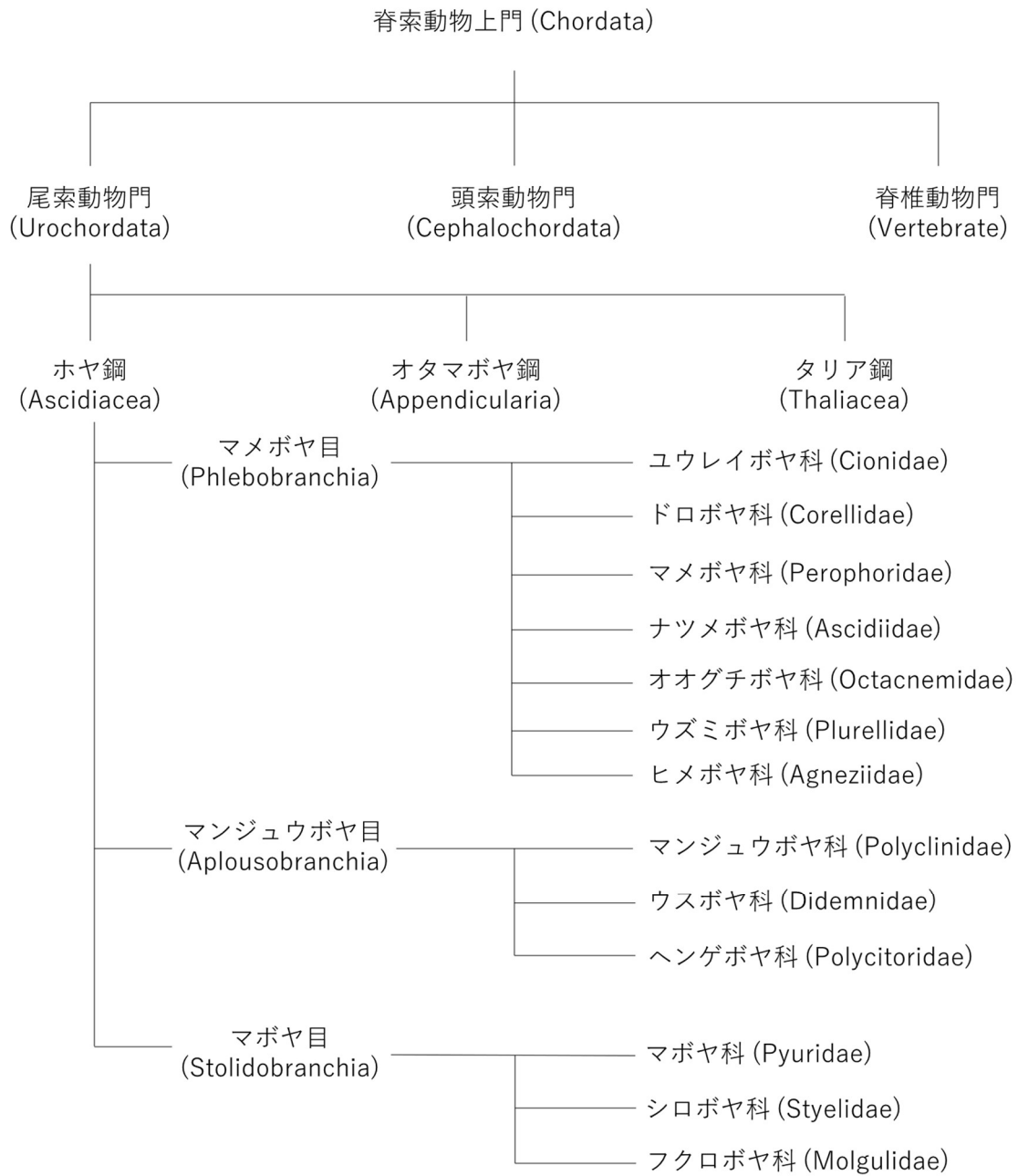
### 1. ホヤの生態

ホヤは脊索動物上門 (Chordata), 尾索動物門 (Urochordata) に属する海洋無脊椎動物であり, 分類学的には脊索動物への進化の分岐点に位置する (Figure 1). 浮遊幼生期に岩やロープなどの基質に付着し, 変態して成体となりその場で一生を過ごす (Figure 2, A). 系統学的分類とは無関係に単体性のホヤと群体性のホヤが存在し, 合わせて 2500 以上の種が知られている.<sup>1</sup> 幼生期のホヤはオタマジャクシ様の形態をとり, その尾部に脊索を持つ (Figure 2, B). 口や消化管に相当する器官が未発達であるため餌は食べない. 尾部の筋肉を動かして泳ぎまわり, 適切な基質に頭部の突起 (papilla, Figure 2, B) が付着すると変態を始める. 付着突起の吸収に始まり, 尾部が頭部 (trunk) に吸収されて脊索を失う. 次第に頭部内に消化管などの臓器が形成され変態が完了して幼若体となり, 餌を食べ始める.<sup>2</sup> ホヤの発生は非常に早く, カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) では受精から 2 日程度で変態が完了する. 餌の取り方は多くの固着生物と同様, ろ過食性であり海水中の植物プランクトンや有機物細片などを濾しとっている. ホヤの体制図を Figure 2C に示す (Shoguchi *et al.* 2011 より転載).<sup>3</sup> 入水口から海水を取り込んで鰓で餌を濾しとり, 出水口から海水が放出される. ホヤは雌雄同体で卵巣, 精巣から伸びた輸卵管, 輸精管が並走しており, 肛門とともに出水口に開いている. 卵, 精子, フンは水流に乗って出水口から放出される. 体全体が被囊 (外皮) で覆われており, ここにはツニシンと呼ばれる動物性セルロースが含まれている. 2002 年にカタユウレイボヤのドラフトゲノムが解読され,<sup>4</sup> ゲノム中にセルロース合成酵素遺伝子が同定された.<sup>5-6</sup> 被囊の内部には筋膜体が存在し, 胃, 腸, 心臓, 生殖巣などの臓器を筋膜体が包み込んでいる. 私たちが日本で食用として口にする「ホヤ」は内臓を取り除いたマボヤ (*Halocynthia roretzi*) やアカボヤ (*Halocynthia aurantium*) の筋膜体である. 筋膜体と内臓組織の隙間部分には体腔液 (血リンパ液) が流れており, 数種類の血球細胞を含んでいる. 血球細胞および体腔液には様々な生理作用が報告されており, マボヤでは血漿に含まれるガ

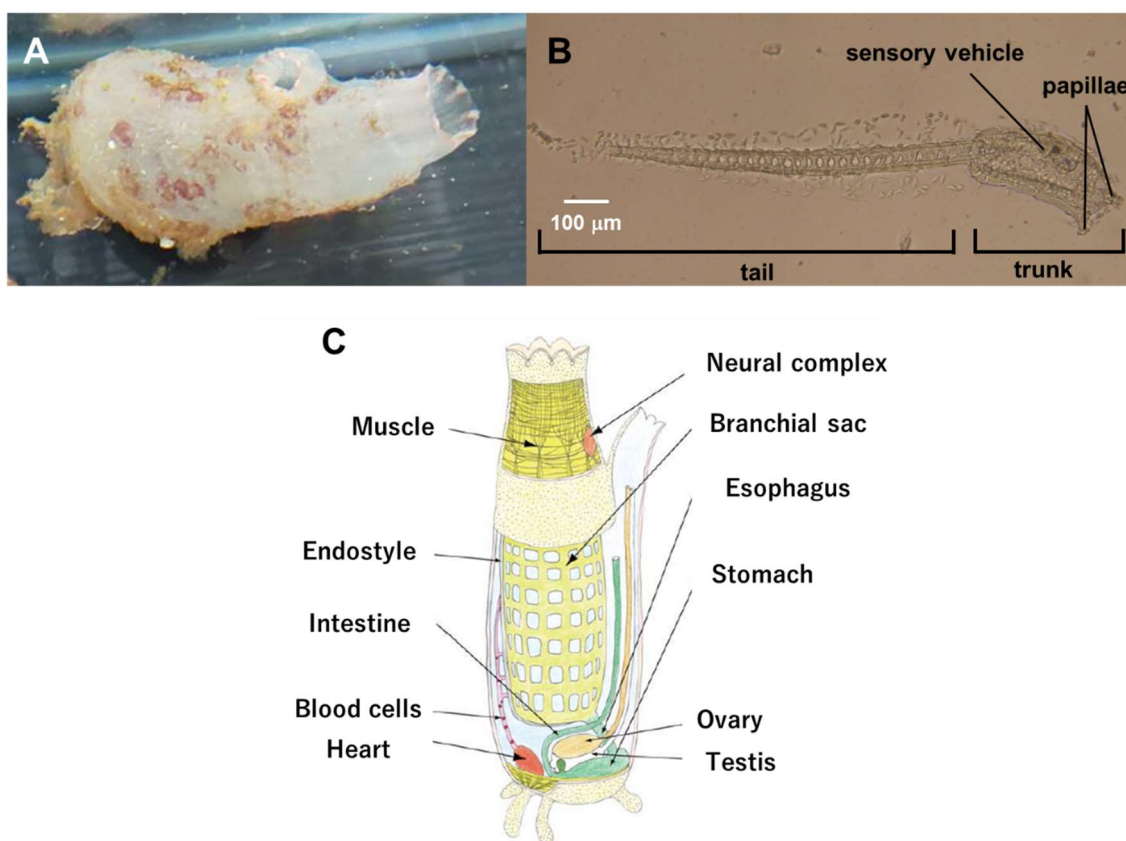
ラクトース特異的レクチンは異物に結合して食作用を受けやすくするオプソニン作用を示すほか,<sup>7</sup> 血球細胞に抗菌ペプチド halocytamine 類<sup>8</sup> やメラニン生成, 抗菌作用に関わると考えられるフェノール水酸化酵素が含まれており,<sup>9</sup> これらは体腔液中で液性防御物質の役割を持つと考えられている. マメボヤ目 (Phlebobranchia) のホヤは血球細胞に高濃度のバナジウムを含み, その濃度は海水の 1,000 万倍にもなる.<sup>10</sup> これほどにバナジウムを含む動物はゴカイの一種<sup>11</sup> を除きホヤ以外に例がなく, 多くの研究者の興味を引き, 盛んに研究が進められてきた. ホヤのバナジウム濃縮については次節で詳しく述べる.

このように興味深い生命現象を示すこと, 重要な系統学的位置を占めること, 発生の早さに加えて幼生の体のつくりが単純であり, かつゲノムサイズがコンパクトであることから進化, 発生, 免疫, 神経系の研究分野でモデル生物として研究材料に用いられている.<sup>10</sup>

一方, 水産業においては第 2 章で研究対象としたヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*) のように養殖二枚貝などに付着・増殖し, 漁業被害をもたらす有害生物としての一面を持つ.<sup>12</sup> 現場では早急な対策が望まれているが, ヨーロッパザラボヤの生理・生態は不明な点が多く, 有効かつ効率的な駆除法は見出されていない.



**Figure 1.** Phylogenetic chart of Chordates.



**Figure 2.** (A) Adult, (B) larva of the ascidian *Ascidiella aspersa* and (C) schematic body structure of ascidians.<sup>3</sup>

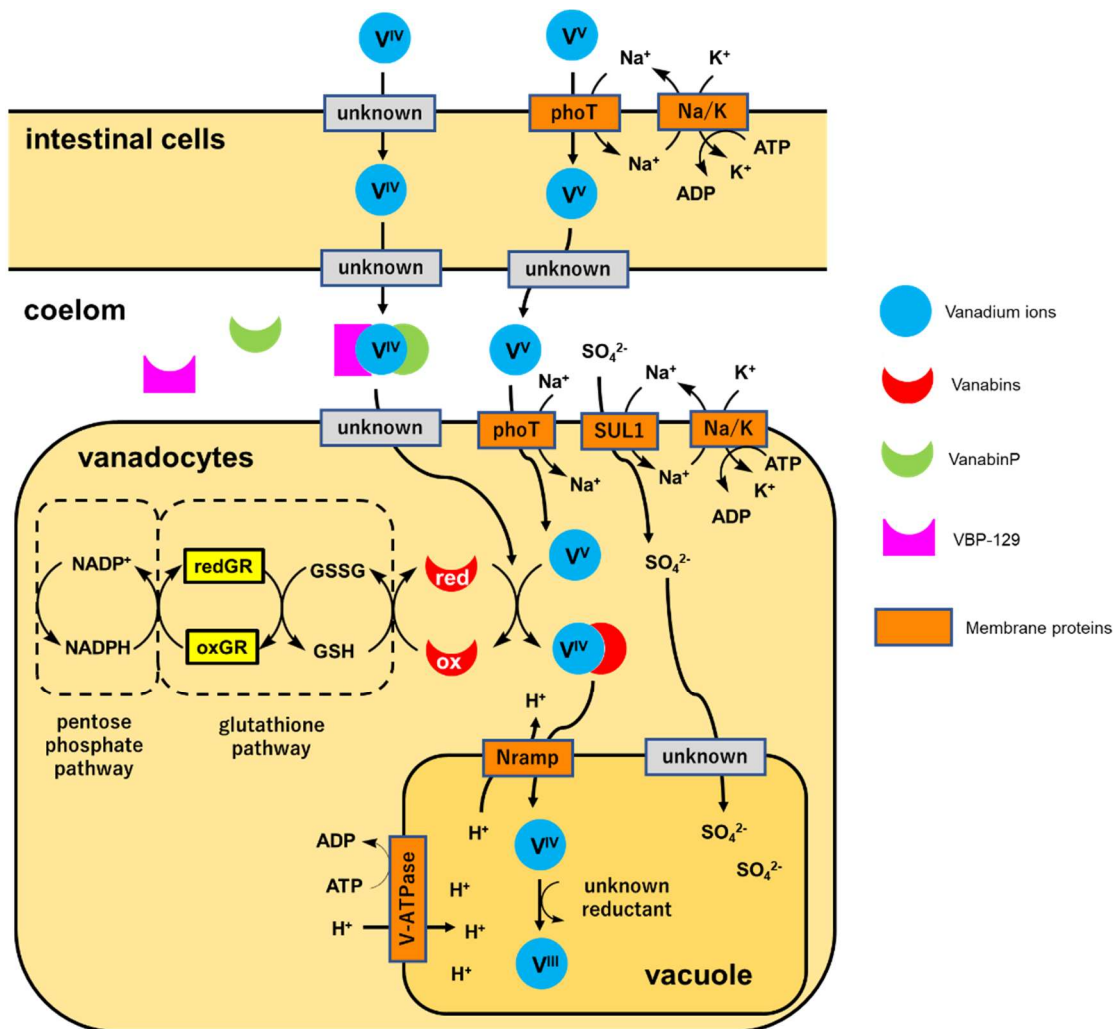
## 2. ホヤのバナジウム濃縮

バナジウムは原子番号 23 番の元素で、鉄や銅と同様、第 1 系列主遷移金属に属する典型的な金属としての特徴を持つ。バナジウムは生理的条件下で容易に酸化状態を変え、多数の酸化数をとる。5 価の酸化状態 ( $V^V$ ) ではアニオン型  $VO_3^-$  (メタバナジン酸イオン),  $VO_4^{3-}$  (バナジン酸イオン) として、4 価の酸化状態 ( $V^{IV}$ ) ではカチオン型  $VO^{2+}$  (バナジルイオン) として存在する。ヒトは食事を通してバナジウムを摂取しており、体内に常に少量のバナジウムが存在する。バナジウムの生理活性としてはインスリン様活性やアドレナリン様活性などが知られているが、<sup>13-14</sup> 現在のところヒトにおけるバナジウム必須性については明らかではない。

## 2-1. ホヤに含まれるバナジウムの発見

前述とおり，マメボヤ目 (Phlebobranchia) に属するホヤは血球細胞中に高濃度のバナジウムを含む。驚くべきことにバナジウムボヤ (*Ascidia gemmata*) の血球細胞には 350 mM ものバナジウムが含まれており，これは海水中 (35 nM) の 1000 万倍にも上る。さらにホヤの血球細胞に濃縮されたバナジウムは不安定な 3 価の酸化状態 ( $V^{III}$ ) で存在する。<sup>10</sup> ホヤはなぜ，そしてどのようにしてバナジウムを海水中から取り込んで還元，濃縮するのか？これらの疑問を明らかにしようとする研究は約 100 年前に遡る。

1911 年，ドイツ人の生理化学者である Henze らによって初めてナツメボヤ科のホヤ *Phallusia mammillata* の血球細胞に高濃度のバナジウムが含まれることが報告された。<sup>10</sup> この発見は多くの研究者の興味を惹き，系統的に脊椎動物と無脊椎動物の間に位置するホヤが進化の過程で呼吸色素における金属元素の選択性が変化し，鉄，銅に替えてバナジウムを利用しているのではないかと考えられたが，のちの研究でその可能性は否定された。<sup>15</sup> また，Henze らはバナジウムの存在に加え，血球細胞には硫黄元素が多く含まれること，ホモジネートは極端な酸性を示すことを見出した。<sup>10</sup> 日本においてもホヤのバナジウム濃縮に関する研究が精力的に行われてきた。道端らは日本各地およびヨーロッパに生息するホヤを採集し，バナジウムの分布，含有量を調査した結果，マメボヤ目 (Phlebobranchia) のホヤにバナジウムが多く含まれており，マボヤ目 (Stolidobranchia) のホヤには少ないことを見出した。<sup>16</sup> さらに，バナジウム濃縮細胞 (バナドサイト) はシグネットリング細胞と呼ばれる指輪状の形をした特定の血球細胞であり，そこに  $V^{III}$  とともに硫酸イオンが濃縮されていること，バナドサイトの液胞内が極端な酸性であることを明らかにした。<sup>10</sup> この発見を契機に研究が加速し，現在では **Figure 3** に示すようなホヤのバナジウム濃縮モデルが提唱されている (Ueki, *et al.* 2015 より改変)。<sup>10</sup> 次にこのモデルが提唱されるうえでカギとなった研究について述べる。



**Figure 3.** Proposed model for vanadium uptake, transport, reduction by vanadocytes.<sup>10</sup> Red, vanabins; red, reduced form; ox, oxidized form. Green, vanabinP. Magenta, VBP-129. Orange, membrane protein. Yellow, glutathione reductase.

## 2-2. バナジウムの取り込み・輸送

ホヤはどのようにして海水中からバナジウムを取り込んでいるのだろうか？そして取り込んだバナジウムをどのようにしてバナドサイトへ、さらには液胞内へと輸送しているのだろうか？海水からの取り込みについては未だ不明な点が多いが、バナドサイト内でのバナジウムの輸送についてはバナジウム濃縮機構に重要な役割を持つと考えられるタンパク質が同定されている。

ホヤが海水中からバナジウムを取り込むことは 1951 年, Goldberg らによって初めて実験的に示された。放射同位体  $^{48}\text{V}$  を用いた取り込み実験により、鰓、腸管壁、卵および卵巣へのバナジウムの取り込みが確認された。加えてリン酸イオン存在下ではバナジウムの取り込みが抑制されることを見出した。<sup>17</sup> 海水中のバナジウムは主に 5 価の酸化状態であるバナジン酸イオン ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ,  $\text{HVO}_4^{2-}$ ) として存在すると考えられており、その化学種の存在比は低濃度ではリン酸イオン ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) とよく似た pH 依存性を示す。<sup>10</sup> さらに糸状菌 *Neurospora crassa* においてリン酸トランスポートシステムを介した  $\text{V}^{\text{V}}$  の取り込みが報告されていることから、<sup>18-19</sup> ナトリウム依存性リン酸トランスポーターがホヤにおける  $\text{V}^{\text{V}}$  の取り込みを担う候補タンパク質とされている。スジキレボヤの消化器官からはグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 様のバナジウム結合タンパク質 *AsGST-I*, *AsGST-II* が見出されており、<sup>20</sup> ホヤにおけるその分布からバナジウム取り込みへの関与が推察されている。スジキレボヤ腸内からバナジウム耐性菌が単離され、さらにこのうち 2 種の細菌株はバナジウムを濃縮・還元する能力を持つことから、これらの細菌がホヤのバナジウム取り込みに寄与している可能性が示唆されている。<sup>21</sup> しかしながらいずれのタンパク質・細菌においてもホヤのバナジウム取り込みに関わることを実験的に示した例はない。

バナドサイト液胞内は酸性に保たれており、バナジウムボヤでその pH は 1.86 である。<sup>10</sup> 液胞膜上には液胞型 ATPase (V-ATPase) が発現、機能しており、液胞内へプロトンを取り込んでいる。<sup>22-23</sup> さらにスジキレボヤ (*A. sydneiensis samea*) のバナドサイトの液胞膜上には金

属イオン輸送タンパク質 Nramp/DCT1 ファミリーに属する *AsNramp* が同定されている。このファミリーのタンパク質はプロトンの濃度勾配を駆動力として 2 価金属イオンを輸送する。<sup>24</sup> アフリカツメガエルの卵母細胞において *AsNramp* はプロトンと共役して  $V^{IV}$  を細胞内に取り込むことが確認された。<sup>25</sup> これらの結果からバナドサイトでは V-ATPase によって液胞内にプロトンが濃縮され、その濃度勾配をエネルギーとして *AsNramp* が  $V^{IV}$  を液胞内へ取り込んでいると考えられている。<sup>10</sup> バナドサイトにはバナジウム、プロトンに加えて硫酸イオンも高濃度に含まれているが、この取り込みに関与するタンパク質として硫酸イオントランスポーター *slc13* ファミリーに属する *AsSUL1* が同定された。<sup>26</sup> *AsSUL1* はナトリウムイオンとのアンチポートにより硫酸イオンをアフリカツメガエルの卵母細胞内へ取り込むことが確認された。バナドサイト内に取り込まれた硫酸イオンはさらに液胞内へと輸送され、蓄えられていると考えられるが、輸送に関わるタンパク質や硫酸イオンの生理的役割については不明であり、今後の研究が待たれる。

### 2-3. バナジウムの還元とバナジウム結合タンパク質

生体内で 3 価に還元されたバナジウム ( $V^{III}$ ) が安定に存在することは化学的に異例である。海水中で 5 価の陰イオン ( $V^V$ ;  $H_2VO_4^-$ ,  $HVO_4^{2-}$ ) で存在するバナジウムは 3 価 ( $V^{III}$ ;  $V^{3+}$ ) に還元されてバナドサイトに濃縮されている。この還元反応に関わるタンパク質が発見されており、ホヤにおけるバナジウム還元機構が紐解かれつつある。

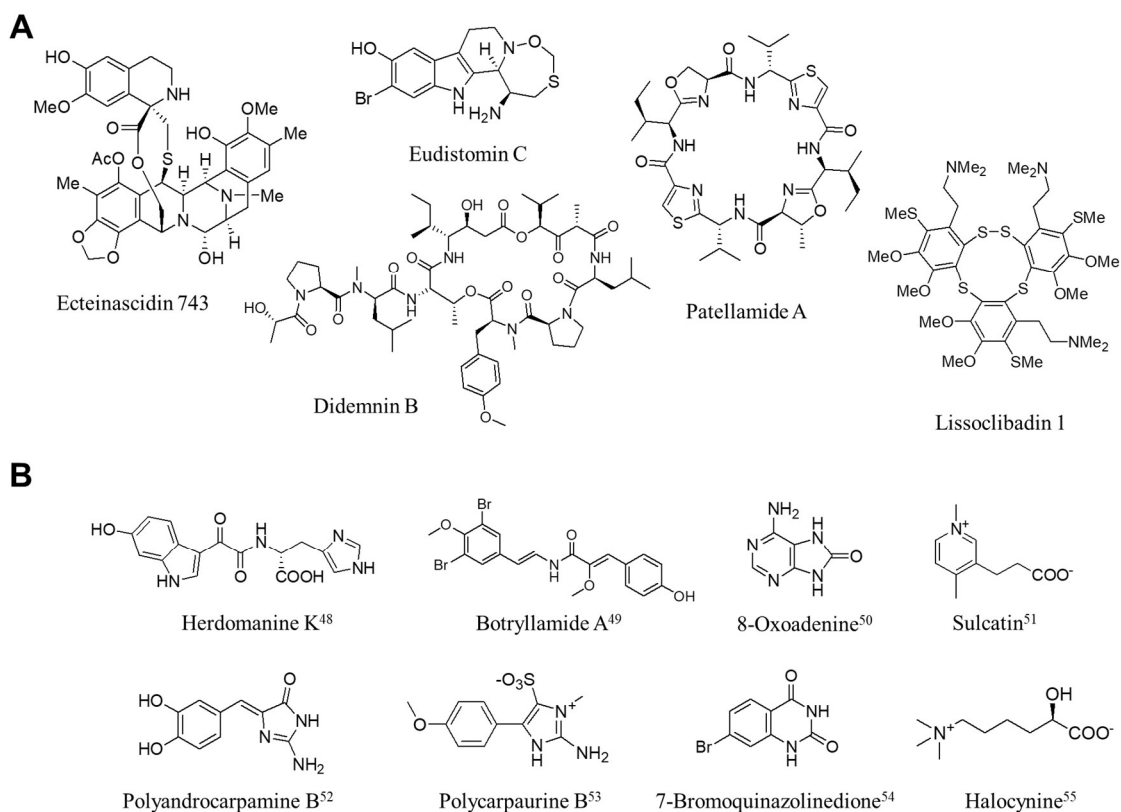
道端らはスジキレボヤ (*Ascidia sydneiensis samea*) の体腔液からバナジウム結合タンパク質 (Vanabin1~4, VanabinP, VBP-129) を見出した。<sup>27-30</sup> Vanabin-1~4 はバナドサイト細胞質に、VanabinP および VBP-129 は血漿中に含まれる。これらのタンパク質のアミノ酸配列と相同性を示す既知のタンパク質は存在せず、新規のタンパク質として同定された。Vanabin ファミリータンパク質は分子量 12.5-20 kDa のバナジウム結合タンパク質であり、非常によく保存された 18 個のシステイン残基を含む特徴的なモチーフを持つ。 $V^V$  ( $VO_4^{3-}$ ) との結合は弱

く,  $V^{IV}$  ( $VO^{2+}$ ) と結合する.<sup>31</sup> Vanabin-2 はバナジウム結合能に加えて, NADPH, グルタチオン還元酵素, グルタチオンの存在下,  $V^V$  を  $V^{IV}$  へと還元することが明らかとなった.<sup>32</sup> またチオレドキシンが還元カスケードに関わる可能性も示唆されている.<sup>33</sup> バナドサイト細胞質にはペントースリン酸経路の酵素が複数確認されており,  $V^V$  の還元においてペントースリン酸経路が NADPH の供給源として機能している可能性が高い.<sup>34-35</sup> 一方で VBP-129 は Vanabin ファミリータンパク質を含めた既知のタンパク質と相同性を示さない分子量 12.3 kDa の新たなバナジウム結合タンパク質であり, アミノ酸残基数 (129 残基) からこのように名付けられた. VBP-129 は同じく血漿中に存在する VanabinP と相互作用することが示唆されており, VBP-129-VanabinP 複合体を形成してバナジウムの輸送を担うと考えられている.<sup>10, 30</sup>

還元された  $V^{IV}$  は中性水溶液中では不安定であり  $V^V$  へと酸化されてしまう. したがって血漿中では VBP-129-VanabinP 複合体が, バナドサイト細胞質中では Vanabin1~4 が  $V^{IV}$  に結合することで生理的 pH でも  $V^{IV}$  が安定に存在できると考えられている. バナドサイトに含まれるバナジウムの 97.6% は  $V^{III}$  で存在し,<sup>10</sup>  $V^{III}$  もまた生理的 pH では不安定であるため, 細胞質で生成した  $V^{IV}$  は最終的に低 pH のバナドサイト液胞内に輸送されたのちに還元されると考えられるが,  $V^{IV}$  還元物質およびそのメカニズムは未だ不明である.

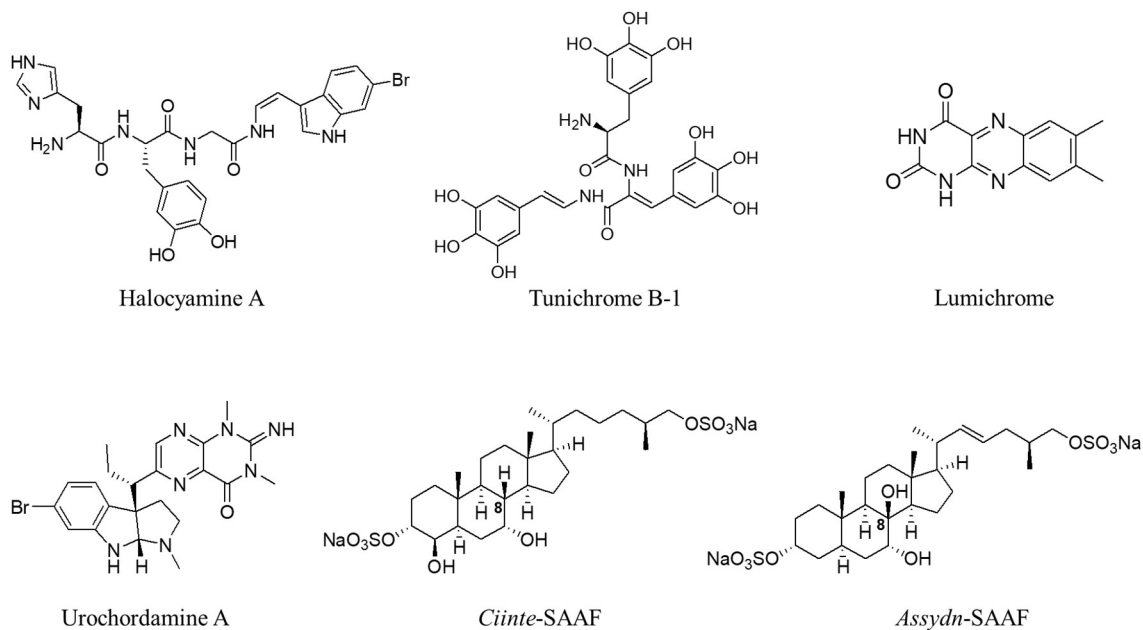
### 3. ホヤ由来の二次代謝物

ここまで述べてきたようにホヤは系統学に重要な生物であり、かつユニークな生命現象を示す、研究対象として非常に魅力的な生き物である。一方で天然物化学分野においては生理活性物質の有用な探索源として広く認識されており、これまでに約 1300 種の二次代謝物が報告されている (Marinlit, 2021. 12.12)。このうち 1116 の化合物はマメボヤ目 (Phlebobranchia)、またはマンジュウボヤ目 (Aplousobranchia) のホヤに由来する。これらの二次代謝物は細胞毒性、抗ガン活性、抗菌・抗真菌活性、抗ウイルス活性、酵素阻害活、神経活性など多様な生理活性を示す。<sup>36-40</sup> 代表的な化合物として、ヨンデリスの商品名で悪性軟部腫瘍の治療薬として承認されている ecteinascidin743,<sup>41</sup> 海洋天然物として初めて臨床試験が行われた抗腫瘍性化合物 didemnin B,<sup>41</sup> ガン細胞の多剤耐性を抑制する patellamide 類,<sup>42</sup> 抗ウイルス性化合物 eudistomin 類,<sup>43-44</sup> 抗腫瘍性ポリサルファアルカロイド lissoclibadin 1<sup>45</sup> などが挙げられる (Figure 4, A)。これらは創薬科学の発展に寄与してきた重要な化合物である。これらの化合物はマメボヤ目またはマンジュウボヤ目に属する群体性のホヤから得られており、ホヤの共生細菌によって生合成されると考えられている化合物が多い。<sup>42,46-47</sup> 他方、食用とされるホヤを含むマボヤ目 (Stolidobranchia) のホヤから得られた化合物は比較的少なく (163 種)、また一次代謝物がわずかに修飾されたシンプルな構造を持つ化合物が多い (Figure 4, B)。<sup>48-55</sup>



**Figure 4.** Secondary metabolites derived from ascidians belonging to (A) Phlebobranchia and (B) Stolidobranchia.

ホヤから得られた二次代謝物は主に医薬品開発など有用資源としての利用を目的とした研究の中で見出されており、ホヤの代謝物研究の多くは構造と生理活性の報告に終わっているため、ホヤとその生態系における機能・役割について知られている二次代謝物は極めて少ない。しかし、ホヤ血球に含まれる抗菌ペプチド halocyanine 類,<sup>8</sup> 3,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニン (TOPA) 含有ペプチド tunichrome 類,<sup>56-58</sup> マボヤ幼生の着生・変態を促進する lumichrome,<sup>59</sup> urochordamine A,<sup>60</sup> 精子誘引・活性物質 SAAFs (Sperm-Activating and Attracting Factor)<sup>61-64</sup> など一部の二次代謝物ではホヤの生理に重要な機能を果たすことが示唆されている (Figure 5)。



**Figure 5.** Secondary metabolites thought to be involved in ascidian physiology.

多様な動植物や微生物で構成される生物圏において二次代謝物が重要な役割を持つ可能性が高い。したがって、二次代謝物の機能解明はホヤの生理・生態を理解、さらにはホヤの生態をコントロールする技術の開発につながることを期待される。

本研究ではホヤに含まれる二次代謝物の構造・生理活性のみならず、ホヤにおける分布など、化合物の生物学的側面を調べることで二次代謝物の機能、さらにはホヤの生命現象の解明に迫る手掛かりを得ることを目的とし、系統的に異なる 2 種類のホヤを対象に研究を行った。

## 一般実験項

### 1. 機器分析

#### 1-1. 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS)

送液ポンプには Nexera X2 LC-30AD (島津製作所, 京都), オートサンプラー Nexera X2 SIL-30AC (島津製作所), コントローラー CBM20A (島津製作所), カラムオープン CTO20-AC (島津製作所), 脱気ユニット DGU-20A<sub>5R</sub> (島津製作所), 質量分析計 Triple TOF 5600<sup>+</sup> (ABsciex, 東京), バルブ EC2A (VICI Valco Instruments Co.Inc, Brockville) で構成される LC/MSMS システムを用いた. カラムとして Inertsil ODS-3 (2.1×100 mm, GL-Science, 東京)を用い, 溶離液を 0.2 mL/min で溶出させた. 溶離液には H<sub>2</sub>O-MeOH 混合液, 0.1%ギ酸 (v/v) を用いた. カラムオープンを 30°C-50°Cに設定した. 質量分析計は TOF-MS および MS/MS (Product ion scan), 極性はポジティブで測定し, 状況に応じてネガティブで測定した. Mass range および Collision Energy (CE) は任意の値に設定した. 移動相, および LC-MS サンプルの調製溶媒には LC-MS グレードの水, メタノール, 2-プロパノール (富士フィルム和光純薬, 大阪)を用いた.

#### 1-2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化型質量分析計 (MALDI-TOF-MS)

AB4700 spectrometer (Applied Biosystems, CA) を用いて測定を行った. マトリックスとして gentisic acid (GA) を用い, acetonitrile : H<sub>2</sub>O = 60 : 40, 0.1% trifluoroacetic acid (v/v) に溶解し 10 mg/mL に調整した. GA と試料 1 mg/mL をそれぞれ 0.5 μL ずつプレート上で混合し, 凍結乾燥により測定試料を乾固させて測定した.

### 1-3. イメージング質量分析

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (FT-ICR MS; Solarix, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を用いて測定を行った。クライオスタット CM1950 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 40  $\mu\text{m}$  のホヤ凍結切片を作成し、導電性の ITO (Indium Tin Oxide) コートスライドガラス上に固定した。切片表面にマトリックスとして 50%メタノールに溶解した 9-アミノアクリジン塗布したものを測定試料とし、ネガティブモードで測定した。

### 1-4. 核磁気共鳴スペクトル (NMR)

NMR の測定は, JNM-ECZ400S/L1 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, 日本電子, 東京) を用いて行った。試料管として, Standard Grade NMR tube 5 $\times$ 7 inch (関東化学, 東京) を使用した。重水素溶媒は deuterium oxide (99.8 %D, 関東化学), deuterium oxide (99.9 %D, メルク, Darmstadt), methanol- $d_4$  (99.8 %D, メルク), dimethyl sulfoxide- $d_6$  (99.9 %D, 関東化学) を使用した。化学シフトの基準値は  $^1\text{H}$  NMR で HDO  $\delta_{\text{H}}$  4.65,  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta_{\text{H}}$  3.30,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$   $\delta_{\text{H}}$  2.49 ppm に,  $^{13}\text{C}$  NMR で  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta_{\text{C}}$  49.5,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$   $\delta_{\text{C}}$  39.5 ppm に設定した。 $\text{D}_2\text{O}$  測定の際は内部標準として  $\text{CD}_3\text{OD}$ , または  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  を 5~10  $\mu\text{L}$  添加し, それを基準値とした。

### 1-5. IR スペクトル

FT/IR-4200 (日本分光, 東京) を用いて KBr ペレット法で測定した。

### 1-6. 紫外線 (UV) 吸光スペクトル

マイクロプレートリーダー (Spectra Max M2, Molecular Devices, CA) を用いて 200-400 nm, 200-450 nm における 1 nm ごとの吸光度を測定した。セルには石英ブラックマイクロ (10 $\times$ 4 $\times$ 45 mm) を用いた。ランベルト・ベールの法則に従い, モル吸光係数 ( $\log \epsilon$ ) を算出した。ブ

ランクには溶媒 (水, メタノール, 0.01 M HCl) の測定値を用いた.

#### 1-7. 旋光度

P-2200 Polarimeter (日本分光) を用いて測定した. セルには円筒型ガラスセル (10×100 mm) を用いた.

#### 1-8. 円偏光二色性 (CD) スペクトル

J-725 Spectropolarimeter (日本分光) を用いて 190~450 nm における 1 nm ごとの楕円率を測定した. セルには光路長 1 mm の角形石英セルを用いた. ブランクには溶媒 (水, または 0.01 M HCl) の測定値を用いた.

### 2. 分離・精製

#### 2-1. 透析

透析膜は透析用セルロースチューブ (UC36-32-100, 透過分子量約 14,000, 孔径 50 Å, 三光純薬, 東京) を用いた.

#### 2-2. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC は順相プレート (silica gel 60F<sub>254</sub>, MERCK) を用いて CHCl<sub>3</sub> : MeOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 40 : 20 : 2 : 4 (v/v) (sharper), 2-PrOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 6 : 1 : 1 (v/v) (糖 Mix) を展開溶媒として用いた. スポットの確認には紫外線ランプ (254 nm, 365 nm), ニンヒドリン溶液 (5% EtOH) を用いた.

### 2-3. カラムクロマトグラフィー

カラムは Econo column (サイズ 1.5×75 cm, 1.5×170 cm, 2.5×50 cm, 2.5×120 cm, 5×30 cm, 5×70 cm, Bio-Rad, CA) を用いた。担体は Sephadex LH-20 (粒子径 18-111 μm, GE Healthcare, IL), TOYOPERAL HW-40F (粒子径 45 μm, 東ソーバイオサイエンス, 東京), TOYOPERAL HW-40S (粒子径 30 μm, 東ソーバイオサイエンス, 東京), Spherical C18 300 Å (粒子径 20-45 μm, SILICYCLE, Quebec), Wakogel 100C18 (粒子径 63-212 μm, 和光純薬工業) を用いた。送液ポンプ (PU980 intelligent Pump, 日本分光) を用いて、流速 0.2-2.5 mL/min で溶出し、フラクシヨコレクター (SR-212N, 日本分光) を用いて 2-10 mL ずつ分取した。溶離液は任意の MeOH-H<sub>2</sub>O 混合液, 0.05% trifluoroacetic acid (v/v) を用いた。

### 2-4. 高速液体クロマトグラフィー

送液ポンプとして, LC-20AD (島津製作所), 脱気装置に DGU-20A (島津製作所), フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器に SPD-M20A (島津製作所, 示差屈折 (RI) 検出器に RID-10A (島津製作所), システムコントローラーに CMB-20A (島津製作所) を用いて分析および手動分取を行った。分析にはカラムとして Cosmosil 5C18-AR-II (4.6×250 mm, ナカライテスク, 京都) を用い、溶離液を流速 0.6 mL/min で溶出した。分取には Cosmosil 5C18-AR-II (10×250 mm, 20×250 mm, ナカライテスク), Cosmosil PBr (4.6×250 mm, 10×250 mm, ナカライテスク), Cosmosil πNAP (10×250 mm, ナカライテスク), Inertsil CN-3 (10×250 mm, GL サイエンス, 東京), SHISEIDO CAPCELL PAK C<sub>18</sub> 10×250 mm, 大阪ソーダ, 大阪) を用い、4.6×250 mm のカラムを用いた際には流速 0.6 mL/min, 10×250 mm のカラムを用いた際には流速 1.5-3.0 mL/min, 20×250 mm のカラムを用いた際には流速 4.0 mL/min で溶出した。溶離液は 0.05% trifluoroacetic acid (v/v) を含む MeOH-H<sub>2</sub>O 混合液, または 250 mM 過塩素酸ナトリウム (NaClO<sub>4</sub>) を含む 2-PrOH-MeCN-H<sub>2</sub>O 混合液を用いた。

## 2-5. 遠心液液分配クロマトグラフィー (Centrifugal partitioning chromatography: CPC)

CPC 装置として LLB-M (センシユール科学, 東京) を用いた. 二層溶媒系には *n*-butanol (BuOH)–MeOH –H<sub>2</sub>O (4:1:5 (v/v)) を使用し, Descending mode (下降法) でサンプルの分離を行った. CPC 装置のローターを 1800 rpm で回転させ, 送液ポンプ (PU980 intelligent pump, 日本分光) を用いて二層系の上層を固定相として送液した (0.5 mL/min, Descending mode). サンプルを二層溶媒系に溶解して固定相へアプライし, 続いて二層系の下層を送液した (1.0 mL/min, Descending mode). 十分に送液を行ったのち, Ascending mode (上昇法) で二層系の上層を送液した. 最後に Ascending mode でメタノールを送液し, 固定相を溶出した. カラムクロマトグラフィーと同様にフラクションコレクターを用いて溶出液を分取した.

## 3. 生理活性試験

### 3-1. マウス脳室内 (intracerebroventricular: i.c.v.) 投与試験

検定用動物には自由摂餌させた ddy 系統 (4-15 週齢, 20-45 g 程度) の雄マウス (三協ラボサービス, 東京) を用いた. 試料は Belknap らの方法を改良した簡易投与方法を用いた. すなわち, 針先が 3 mm 出るように先を斜角 45 度に切断したシリコンチューブを被せたシリンジ (MS-GFN50, 伊藤製作所, 静岡) を用い, 脳室内に試料溶液 10  $\mu$ L を投与した. マウスの行動変化は 20 分~1 時間の範囲で目視観察およびビデオ撮影を行い, 国立医薬品食品衛生研究所によりインターネットに公開されている, 安全性試験において化学物質を投与された動物の起こす種々の行動変化症状についての文献 (<http://www.nihs.go.jp/center/yougo/shoujyou.html>) を参考に, 活性を興奮性, 抑制性, その他の活性に分けて評価した (Table 1). マウスに自発行動の減少が見られた際は酒井らが報告しているカップテストを用いて評価した.<sup>65</sup> すなわち半径 4 cm, 高さ 11 cm のカップ上においてマウスが静止する時間を測定し, 評価した. なお, 本実験は国立大学法人北海道大学動物実験委員会による承認を受け行われた (承認番号: 14-0081).

**Table 1.** Behavioral changes observed in mice assay.

Activity type	Behavioral type	Description
<b>Excitatory</b>	Whole body convulsion	Violent shaking and convulsions.
	Rolling	Rolling over violently.
	Running	Running around wildly.
	Circling	Walking around in circles.
	Walking around	Walking around restlessly.
<b>Inhibitory</b>	Muscle flaccidness	Muscle relaxation, no voluntary movement.
	Catalepsy	Unable to return from unnatural postures.
	tremor	Involuntary body shaking.
	Motor suppression	Loss of locomotor activity.
<b>Stereotype</b>	Scratching	Frequent scratching of body and face.
<b>Others</b>	Ataxia motion	Staggering and unable to walk normally.
	Shivering	Body shaking.
	Straub tail	Sticking up tail at right angle.

### 3-2. イオンチャネル型グルタミン酸受容体結合試験

イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) の各サブタイプ (カイニン酸 (KA) 受容体,  $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 受容体, N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体) に対する結合試験は大阪市立大学の品田哲郎教授, および保野陽子助教により行われた.<sup>66-67</sup> 解剖したラットの脳よりシナプス膜画分を調製し, 実験に用いた. ラットの解剖は2015年, 摂南大学動物実験委員会の承認を受け, 秋澤俊史教授 (現在の所属は高知大学医学部医学科薬理学教室, 客員教授), 小西元美教授により行われた (承認番号: K11-13).

### 3-3. 細胞毒性試験

細胞株は HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞腫, 付着細胞, 理化学研究所より分譲 NO. RBRC-RCB0007) を用いた. 細胞の生育・継代には EMEM 培地 (10% FBS 含有) (和光純薬工業, 大阪) を用いた.

CELL BANKER 1plus (タカラバイオ, 滋賀) により凍結保存していた細胞を起こし, 3~5 日間培養した細胞を用いた. 96 穴マイクロプレートの各ウェルにおいて 2000 cells/well となるように細胞懸濁液を 90  $\mu$ L ずつ播種し, 炭酸ガスインキュベーター (5%, 37°C) で 24 時間培養した. イオン交換水, または 10% DMSO で溶解したサンプルを各ウェルに 10  $\mu$ L ずつ添加し (終濃度 100  $\mu$ g/mL), 炭酸ガスインキュベーター (5%, 37°C) で 48 時間培養した. 培養後, WST-8 溶液 (同仁化学研究所, 熊本) を 10  $\mu$ L ずつ各ウェルに添加した後, 炭酸ガスインキュベーター (5%, 37°C) で 4 時間呈色反応を行った. その後, マイクロプレートリーダー (Spectra Max M2, Molecular Devices, San Jose) で 450 nm における吸光度を測定した.

測定した吸光度を用いて, サンプル終濃度 100  $\mu$ g/mL における細胞生存率 (%) を以下の式により算出した. ネガティブコントロールには培地, 細胞に WST-8, 調製溶媒 (蒸留水, または 10% DMSO) を添加したウェルにおける吸光度, ブランク (blank) には培地, 細胞に調製溶媒を添加したウェルにおける吸光度を測定した値を用いた.

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \left( \frac{\text{absorbance, treated} - \text{absorbance, blank}}{\text{absorbance, negative control} - \text{absorbance, blank}} \right) \times 100$$

### 3-4. アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害試験

AChE 阻害試験は Ellman 法を用いて行った. すなわち, 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 5, 5'-dithiobis[2-nitrobenzoic acid] (DTNB, 東京化成工業, 東京, 3 mM, 125  $\mu$ L), acetylthiocholine iodide (ATChI, 東京化成工業, 1.5 mM, 25  $\mu$ L), Tris-HCl buffer (pH 8.0, 50 mM,

50  $\mu\text{L}$ ), サンプル (1 mg/mL, 5  $\mu\text{L}$ ) を混合した後, acetylcholinesterase (AChE, 0.28 U/mL, 25  $\mu\text{L}$ , Sigma-Aldrich, MO) を加え 37°C の条件下, 5 分間インキュベートした. インキュベート終了後, マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm における吸光度を測定した(エンドポイントアッセイ). ポジティブコントロールではサンプルに代えて蒸留水を 5  $\mu\text{L}$ , ブランク (blank) では AChE に代えて buffer を 25  $\mu\text{L}$  加え, 吸光度を測定した. 測定した吸光度と以下の式を用いて酵素反応の阻害率を算出した.

$$\text{阻害率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{absorbance, treated} - \text{absorbance, blank}}{\text{absorbance, negative control} - \text{absorbance, blank}} \right) \times 100$$

### 3-5. 血球溶血試験

ウサギ保存血液 (コージンバイオ株式会社, 埼玉) を TBS (トリス緩衝食塩水: 0.85% NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0) で数回洗浄し, 遠心分離によって溶液を取り除いた (162  $\times$  g). TBS で 4% (v/v) となるように血球ペレットを希釈し, 血球液を調製した. 96 穴 V 底マイクロプレート上で各サンプルを 1.2 mg/mL を起点として 3/4 倍希釈系列を作成した. 20  $\mu\text{L}$  のサンプル溶液に対し 40  $\mu\text{L}$  の血球液を加え, 恒温振盪機で 1 時間インキュベート後 (37°C, 700 rpm, M・BR-022UP, TAITEC, 愛知), 室温 (24°C) で 1 時間静置し, 血球を沈殿させた. 血球を吸い取らないように上清 20  $\mu\text{L}$  を 96 穴平底マイクロプレートへ移し, 100 mL の TBS で希釈後, マイクロプレートリーダーで 405 nm における吸光度を測定した.

### 3-6. 抗菌試験

菌体はグラム陰性菌として大腸菌 (*Escherichia coli*), グラム陽性菌としてセレウス菌 (*Bacillus cereus*) を用いた. 液体 LB 培地 (ペプトン: 10 g/L, 酵母エキス: 5 g/L, NaCl: 10 g/L) に各菌体を懸濁し, 37°C で一晩振盪培養した. 細菌懸濁液を寒天 LB 培地に播種し, サンプルを染み込ませたペーパーディスクとともに 37°C で一晩培養し, 発育阻止円が形成されるかを確認した. ポジティブコントロールにはテトラサイクリン塩酸塩を用いた (10 µg/disk).

### 3-7. 幼生変態促進試験

第 1 章ではシロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*), 第 2 章ではヨーロッパザラボヤ (*Asciidiella aspersa*) の幼生を用いた. 幼生の採集法についてはそれぞれ第 1 章, 第 2 章で述べる. 24 穴マイクロプレートの各ウェルに 1 mL の海水とともに 5-10 匹の幼生を収容し, イオン交換水, メタノール, DMSO のいずれかで溶解したサンプル 10 µL を加えた. サンプル添加から 3 時間, 7 時間, 12 時間, 33 時間, 84 時間後に幼生を実体顕微鏡下で観察した. 幼生の尾部が頭部へと吸収されていた個体を変態中, 尾部が完全に吸収されている個体を変態完了したものとした. 各ウェルにおける変態中, および変態が完了した幼生の割合 (幼生変態率) を算出し, ネガティブコントロール (溶媒) で処理した幼生における変態率と比較し, 各サンプルの変態促進活性を評価した.

## 第 1 章

### 蛍光血液を持つシロボヤモドキ *Cnemidocarpa irene* より得られた芳香族化合物

先行研究において、生理活性物質の報告が乏しい函館近海の海洋生物に着目した生理活性物質の探索が行われ、ブライシュリンプ毒性試験、マウス脳室内投与試験、AChE 阻害試験を用いた抽出物のスクリーニングが実施された。AChE 阻害剤は認知機能の調節を担う神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) の分解を防ぐことで脳内の ACh 濃度を高く保つ作用を示すためアルツハイマー病治療薬のリード化合物として期待される。スクリーニングの結果、マボヤ目、シロボヤ科 (Styelidae) に属する単体ボヤ、シロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*) の抽出物に強力なアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害活性が確認され、活性成分として新規 $\beta$ -carboline 化合物 irenecarboline A (1), B (2), 既知の $\beta$ -carboline である *N*-methyl- $\beta$ -carbolinium chloride (3) に加え新規プリン化合物 1,3,9-trimethyl-8-oxoisoguanine (5) が単離・構造決定された (Figure 6).<sup>68</sup> また、分離の過程で *N*-methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (4) が単離された。4 は AChE 阻害活性を示さなかったため 3 位のカルボキシ基が $\beta$ -carbolinine 類の AChE 阻害活性を低下させると考えられている。

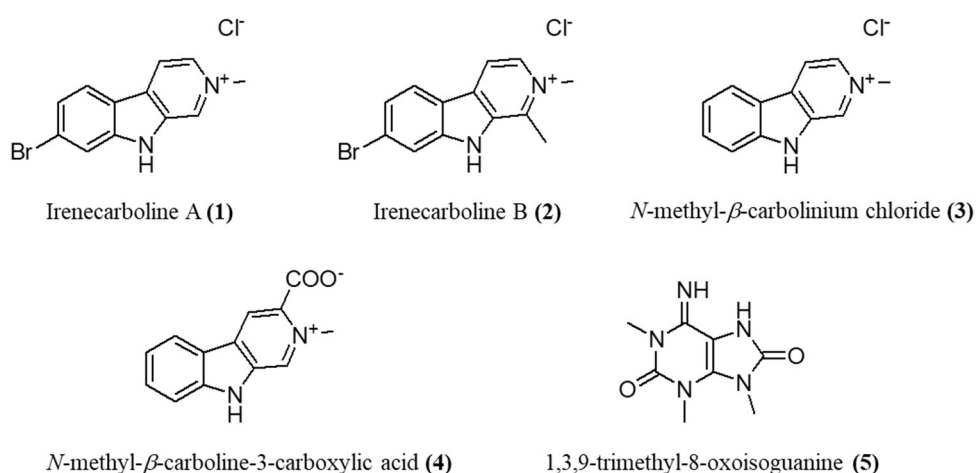
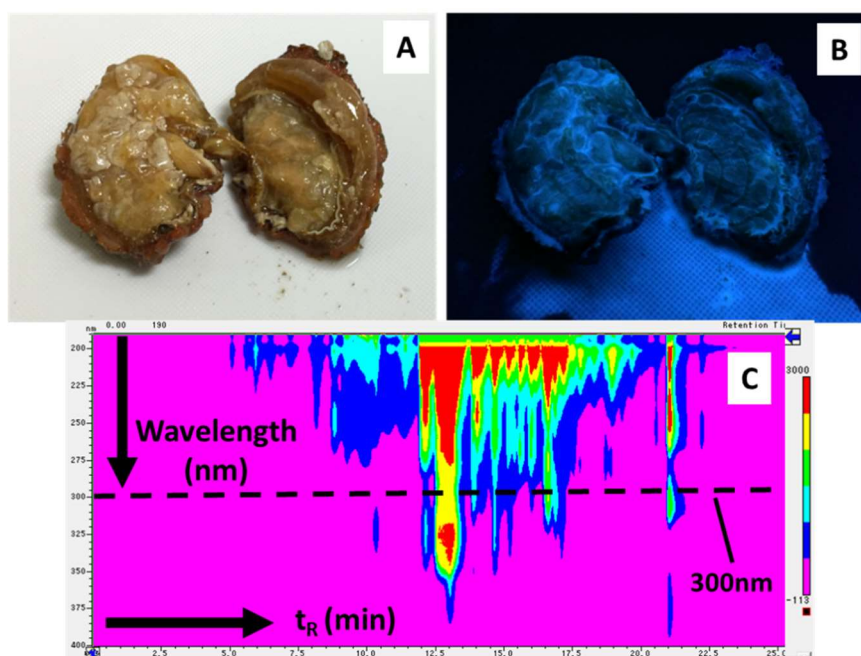


Figure 6. The structures of compounds 1-5 from *C. irene*.

興味深いことに、シロボヤモドキの血液 (体腔液) は 365 nm の紫外線照射により強い蛍光を示し (Figure 7, A-B, Tadokoro *et al.* 2017 より転載),<sup>68</sup> 体液には蛍光物質である **1** および **3** が高濃度で含まれることが見出された。<sup>68</sup> 先に述べたようにホヤの血液では様々な生命現象が知られている。**1**, **3** が体液に含まれるという観察結果は、これらの化合物がホヤにおいて何らかの役割を持つことを示唆するものである。また、**1-5** の分離の過程でシロボヤモドキには**1-5**のみならず多様な芳香族化合物が含まれることが分かった (Figure 7, C).



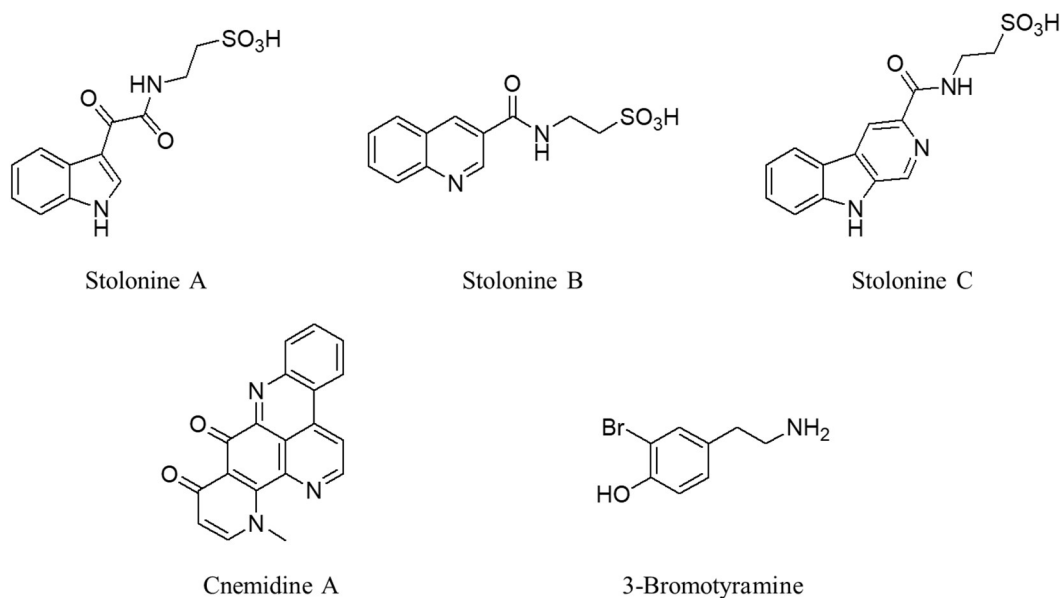
**Figure 7.** Dissected tunicate under (A) natural light and (B) blue light (405 nm)<sup>68</sup>. (C) PDA chromatogram for the aromatic-rich fraction.

シロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*) が属するシロボヤ科のホヤ由来の化合物数はマボヤ目に属するホヤの中で最も多い 109 種類で、マボヤ目のホヤから得られた化合物の 67% を占める。このうち *Cnemidocarpa* 属からは 5 種類の化合物が報告されている (Figure 8)。オーストラリア産の *Cnemidocarpa stolonifera* より五環性ピリドアクリジンアルカロイド *cnemidine A*<sup>69</sup> およびタウロアミド化合物 *stolonine A-C*<sup>70</sup> が得られており、いずれもヒト前立

腺ガン細胞 (PC3 細胞) に対し細胞毒性を示す。セルイメージング解析の結果から stolonine A, C は PC3 細胞にアポトーシスを引き起こすことで毒性を示していると考えられている。

ニュージーランド産の *Cnemidocarpa bicornuta* からは 3-bromotyramine が単離されている。本化合物は抗菌・抗真菌活性は示さず、マウス白血病細胞 (P-388 細胞) に対して弱い細胞毒性を示す (IC<sub>50</sub> 46 μM)。<sup>71</sup>

これらの化合物はいずれも特徴的な UV 吸収を示す芳香族化合物であり、シロボヤモドキのみならず *Cnemidocarpa* 属のホヤには多様な芳香族化合物を生成する代謝系が備わっていると考えられる。本研究では、シロボヤモドキに芳香族化合物が豊富に含まれること、血液に二次代謝物を高濃度で含むことに着目し、それらの化合物のホヤにおける役割・意義についての知見を得ることを目的とした。



**Figure 8.** Secondary metabolites derived from ascidians *Cnemidocarpa* sp..

## 1. 実験材料・方法

### 1-1. 生物試料

#### 1-1-1. シロボヤモドキ成体および幼若体

シロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*, **Figure 9, A**) 生物試料は 2013-2015 年に松前沖渡島小島 (41° 21' 40" N, 139° 48' 20" E) の水深 15-20 m に生息するホヤをスキューバダイビングにて採集した後に-20°Cで保管したもの (HAK83, 100), または 2017 年, 2019 年に採集し実験室にて飼育したもの (HAK121) を用いた. 飼育は縦 29.5 cm, 横 59.5 cm, 高さ 35 cm のガラス製水槽に海水を満たし, 室温で行った. 水槽中の海水は水中ポンプ式フィルターで簡易的にろ過し, 循環させ, 汚れに応じて適宜換水した. 飼育海水は (41° 81' 11" N, 140° 70' 33" E) もしくは (41° 78' 28" N, 140° 70' 34" E) にてくみ上げたものを用いた. ホヤの同定は東邦大学理学部生物学科系統分類学研究室の西川輝昭教授により行われた.

2017 年に採集したホヤの中に幼若体が付着している個体が数匹確認された (**Figure 9, B**). これらの個体から解剖ハサミとピンセットを用いて, 傷つけないよう幼若体を引きはがし, 実験に使用した.

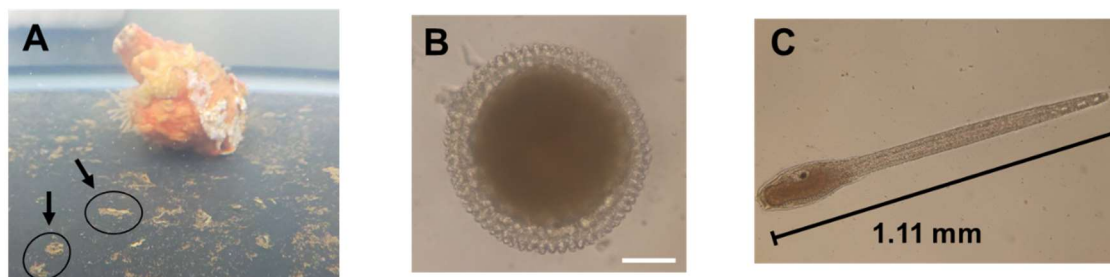


**Figure 9.** *Cnemidocarpa irene* in laboratory aquarium. (A) Adult animal and (B) juvenile animals (arrow).

### 1-1-2. シロボヤモドキ幼生および卵

2019 年に採集したホヤを水槽内で飼育していたところ、放卵および放精が確認された。数時間後、水槽内で沈んでいる卵 (**Figure 10, A**) をパスツールピペットで採集し、エッペンチューブに回収した。卵を吸い取らないよう注意しながら上澄みの海水を取り除き、実験サンプルとした。

卵を顕微鏡で観察したところ、卵割が確認されたため、一部の卵を 24 穴プラスチックプレート内で海水とともにインキュベートした。数時間後、孵化幼生が確認されたため採集し、抽出および変態アッセイに用いた。海水とともに幼生を採集し、目開き 20  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュフィルターで幼生を濾しとったのちにイオン交換水でリンスし、凍結乾燥したものを抽出用サンプルとした。



**Figure 10.** Eggs and a larva of *C. irene*. (A) Eggs sinking to the bottom aquarium (arrow). (B) Light micrographs of (B) an egg (white bar: 50  $\mu\text{m}$ ) and (C) a larva.

### 1-1-3. シロボヤモドキ血液 (体腔液) の調製

2019 年 9 月に渡島小島沿岸にて採集し、実験室にて飼育した 3 個体を用いて行った。シロボヤモドキに十分に水を吐き出させた後、解剖用ハサミで被囊を切りとり、筋膜体および内臓と分離した。筋膜体を一部切開し、内部から出る血液をビーカーに回収した。得られた液体を目開き 20  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュフィルターでろ過したものを血液とした。遠心分離 (650  $\times$  g, 10 min) によって血液を上清の血しょう画分と沈殿の血球細胞画分に分離した。血しょうは凍結乾燥し、抽出用サンプルとして用いた。

#### 1-1-4. ライフステージ別ホヤおよびホヤ血液の抽出

シロボヤモドキ成体, 幼若体をそれぞれ 3 個体 50%メタノールで抽出した. 幼生, 卵, 血球細胞は超音波ホモジナイザー (Smurt NR50M, マイクロテック・ニチオン, 千葉) を用いて 50%メタノール, または 70% 2-プロパノールで抽出した. 抽出液の有機溶媒を留去, 凍結乾燥した. 乾燥サンプルを 50%メタノールで溶解し, 水で希釈して LC-MS 分析に供した (成体: 0.005 mg/mL, 幼若体, 幼生, 卵: 0.05 mg/mL, 血しょう, 血球細胞: 0.02 mg/mL). 成体, 血しょう, 血球細胞の抽出物は 50%メタノール中では不溶物を大量に生じたため, 5 mM HCl を含む 50%メタノール溶液で再溶解したのち水で希釈した.

#### 1-1-5. その他のホヤの抽出

ヨーロッパザラボヤ (*Asciidiella aspersa*), ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*), アカボヤ (*Halocynthia aurantium*), エボヤ (*Styela clava*) の 4 種類のホヤをイオン交換水で抽出し, 得られた抽出物を HPLC 分析に供し, シロボヤモドキと成分プロファイルの比較を行った. これらのホヤの採集については第 2 章で述べる.

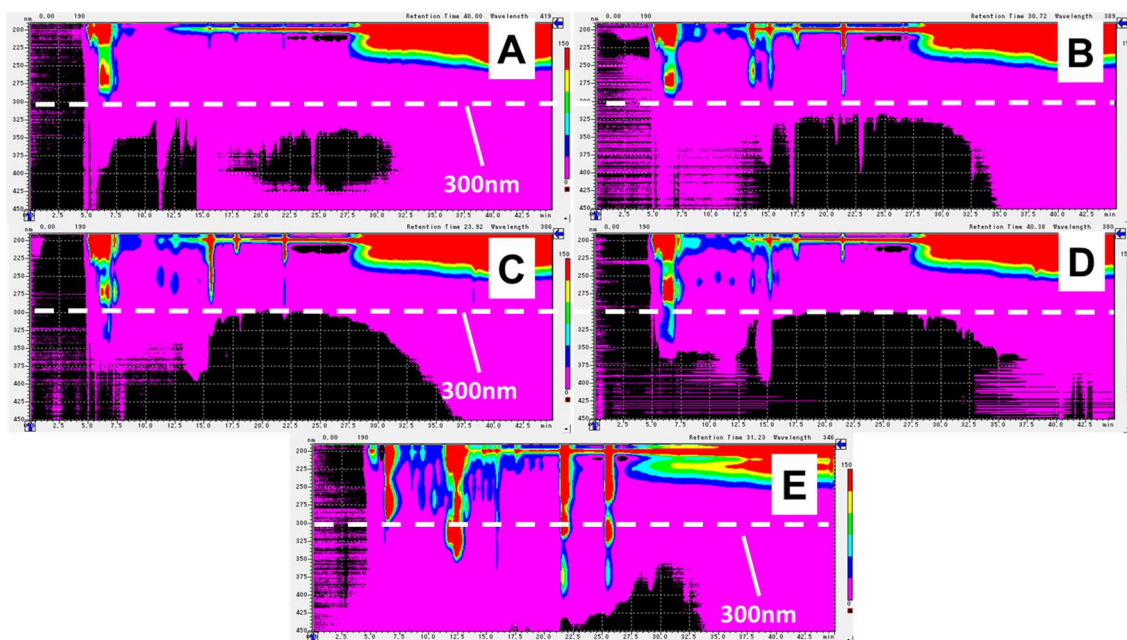
#### 1-1-6. バナジウム分析

食品分析センターに依頼し, 高周波誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-OES) によりシロボヤモドキに含まれるバナジウムの分析を行った. シロボヤモドキの被嚢を取り除いたのちに凍結乾燥した. 得られた乾燥試料を破碎して一様な粉末試料とし, これを分析サンプルとした.

## 2. 結果

### 2-1. 抽出および化合物 6-20 の分離・精製

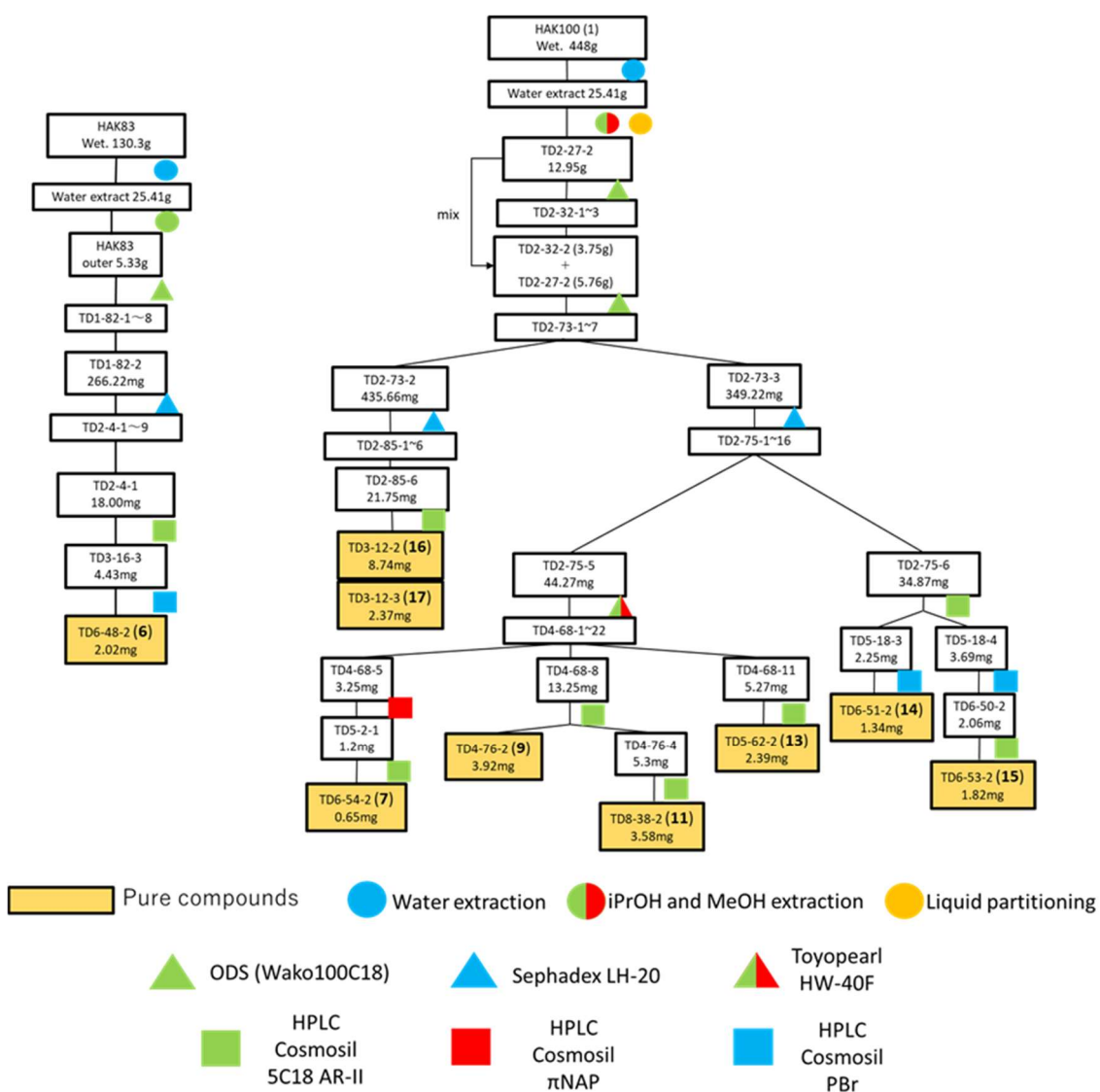
先行研究においてシロボヤモドキには芳香族化合物が豊富に含まれることが示唆された (Figure 7, C, Figure 11, E).<sup>68</sup> 他種のホヤ, ヨーロッパザラボヤ (*Asciodiella aspersa*, Figure 11, A), ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*, Figure 11, B), アカボヤ (*Halocynthia aurantium*, Figure 11, C), エボヤ (*Styela clava*, Figure 11, D) と HPLC クロマトグラムを比較すると, アミノ酸やヌクレオシド類, 核酸塩基などの一次代謝物では見られない 300 nm 以上の UV 吸光波長を持つ化合物がシロボヤモドキに特に多く確認された. さらに LC-MS 分析の結果, 一次代謝物がほとんど検出されず, 検出されたイオンの多くが未同定物質であった. そこで本研究を始めるにあたり, シロボヤモドキにはどのような化合物群が含まれるか大まかに把握するため, 未知物質の同定を行った.



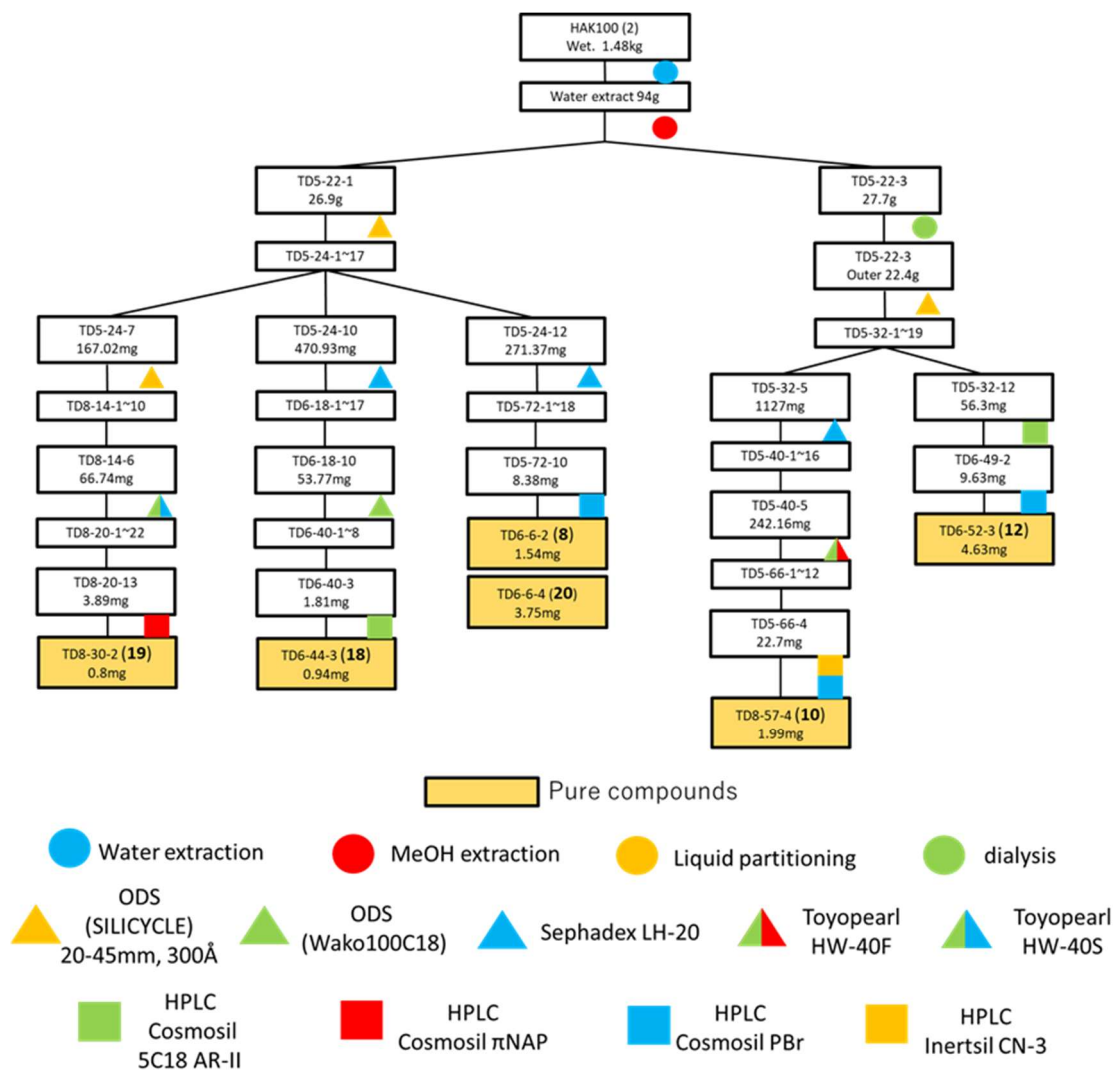
**Figure 11.** HPLC chromatograms for the extract of (A) *A. aspersa*, (B) *C. savignyi*, (C) *H. aurantium*, (D) *S. clava* and (E) *C. irene*.

化合物 6-7, 9, 11, 13-17 および化合物 8, 10, 12, 18-20 の分離スキームを Scheme 1, 2 に示す。

Scheme 1. Separation scheme for compounds 6-7, 9, 11, 13-17.



Scheme 2. Separation scheme for compounds **8**, **10**, **12**, **18-20**.



### 2-1-1. HAK83 の抽出と分離 (田所修論, 2014)

2013年に渡島小島にて採集したシロボヤモドキ (HAK83) 130 g を凍結乾燥後, 得られた試料 (14 g) をイオン交換水で抽出して (140 mL × 3) 水粗抽出物を得た (6.0 g). 水抽出物をニトロセルロース膜で透析し, 低分子画分 (5.3 g) と高分子画分 (290 mg) を得た. 低分子画分 (3.8 g) を逆相 C<sub>18</sub> カラムクロマトグラフィーに供し (Wako 100C<sub>18</sub>, 5.5 cm I.D. × 20 cm, H<sub>2</sub>O – MeOH, 0.05% TFA, ステップワイズ溶出), 8 画分に分離した (TD2-4-1~8).

### 2-1-2. HAK100 の抽出と分離 (1, 田所修論, 2014)

2014年に採集したシロボヤモドキ 448 g を凍結乾燥し, 得られた半乾燥状態の試料 (208 g) をミキサーで破碎後, イオン交換水で3回抽出した (200 mL, 300 mL, 500 mL). 得られた水粗抽出物 25.4 g を2-プロパノール (200 mL × 2, 100 mL × 3) で抽出し, さらにメタノール (100 mL × 3) で抽出した. この抽出物をマジックソルベント (ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (4:7:4:3) (v/v)) を用いて液-液分配し, 上層の低極性画分 (TD2-27-1, 933 mg) と下層の高極性画分 (TD2-27-2, 11.2 g) を得た.

高極性画分 (3.8 g) を逆相 C<sub>18</sub> カラムクロマトグラフィーで分離し (Wako 100C<sub>18</sub>, 5.5 cm I.D. × 20 cm, 30% MeOH, 40% MeOH, 100% MeOH, 0.05% TFA, ステップワイズ溶出), 3 画分に分離した (TD2-32-1~3). 高極性画分 TD2-27-2 (5.8 g) と分画物 TD2-32-1 (3.8 g) をさらに逆相 C<sub>18</sub> クロマトグラフィーで分離し (Wako 100C<sub>18</sub>, 5.5 cm I.D. × 20 cm, H<sub>2</sub>O – MeOH, 0.05% TFA, ステップワイズ溶出), 7 画分に分離した (TD2-73-1~7). 分画物 TD2-73-2 (436 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーに供し (Sephadex LH-20, 2.5 cm I.D. × 120 cm, 0.05% TFA H<sub>2</sub>O 溶出), 6 画分に分離した (TD2-85-1~6). 次に分画物 TD2-73-3 (349 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し (Sephadex LH-20, 2.5 cm I.D. × 120 cm, 0.05% TFA H<sub>2</sub>O 溶出), 16 画分に分離した (TD2-75-1~16). さらに分画物 TD2-75-5 (44.3 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し (HW-40F, 1.5 cm I.D. × 155 cm, 0.05% TFA H<sub>2</sub>O 溶出, 0.2 mL/min), 22 画分に分離した (TD4-

68-1~22).

### 2-1-3. HAK100 の抽出と分離 (2)

シロポヤモドキ (HAK100, Wet. 1.5 kg) をミキサーで破碎後、イオン交換水で抽出し (計 1.5 L), 94 g の水粗抽出物を得た. この抽出物をメタノールで抽出し (300 mL × 2), メタノール抽出物 (TD5-22-1, 27 g) と抽出残渣を得た. 抽出残渣をイオン交換水で再度抽出して (200 mL × 2, 150 mL, 100 mL × 3) 水抽出物 (TD5-22-3, 28 g) を得た. さらに透析により水溶性低分子画分 (TD5-22-3, 22 g) を得た.

メタノール抽出物 TD5-22-1 (27 g) を C<sub>18</sub> 逆相クロマトグラフィーで分離し (SILICYCLE, 5.5 cm I.D. × 60 cm, H<sub>2</sub>O-MeOH グラジエント溶出, 2.0 mL/min), 17 画分を得た (TD5-24-1~17). 同様に水溶性低分子画分 TD5-22-3 (22 g) を C<sub>18</sub> 逆相クロマトグラフィーで分離し (SILICYCLE, 5.5 cm I.D. × 60 cm, H<sub>2</sub>O-MeOH グラジエント溶出, 1.0 mL/min), 18 画分を得た (TD5-32-1~18).

### 2-1-4. 化合物 **6-20** の分離・精製

以下, 分取 HPLC においては特に断りがない限り 0.05% TFA を含む H<sub>2</sub>O-MeOH 系の移動相を用いた.

#### 1. Ireneamide A (**6**) の分離・精製

分画物 TD2-4-1 (18 mg) を 2 度 HPLC 分取により精製し (1, Cosmosil<sub>5</sub>C<sub>18</sub> AR-II, 20 mm I.D. × 250 mm; 2, Cosmosil PBr, 10 mm I.D. × 250 mm), **6** (TD6-48-2, 2.0 mg) を得た. シロポヤモドキの学名 *Cnemidocarpa irene* から **6** を ireneamide A と命名した. **20** を除く後述の化合物についても同様に命名した.

## 2. Ireneamide B (7) の分離・精製

分画物 TD4-68-5 (3.3 mg) を 2 度 HPLC 分取で精製し (1, Cosmosil  $\pi$ NAP, 10 mm I.D.  $\times$  250 mm; 2, Cosmosil  $\text{C}_{18}$  AR-II, 10 mm I.D.  $\times$  250 mm), 7 (TD6-54-2, 0.7 mg) を得た.

## 3. Ireneamide C (8) および Cneiremine A (20) の分離・精製

分画物 TD5-24-12 (271 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーに供し (Sephadex LH-20, 2.5 cm I.D.  $\times$  120 cm,  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH, 0.05% TFA, ステップワイズ溶出, 0.5 mL/min), 18 画分に分離した (TD5-72-1~18). 分画物 TD5-72-10 (8.4 mg) を HPLC で分離し (Cosmosil PBr, 10 mm I.D.  $\times$  250 mm), 8 (TD6-6-2, 1.5 mg) および 20 (TD6-6-4, 3.8 mg) を得た. 20 についてもホヤの学名 *Cnemidocarpa irene* から命名した. 20 は  $-20^\circ\text{C}$  の保存条件において不安定で, 20 由来と考えられる多数の不純物を生じたため, サンプルを大きくロスしてしまった. そのため後述の生理活性試験ではマウスに対する神経活性以外の活性を評価することができなかった.

## 4. 6-Biopterin-2'-sulfate (9) および 3-methyl-6-biopterin-2'-sulfate (11) の分離・精製

分画物 TD4-68-8 (13.3 mg) を HPLC で分離し (Cosmosil  $\text{C}_{18}$  AR-II, 20 mm I.D.  $\times$  250 mm), 9 (TD4-76-2, 3.9 mg) および 11 含有フラクション (TD4-76-4) を得た. TD4-76-4 (5.3 mg) を HPLC 分取で精製し (Cosmosil  $\text{C}_{18}$  AR-II, 20 mm I.D.  $\times$  250 mm), 11 (TD8-38-2, 3.6 mg) を得た.

## 5. 6-Biopterin-1'-2'-sulfate (10) の分離・精製

分画物 TD5-32-5 (1.1 g) をゲルろ過クロマトグラフィーに供し (Sephadex LH-20, 5.5 cm I.D.  $\times$  58 cm, 0.05% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  溶出, 1.0 mL/min), 16 画分に分離した (TD5-40-1~16). 分画物 TD5-40-5 (242 mg) をさらにゲルろ過クロマトグラフィーで分離し (HW-40F, 1.5 cm I.D.  $\times$  162 cm, 0.05% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  溶出, 0.25 mL/min), 12 画分に分離した (TD5-66-1~12). 分画物 TD5-

66-4 (23 mg) を HPLC で分離し (Inertsil CN-3, 10 mm I.D. × 250 mm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 0.05% TFA), **10** を含むフラクション (TD8-48-2) を得た。**10** は強酸性条件下では不安定で容易に加水分解されるため, **10** を含む溶出液を 0.1% アンモニア水を適量加えて中和したのち, エバポレーターで溶媒を留去した。TD8-48-2 は TFA アンモニウムと思われる塩が含まれていたため, さらに酸フリーの蒸留水を移動相に用いた HPLC で精製し (Cosmosil PBr, 10 mm I.D. × 250 mm), **10** (TD8-57-4, 2.0 mg) を得た。

#### 6. 1-Methyl-7-oxobiopterin (**12**) の分離・精製および **12** アセチル化体 (**12a**) の調製

分画物 TD5-32-12 (56.3 mg) を 2 度 HPLC で分離し (1, Cosmosil <sub>5</sub>C<sub>18</sub> AR-II, 20 mm I.D. × 250 mm; 2, Cosmosil PBr, 10 mm I.D. × 250 mm), **12** (TD6-52-3, 4.6 mg) を得た。

**12** を主要に含むフラクション (TD2-73-3 を水に溶解した際の残渣) 9 mg を 5 mL の N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し, 触媒として 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP, 4.12 mg), 塩基としてピリジン (200 μL) を加え, 30 μL の無水酢酸と室温で 1 時間反応させた。遠心エバポレーターで溶媒を留去したのちにシリカゲルクロマトグラフィーで精製し (Merck, Silica gel 60, 2.5 cm I.D. × 13 cm, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:1)), アセチル化体 **12a** (TD8-77-1, 7.9 mg) を得た。

#### 7. 3,7-Dimethylguanine (**13**) の分離・精製

分画物 TD4-68-11 (5.3 mg) を HPLC 分取により精製し (Cosmosil <sub>5</sub>C<sub>18</sub> AR-II, 20 mm I.D. × 250 mm), **13** (TD5-62-2, 2.4 mg) を得た。

#### 8. Ireneguanine (**14**) および Irenecytidine (**15**) の分離・精製

分画物 TD2-75-6 (35 mg) を 3 度の HPLC 分取により分離し (1, Cosmosil <sub>5</sub>C<sub>18</sub> AR-II, 20 mm I.D. × 250 mm; 2, Cosmosil PBr, 10 mm I.D. × 250 mm; 3, Cosmosil <sub>5</sub>C<sub>18</sub> AR-II, 10 mm I.D. × 250

mm), **14** (TD6-51-2, 1.3 mg) および **15** (TD6-53-2, 1.8 mg) を得た.

#### 9. 3-Chlorotyramine (**16**) および 3-bromotyramine (**17**) の分離・精製

分画物 TD2-85-6 (21.8 mg) を HPLC 分取で分離し, (Cosmosil  $\text{C}_{18}$  AR-II, 20 mm I.D.  $\times$  250 mm), **16** (TD3-12-2, 8.7 mg) および **17** (TD3-12-3, 2.4 mg) を得た.

#### 10. 3-Bromotyramine-*O*-sulfate (**18**) の分離・精製

分画物 TD5-24-10 (471 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーに供し (Sephadex LH-20, 2.5 cm I.D.  $\times$  120 cm, 0.05% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  溶出, 0.5 mL/min), 17 画分に分離した (TD6-18-1~17). 分画物 TD6-18-10 を逆相  $\text{C}_{18}$  クロマトグラフィーで分離し (Wako  $100\text{C}_{18}$ , 5.5 cm I.D.  $\times$  20 cm,  $\text{H}_2\text{O}$  - MeOH, 0.05% TFA, グラジエント溶出), 8 画分 (TD6-40-1~8) を得た. 分画物 TD6-40-3 (1.8 mg) を HPLC で精製し (Cosmosil  $\text{C}_{18}$  AR-II, 20 mm I.D.  $\times$  250 mm), **18** (TD6-44-3, 0.9 mg) を得た.

#### 11. Tyramine-*O*-sulfate (**19**) の分離・精製

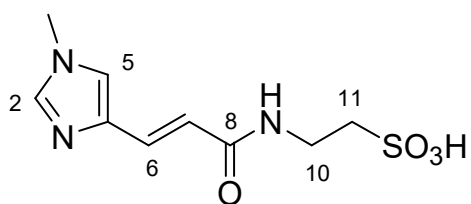
分画物 TD5-24-7 (167 mg) を  $\text{C}_{18}$  逆相クロマトグラフィーで分離し (SILICYCLE, 2.5 cm I.D.  $\times$  49 cm,  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH グラジエント溶出, 0.5 mL/min), 10 画分を得た (TD8-14-1~10). 分画物 TD8-14-6 (66.7 mg) をさらにゲルろ過クロマトグラフィーで分離し (HW-40S, 1.5 cm I.D.  $\times$  67cm, 0.05% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  溶出, 0.2 mL/min), 22 画分に分離した (TD8-20-1~22). 分画物 TD8-20-13 (3.9 mg) を HPLC で精製し (Cosmosil  $\pi\text{NAP}$ , 10 mm I.D.  $\times$  250 mm), **19** (TD8-30-2, 0.8 mg) を得た.

## 2-2. 化合物 **6-20** の構造決定

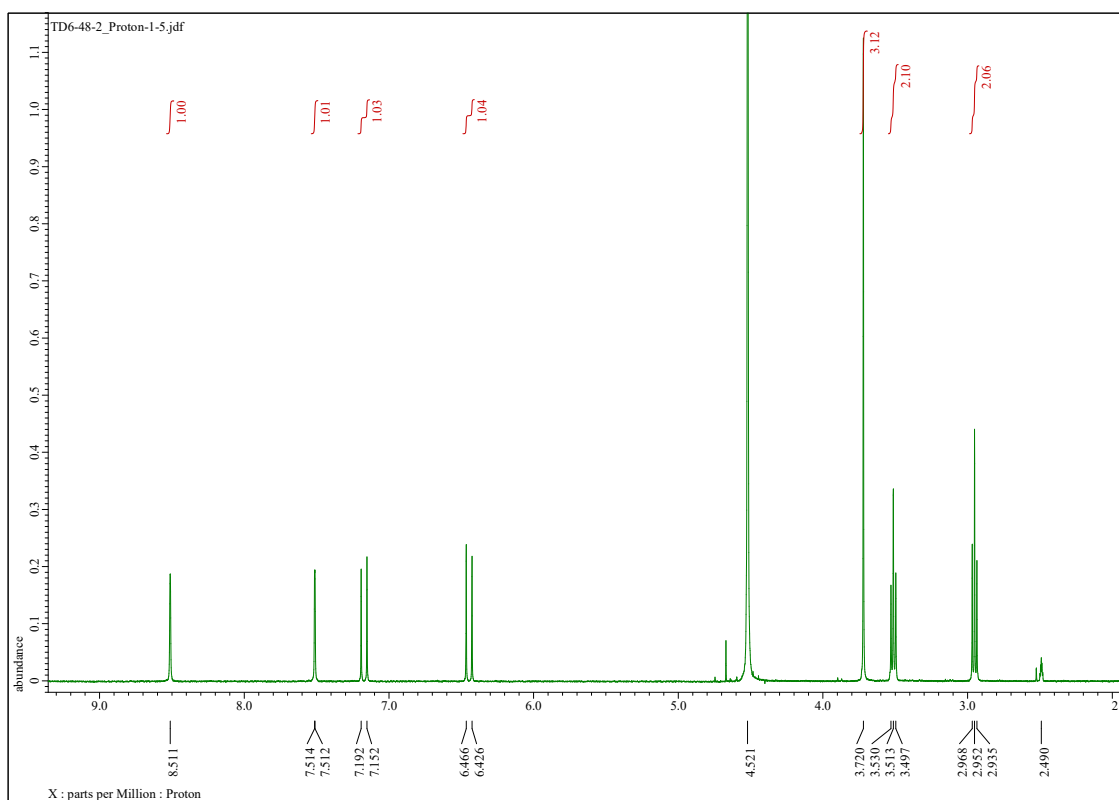
### 2-2-1. Ireneamide A (**6**, **Figure 12**) の構造決定

Ireneamide A (**6**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

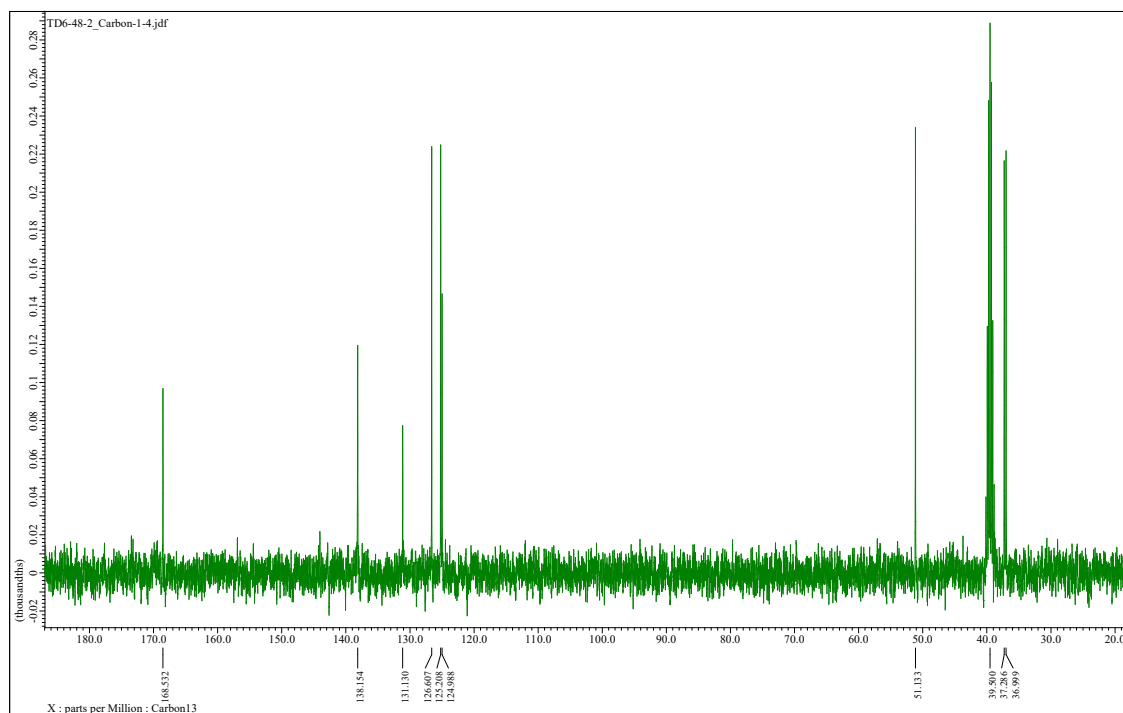
Ireneamide A (**6**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 273 (4.10) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3434, 2920, 2850, 1679, 1637, 1148, 1046 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of DMSO-*d*<sub>6</sub>) shown in **Figure 13-14** and **Table 2**; HRESIMS:  $m/z$  258.0545 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S,  $m/z$  258.0554); HRESIMS/MS:  $m/z$  150.0669 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O),  $m/z$  124.0071 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>3</sub>S),  $m/z$  106.9806 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S),  $m/z$  80.9656 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>-</sup> (calcd. for HSO<sub>3</sub>).



**Figure 12.** The structure of **6**.



**Figure 13.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **6** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Figure 14.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **6** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{DMSO-}d_6$ .

Ireneamide A (**6**) は白色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  258.0554 [M-H]<sup>-</sup> のピークが観測されたこと、また、<sup>13</sup>C NMR スペクトルにおいて 9 本のピークが観測されたことから (Figure 14), 分子式を C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S と決定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて 11 H 分のプロトン, すなわち高磁場領域に 2 個のメチレントリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  2.95, 3.51), 1 個のメチルシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.72), 低磁場領域に 2 個のダブルット ( $\delta_{\text{H}}$  6.45, 7.17), 2 個のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  6.45, 7.51) を観測した (Figure 13). <sup>13</sup>C NMR, HSQC スペクトルより 5 個の sp<sup>2</sup> 炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  125.0, 125.2, 126.0, 131.1, 138.2), 1 個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  168.5), 3 個の sp<sup>3</sup> 炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  37.0, 37.3, 51.1) を観測した (Figure 14, Table 2). <sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいてイミダゾール基における典型的な化学シフト ( $\delta_{\text{H}}$  7.51, 8.51) が観測されたこと, さらに HMBC スペクトルにおいて H-2 から C-4, C-5 に, H-5 から C-2, C-4 への相関がみられたことからイミダゾール基の存在が示唆された (Figure 15). さらにメチルシングレット H<sub>3</sub>-1 から C-2, C-5 への相関がみられたことからメチル基は N-1 に帰属された. 2置換オレフィンの相対配置は  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6.45/125.0 (CH-7),  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  7.17/126.6 (CH-6) の結合定数 <sup>3</sup>J<sub>H-6-H-7</sub> が 16 Hz であることからトランスであると決定した. さらなる COSY, HMBC スペクトル解析により **6** を N-methylurocanyltauroamide と決定した (Figure 15). 11 位のスルホン酸の存在は IR スペクトルにおいて 1146 cm<sup>-1</sup> の吸収が見られたこと, NMR における化学シフト ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2.95/51.1), HRESI-MS/MS スペクトルにおいて C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> のニュートラルロスが見られたことから確認した (Figure 15).

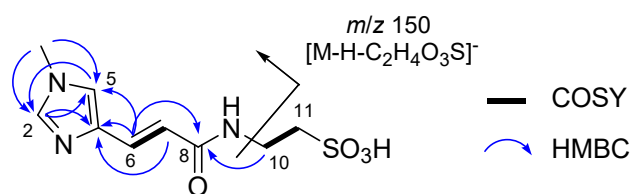


Figure 15. Key 2D NMR correlations and a fragment ion for **6**.

**Table 2.** NMR data for **6** in D<sub>2</sub>O.

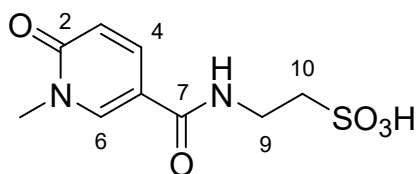
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1-Me	37.3, CH <sub>3</sub>	3.72, s		2, 5	2, 5
2	138.2, CH	8.51, s		4, 5	1-Me
4	131.1, C				
5	125.2, CH	7.51, s		2, 4	1, 6, 7
6	126.0, CH	7.17, d (16.0)	7	4, 5, 8	5, 7
7	125.0, CH	6.45, d (16.0)	6	4, 8	5, 6
8	168.5, C				
10	37.0, CH <sub>2</sub>	3.51, t (6.86, 6.40)	11	8, 11	11
11	51.1, CH <sub>2</sub>	2.95, t (6.86, 6.40)	10	10	10

Measured at 298 K.

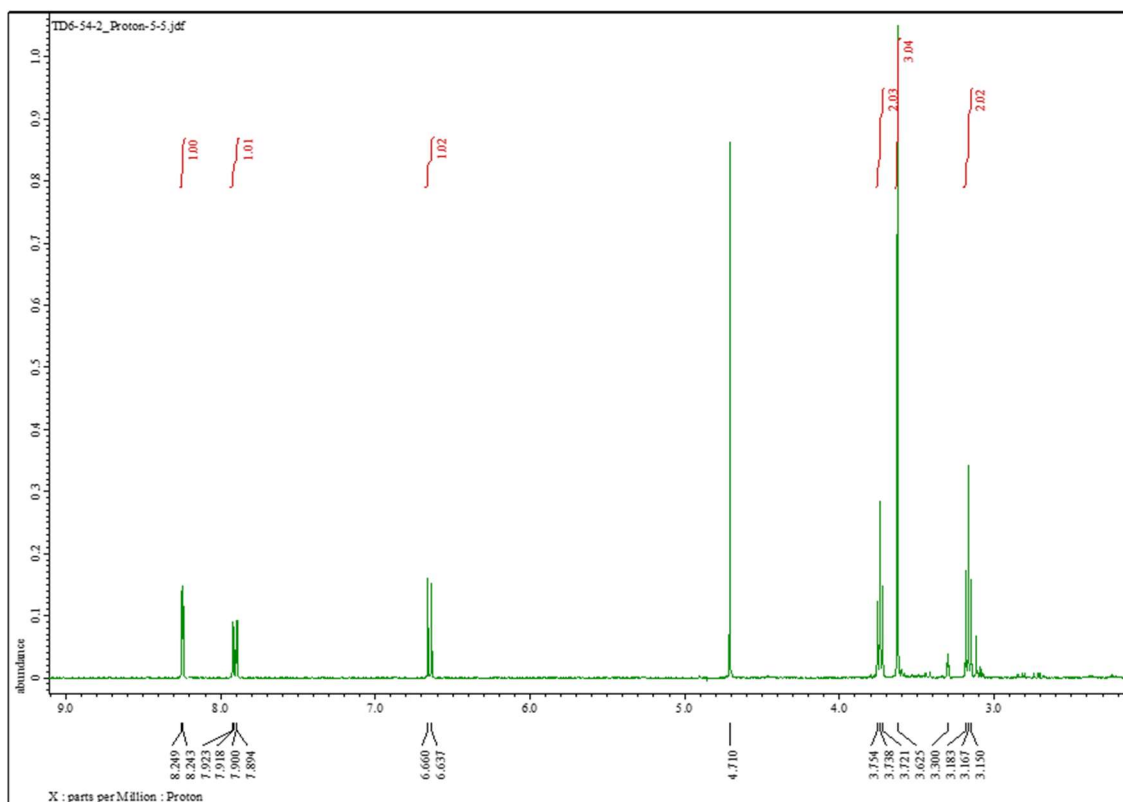
## 2-2-2. Ireneamide B (7, Figure16) の構造決定

Ireneamide B (7) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

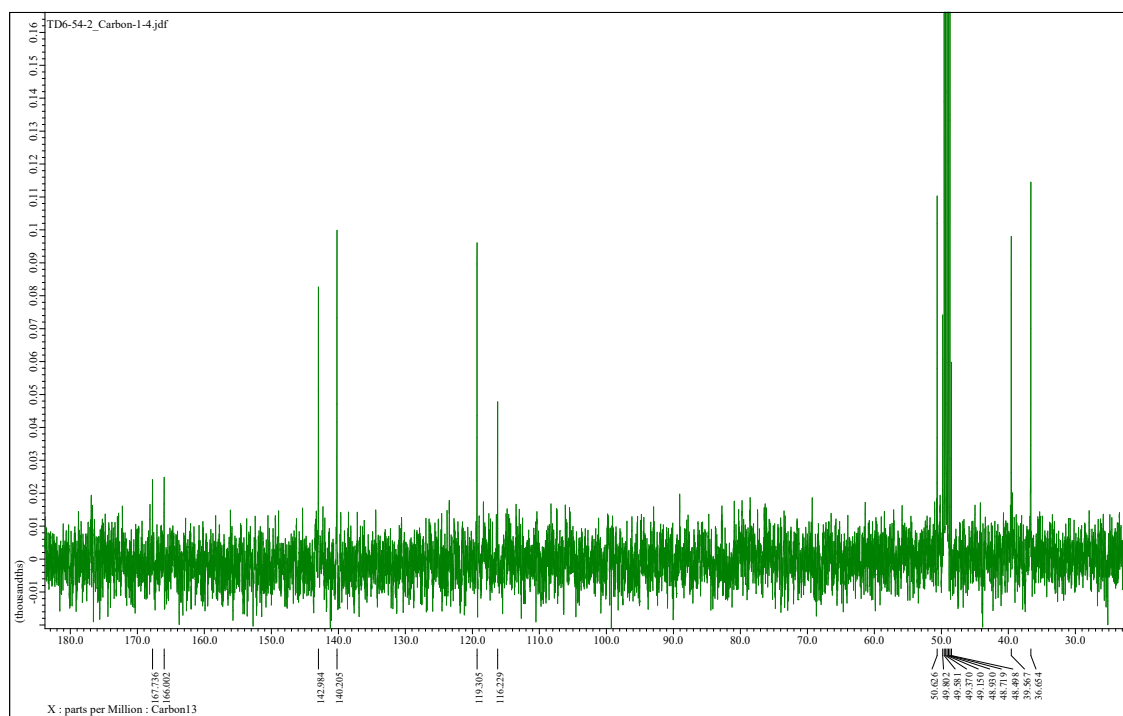
Ireneamide B (7): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 257 (4.05), 296 (3.56) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3444, 2917, 2850, 1665, 1542, 1201, 1170, 1046 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD, DMSO-*d*<sub>6</sub>) shown in **Figure 17-18** and **Table 3**; HRESIMS:  $m/z$  259.0397 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S,  $m/z$  259.0394); HRESIMS/MS:  $m/z$  195.0777 [M-H-SO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),  $m/z$  151.0513 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),  $m/z$  106.9811 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S),  $m/z$  80.9661 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for HSO<sub>3</sub>).



**Figure 16.** The structure of 7.

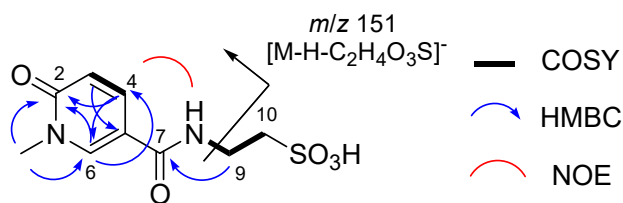


**Figure 17.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **7** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 18.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **7** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Ireneamide B (**2**) は薄黄色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  259.0397 [M-H]<sup>-</sup> のピークが観測されたこと、また、<sup>13</sup>C NMR スペクトルにおいて 9 本のピークが観測されたことから (**Figure 18**), 分子式を C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S と決定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて 10H 分のプロトン, すなわち高磁場領域に 2 個のメチレントリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.17, 3.74), 1 個のメチルシグレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.63), 低磁場領域に 2 個のダブレット ( $\delta_{\text{H}}$  6.65, 8.25), 1 個のダブルダブレット ( $\delta_{\text{H}}$  7.91) を観測した (**Figure 17**)。 <sup>13</sup>C NMR, HSQC スペクトルより 4 個の sp<sup>2</sup> 炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  116.2, 119.3, 140.2, 143.0), 2 個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  166.0, 167.7), 3 個の sp<sup>3</sup> 炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  36.7, 39.6, 50.6) を観測した (**Figure 18, Table 3**)。 <sup>1</sup>H NMR および各種二次元 NMR (HSQC, HMBC) スペクトル解析により *N*-methylpyridone 骨格を帰属した (**Figure 19**)。 IR スペクトル, NMR における化学シフト, MS/MS データから **6** と同様にタウリンユニットを帰属した。HMBC スペクトルにおいて  $\delta_{\text{H}}$  3.74 (H<sub>2</sub>-9) からカルボニル炭素  $\delta_{\text{C}}$  167.7 (C-7) への相関が見られたことから, カルボニル炭素とタウリンユニットのアミド結合を帰属した (**Figure 19**)。 このカルボニル炭素と *N*-methylpyridone 環との HMBC 相関が見られなかったが, 重溶媒に DMSO-*d*<sub>6</sub> を用いて 2D NOE スペクトルを測定したところ  $\delta_{\text{H}}$  8.22 (NH-8) と H-4 に相関が見られたため C-5-C-7 の結合を帰属した。以上より, **7** を **Figure 19** のように決定した。



**Figure 19.** Key 2D NMR correlations and a fragment ion for **7**.

**Table 3.** NMR data for **7** in D<sub>2</sub>O.

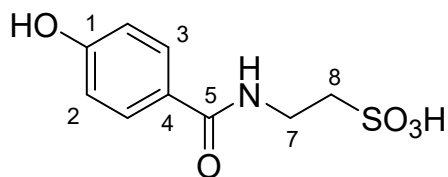
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz) <sup>a</sup>	COSY	HMBC	NOESY
1-Me	39.6, CH <sub>3</sub>	3.63, s	3.46, s		2, 6	6
2	166.0, C					
3	119.3, CH	6.65, d (9.2)	6.38, d (9.6)	4	5	3, 8 <sup>a</sup>
4	140.2, CH	7.91, dd (9.6, 2.4)	7.74, dd (9.6, 2.7)	3, 6	2, 6	3, 8 <sup>a</sup>
5	116.2, C					
6	143.0, CH	8.25, d (2.4)	8.28, d (2.7)	4	2, 4	1-Me, 8 <sup>a</sup>
7	167.7, C					
8-NH <sup>a</sup>			8.22, brt	9		4, 6, 9, 10
9	36.7, CH <sub>2</sub>	3.74, t (6.9, 6.4)	3.45 <sup>b</sup> , overlapped	8 <sup>a</sup> , 10	7, 10	8 <sup>a</sup> , 10
10	50.6, CH <sub>2</sub>	3.17, t (6.9, 6.4)	2.62, t (7.8, 6.9)	9	9	8 <sup>a</sup> , 9

Measured at 298 K. <sup>a</sup>Measured in DMSO-*d*<sub>6</sub>. <sup>b</sup>Chemical shift determined from COSY spectrum.

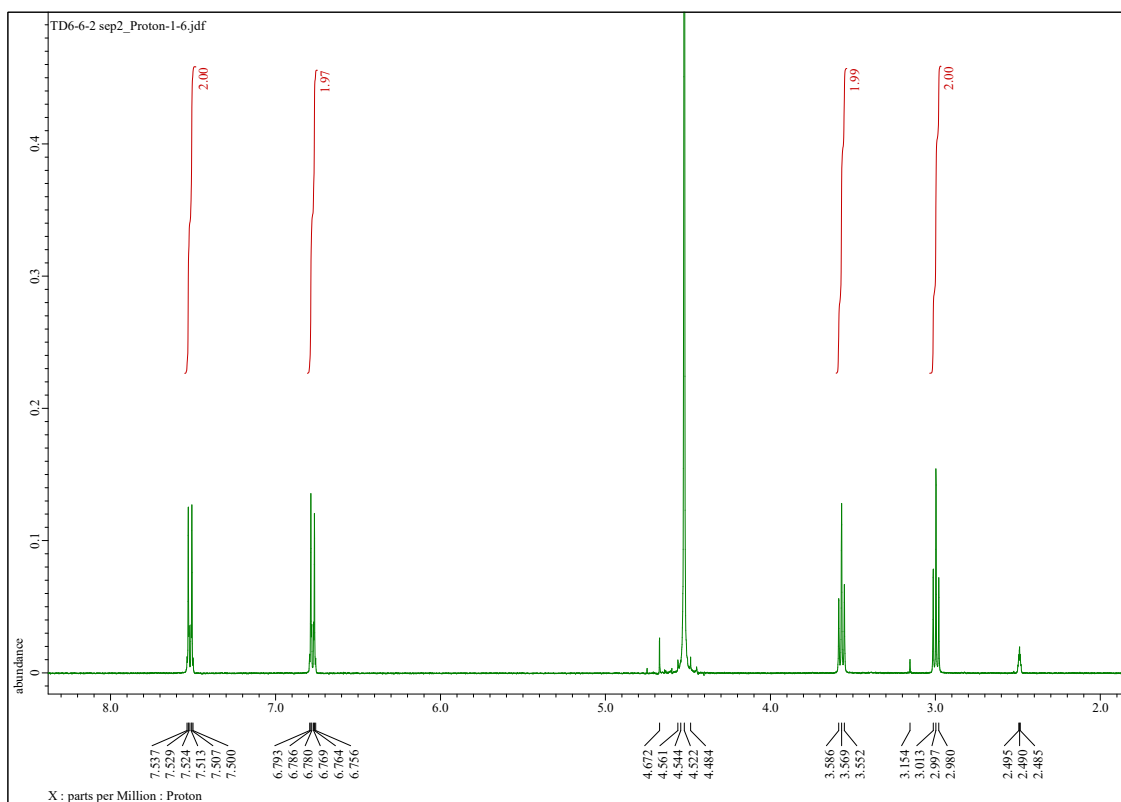
### 2-2-3. Ireneamide C (**8**, **Figure 20**) の構造決定

Ireneamide C (**3**)は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

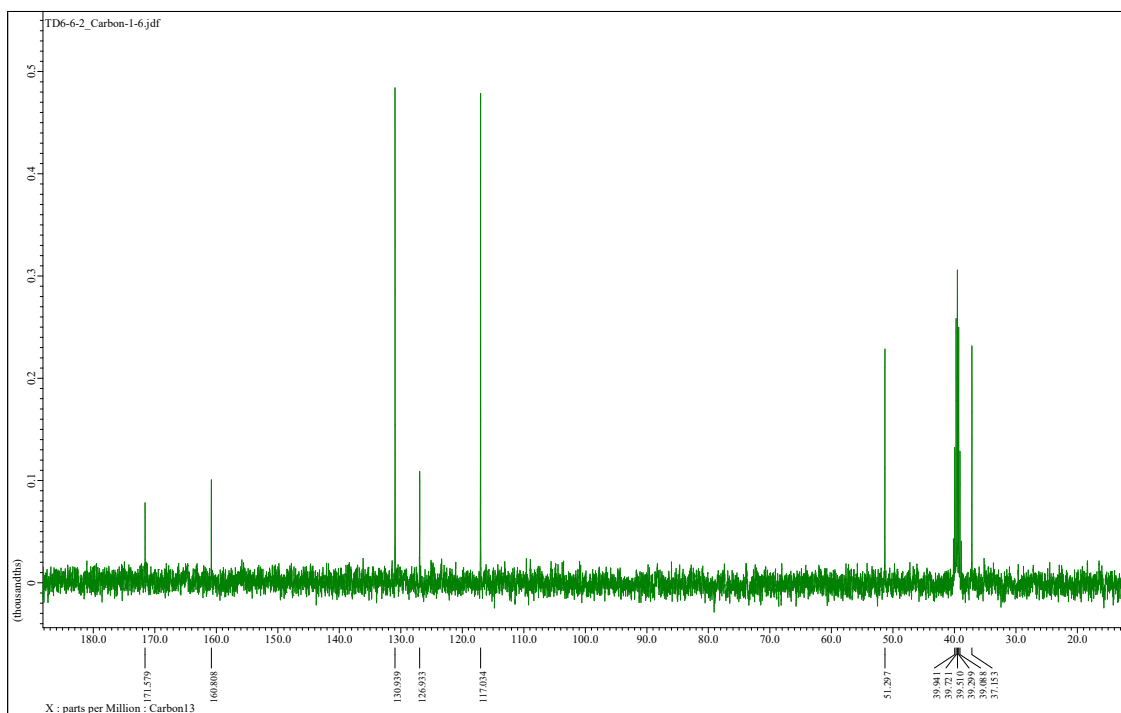
Ireneamide C (**3**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 251 (4.13) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3435, 2915, 2850, 1627, 1581, 1546, 1510, 1468, 1201, 1050 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of DMSO-*d*<sub>6</sub>) shown in **Figure 21-22** and **Table 4**; HRESIMS:  $m/z$  244.0280 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>S,  $m/z$  244.0285); HRESIMS/MS:  $m/z$  136.0400 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>),  $m/z$  124.0073 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S),  $m/z$  80.9657 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (calcd. for HSO<sub>3</sub>).



**Figure 20.** The structure of **8**.



**Figure 21.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **8** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Figure 22.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **8** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{DMSO-}d_6$ .

Ireneamide **8** は薄褐色アメ状物質として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  244.0280 [M-H]<sup>-</sup> のピークが観測され、分子式は C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>S と推定された。<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて 2 個の 2H 分の芳香族ダブルトリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  6.78, 7.52), 2 個の 2H 分のトリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  6.78, 7.52) を観測した (Figure 21)。<sup>13</sup>C NMR, HSQC スペクトルより 4 個の sp<sup>2</sup> 炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  117.0, 126.9, 130.9, 160.8), 1 個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  171.6), 2 個の sp<sup>3</sup> 炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  37.2, 51.3) を観測した (Figure 22, Table 4)。<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR スペクトル解析により *p*-ヒドロキシ二置換ベンゼン骨格を帰属した。また, **6, 7** と同様に MS/MS スペクトルからタウロアミドユニットを帰属した。HMBC スペクトルにおいて H-3, H-7 から C-5 カルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  171.6) への相関が見られたことから **8** の構造を Figure 23 のように決定した。

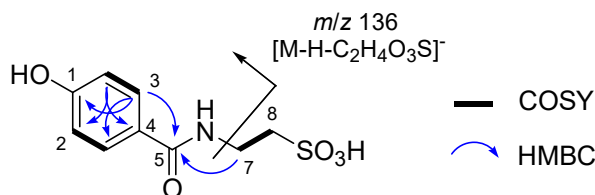


Figure 23. Key 2D NMR correlations and a fragment ion for **8**.

Table 4. NMR data for **8** in D<sub>2</sub>O.

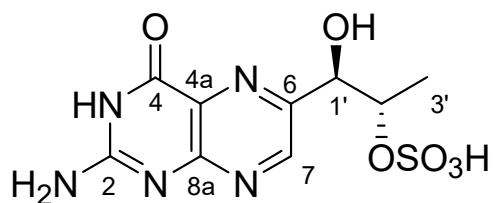
#C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ mult. (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	160.8, C				
2	117.0, CH	6.78, dt <sup>a</sup> (8.7)	3	1, 2, 4	3
3	130.9, CH	7.52, dt <sup>a</sup> (8.7)	2	1, 3, 5	2
4	126.9, C				
5	171.6, C				
7	37.2, CH <sub>2</sub>	3.57, t (6.9)	8	5, 8	8
8	51.3, CH <sub>2</sub>	3.00, t (6.9, 6.4)	7	7	7

Measured at 298 K. <sup>a</sup>Due to second order effect.

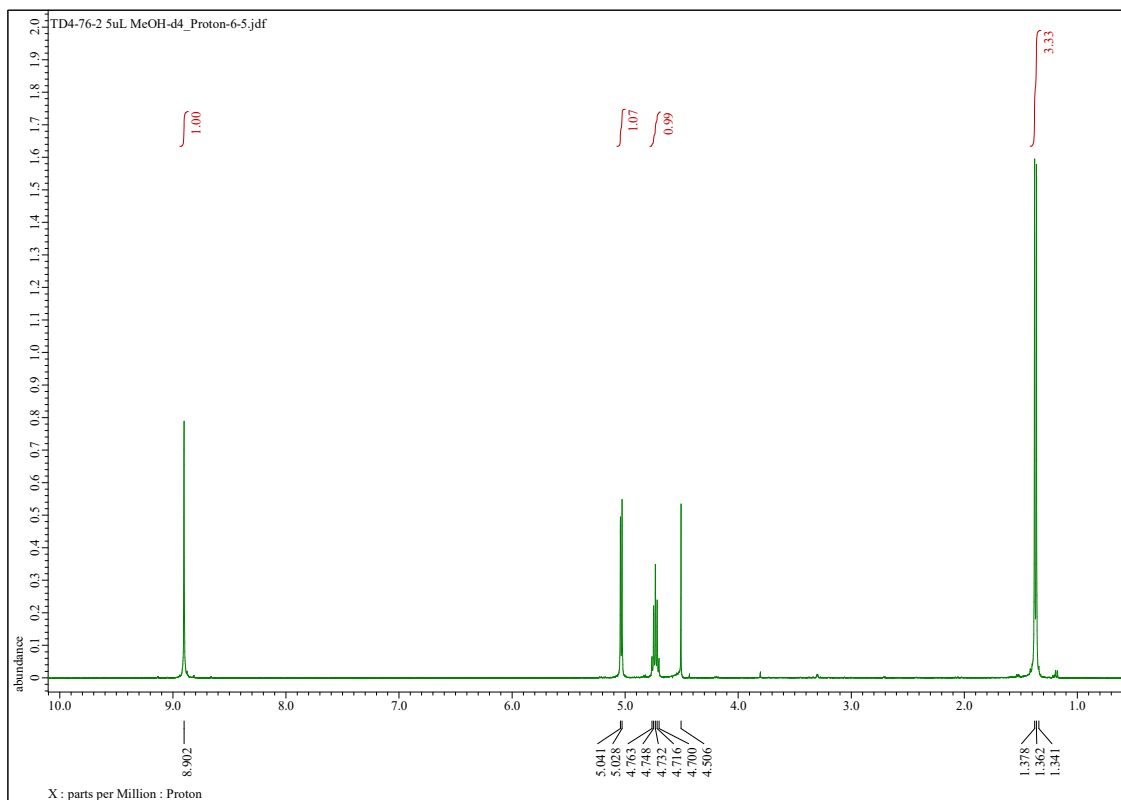
#### 2-2-4. 6-Biopterin-2'-sulfate (**9**, **Figure 24**) の構造決定

6-Biopterin-2'-sulfate (**9**)は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

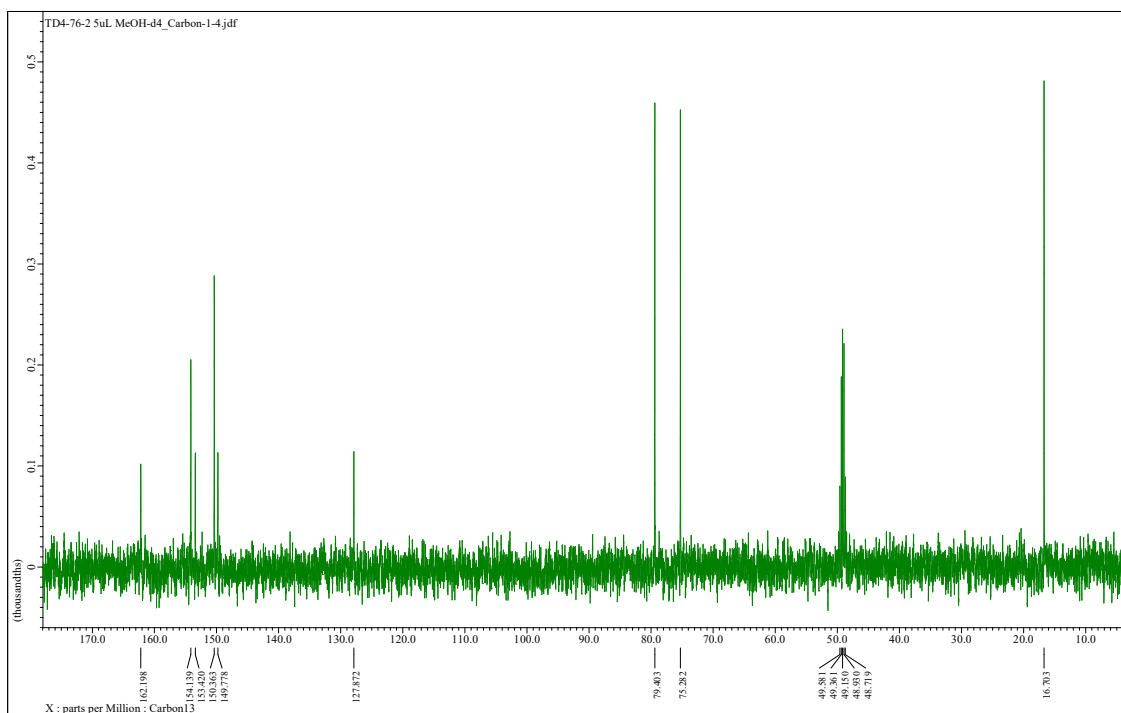
6-Biopterin-2'-sulfate (**9**):  $[\alpha]^{20}_D$  -23 (*c* 0.021, H<sub>2</sub>O); UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 215 (4.03), 233 (4.02), 274 (4.10), 343 (3.73) nm; ECD (1.3 mM, H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 226 (+2.1), 244 (-2.4), 313 (-0.4) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3434, 2917, 2855, 1701, 1638, 1074 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 25-26** and **Table 5**; HRESIMS: *m/z* 316.0358 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S, *m/z* 316.0357).



**Figure 24.** The structure of **9**.



**Figure 25.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **9** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 26.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **9** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

6-Biopterin-2'-sulfate (**9**) は薄黄色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  318.0497  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、また、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 9 本のピークが観測されたことから (Figure 26), 分子式を  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 6 H 分のプロトン, すなわち 3H 分のダブルット ( $\delta_{\text{H}}$  1.37), 1H 分のクインテット ( $\delta_{\text{H}}$  4.73), 1H 分のダブルット ( $\delta_{\text{H}}$  5.03), 芳香族領域に 1H 分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  8.90) を観測した (Figure 25).  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 6 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  127.9, 149.8, 150.4, 153.4, 154.1, 162.2), 3 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  16.7, 75.3, 79.4) を観測した (Figure 26, Table 5). 分子式, NMR データに加え UV 吸収スペクトルにおいて 215 nm, 233 nm, 274 nm, 343 nm に極大吸収を示したことから **9** はプテリン骨格を有することが示唆された。6 個の  $\text{sp}^2$  炭素の化学シフトはプテリン化合物の芳香族炭素のそれと良い一致を示した。 $^{60,72-73}$   $^1\text{H}$  NMR, COSY スペクトル解析により  $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{X})-\text{CH}(\text{X})-$  のスピンスystemを帰属した。以上のデータから **9** はビオプテリン誘導体であることが示唆された (Figure 27). MS/MS データから存在が示唆された硫酸エステルは 6-biopterin と NMR の化学シフトを比較し (Figure 28 A, C, 6-biopterin:  $\delta_{\text{H}}$  3.92; **9**:  $\delta_{\text{H}}$  4.60), C-2' に帰属した。DMSO 中で **9** は一部加水分解を受けて **9a** を生じたため, これを単離し,  $^1\text{H}$  NMR, LC-MS/MS データ ( $m/z$ , 保持時間, MS/MS スペクトル) を 6-biopterin の標品と比較したところ良く一致した (Figure 28-30). さらに **9a** は 6-biopterin と比旋光度が同符号であり (**9a**,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -23,  $c$  0.004; 6-biopterin,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -59,  $c$  0.01), 同様の ECD スペクトルを示したことから (Figure 31), 立体化学を 1'*R*, 2'*S* と決定した。以上より **9** を 6-biopterin-2'-sulfate と決定した。

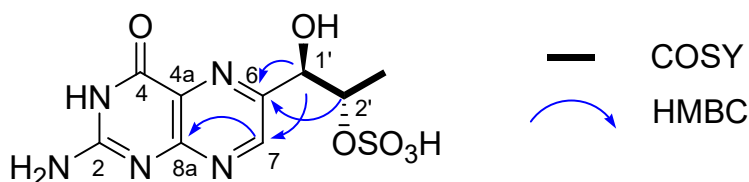
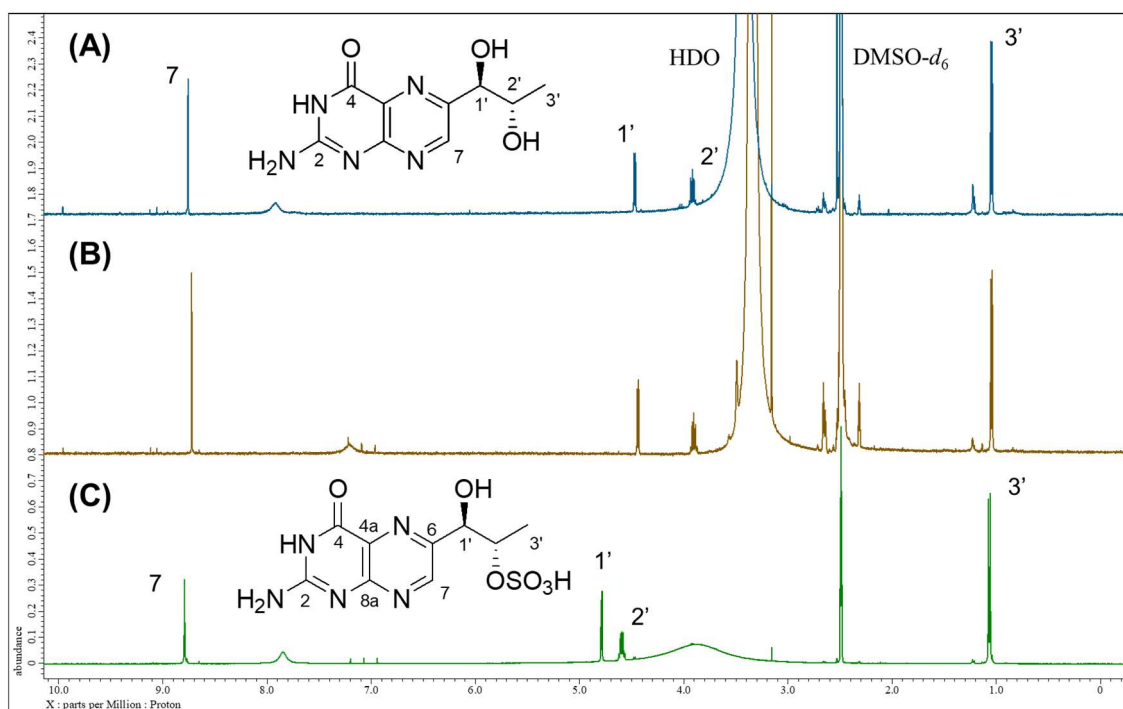
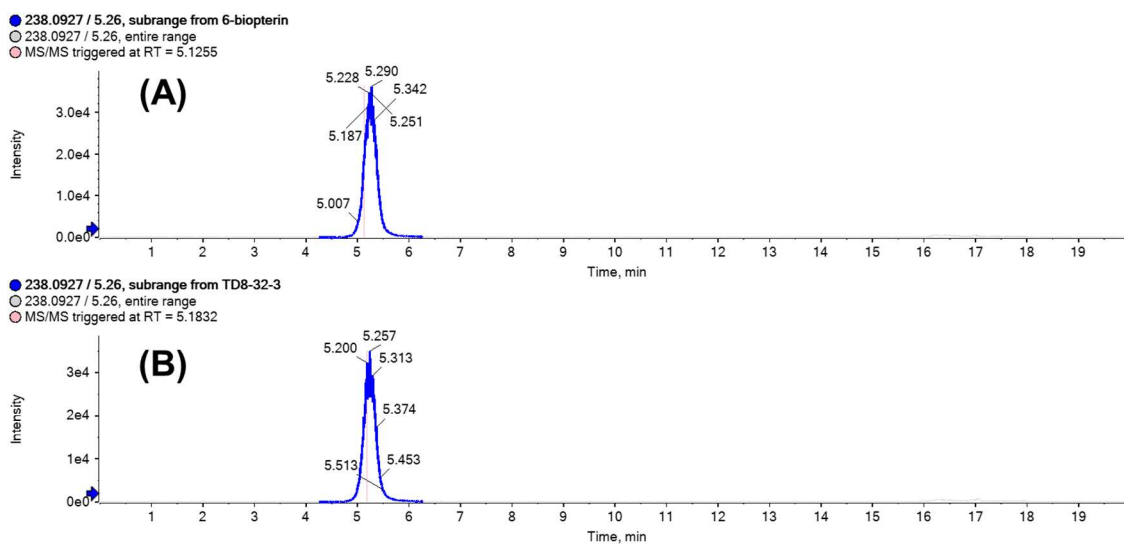


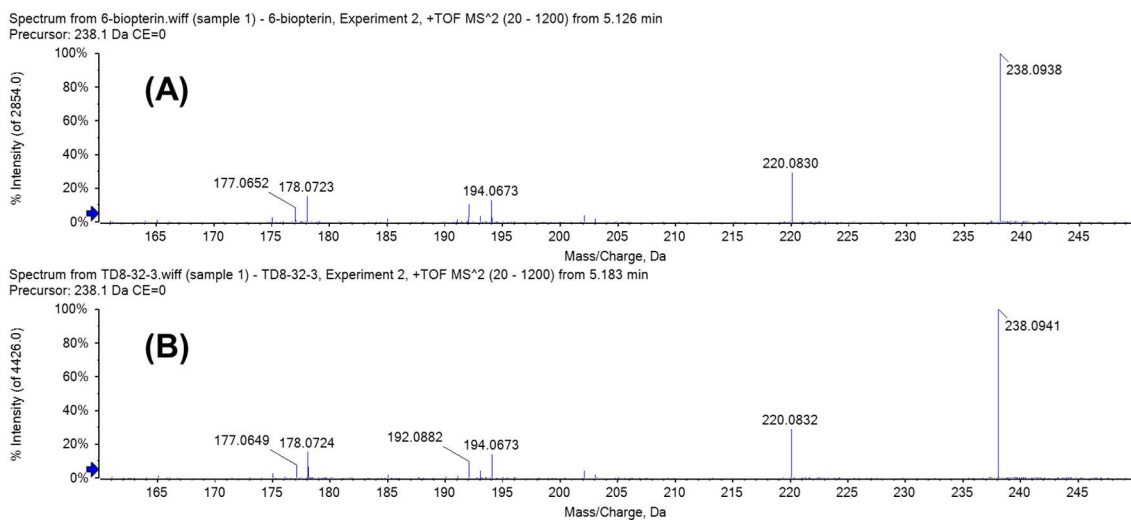
Figure 27. Key 2D NMR correlations for **9**.



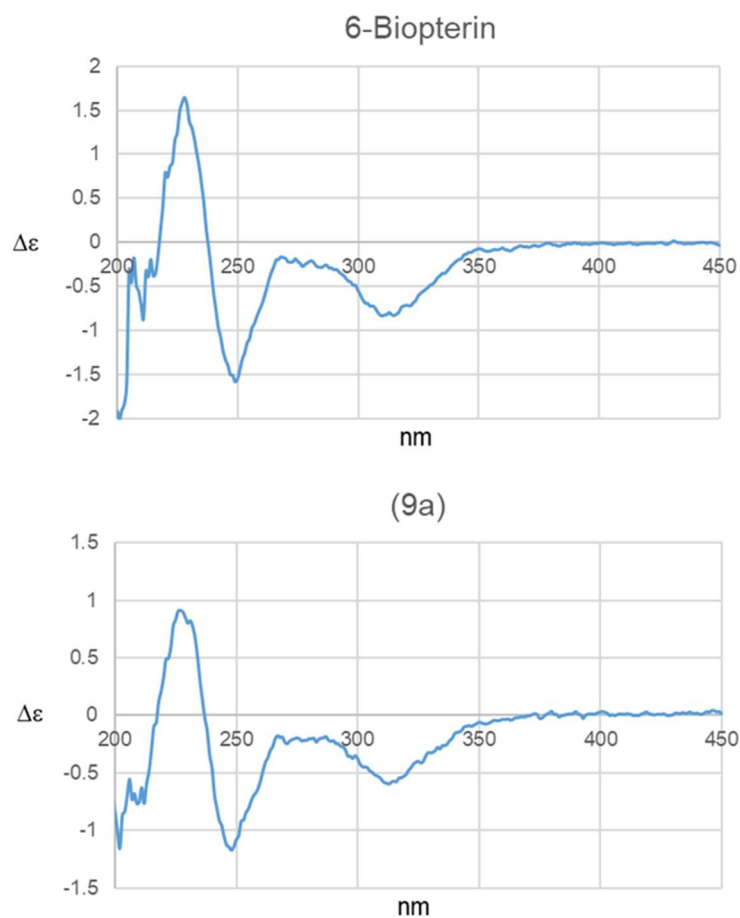
**Figure 28.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of (A) authentic 6-biopterin HCl salt, (B) **9a**, and (C) **9** in  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Figure 29.** Extracted ion chromatograms (positive mode) of (A) authentic 6-biopterin and (B) **9a**.



**Figure 30.** Positive mode HRESI-MS/MS spectra of (A) 6-biopterin and (B) **9a**.



**Figure 31.** ECD spectra of 6-biopterin and **9a**.

**Table 5.** NMR data for **9** in D<sub>2</sub>O.

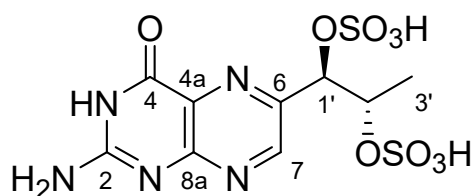
#C	$\delta_c$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	153.4, C				
4	162.2, C				
4a	127.9, C				
6	154.1, C				
7	150.4, CH	8.90, s		6, 8a	1' (vw), 2' (vw), 3' (vw)
8a	149.8, C				
1'	75.3, CH	5.03, d (5.5)	2'	6, 7, 2', 3'	7, 2', 3'
2'	79.4, CH	4.73, quin (6.4, 6.0)	1', 3'	6, 1', 3'	7 (vw), 1', 3'
3'	16.7, CH <sub>3</sub>	1.37, d (6.4)	2'	1', 2'	7 (vw), 1', 2'

Measured in D<sub>2</sub>O at 323 K. vw = very weak signal.

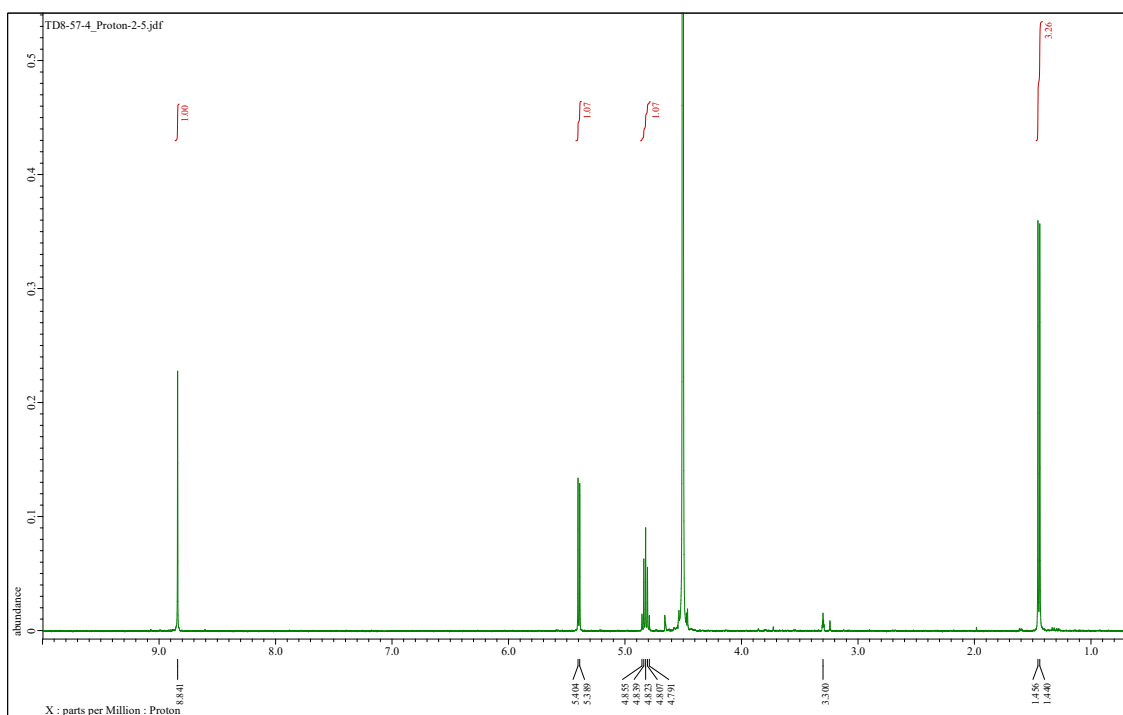
2-2-5. 6-Biopterin-1'-2'-disulfate (**10**, **Figure 32**) の構造決定

6-Biopterin-1'-2'-disulfate (**10**)は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

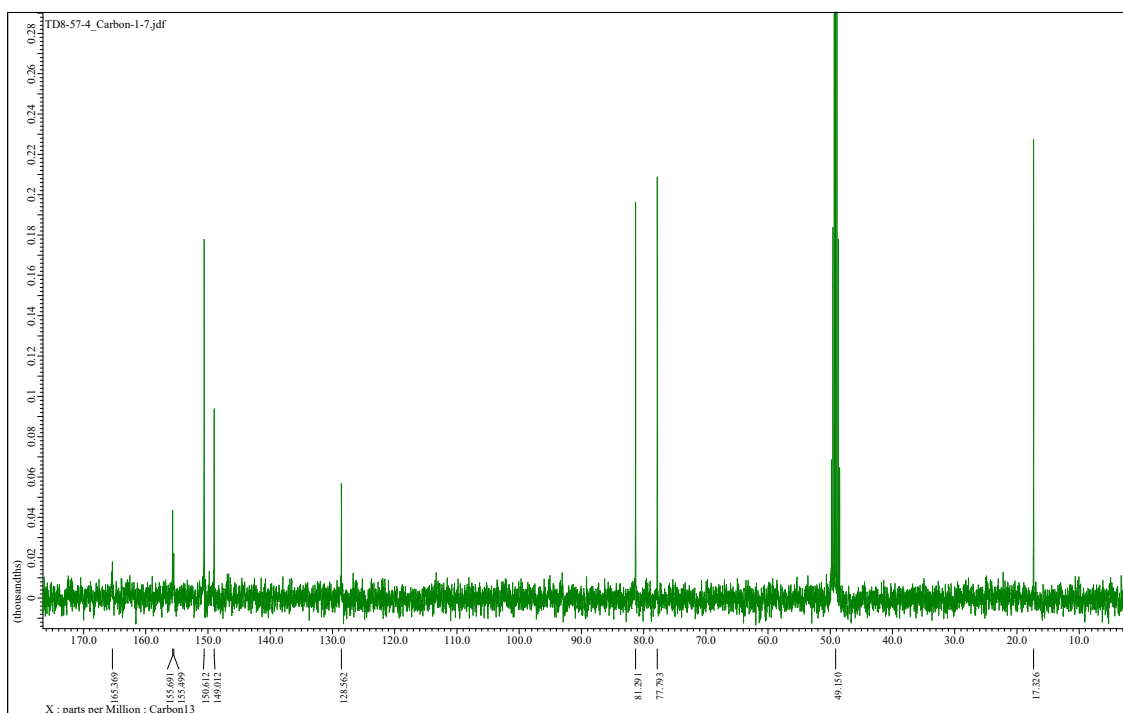
6-Biopterin-1'-2'-disulfate (**10**) :  $[\alpha]^{20}_D$  -81 ( $c$  0.019, H<sub>2</sub>O); UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) 234 (4.39), 276 (3.68), 343 (4.08) nm; ECD (1.0 mM, H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta \epsilon$ ) 222 (+3.09), 243 (-3.75), 273 (-2.66), 331 (-0.77) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3430, 2924, 2856, 1644, 1401, 1079, 790, 463 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 33-34** and **Table 6**; HRESIMS:  $m/z$  395.9927 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>,  $m/z$  395.9925).



**Figure 32.** The structure of **10**.



**Figure 33.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **10** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 34.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **10** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

6-Biopterin-1'-2'-disulfate (**10**) は白色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  395.9927 [M-H]<sup>-</sup> のピークが観測されたこと、また、<sup>13</sup>C NMR スペクトルにおいて 9 本のピークが観測されたことから (Figure 34), 分子式を C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub> と決定した。分子式 UV, NMR データから **10** は **9** の 1'位の水酸基がさらに硫酸エステル化された化合物であることが示唆された (Figure 33-35). **9** と同様に **10** の加水分解物 (**10a**) の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (Figure 36), LC-MS/MS データ (Figure 37-38) および比旋光度 (**10a**, [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> -70, c 0.012; 6-biopterin, [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> -59, c 0.01), ECD スペクトル (Figure 39) を 6-biopterin と比較することで **10** を 6-biopterin-1'-2'-disulfate と決定した。

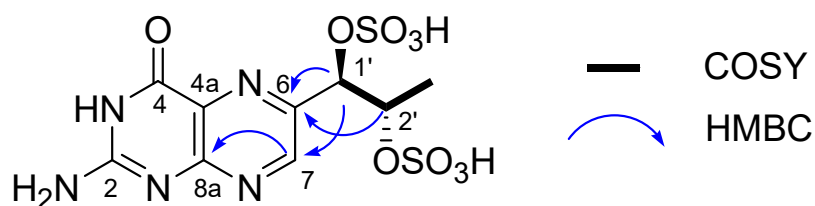


Figure 35. Key 2D NMR correlations for **10**.

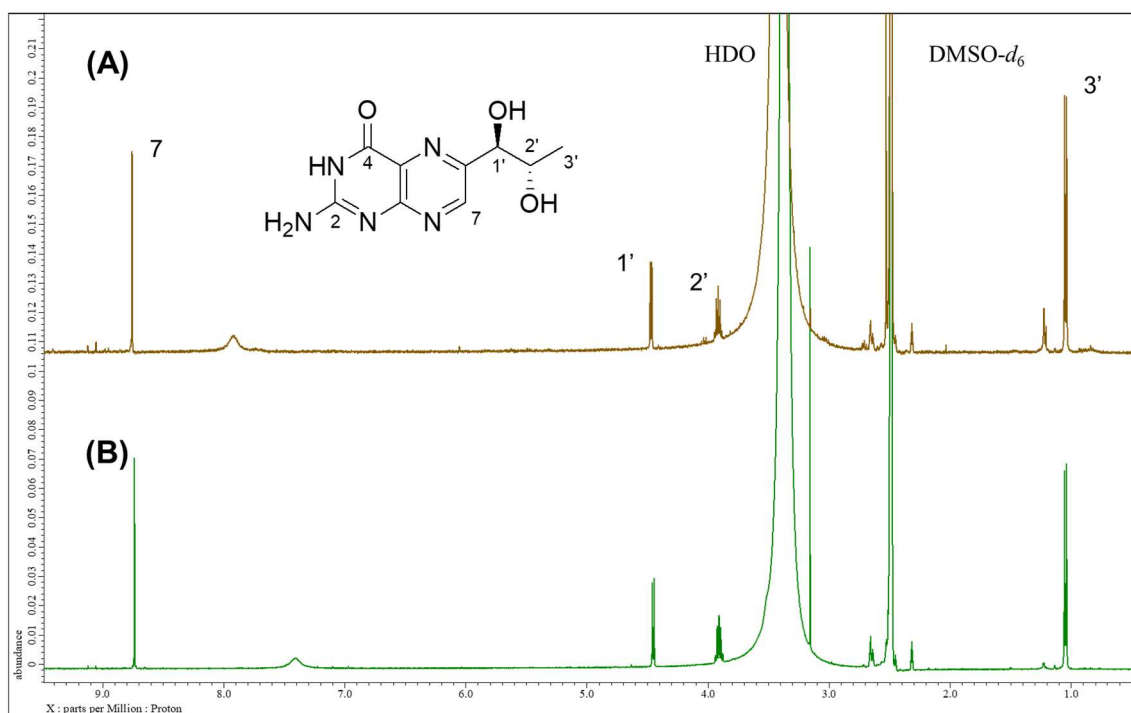


Figure 36.  $^1\text{H}$  NMR spectra of (A) authentic 6-biopterin and (B) **10a**.

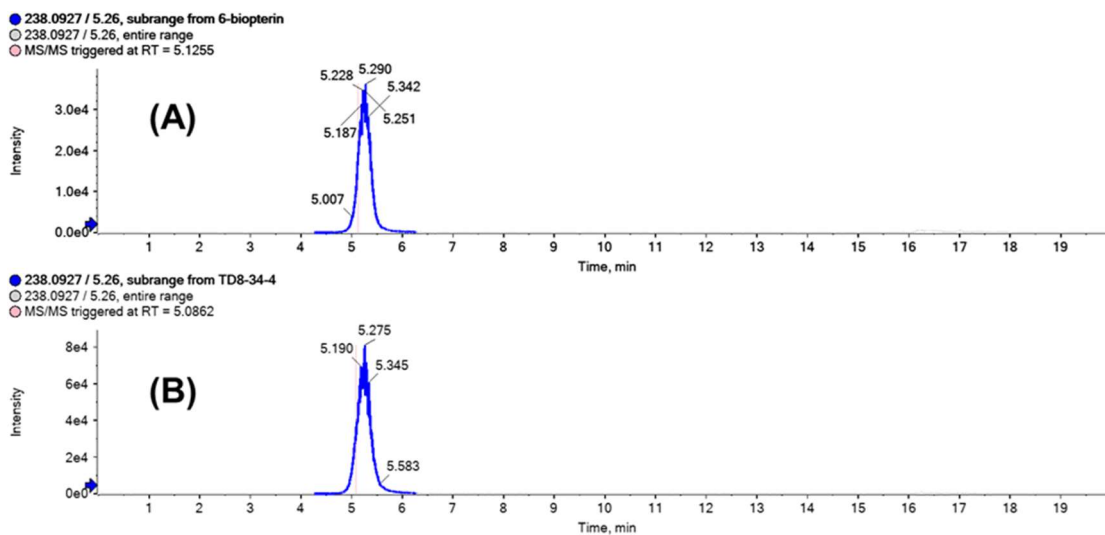
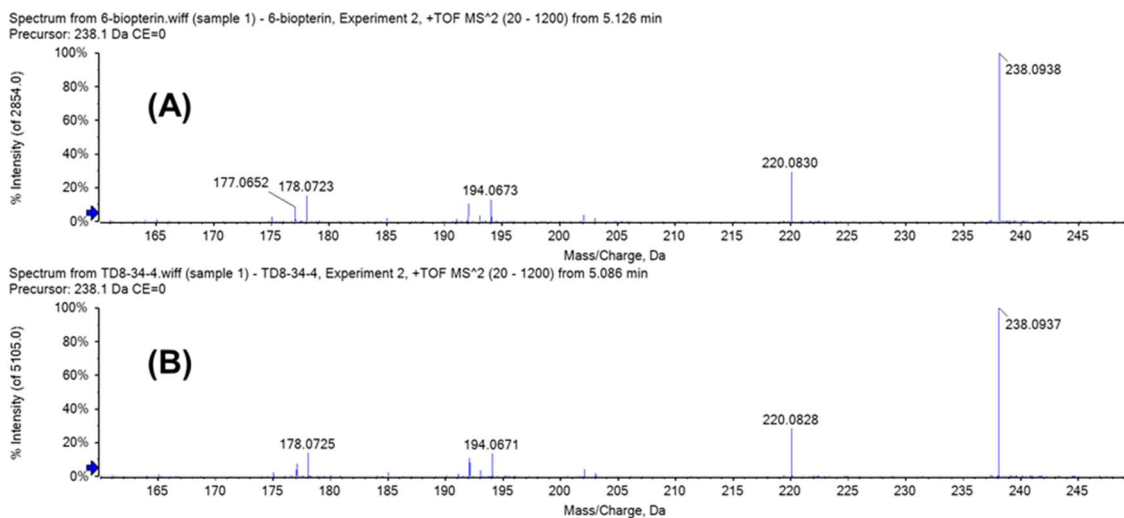
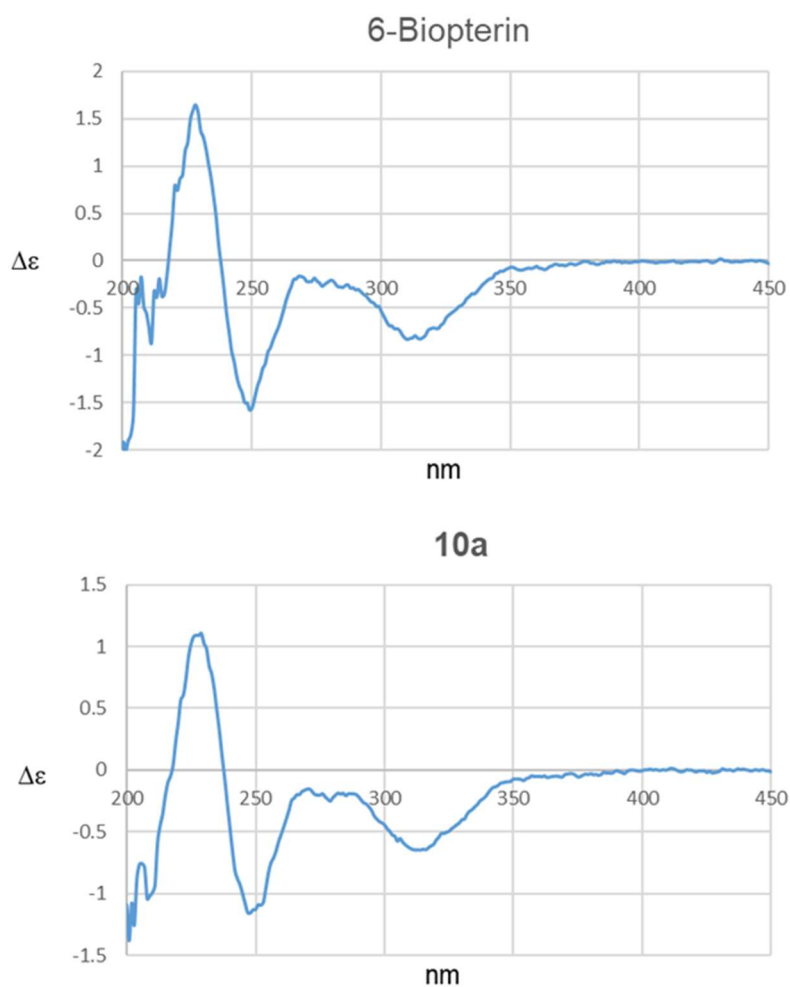


Figure 37. Extracted ion chromatograms (positive mode) of (A) authentic 6-biopterin and (B) **10a**.



**Figure 38.** Positive mode HRESI-MS/MS spectra of (A) authentic 6-biopterin and (B) **10a**.



**Figure 39.** ECD spectra of 6-biopterin and **10a**.

**Table 6.** NMR data for **10** in D<sub>2</sub>O.

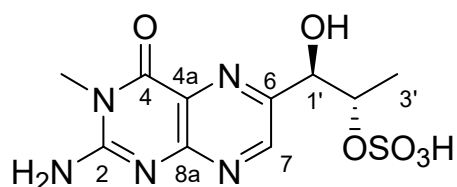
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	155.7, C				
4	165.4, C				
4a	128.6, C				
6	149.0, C				
7	150.6, CH	8.84, s		7, 8a	
8a	155.5, C				
1'	81.3, CH	5.40, d (6.0)	2'	6, 7, 2', 3'	7, 2', 3'
2'	77.8, CH	4.82, quin (6.4)	1', 3'	6, 1'	7, 1', 3'
3'	17.3, CH <sub>3</sub>	1.45, d (6.4)	2'	1', 2'	1', 2'

Measured at 323 K.

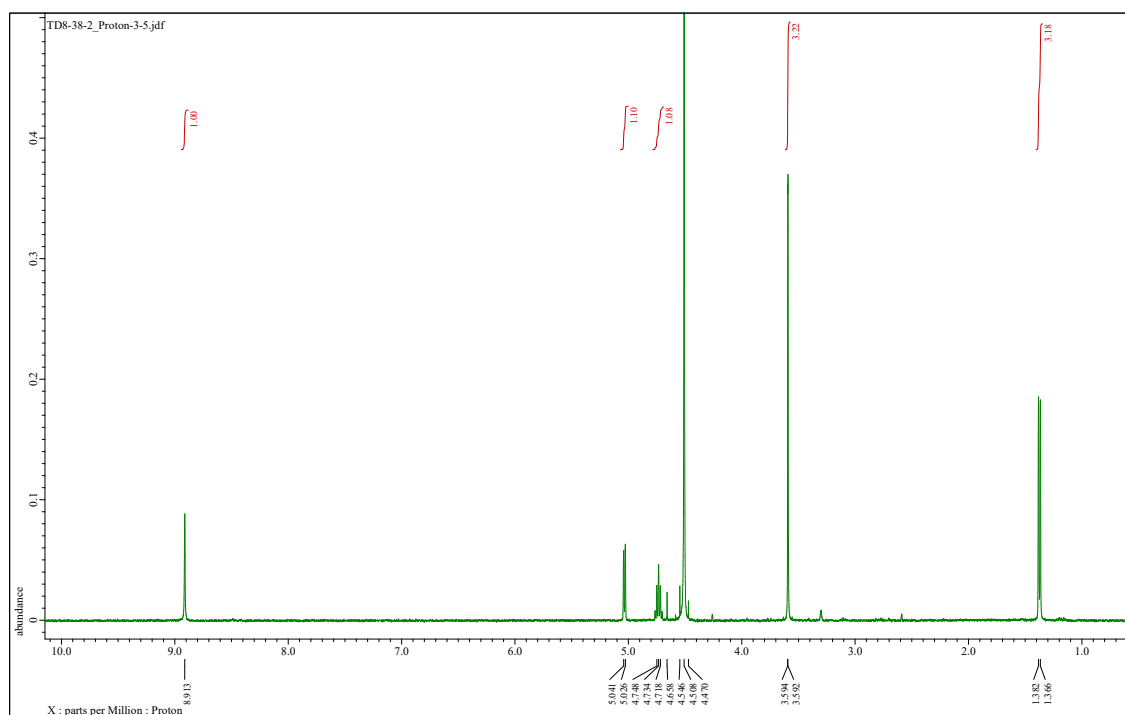
2-2-6. 3-Methyl-6-biopterin-2'-sulfate (**11**, **Figure 40**) の構造決定

3-Methyl-6-biopterin-2'-sulfate (**11**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

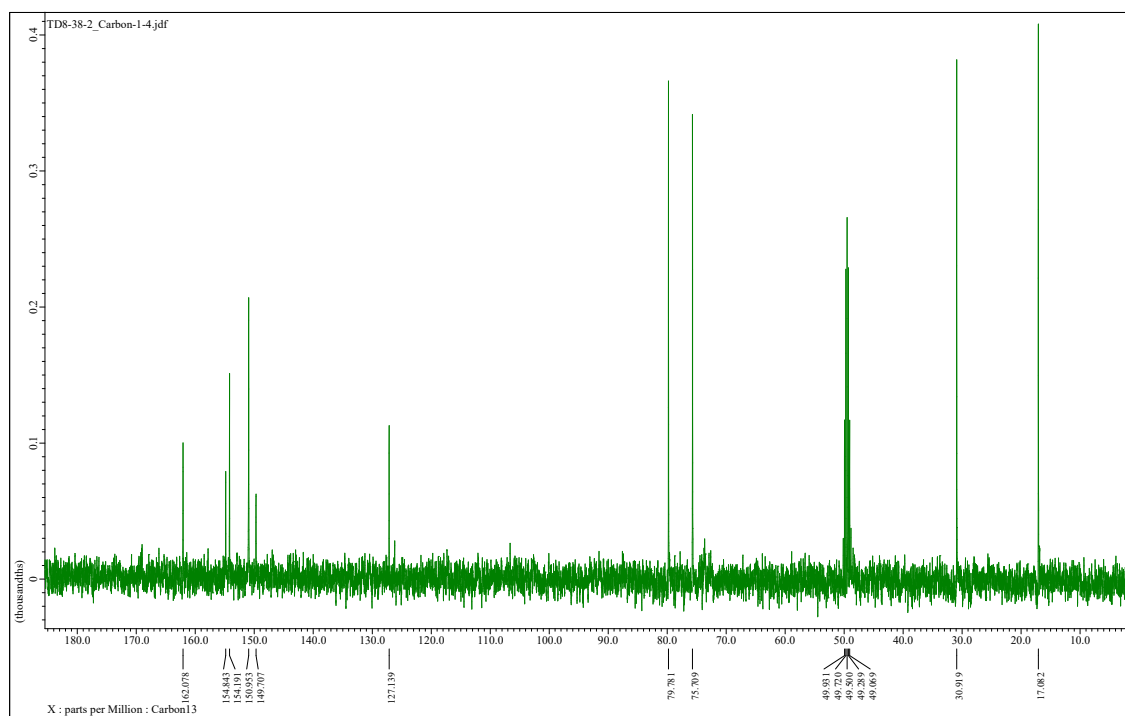
3-Methyl-6-biopterin-2'-sulfate (**11**):  $[\alpha]^{20}_D$  -26 (*c* 0.024, H<sub>2</sub>O); UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) 241 (4.12), 276 (4.10), 356 (3.72) nm; ECD (1.2 mM, H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 227 (+3.5), 248 (-2.5), 320 (-0.10) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  3425, 2924, 2856, 1675, 1644, 1079 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 41-42** and **Table 7**; HRESIMS: *m/z* 330.0514 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S, *m/z* 330.0514).



**Figure 40.** The structure of **11**.



**Figure 41.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **11** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 42.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **11** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

3-Methyl-6-biopterin-2'-sulfate (**11**) は黄色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  330.0514 [M-H]<sup>-</sup> のピークが観測されたこと、また、<sup>13</sup>C NMR スペクトルにおいて 10本のピークが観測されたことから (Figure 42), 分子式を C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S と決定した。分子式および NMR データから **11** は **10** の *N*-メチル化体であることが示唆された。HMBC スペクトルにおいてメチルシグレット  $\delta_{\text{H}}$  3.59 から  $\delta_{\text{C}}$  154.8 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  162.1 (C-4) への相関が見られたことから N-3 にメチル基を帰属した (Figure 43)。 **11** は **9** とよく似た ECD スペクトルを示したことから (Figure 44), 立体化学を **9** と同様に 1'*R*, 2'*S* と決定した。以上より, **11** を 3-methyl-6-biopterin-2'-sulfate と決定した。

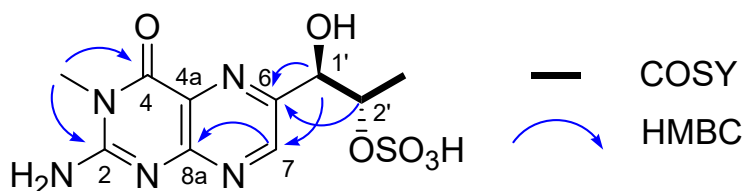
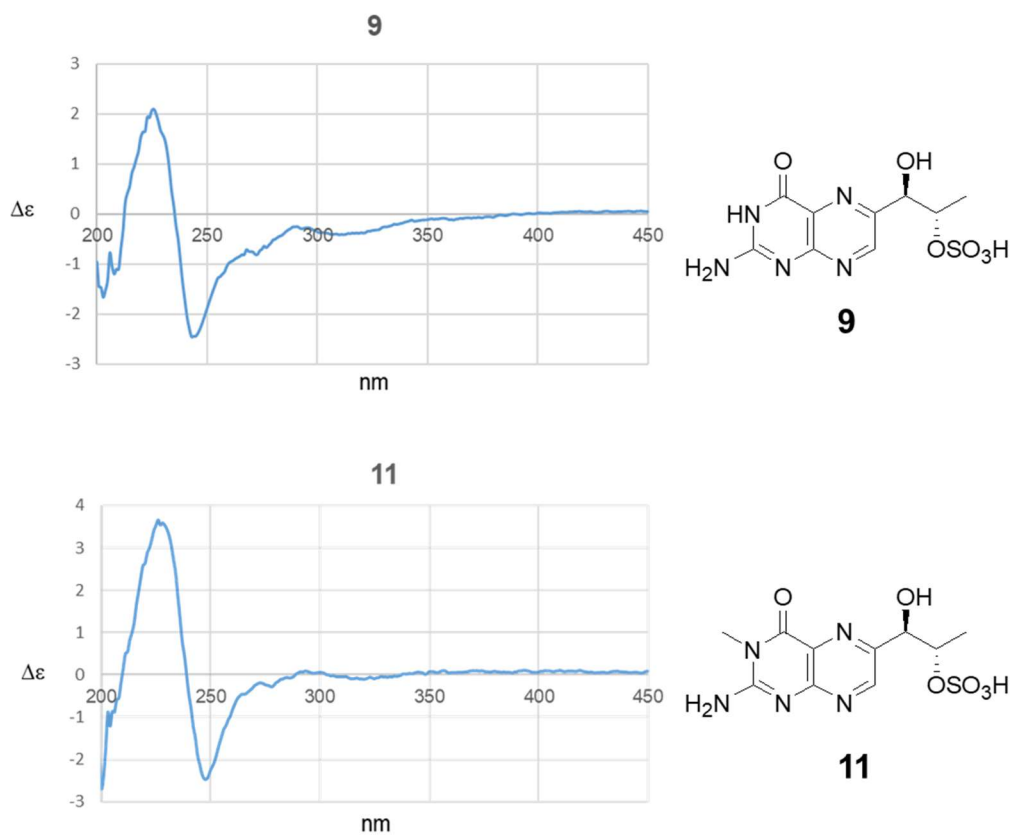


Figure 43. Key 2D NMR correlations for **11**.



**Figure 44.** ECD spectra of **9** and **11**.

**Table 7.** NMR data for **11** in D<sub>2</sub>O.

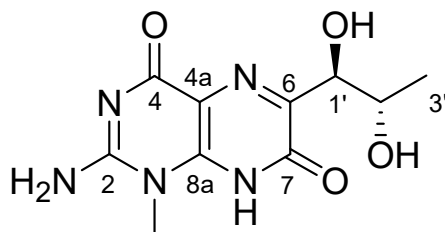
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	154.8, C				
3-Me	30.9, CH <sub>3</sub>	3.59, s		2, 4	
4	162.1, C				
4a	127.1, C				
6	154.2, C				
7	151.0, CH	8.91, s		6, 8a	1', 2', 3' (vw)
8a	149.7, C				
1'	75.7, CH	5.03, d (6.0)	2'	6, 7, 2', 3'	7, 2', 3'
2'	79.8, CH	4.73, quin (6.4, 6.0)	1', 3'	6, 2', 3'	7, 1', 3'
3'	17.1, CH <sub>3</sub>	1.37, d (6.4)	2'	1', 2'	7 (vw), 1', 2'

Measured at 323 K. vw = very weak signal.

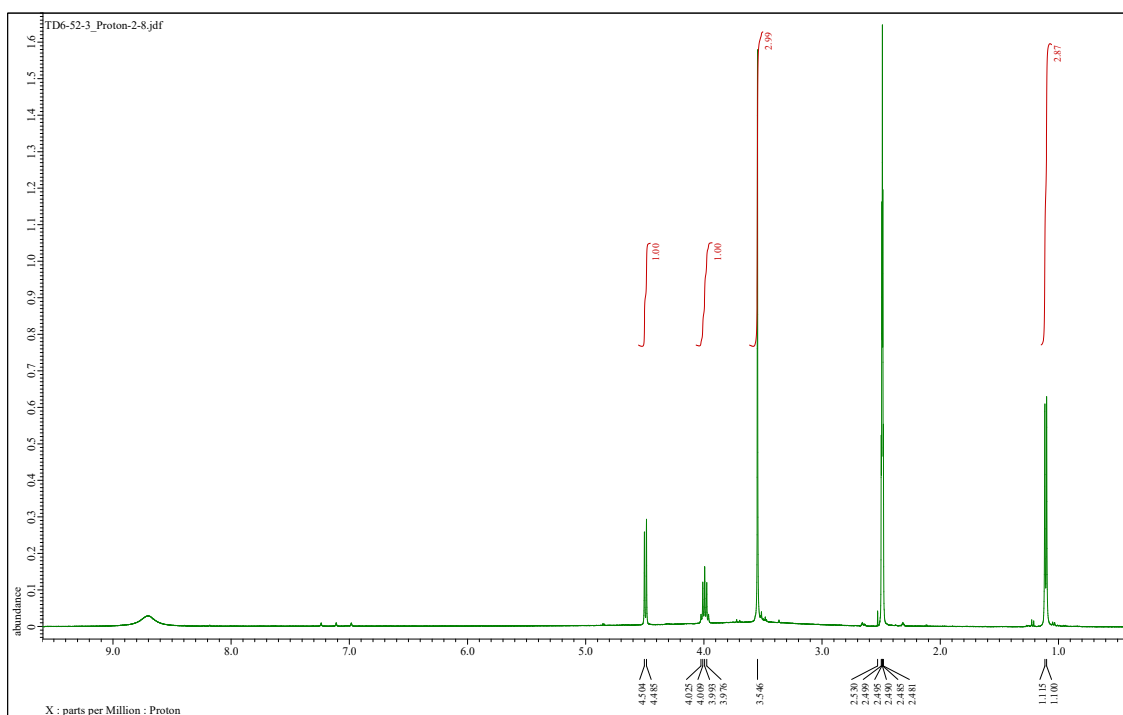
### 2-2-7. 1-Methyl-7-oxobiopterin (**12**, **Figure 45**) の構造決定

1-Methyl-7-oxobiopterin (**12**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

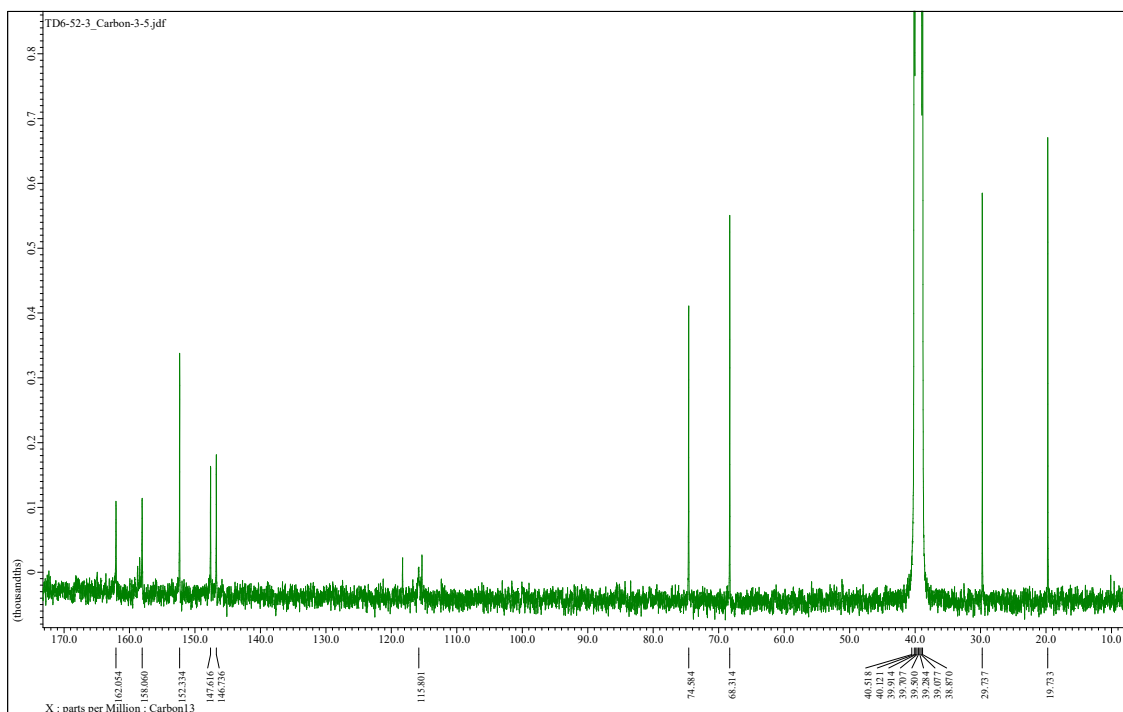
1-Methyl-7-oxobiopterin (**12**):  $[\alpha]_D^{20}$  -24 (*c* 0.011, 0.01M HCl); UV (0.01 M HCl)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) 206 (4.23), 271 (3.68), 323 (3.97) nm; ECD (1.5 mM, 0.01 M HCl)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta \epsilon$ ) 238 (-0.61), 256 (-0.17), 281 (-0.77), 321 (0.35) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3430, 2920, 2850, 1658, 1552, 1461, 1078  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) shown in **Figure 46-47** and **Table 8**; HRESIMS:  $m/z$  268.1038  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ ,  $m/z$  268.1040); HRESIMS/MS:  $m/z$  250.0935  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3$ ),  $m/z$  224.0772  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_3$ ),  $m/z$  208.0828  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  (calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_2$ ),  $m/z$  180.0877  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3]^+$  (calcd. for  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}$ ).



**Figure 45.** The structure of **12**.



**Figure 46.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **12** in  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Figure 47.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **12** in  $\text{DMSO-}d_6$ .

1-Methyl-7-oxobiopterin (**12**) は黄色粉末のトリフルオロ酢酸塩として得られた。**12** は生理的 pH では水に非常に溶けにくく、酸性水溶液に溶ける (10 mg/mL, 0.1 M HCl)。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  268.1038  $[M+H]^+$  のピークが観測されたことから分子式は  $C_{10}H_{13}N_5O_4$  と推定された。 $^1H$  NMR スペクトルにおいて 8H 分のプロトン、すなわち 3H 分のダブルット ( $\delta_H$  1.11), 3H 分のシングレット ( $\delta_H$  3.55), 1H 分のクインテット ( $\delta_H$  3.99), 1H 分のダブルット ( $\delta_H$  4.49) を観測した (**Figure 46**)。  $^{13}C$  NMR, HSQC スペクトルより 5 個の  $sp^2$  炭素 ( $\delta_C$  146.7, 147.6, 152.3, 158.1, 162.1), 4 個の  $sp^3$  炭素 ( $\delta_C$  19.7, 29.7, 68.3, 74.6) を観測した (**Figure 47, Table 8**)。 NMR および UV データから **12** もまたビオプテリン骨格を有することが示唆された。 $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR, HSQC スペクトルから *N*-メチル基 ( $\delta_H/\delta_C$  3.55/29.7) の存在が示唆され、さらに  $\delta_C$  152.3 (C-2),  $\delta_C$  147.6 (C-8a) への HMBC 相関が見られたことから N-1 にメチル基を帰属した (**Figure 48, A**)。 **12** はビオプテリンよりも酸素原子を一つ多く持っており、HMBC スペクトルにおいて  $\delta_H$  4.49 (H-1') から  $\delta_C$  162.1 への相関が見られたため C-7 にカルボニルを帰属した (**Figure 48, A**)。したがって **12** の平面構造を 1-methyl-7-oxobiopterin と決定した。次に 1', 2' 位の立体化学を決めるため ECD スペクトルを測定し、7-oxobiopterin<sup>74</sup> と比較したが、**12** は *D-threo*-, *L-erythro*-7-oxobiopterin の双方と似たスペクトルを示し、ECD スペクトルの比較では立体化学の決定には至らなかった。そこで **12** のアセチル化体 (**12a**) を調製し、 $^1H$  NMR データと比旋光度を既知のプテリン化合物と比較することで立体化学の決定を試みた。

化合物 **12a** は以下に示す物理学・分光的性質を与えた。

**12a**:  $[\alpha]_D^{20}$  -68 (*c* 0.068, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 234 (4.23), 252 (4.18), 338 (4.16) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  3430, 2920, 2850, 1658, 1552, 1461, 1078  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $CD_3OD$ , 400 MHz),  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) shown in **Table 9**; HRESIMS:  $m/z$  394.1351  $[M+H]^+$  (calcd. for  $C_{16}H_{19}N_5O_7$ ,  $m/z$  394.1357).

1,2-Diacetyl-1-arylpropane (**12b**) におけるビシナル結合定数  $^3J_{\text{H-1-H}2}/^3J_{\text{H-2-H}3}$  は *erythro* 体で 4.0/6.5 Hz, *threo* 体で 7.5/6.0 Hz であることが報告されており,<sup>75</sup> また海綿 *Corallistes undulatus* から単離されたプテリジン化合物 **12c** のアセチル化体 **12d** の  $^3J_{\text{H-1-H}2}$ ,  $^3J_{\text{H-2-H}3}$  はそれぞれ 4.2 Hz, 6.6 Hz と報告されている (Figure 48, B-C).<sup>72</sup> **12a** の  $^3J_{\text{H-1-H}2}/^3J_{\text{H-2-H}3}$  は CD<sub>3</sub>OD 中で 4.1/6.4 Hz を示したため前述の報告例と同様に **12** の 1',2'-ジオールは *erythro* 型の相対配置であると決定した. さらに **12a** の比旋光度は 1'R, 2'S の絶対立体配置である **12d** と近い値を示した (**12a**,  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -68$ ; **12d**,  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -52$ ). これらのデータより, **9-11** と同じく **12** の立体化学を 1'R, 2'S と決定した.

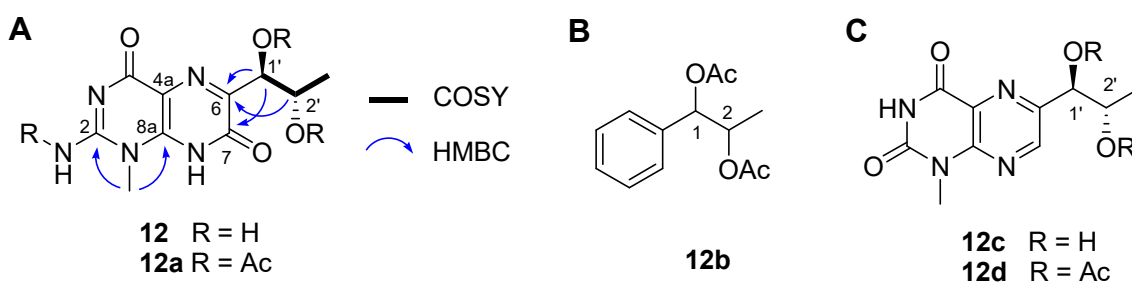


Figure 48. (A) 2D NMR correlations for **12** and structures of (B) **12b** and (C) **12c**, **12d**

**Table 8.** NMR data for **12** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

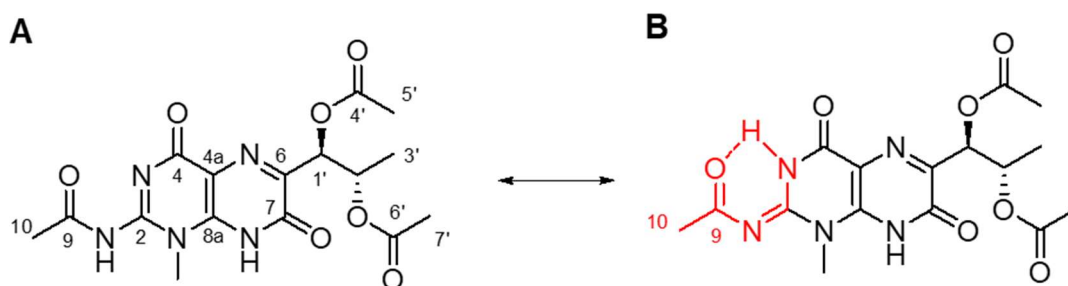
#C	$\delta_c$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
N-Me	29.7, CH <sub>3</sub>	3.55, s		2, 8a	
2	152.3, C				
4	158.1, C				
4a	115.8, C				
6	146.7, C				
7	162.1, C				
8a	147.6, C				
1'	74.6, CH	4.49, d (7.2)	2'	6, 7, 2', 3'	2', 3'
2'	68.3, CH	3.99, quin (6.4)	1', 3'	6, 1'	1', 3'
3'	19.7, CH <sub>3</sub>	1.11, d (6.0)	2'	1', 2'	1', 2'

Measured at 298 K.

**Table 9.** NMR data for **12a** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1-Me	28.9, CH <sub>3</sub>	3,48, s		2, 8a	
2	152.7, C <sup>a</sup>				
4	156.8, C				
6	143.0, C				
7	164.6, C				
8a	151.7, C <sup>a</sup>				
9	184.2, C <sup>c</sup>				
10	28.6, CH <sub>3</sub> <sup>c</sup>	2.09, s		9	
1'	73.1, CH	5.97, d (3.2)	2'	6, 2', 3', 4'	2', 3'
2'	69.0, CH	5.34, dq (6.4, 3.5)	1', 3'	6'	1', 3'
3'	14.3, CH <sub>3</sub>	1.12, d (6.4)	2'	1', 2'	1', 2'
4'	169.7, C				
5'	21.0, CH <sub>3</sub> <sup>b</sup>	2.07, s		4'	
6'	169.6, C				
7'	21.0, CH <sub>3</sub> <sup>b</sup>	1.97, s		6'	

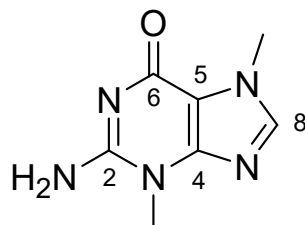
Measured at 276 K in DMSO-*d*<sub>6</sub>. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>Interchangeable. <sup>c</sup>Too much deshielding at C-9 ( $\delta_C$  184.2) and C-10 ( $\delta_C$  28.6) thought to be caused by formation of a hydrogen bond between C-9 carbonyl oxygen and NH-3 proton (**Figure 49**).

**Figure 49.** Proposed tautomeric forms of acetate **12a**.

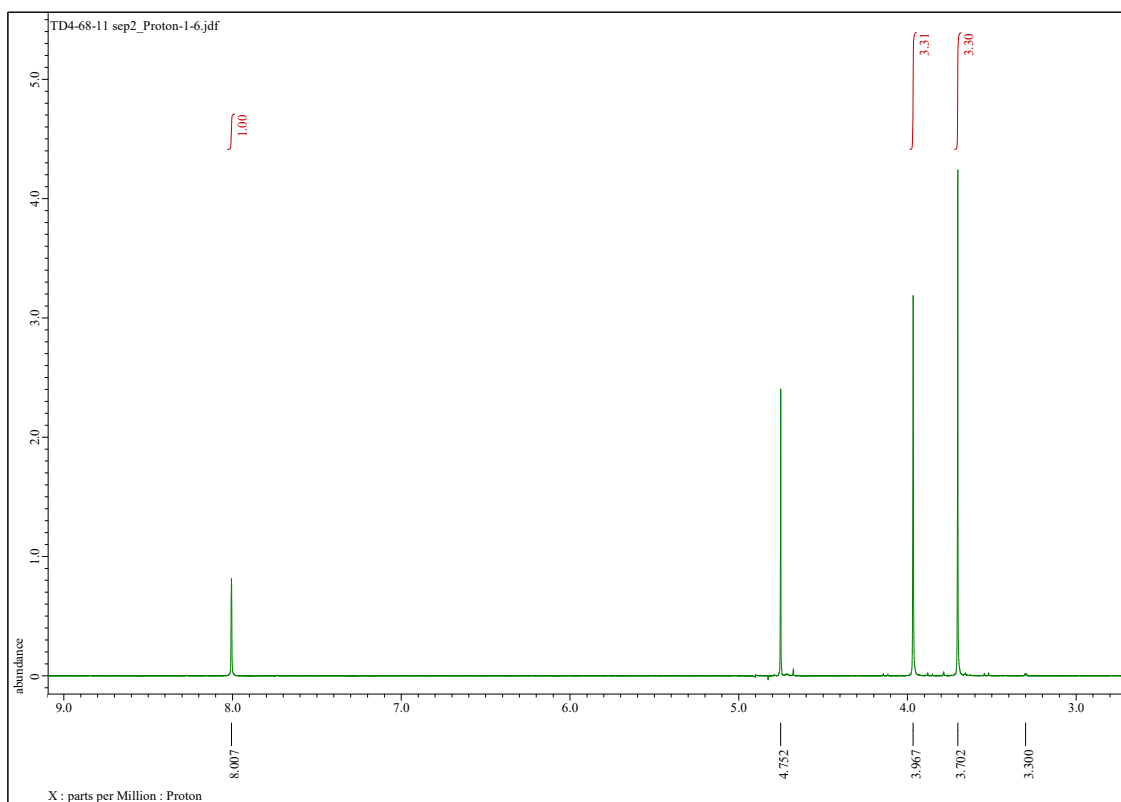
2-2-8. 3,7-dimethylguanine (**13**, **Figure 50**) の構造決定

3,7-Dimethylguanine (**13**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

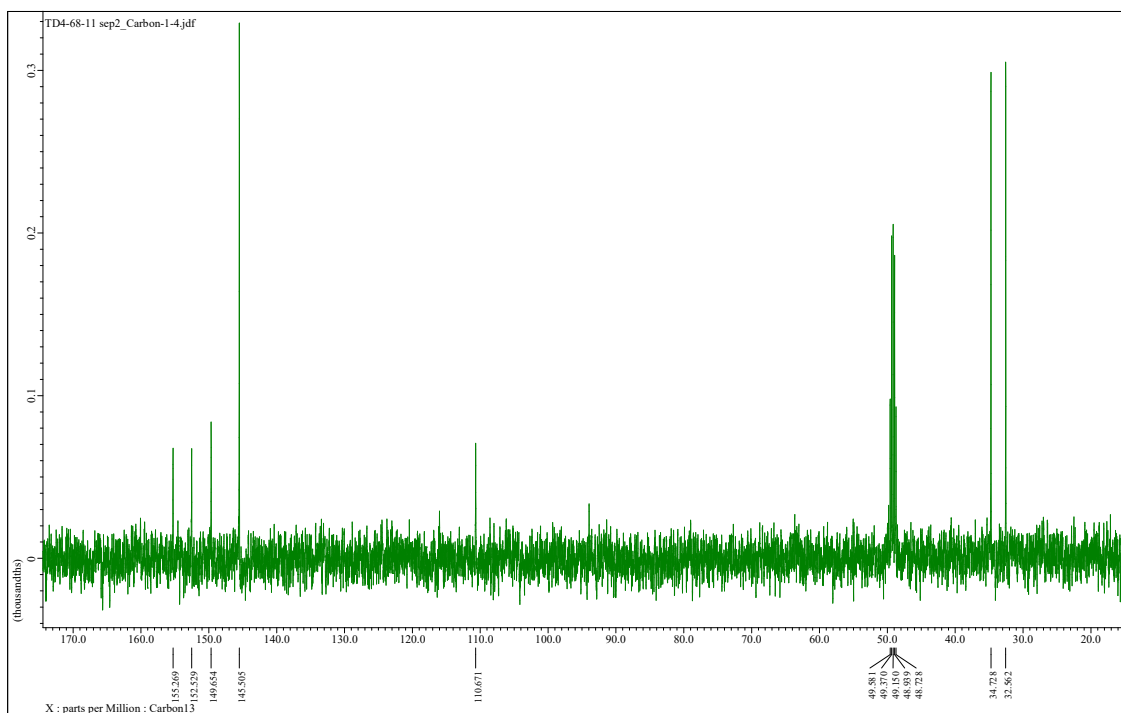
3,7-Dimethylguanine (**13**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 214 (3.96), 235 (3.53), 268 (3.67) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3414, 2920, 2850, 1693, 1402, 1131, 1075 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 51-52** and **Table 10**; HRESIMS:  $m/z$  180.0880 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O,  $m/z$  180.0880).



**Figure 50.** The structure of **13**.



**Figure 51.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **13** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 52.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **13** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

3,7-Dimethylguanine (**13**)は白色粉末のトリフルオロ酢酸塩として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  180.0880  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて7本のピークが観測されたことから (Figure 52), 分子式は  $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて7H分のプロトン, すなわち2個の3H分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.70, 3.97), 1H分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  8.01) を観測した (Figure 51).  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより5個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  110.7, 145.5, 149.7, 152.5, 155.3), 2個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  32.6, 34.7) を観測した (Figure 52, Table 10).  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて5個の芳香族炭素が観測されたこと,  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて2つのN-メチル由来のピークが観測されたこと, およびその分子式から **7** は dimethylguanine, または dimethylisoguanine であることが示唆されたが, UV スペクトル ( $\lambda_{\text{max}}$  268 nm) は guanine 骨格を支持した (1,3,7-trimethylisoguanine:  $\lambda_{\text{max}}$  288 nm<sup>76</sup>). 2つのメチル基は HMBC スペクトルより3位, 7位に帰属した (Figure 53). フィリピン産海綿 *Zyza fuliginosa* より単離された既知化合物である 3,7-dimethylguanine と  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを比較したところそれぞれ良い一致を示した.<sup>77</sup> よって **13** を 3,7-dimethylguanine と決定した.

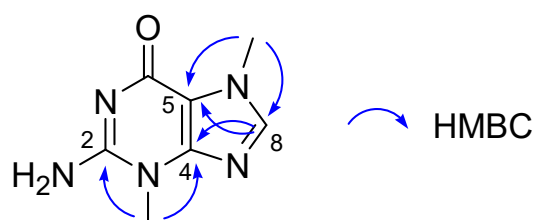


Figure 53. 2D NMR correlations for **13**.

**Table 10.** NMR data for **13** in D<sub>2</sub>O.

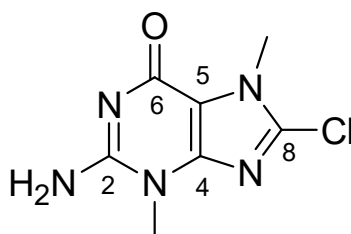
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	HMBC
2	152.5, C		
4	149.7, C		
5	110.7, C		
6	155.3, C		
8	145.5, CH	8.01, s	4, 5
3-Me	32.6, CH <sub>3</sub>	3.70, s	2, 4
7-Me	34.7, CH <sub>3</sub>	3.97, s	5, 8

Measured in D<sub>2</sub>O with CD<sub>3</sub>OD.

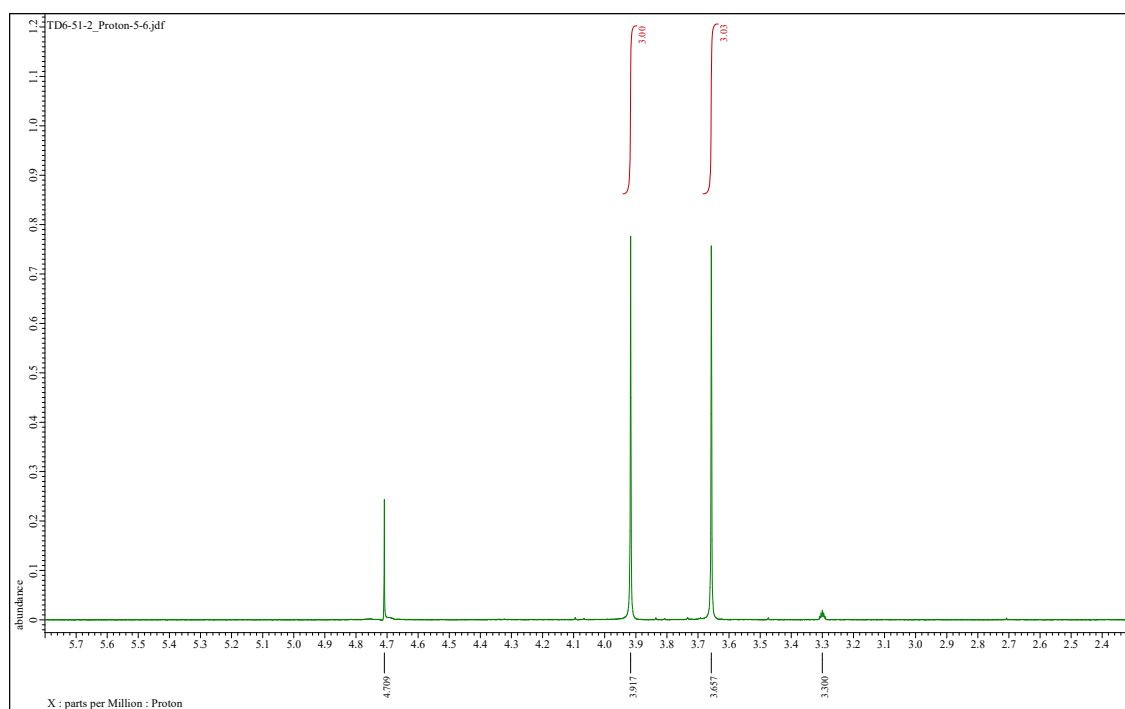
2-2-9. Ireneguanine (**14**, **Figure 54**) の構造決定

Ireneguanine (**14**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた。

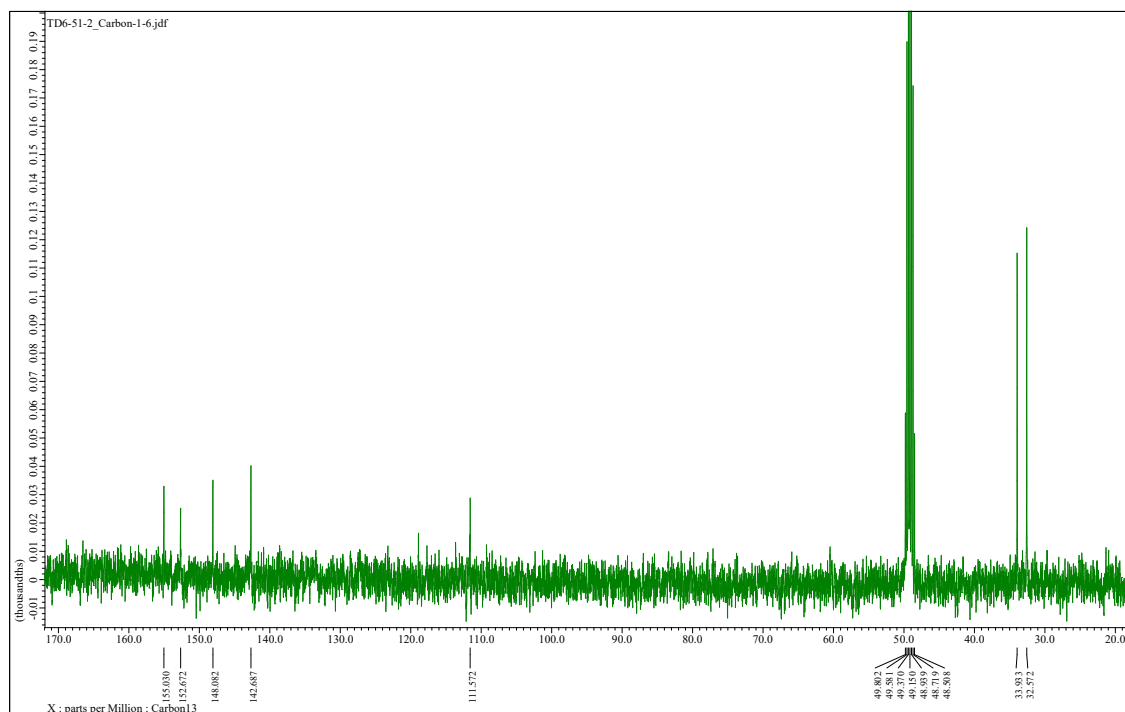
Ireneguanine (**14**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 209 (4.04), 273 (3.79) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3434, 2920, 2846, 1679, 1637, 1402, 1081 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 55-56** and **Table 11**; HRESIMS:  $m/z$  214.0488 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>5</sub>O,  $m/z$  214.0490).



**Figure 54.** The structure of **14**.

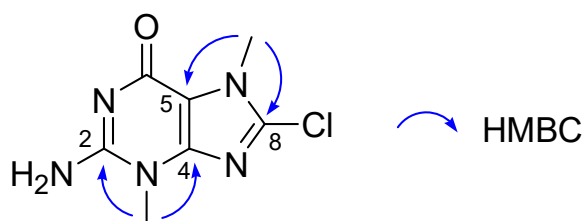


**Figure 55.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **14** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 56.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **14** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Ireneguanine (**14**) は白色粉末のトリフルオロ酢酸塩として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  214.0488  $[M+H]^+$  のピークが観測され、さらに  $m/z$  216.0456 に Cl の同位体ピークが観測されたこと、また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 7 本のピークが観測されたことから (**Figure 56**), 分子式は  $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_5\text{O}$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 6H 分のプロトン、すなわち 2 個の 3H 分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.66, 3.92) を観測した (**Figure 55**)。  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 5 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  111.6, 142.7, 148.1, 152.7, 155.0), 2 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  32.6, 33.9) を観測した (**Figure 56, Table 11**)。分子式および各種 NMR データから **14** は **13** と同様, dimethylguanaine 骨格を有することが示唆された (**Figure 57**)。  $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは **13** とよく一致しており、さらに芳香族シングレットプロトンが観測されず、8 位の炭素のピークが高磁場シフトしていたことから、**14** は **13** の 8 位プロトンが塩素原子で置換された 3,7-dimethyl-8-chloroguanine であると決定した。



**Figure 57.** 2D NMR correlations for **14**.

**Table 11.** NMR data for **14** in D<sub>2</sub>O.

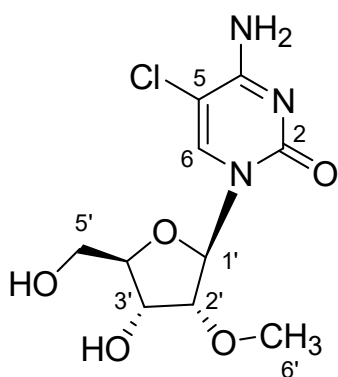
#C	$\delta$ C	$\delta$ H mult. ( <i>J</i> in Hz)	HMBC
2	152.7, C		
4	148.1, C		
5	111.6, C		
6	155.0, C		
8	142.7, C		
3-Me	32.6, CH <sub>3</sub>	3.66, s	2, 4
7-Me	33.9, CH <sub>3</sub>	3.92, s	5, 8

Measured at 298 K.

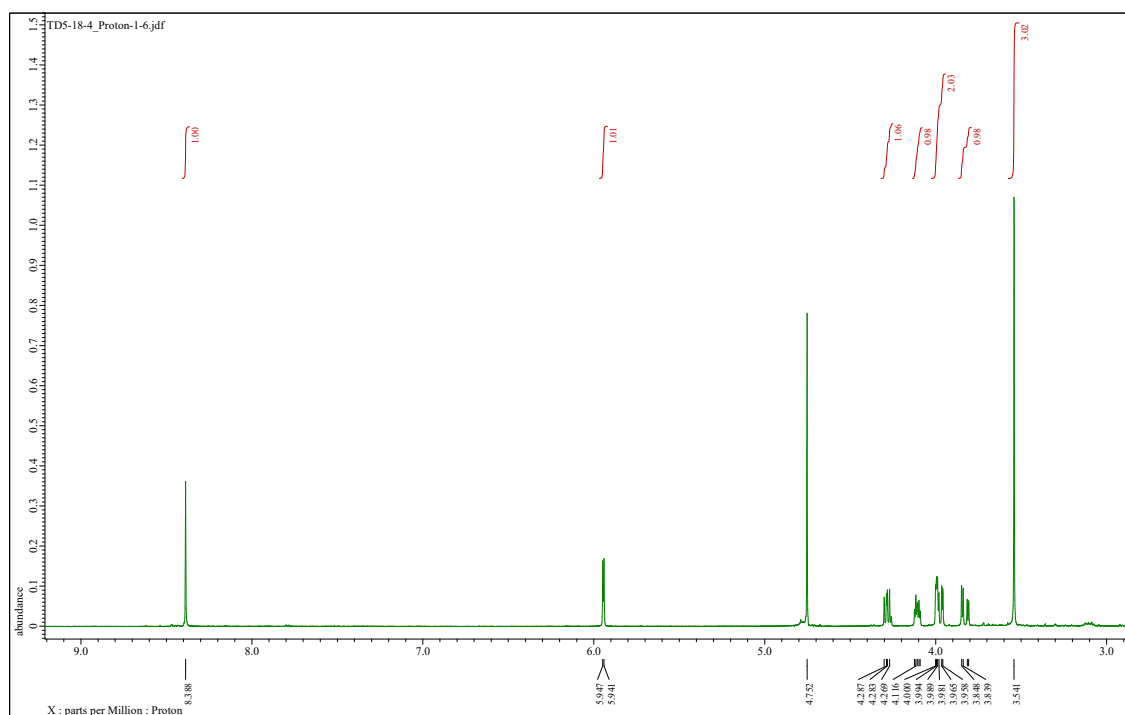
2-2-10. Irenecytidine (**15**, **Figure 58**) の構造決定

Irenecytidine (**15**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

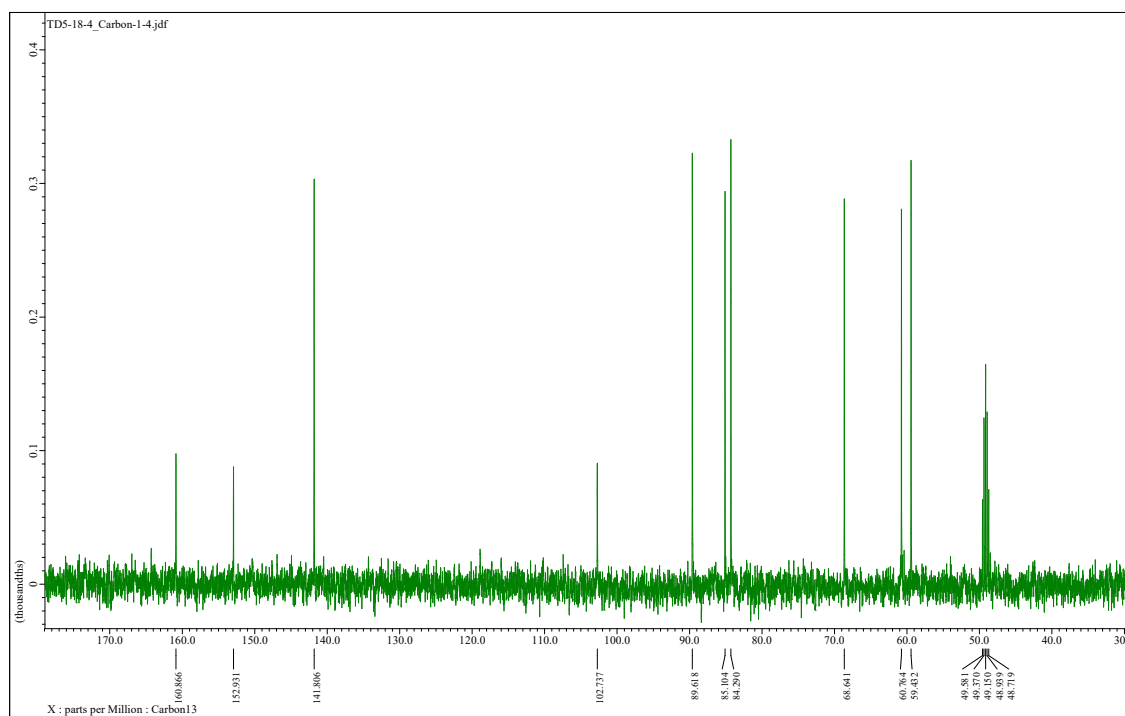
Irenecytidine (**15**):  $[\alpha]^{20}_D +43.2$  (*c* 0.012, H<sub>2</sub>O); UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) 217 (3.79), 286 (3.58) nm; ECD (0.3 mM, H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta \epsilon$ ) 223 (-0.2), 289 (+0.3) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3423, 2920, 2850, 1679, 1651, 1289, 1113, 1064  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 59-60** and **Table 12**; HRESIMS: *m/z* 292.0696 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, *m/z* 292.0695).



**Figure 58.** The structure of **15**.

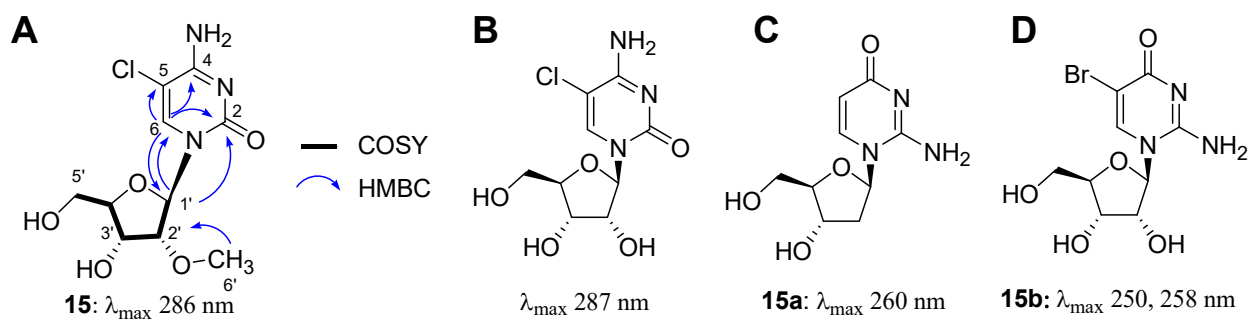


**Figure 59.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **15** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

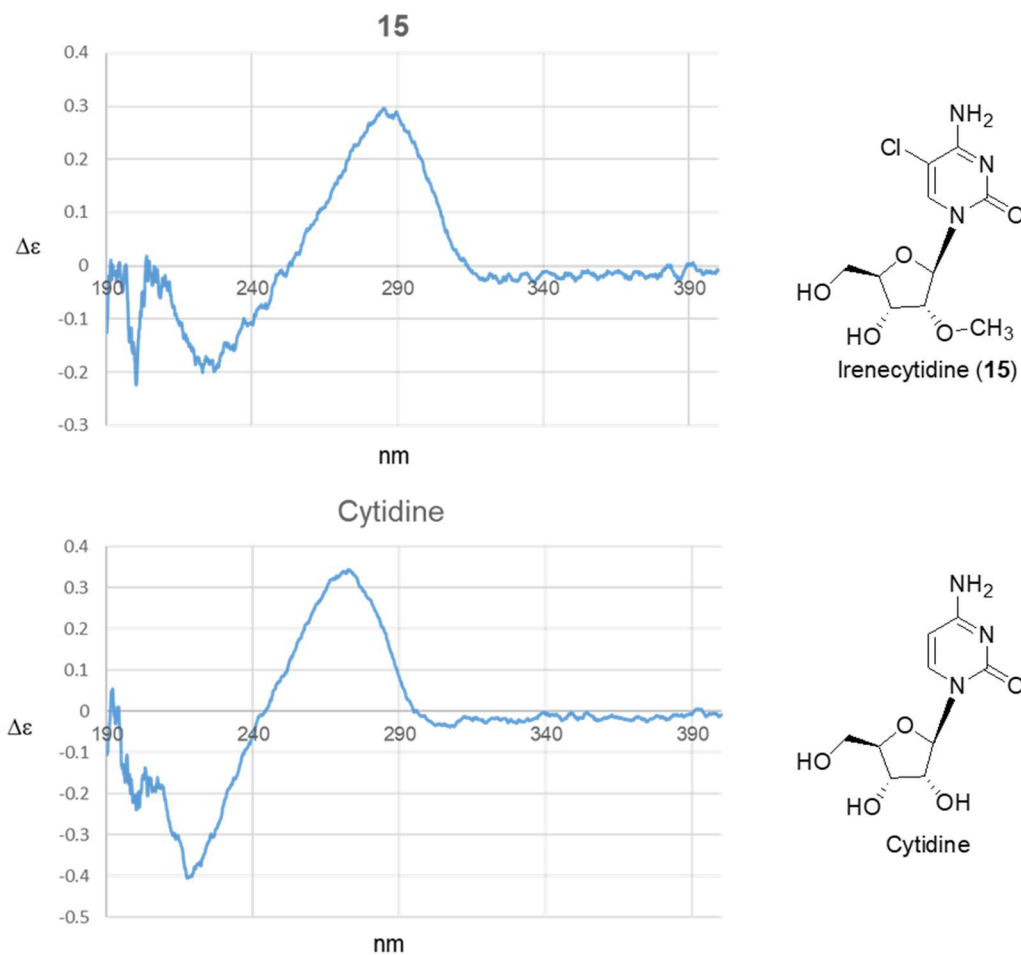


**Figure 60.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **15** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Irenecytidine (**15**) は白色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  292.0696  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、 $m/z$  294.0688 に Cl の同位体ピークが観測されたこと、また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 10 本のピークが観測されたことから (Figure 60), 分子式は  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{O}_5$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 10H 分のプロトン, すなわち 1 個の 1H 分の芳香族シングレット ( $\delta_{\text{H}}$  8.40), 1 個の 1H 分のダブルット ( $\delta_{\text{H}}$  5.94),  $\delta_{\text{H}}$  3.7-4.4 ppm に 5H 分のシグナル, 1 個の 3H 分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.54) を観測した (Figure 59).  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 4 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  102.7, 141.9, 152.6, 160.7), 6 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  59.4, 60.8, 68.7, 84.3, 85.1, 89.7) を観測した (Figure 60, Table 12). HMBC スペクトルにおいて  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (H-1') から  $\delta_{\text{C}}$  152.9 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  141.8 (C-6) へ,  $\delta_{\text{H}}$  8.40 (H-6) から  $\delta_{\text{C}}$  152.9 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  160.9 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  89.6 (C-1') へ相関が見られた (Figure 61, A). これらの NMR データから **15** は cytidine もしくは isocytidine 骨格を有しており, 核酸塩基の 5 位にひとつの置換基を持つこと, リボースの水酸基がひとつメチル化されていることが示唆された。**15** は UV 吸収スペクトルにおいて 286 nm に極大吸収を示し, この極大吸収波長 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) は chlorocytidine (Figure 61, B,  $\lambda_{\text{max}}$  287 nm)<sup>78</sup> とよく一致した。一方で isocytidine 誘導体 **15a**, **15b** の  $\lambda_{\text{max}}$  はそれぞれ 260, 258 nm であり (Figure 61, C, D),<sup>79-80</sup> これらのデータから **15** は cytidine 誘導体であることが示唆された。次にメチルシングレット  $\delta_{\text{H}}$  3.54 (H<sub>3</sub>-6') から  $\delta_{\text{C}}$  84.3 (C-2') への HMBC 相関が見られたことから 2'-OH にメチル基を帰属し, 最後に C-5 に塩素原子を帰属した (Figure 61, A). Cytidine と比旋光度 (**15**,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +43$ ; cytidine,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +33$ ) および ECD スペクトルを比較したところいずれも良く一致したため (Figure 62), **15** は cytidine と同じ立体化学であると決定した。



**Figure 61.** (A) Key 2D NMR correlations for **15** and the structures of (B) chlorocytidine and (C) isocytidine derivatives.



**Figure 62.** ECD spectra for **15** and authentic cytidine.

**Table 12.** NMR data for **15** in D<sub>2</sub>O.

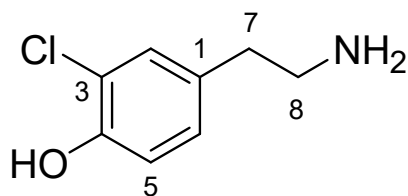
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	152.9, C				
4	160.9, C				
5	102.7, C				
6	141.8, CH	8.39, s		2, 4, 5, 1'	1', 2', 3', 5'a
1'	89.6, CH	5.94, d (2.7)	2'	2, 6, 2'	6, 2', 4', 6'
2'	84.3, CH	3.99, overlapped	1', 3'	6'	6, 1', 3', 6'
3'	68.6, CH	4.29, dd (7.3, 5.5)	2', 4'	1', 4', 5'	6, 2', 5'a, 5'b, 6'
4'	85.1, CH	4.11, dt (7.3, 3.5)	3', 5'a, 5'b	3'	1', 2', 5'a, 5'b
5'	60.8, CH <sub>2</sub>	a: 3.83, dd (13.0, 3.5) b: 3.98, overlapped	4', 5'b 4', 5'a	3', 4'	6, 4', 5'b 3', 4', 5'a
6'	59.4, CH <sub>3</sub>	3.54, s		2'	6, 1', 2', 3'

Measured at 303 K in D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD as internal standard ( $\delta_H$  3.30,  $\delta_C$  49.15 ppm).

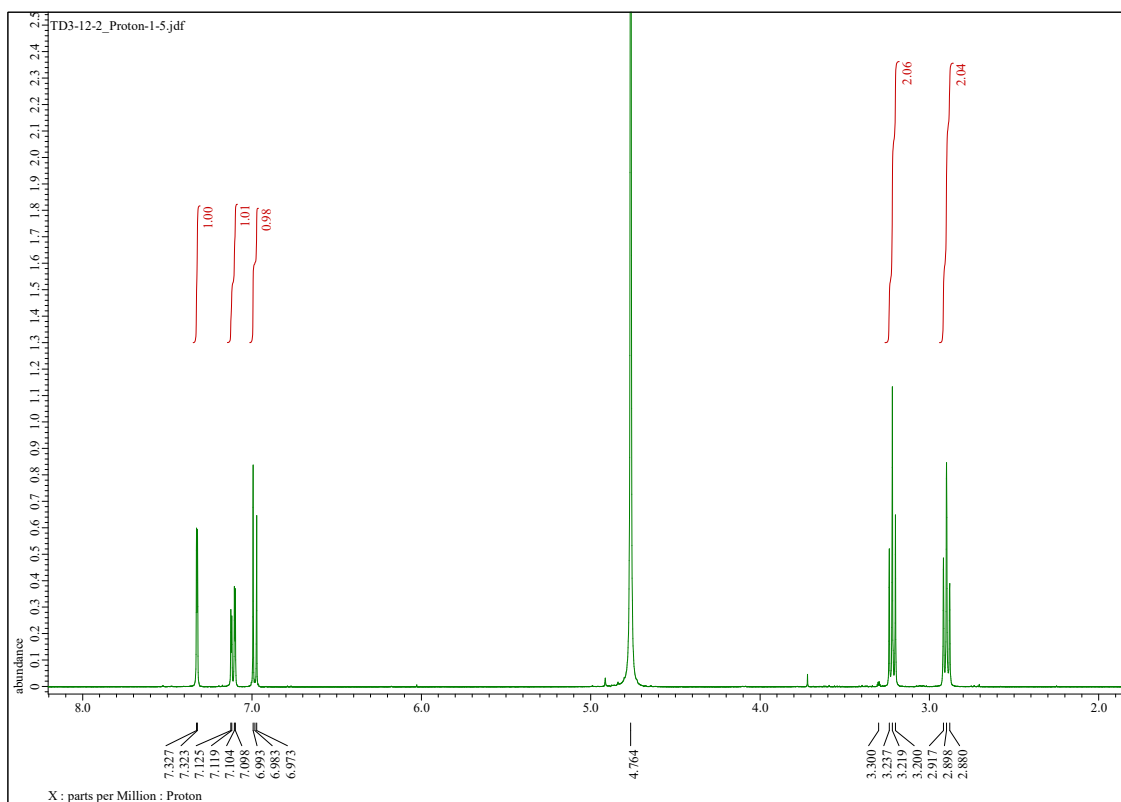
2-2-11. 3-Chlorotyramine (**16**, **Figure 63**) の構造決定

3-Chlorotyramine (**16**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

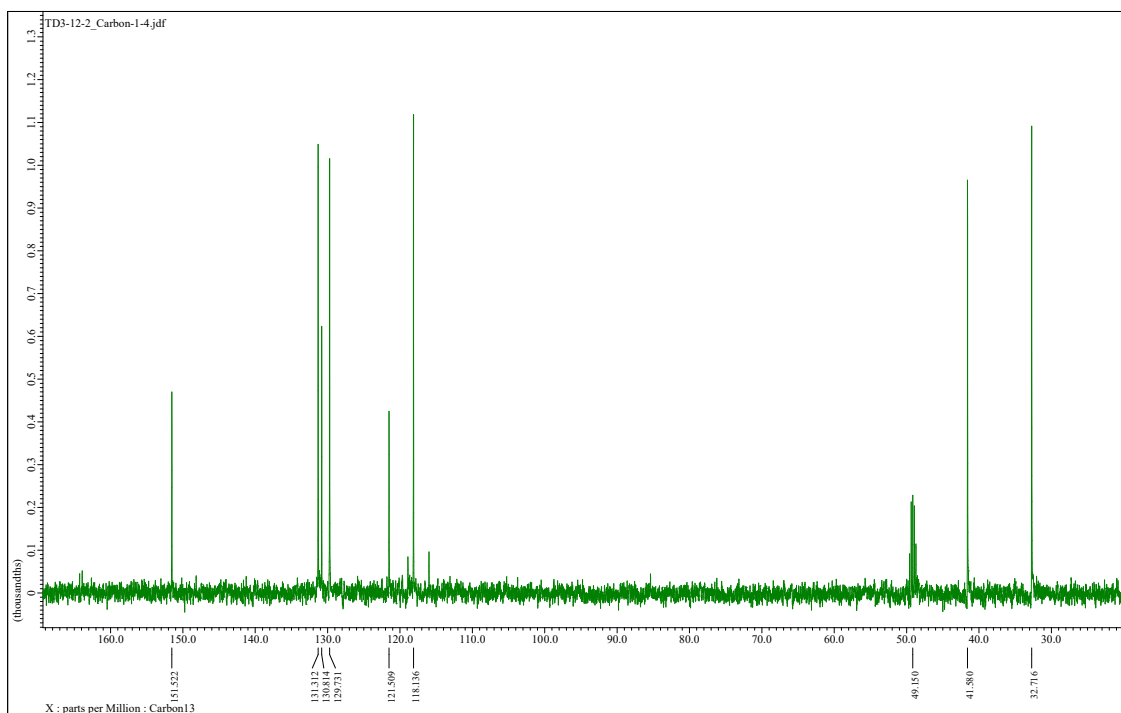
3-Chlorotyramine (**16**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 217 (3.61), 278 (3.01) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3435, 1672, 1514, 1070, 467 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 64-65** and **Table 13**; HRESIMS:  $m/z$  172.0523 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClNO,  $m/z$  172.0524).



**Figure 63.** The structure of **16**.

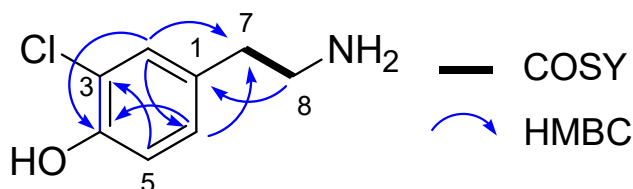


**Figure 64.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **16** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 65.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **16** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

3-Chlorotyramine (**16**) は白色粉末のトリフルオロ酢酸塩として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  172.0523  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、 $m/z$  174.0493 に Cl の同位体ピークが観測されたこと、また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 8 本のピークが観測されたことから (**Figure 65**), 分子式は  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClNO}$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 7H 分のプロトン, すなわち 2 個の 2H 分のトリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  2.90, 3.22), 3 個の 1H 分の芳香族シグナル ( $\delta_{\text{H}}$  6.98, 7.11, 7.33) を観測した (**Figure 64**)。  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 6 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  118.1, 121.5, 129.7, 130.8, 131.3, 151.5), 2 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  32.7, 41.6) を観測した (**Figure 65, Table 13**)。  $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび, HMBC スペクトルにおいて  $\delta_{\text{H}}$  7.33 (H-2),  $\delta_{\text{H}}$  7.11 (H-6) から  $\delta_{\text{C}}$  32.7 (C-7) へ,  $\delta_{\text{H}}$  3.22 (H-8) から  $\delta_{\text{C}}$  130.8 (C-1) への相関が見られたことから 3,4,-二置換エチルベンゼン骨格を同定した (**Figure 66**)。ベンゼン環およびエチル基の置換基については化学シフトから判断し, 3 位 ( $\delta_{\text{C}}$  121.5) に塩素原子を, 4 位 ( $\delta_{\text{C}}$  151.5) にヒドロキシ基を, 8 位 ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3.22/41.6) にアミノ基を帰属し, **16** を 3-chlorotyramine と決定した。



**Figure 66.** Key 2D NMR correlations for **16**.

**Table 13.** NMR data for **16** in D<sub>2</sub>O.

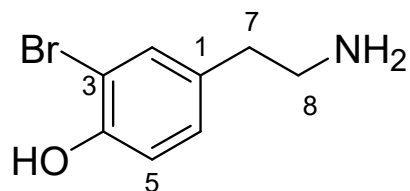
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	130.8, C				
2	131.3, CH	7.33, d (1.8)	5 (w), 6, 7(w)	3, 4, 6, 7	7, 8
3	121.5, C				
4	151.5, C				
5	118.1, CH	6.98, d (8.2)	2 (w), 5	1, 3, 4	6
6	129.7, CH	7.11, dd (8.2, 2.3)	2, 5, 7	3, 4, 7	5, 7, 8
7	32.7, CH <sub>2</sub>	2.90, t (7.3)	2 (w), 6 (w), 8	1, 8	2, 6, 8
8	41.6, CH <sub>2</sub>	3.22, t (7.3)	7	1, 7	2, 6, 7

Measured at 298 K. w = weak signal.

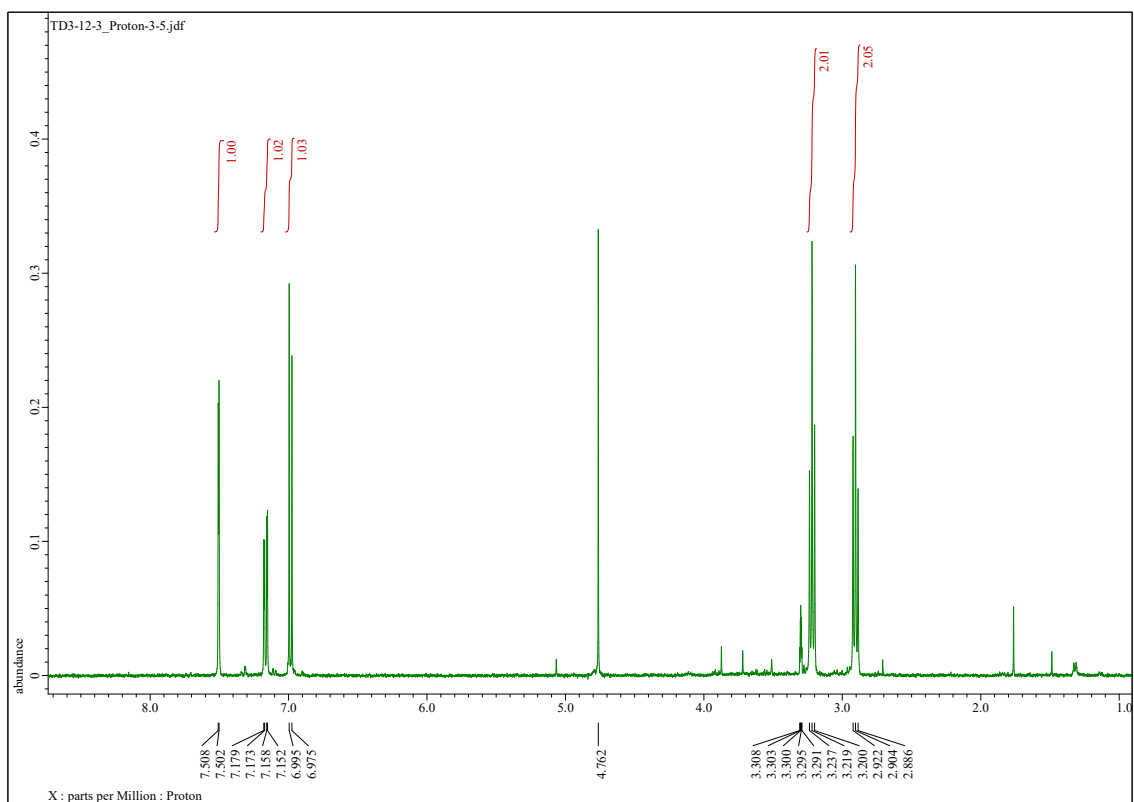
2-2-12. 3-Bromotyramine (**17**, **Figure 67**) の構造決定

3-Bromotyramine (**17**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

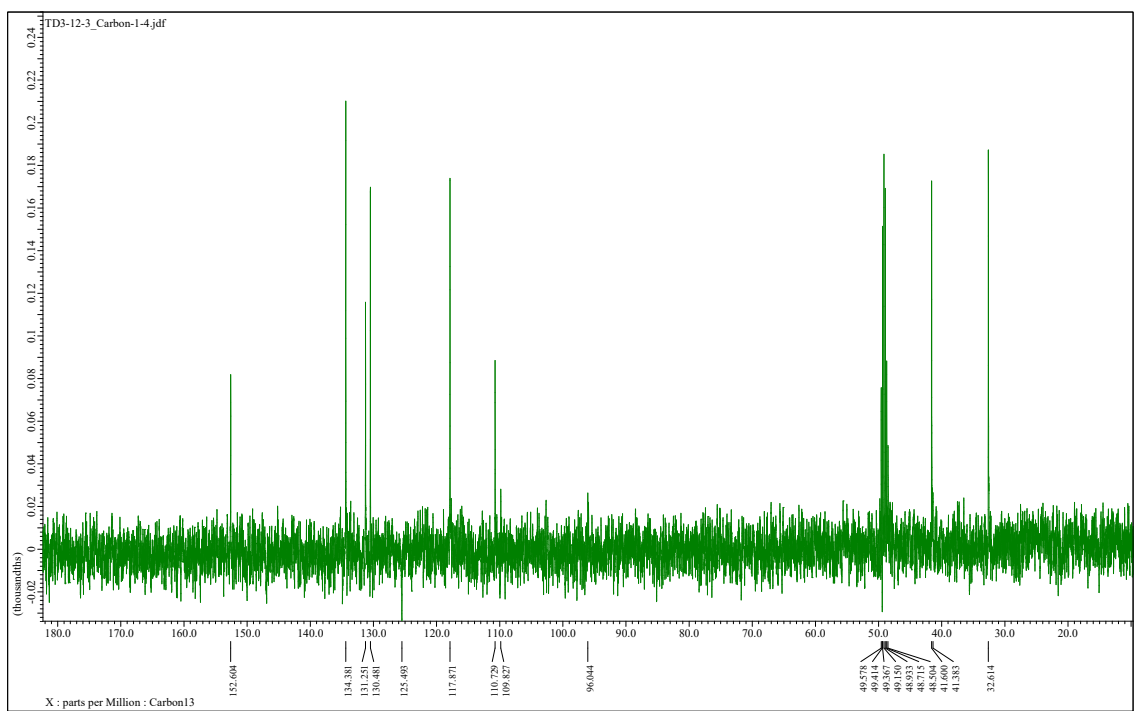
3-Bromotyramine (**17**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 279 (3.03) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3435, 1680, 1635, 1130, 1070, 475 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 68-69** and **Table 14**; HRESIMS:  $m/z$  216.0020 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>BrNO,  $m/z$  216.0019).



**Figure 67.** The structure of **17**.

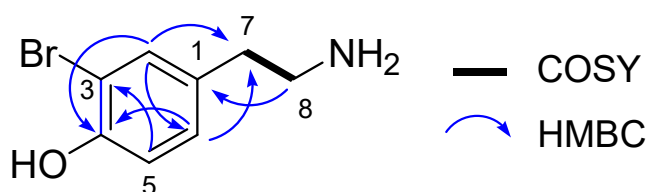


**Figure 68.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **17** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 69.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **17** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

3-Bromotyramine (**17**) は白色粉末のトリフルオロ酢酸塩として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  216.0523  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、 $m/z$  217.9999 に Br の同位体ピークが観測されたこと、また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 8 本のピークが観測されたことから (**Figure 69**), 分子式は  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{BrNO}$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 7H 分のプロトン, すなわち 2 個の 2H 分のトリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  2.90, 3.22), 3 個の 1H 分の芳香族シグナル ( $\delta_{\text{H}}$  6.99, 7.17, 7.51) を観測した (**Figure 68**)。  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 6 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  110.7, 117.9, 130.5, 131.2, 134.4, 152.6), 2 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  32.6, 41.6) を観測した (**Figure 69, Table 14**)。 HMBC スペクトルにおいて **16** と同様に,  $\delta_{\text{H}}$  7.51 (H-2),  $\delta_{\text{H}}$  7.17 (H-6) から  $\delta_{\text{C}}$  32.6 (C-7),  $\delta_{\text{H}}$  3.22 (H-8) から  $\delta_{\text{C}}$  131.2 (C-1) への相関が見られたことから (**Figure 70**), 3,4,-二置換エチルベンゼン骨格を同定し, 臭素原子, ヒドロキシ基, アミノ基についても **16** と同様に帰属し, **17** を 3-bromotyramine と決定した。これらの分光学的データは同属のホヤである *Cnemidocarpa bicornuta* より得られた 3-bromotyramine<sup>71</sup> とよく一致した。



**Figure 70.** Key 2D NMR correlations for **17**.

**Table 14.** NMR data for **17** in D<sub>2</sub>O.

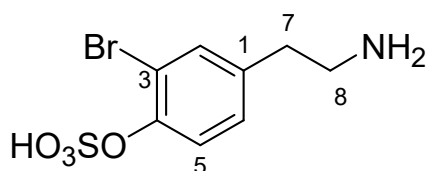
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	131.2, C				
2	134.4, CH	7.51, d (2.3)	6 (w)	3, 4, 6, 7	7, 8
3	110.7, C				
4	152.6, C				
5	117.9, CH	6.99, d (8.2)	6	1, 2, 4	6
6	130.5, CH	7.17, dd (8.2, 2.3)	2 (w), 5	2, 3 (w), 4, 5 (w), 7	5, 7, 8
7	32.6, CH <sub>2</sub>	2.90, t (7.3)	8	3, 4, 5, 8	3, 5, 8
8	41.6, CH <sub>2</sub>	3.22, t (7.3)	7	4, 7	3 (w), 5(w), 7

Measured at 298 K.

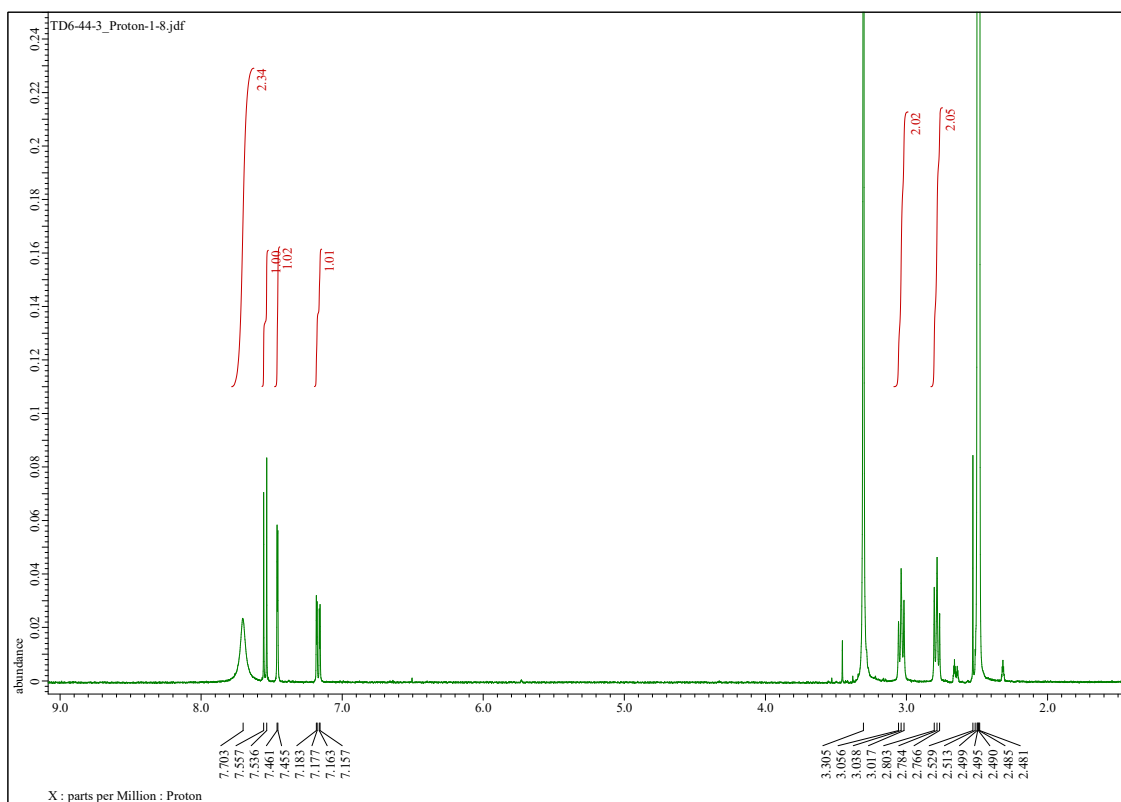
2-2-13. 3-Bromotyramine-*O*-sulfate (**18**, **Figure 71**) の構造決定

3-Bromotyramine-*O*-sulfate (**18**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

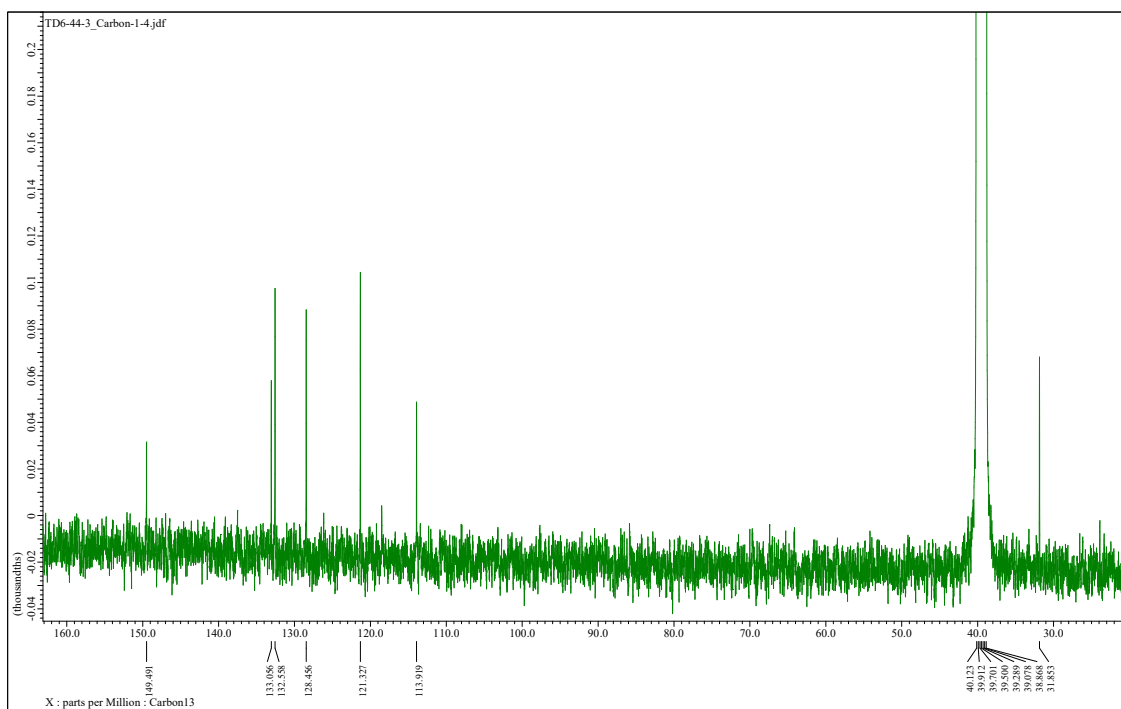
3-Bromotyramine-*O*-sulfate (**18**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 269 (2.62) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3434, 2920, 2850, 1633, 1560, 1064, 1039 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) shown in **Figure 72-73** and **Table 15**; HRESIMS:  $m/z$  295.9588 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>BrNO<sub>4</sub>S,  $m/z$  295.9587); HRESIMS/MS:  $m/z$  278.9320 [M+H-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>BrO<sub>4</sub>S),  $m/z$  216.0016 [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>), 198.9758 [M+H-NH<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.



**Figure 71.** The structure of **18**.



**Figure 72.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **18** in  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Figure 73.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **18** in  $\text{DMSO-}d_6$ .

3-Bromotyramine-*O*-sulfate (**18**) は白色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  295.9588  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、 $m/z$  297.9569 に Br の同位体ピークが観測されたこと、また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 8 本のピークが観測されたことから分子式は  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{BrNO}_4\text{S}$  と決定した (Figure 73)。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 9H 分のプロトン、すなわち 2 個の 2H 分のトリプレット ( $\delta_{\text{H}}$  2.78, 3.04), 3 個の 1H 分の芳香族シグナル ( $\delta_{\text{H}}$  7.17, 7.55, 7.64), 2H 分のブロードシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  7.70) を観測した (Figure 72)。 $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 6 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  113.9, 121.3, 128.5, 132.6, 133.1, 149.5), 2 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  31.9, 39.8) を観測した (Figure 73, Table 15)。HRESIMS データ, NMR データより **17** と同様, 3-bromotyramine 骨格を帰属した (Figure 74)。MS/MS スペクトルにおいて  $[M+H-\text{SO}_3]^+$  のニュートラルロスが見られたことから硫酸エステルの存在が示唆された。アンモニアのニュートラルロス  $[M+H-\text{NH}_3]^+$  が見られたこと, **18** は TLC 分析におけるニンヒドリン染色で強く呈色したことから, C-4 のフェノール性水酸基に硫酸エステルを帰属した。以上より, **18** を 3-bromotyramine-*O*-sulfate と決定した。

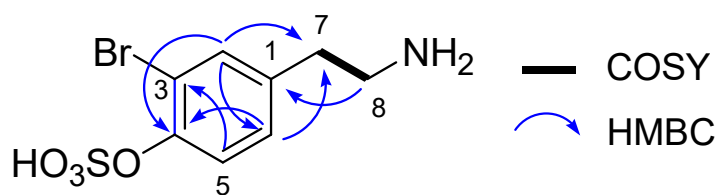


Figure 74. Key 2D NMR correlations for **18**.

**Table 15.** NMR data for **18** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

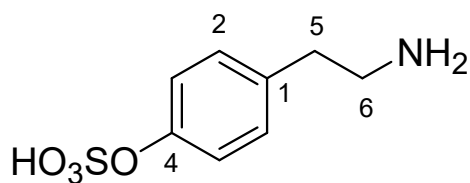
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	133.1, C				
2	132.6, CH	7.64, d (2.3)	5 (w)	3, 4, 6, 7	5, 7, 8
3	113.9, C				
4	149.5, C				
5	121.3, CH	7.55, d (8.7)	6	1, 3, 4	6
6	128.5, CH	7.17, dd (8.2, 2.3)	2 (w), 5	2, 3 (vw), 4, 7	5, 7, 8 (w)
7	31.9, CH <sub>2</sub>	2.78, t (7.8, 7.3)	8	1, 6, 8	2, 6, 8, 9-NH <sub>2</sub> (w)
8	39.8, CH <sub>2</sub> <sup>α</sup>	3.04, t (8.2, 7.3)	7	1, 7	2 (w), 6 (w), 7, 9
9-NH <sub>2</sub>		7.70, brs			7 (w), 8

Measured at 298 K. <sup>α</sup>Chemical shift determined from HSQC spectrum.

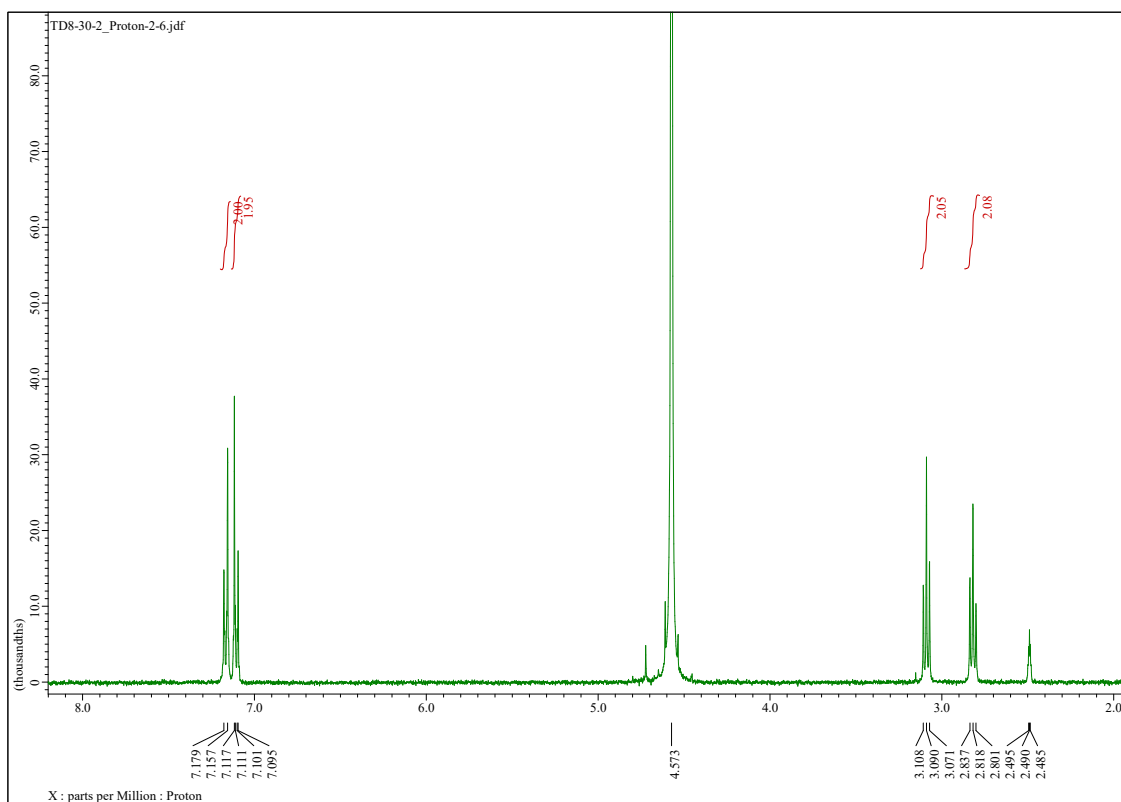
2-2-14. Tyramine-*O*-sulfate (**19**, **Figure 75**) の構造決定

Tyramine-*O*-sulfate (**19**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

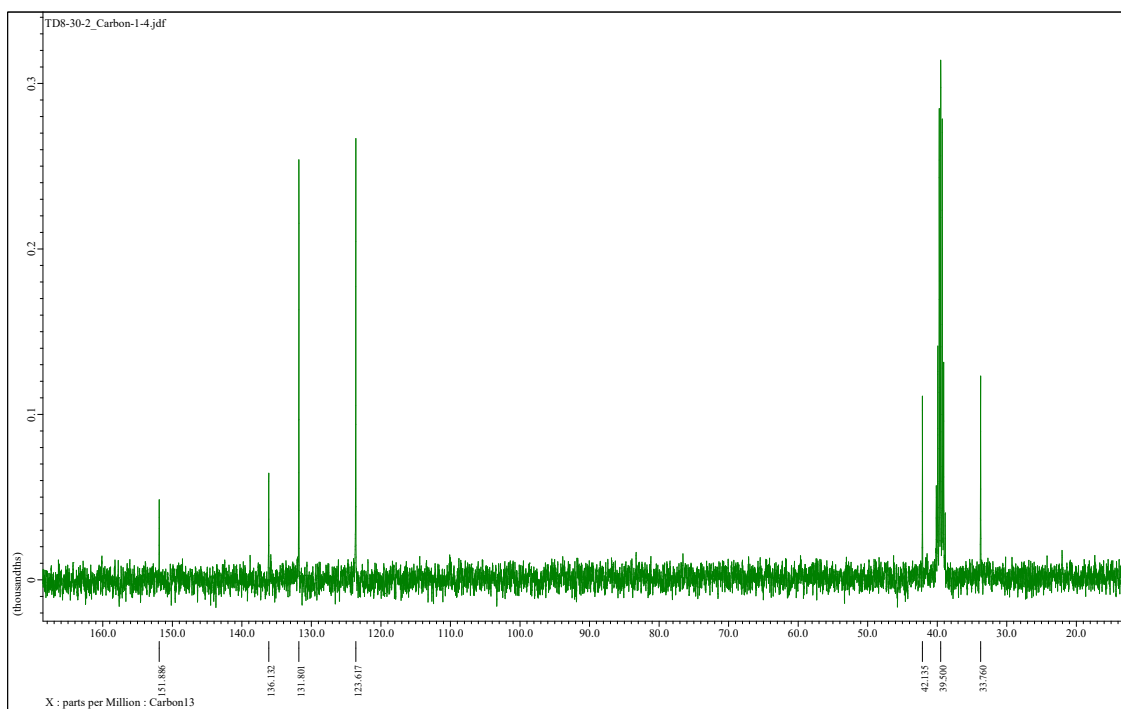
Tyramine-*O*-sulfate (**19**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 208 (3.75), 262 (2.34) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3448, 2924, 2850, 1633, 1577, 1538, 1468, 1285, 1205, 1050 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with 10  $\mu$ L DMSO-*d*<sub>6</sub>) shown in **Figure 76-77** and **Table 16**; HRESIMS:  $m/z$  218.0475 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>S,  $m/z$  218.0482),  $m/z$  216.0327 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>4</sub>S,  $m/z$  216.0336); HRESIMS/MS:  $m/z$  201.0212 [M+H-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>S),  $m/z$  121.0656 [M+H-NH<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O), 136.0765 [M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>.



**Figure 75.** The structure of **19**.

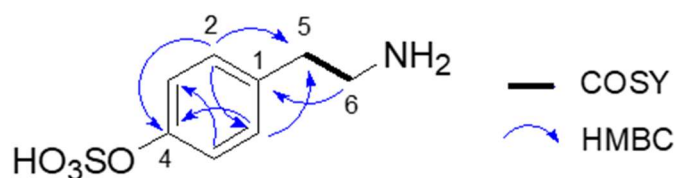


**Figure 76.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **19** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{DMSO-}d_6$ .



**Figure 77.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **19** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{DMSO-}d_6$ .

Tyramine-*O*-sulfate (**19**) は白色粉末として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  218.0475  $[M+H]^+$  のピークが観測されたことから分子式は  $C_8H_{11}NO_4S$  と推定された。 $^1H$  NMR スペクトルにおいて 8H 分のプロトン, すなわち 2 個の 2H 分のトリプレット ( $\delta_H$  2.82, 3.09), 2 個の 2H 分の芳香族ダブルトリプレット ( $\delta_H$  7.11, 7.17) を観測した (**Figure 76**).  $^{13}C$  NMR, HSQC スペクトルより 4 個の  $sp^2$  炭素 ( $\delta_C$  123.6, 131.8, 136.1, 151.9), 2 個の  $sp^3$  炭素 ( $\delta_C$  33.8, 42.1) を観測した (**Figure 77, Table 16**). HMBC スペクトルから **19** はパラ置換エチルベンゼン骨格を有することが示唆された (**Figure 78**). HRESIMS/MS スペクトルにおいて,  $[M+H-NH_3]^+$ ,  $[M-H-SO_3]^-$  のフラグメントイオンが観測されたことからアミノ基および硫酸基の存在が示唆された。化学シフト値から 4 位に硫酸基を, 6 位にアミノ基を帰属した。以上より **19** を Tyramine-*O*-sulfate と決定した。



**Figure 78.** Key 2D NMR correlations for **19**.

**Table 16.** NMR data for **19** in D<sub>2</sub>O.

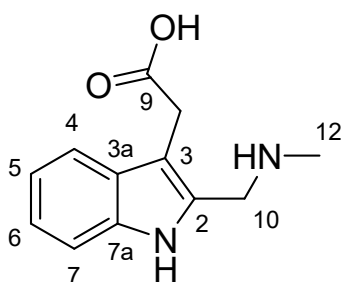
#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	136.1, C				
2	131.8, CH	7.17, dt (8.7, 2.3) <sup>a</sup>	3	2, 4, 5	5, 6
3	123.6, CH	7.11, dt (8.7, 2.3) <sup>a</sup>	2	1, 3	
4	151.9, C				
5	33.8, CH <sub>2</sub>	2.82, t (7.3, 6.9)	6	1, 2, 6	2, 6
6	42.1, CH <sub>2</sub>	3.09, t (7.3)	5	1, 5	2, 5

Measured at 298 K. <sup>a</sup>Due to virtual coupling

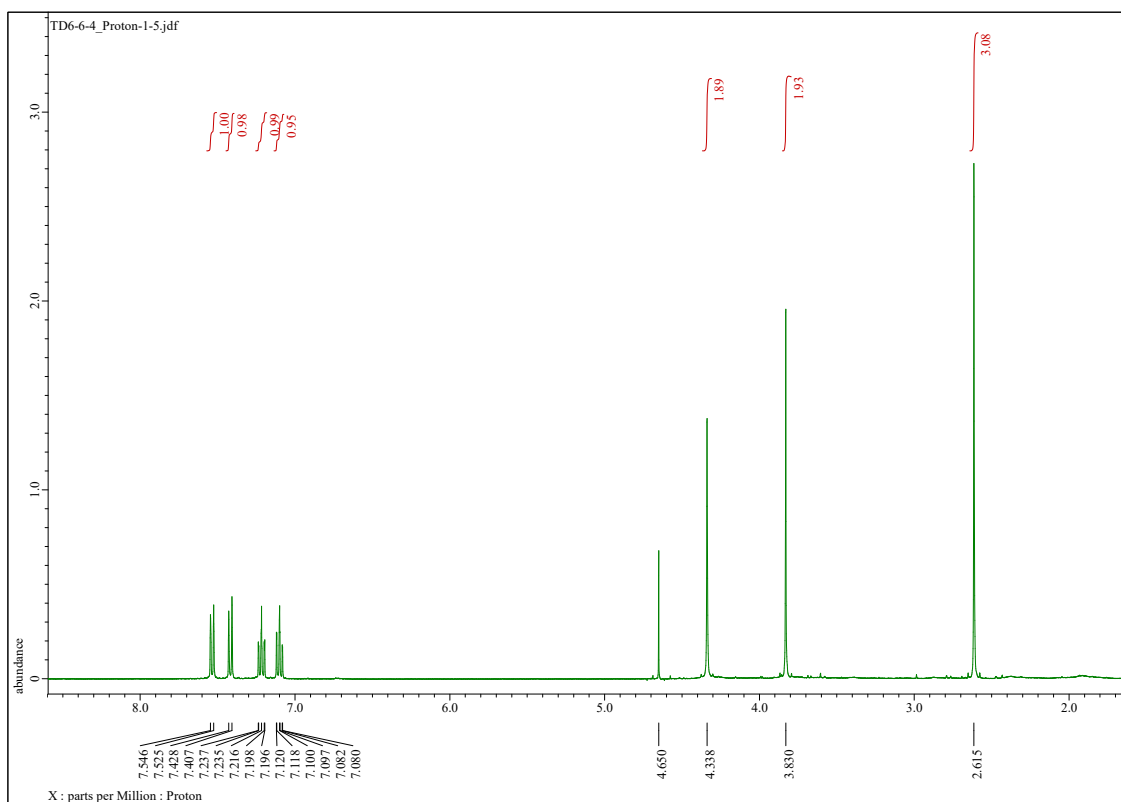
2-2-15. Cneiremine A (**20**, **Figure 79**) の構造決定

Cneiremine A (**20**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

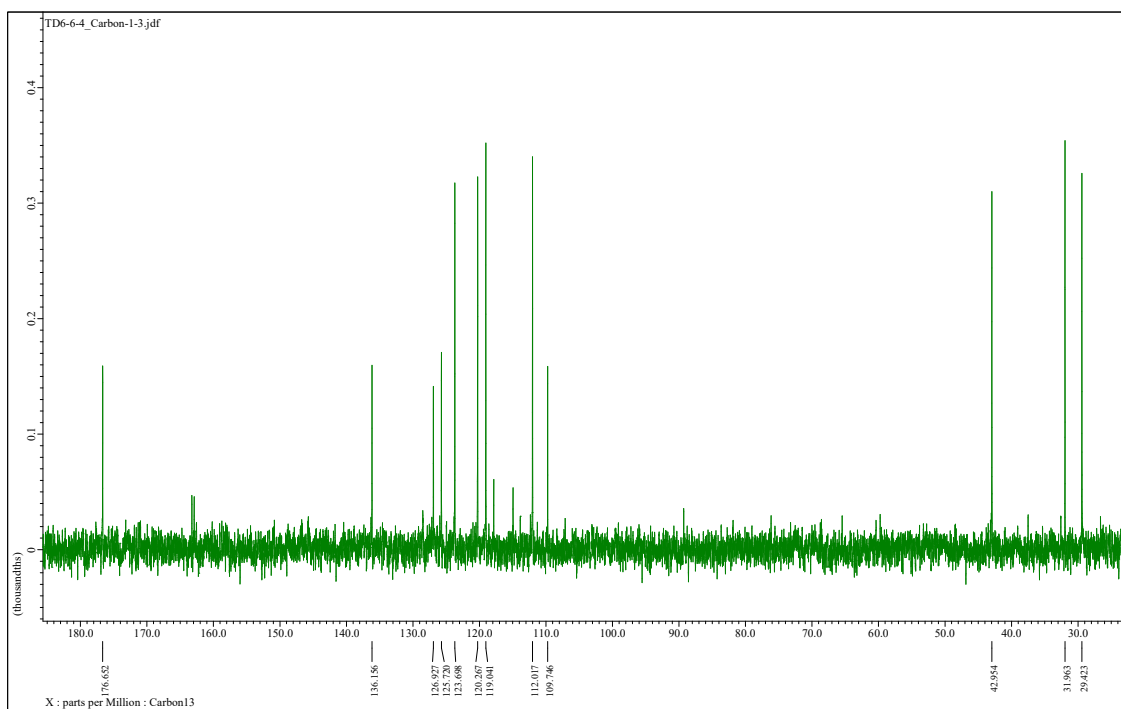
Cneiremine A (**20**): UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) 215 (4.21), 271 (3.59) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3436, 2919, 2850, 1685, 1206, 1132, 1079  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) shown in **Figure 80-81** and **Table 17**; HRESIMS:  $m/z$  219.1129  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $m/z$  219.1128); HRESIMS/MS:  $m/z$  188.0708  $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_5\text{N}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_2$ ),  $m/z$  160.0761  $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_5\text{NO}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}$ ), 142.057  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}$ ).



**Figure 79.** The structure of **20**.

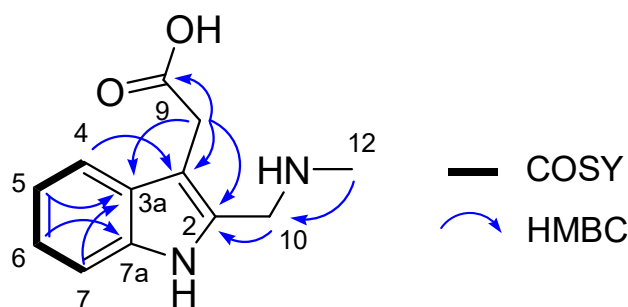


**Figure 80.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **20** in  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figure 81.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **20** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Cneiremine A (**20**) は薄黄色粉末のトリフルオロ酢酸塩として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  219.1129  $[M+H]^+$  のピークが観測されたこと、また、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて 12 本のピークが観測されたことから (**Figure 81**), 分子式を  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$  と決定した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて 11H 分のプロトン, すなわち 3H 分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  2.62), 2 個の 2H 分のシングレット ( $\delta_{\text{H}}$  3.83, 4.34), 4 個の 1H 分の芳香族シグナル ( $\delta_{\text{H}}$  7.10, 7.22, 7.42, 7.54) を観測した (**Figure 80**)。  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC スペクトルより 8 個の  $\text{sp}^2$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  109.7, 112.0, 119.0, 120.3, 123.7, 125.7, 126.9, 136.2), 1 個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  176.7), 3 個の  $\text{sp}^3$  炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  29.4, 32.0, 43.0) を観測した (**Figure 81, Table 17**)。  $^1\text{H}$  NMR スペクトル,  $\text{sp}^2$  炭素の化学シフトおよび UV 吸収スペクトル ( $\lambda_{\text{max}}$  271 nm) からインドール環の存在が示唆された。COSY スペクトルから CH-4/CH-5/CH-6/CH-7 のスピンスystemを帰属した。HMBC スペクトルにおいて  $\delta_{\text{H}}$  7.54 (H-4) から  $\delta_{\text{C}}$  109.7 (C-3),  $\delta_{\text{H}}$  7.10 (H-5),  $\delta_{\text{H}}$  7.42 (H-7) から  $\delta_{\text{C}}$  126.9 (C-3a),  $\delta_{\text{H}}$  7.22 (H-6) から  $\delta_{\text{C}}$  136.2 (C-7a) への相関が見られた。さらに  $\delta_{\text{H}}$  3.83 (H<sub>2</sub>-8) から  $\delta_{\text{C}}$  109.7 (C-3),  $\delta_{\text{C}}$  126.9 (C-3a),  $\delta_{\text{C}}$  125.7 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  176.7 (C-9) への相関が見られたことから **20** の基本構造としてインドール-3-酢酸を帰属した (**Figure 82**)。最後に,  $\delta_{\text{H}}$  2.62 (H<sub>3</sub>-12) から  $\delta_{\text{C}}$  43.0 (C-10),  $\delta_{\text{H}}$  4.34 (H<sub>2</sub>-10) から  $\delta_{\text{C}}$  125.7 (C-2) へ HMBC 相関が観測されたことから **20** の構造を **Figure 82** のように決定した。



**Figure 82.** Key 2D NMR correlations for **20**.

**Table 17.** NMR data for **20** in D<sub>2</sub>O.

#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC
2	125.7, C			
3	109.7, C			
3a	126.9, C			
4	119.0, CH	7.54, d (8.2)	5, 6 (w), 7 (w)	3, 3a, 6, 7a
5	120.3, CH	7.10, td (7.8, 0.9)	4, 6, 7 (w)	3a, 6, 7
6	123.7, CH	7.22, td (7.8, 0.9)	4 (w), 5, 7	4, 7, 7a
7	112.0, CH	7.42, d (8.2)	4 (w), 5 (w), 6	3a, 5, 6
7a	136.2, C			
8	29.4, CH <sub>2</sub>	3.83, s		2, 3, 3a, 9
9	176.7, C			
10	43.0, CH <sub>2</sub>	4.34, s		2, 3, 12
12	32.0, CH <sub>3</sub>	2.62, s		10

Measured at 298 K.

## 2-3. 生理活性試験

本研究でシロポヤモドキより得られた化合物についてアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害試験, 細胞毒性試験, マウス脳室内投与試験を行い, 生理活性を評価した.

### 2-3-1. AChE 阻害試験, 細胞毒性試験

本研究はシロポヤモドキ抽出物に AChE 阻害活性を見出したことに始まる.<sup>68</sup> そこで化合物 **6-19** について AChE 阻害活性試験を行った. また, HeLa 細胞を用いてこれらの化合物の細胞毒性を評価した. **20** についてはサンプル量の制限によりこれらの活性を評価することができなかった. 活性を示した化合物の結果を **Table 18** に示す.

**Table 18.** AChE inhibition and cytotoxicity of active compounds.

Compound	Inhibition <sup>b</sup>	Cell viability <sup>c</sup>
<b>1</b> <sup>a</sup>	80	Not tested
<b>5</b>	62 <sup>68</sup>	Inactive
<b>13</b>	20	Inactive
<b>14</b>	47	Inactive
<b>16</b>	31	27
<b>17</b>	60	28

<sup>a</sup>Positive control for AChE inhibition assay in this study. <sup>b</sup>Inhibition % at 21.7 µg/mL. Means of trials in triplicate. <sup>c</sup>Cell viability at 100 µg/mL. Means of trials in triplicate.

AChE 阻害試験においてはグアニン誘導体 (**13-14**), チラミン誘導体 (**16-17**) に弱い活性が見られた. 先行研究で 1,3,9-trimethyl-8-oxoisoguanine (**5**) に AChE 阻害活性が見出されていることから,<sup>68</sup> 8 位に置換基を持つプリン骨格がこれらの化合物の AChE 阻害活性に寄与していると考えられる. また, 3-bromotyramine (**17**) に活性が見られた一方で, **17** の硫酸エステル体である 3-bromotyramine-*O*-sulfate (**18**) は活性を示さなかったことから, チラミン類の

フェノール性水酸基が AChE 阻害活性において重要であると考えられる。

細胞毒性試験においてはチラミン類 **16-17** が弱い細胞毒性を示した。**17** はマウス白血病細胞 P-388 に対して弱い細胞毒性 (IC<sub>50</sub> 9.9 µg/mL) を示す化合物として、シロボヤモドキと同属である *C. bicornuta* から報告されている。<sup>71</sup> 3 位の置換基のみが異なる 3-chlorotyramine (**16**) と 3-bromotyramine (**17**) は同等の細胞毒性を示した。

### 2-3-2. マウス脳室内投与試験

本研究で得られた化合物の中にはモノアミン生合成酵素の補酵素であるビオプテリン類 (**9-12**),<sup>81</sup> プリン受容体などに作用して神経伝達を調節するプリン類 (**13-14**) およびヌクレオシド (**15**), チラミン類 (**16-19**) など、神経伝達に関連する化合物群に属する構造を有するものが多い。そこでマウス脳室内投与試験を行い、化合物 **6-20** の神経活性について検討した。その結果、**10, 18-20** がマウスに対し行動変化を引き起こした。

#### 1. Tyramine-*O*-sulfates (**18-19**)

3-Bromotyramine-*O*-sulfate (**18**), tyramine-*O*-sulfate (**19**) をマウス脳室内へ投与すると、高用量 (**18**: 17 nmol/mouse, **19**: 92 nmol/mouse) では痙攣や挙尾を伴う興奮性の致死活性が見られ、低用量 (**18**: 3.4 nmol/mouse, **19**: 23 nmol/mouse) では自発行動の抑制が観察された。**18** の活性の詳細を **Table 19** に示す。17 nmol/mouse, 8.4 nmol/mouse の投与量では、投与後 7 日後にマウスが死亡するといった遅効性致死活性を示した。これらのマウスは死に至るまで自発行動の抑制および体重の減少が続いた。さらにオープンフィールドでこれらのマウスの行動を観察すると、興味深いことに、一度動き出すと壁や障害物に当たるまで前進し続けるといった様子が観察された。また、投与後 5 日後から死に至るまでマウスは常時前傾姿勢であった。

**Table 19.** Behavioral changes after administration of **18** into mice.

Dose (nmol/mouse)	Behavioral changes
34 (n=1)	Convulsion, death (1/1)
17 (n=2)	Convulsion, tremor, death (1/2) Straub tail, suspicious behavior, death (after 7 days) (1/2)
8.4 (n=2)	Convulsion, tremor, Straub tail, motor suppression (1/2) Convulsion, tremor, Straub tail, loss of balance, death (after 7days) (1/2)
3.4 (n=2)	Convulsion, tremor, motor suppression (2/2)

## 2. Cneiremine A (**20**)

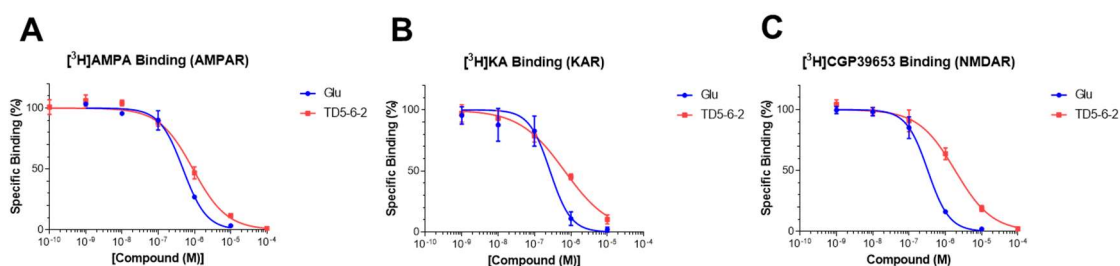
Cneiremine A (**20**) をマウス脳室内に投与するとマウスに間代性痙攣を引き起こした。痙攣から回復後、自発的な行動がほとんど見られなかったため、カップテストを用いて自発行動抑制活性を検証した。半径 4 cm, 高さ 11 cm のカップ上でマウスが静止する時間を測定した。正常なマウスではカップ上に乗せるとその場で動き回り、カップから降りようと試みる様子が観察されるが、**20** を 46 nmol 投与したマウスはカップ上で 12 分間静止した。サンプル量の制限から詳細な活性評価を行うことができなかった。

### 3. 6-Biopterin-1',2'-disulfate (**10**)

6-Biopterin-1',2'-disulfate (**10**) を 10  $\mu\text{g}$  (25 nmol) マウス脳室内へ投与すると、バランスを失い横転し、そのまま動くことができずに投与後4分で死亡した。マウスに対する活性を詳細に評価するため、5段階の投与量 (10, 5, 2.5, 0.5, 0.05 nmol/mouse) でアッセイし、マウスの行動変化を観察した。結果を **Table 20** に示す。高用量 (5-25 nmol/mouse) ではバランスを失い横転したのち、弛緩性麻痺により身動きをとることができない様子が観察された。5 nmol/mouse の投与量では3匹中1匹が死に至り、他の2匹では症状の回復が見られた。低用量 (0.5-2.5 nmol/mouse) ではバランス失調や弛緩性麻痺に加えて、せわしく動き回る様子が観察された。0.05 nmol/mouse の投与量でははっきりと見て取れる行動変化がほとんど見られなかった。このような行動変化のプロファイルはイオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) アンタゴニストである IKM-159<sup>65</sup> のそれと非常に類似しており、**10** は iGluR に作用する可能性が示唆された。そこでラットシナプス膜を用いた放射性リガンド結合試験により iGluR サブタイプであるカイニン酸受容体 (KAR), AMPA 受容体 (AMPA), NMDA 受容体 (NMDAR) に対する親和性を調べた。その結果、**10** は各サブタイプに対してグルタミン酸よりやや弱い親和性を示した ( $\text{IC}_{50}$ : **10**, AMPAR: 0.91  $\mu\text{M}$ , KAR: 0.68  $\mu\text{M}$ , NMDAR: 1.9  $\mu\text{M}$ ; glutamate,<sup>82</sup> AMPAR: 0.60  $\mu\text{M}$ , KAR: 0.25  $\mu\text{M}$ , NMDAR: 0.2  $\mu\text{M}$ , **Figure 83**).

**Table 20.** Behavioral changes after administration of **10** into mice.

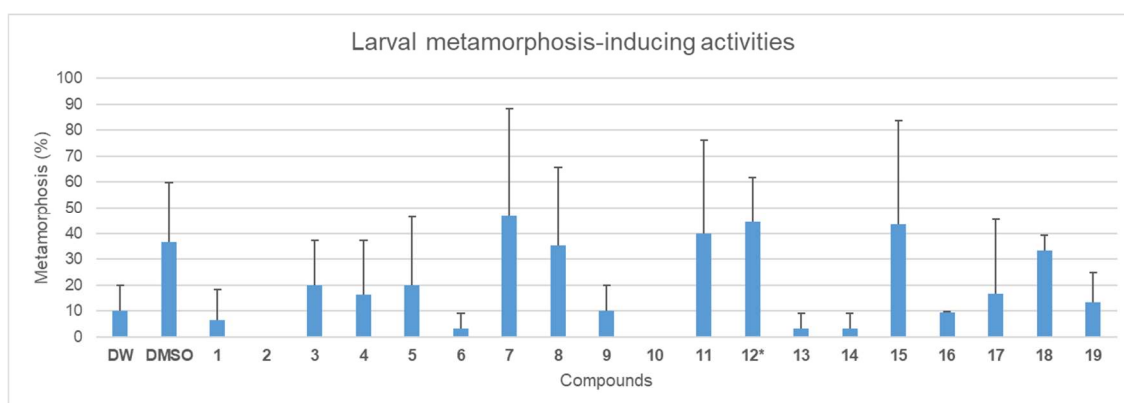
Dose (nmol/mouse)	Behavioral changes
25 (n=1)	Muscle flaccidness, death (after 5 min)
10 (n=3)	Muscle flaccidness, death (after 6 and 44 min) (2/3)
5 (n=3)	Muscle flaccidness, death (after 5 min) (1/3)
	Ataxia motion, muscle flaccidness. (2/3)
2.5 (n=3)	Ataxia motion, muscle flaccidness. (1/3)
	Ataxia motion. (1/3)
0.5 (n=3)	Frequent grooming (1/3)
	Ataxia motion, moving restlessly (2/3)
0.05 (n=3)	Ataxia motion (1/3)
	Frequent grooming (1/3)



**Figure 83.** Inhibition of bindings of radiolabeled glutamate receptor ligands [<sup>3</sup>H] AMPA, [<sup>3</sup>H] kainic acid and [<sup>3</sup>H] CGP39653 by **10** in rat synaptic membrane.

### 2-3-3. 幼生変態促進試験

ホヤ幼生は同種の成体由来の代謝物を認識し、変態を開始する可能性が指摘されており、マボヤ、ユウレイボヤから幼生の着生・変態促進活性を有する化合物が報告されている。<sup>59-60</sup>そこでシロボヤモドキより得られた化合物 (1-19) について同様の活性を検討した (終濃度: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。しかしながら、いずれの化合物を処理した幼生群においても有意な変態促進活性は見られなかった (Figure 84)。



**Figure 84.** Larval-metamorphosis-inducing activities of compounds 1-19 at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Bars: standard deviation,  $n = 3$ ). Distilled water (DW) and DMSO were used for negative control. \*Compound 12 solely dissolved in DMSO.

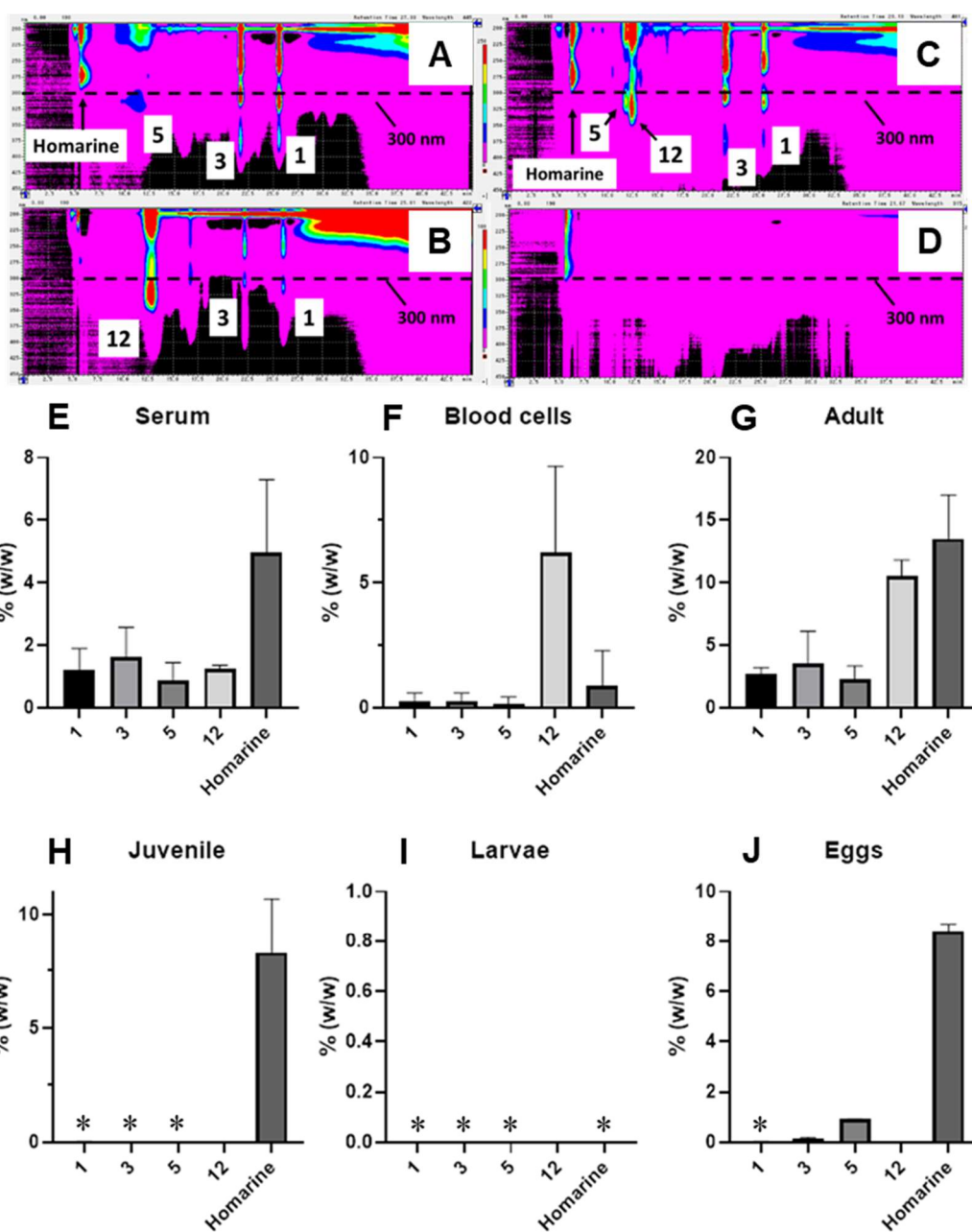
#### 2-4. ホヤ血液およびライフステージ別ホヤの二次代謝物プロファイル

シロボヤモドキの血液 (体腔液) には $\beta$ -カルボリニウム化合物 (**1, 3**) が主要成分として含まれており、ブルーライト照射 (405 nm) により強い蛍光を発する。<sup>68</sup> また、数種類の血球細胞が同様に蛍光を示す。しかし**1, 3**が血液中の血漿、血球細胞のどちらに含まれるのか、または双方に含まれるのかは不明であった。そこでシロボヤモドキの血液を血漿と血球細胞に分画し、それぞれHPLC, LC-MS分析に供し、成分プロファイルを比較した。また、シロボヤモドキを飼育中に受精卵および幼生を得ることができたため、ライフステージ別に抽出物を調製して血液と同様にHPLC, LC-MS分析を行った。

血漿成分には $\beta$ -カルボリニウム (**1, 3**) がメジャーに検出された (**Figure 85, A, E**)。一方で血球細胞には蛍光物質であるプテリン**12**が主要成分として検出されたことから (**Figure 85, B, F**)、血球細胞に含まれる蛍光物質は**1, 3**ではなく**12**であることが分かった。各ライフステージにおけるホヤの成分を比較すると、成体に主要に含まれる二次代謝物である $\beta$ -カルボリニウム (**1, 3**)、プテリン**12**、イソグアニン**5**は幼若体、幼生、卵においては微量に検出されるのみであり、血球細胞の主要成分である**12**は全く検出されなかった (**Figure 85, C, D, G-J**)。この結果から、これらの二次代謝物はホヤが変態後、成体へと成長する過程で体内へと蓄積されると考えられる。

ホヤの血球に含まれる化合物の機能としては序論で述べた抗菌活性による化学防御やバナジウム濃縮などが考えられる。そこで大腸菌 *Escherichia coli*, セレウス菌 *Bacillus cereus* に対する **12** の抗菌活性を調べたが、活性は見られなかった。

次にバナジウム濃縮との関連を考えるにあたり、ICP 発光分光分析によりシロボヤモドキに含まれるバナジウム濃度を調べた。その結果、バナジウムを濃縮することが知られている *Ascidia nigra* (マメボヤ目, ナツメボヤ科) には約 4000 ppm のバナジウムが含まれるのに対し,<sup>83</sup> シロボヤモドキに含まれるバナジウム量は 2 ppm であった。



**Figure 85.** PDA chromatograms of (A) serum, (B) blood cells, (C) an adult animal and (D) a juvenile animal. Semiquantitative analysis of compounds 1, 3, 5, 12 and homarine in hemolymph and different life stages of *C. irene* (E: serum, F: blood cells, G: adults, H: juveniles, I: larvae, J: eggs). Contents (w/w [calculated compound weight/extract weight] %, histograms) and standard deviations (bars, n = 3) are plotted. \*These ions were detected at trace levels.



今回、プテリン **10** の脳室内投与によりマウスの行動変化が引き起こされたが (Table 20), **10** はイオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) に親和性を示したこと (Figure 83), 細胞毒性は見られないことから, マウスに対する活性は神経系に作用した結果であると考えられる. プテリン化合物が iGluR に作用することを示した研究例はなく, 本研究が初の報告となった. **10** を脳室内に投与されたマウスの行動変化は IKM-159<sup>65</sup> などの iGluR アンタゴニストと非常に類似しており, **10** は iGluR のアンタゴニスト, もしくは負のアロステリックモジュレーターである可能性が高いと考えている. 今後, 電気生理学的手法で iGluR に対する **10** の機能性を調べる必要がある. また, 同時に得られたビオプテリン **9**, **11**, **12** および 6-ビオプテリンはいずれもマウスに対して活性を示さなかったことから, **10** の活性発現には 1',2'-ビス硫酸エステル構造が重要であると考えられる. **10** の神経活性に関して注目すべき点はその構造が 6-ビオプテリンの硫酸エステル体であることにあり得ると思われる. テトラヒドロビオプテリン (BH<sub>4</sub>) はモノアミン系神経伝達物質であるドーパミン, アドレナリン, セロトニンなどの生合成に関わる重要な代謝物であり, その酸化型である 6-ビオプテリンはヒトの脳内にも存在する.<sup>81</sup> 今後, **10** および関連物質がヒトにおいても同定されれば, 今回の発見が新たな脳機能の解明や神経疾患の治療につながる可能性を秘めていると考えられる. また, ヒトの脳の原型が備わっているといわれるホヤにこのような化合物が含まれていること, そしてその機能は非常に興味深く, さらなる研究が期待される.

シロボヤモドキ血液の HPLC, LC-MS 分析の結果から, 体腔液に含まれる蛍光物質のうちカルボリン **1**, **3** は血漿, プテリン **12** は血球に含まれることが本研究で明らかとなった (Figure 85, A-B, E-F). このような局在性から **12** はホヤの生理において重要な役割を持つことが推察される. 蛍光を示す血球細胞は数種類存在する.<sup>68</sup> ひとつは液胞細胞様の細胞であり, バナジウムを濃縮するホヤではこの液胞細胞 (バナドサイト) にバナジウムが濃縮されている. また, バナドサイトの液胞内の液性は酸性に保たれている. **12** は水に溶けにくく, 酸性水溶液には比較的溶けやすいため, バナドサイトのような酸性環境の血球細胞に含ま

れていると考えられる。シロボヤモドキに含まれるバナジウムは2 ppmであり、マメボヤ目のホヤに含まれるバナジウム量 (100-4000 ppm)<sup>83</sup> と比べると少ないが、海水の約 1000 倍に相当する。<sup>84</sup> 今後、シロボヤモドキの血球細胞を分離することができれば、**12** の機能に関する研究が進むものと考えられる。

### 3-3. プリン, ヌクレオシド

*N*-メチル化グアニン、イソグアニン類はホヤに加え海綿からも報告されている。<sup>77,85</sup> イソグアニンの8位が酸化された化合物がいくつか単離されているが、<sup>68,86-87</sup> 8位がハロゲン化された化合物の報告は**14**が初である。**13, 14**はわずかにAChE阻害活性を示したが、**14**がより強い阻害を示した (Table 18)。8-オキソイソグアニンである**5**は**14**よりも強いAChE阻害活性をしめすことから、プリン化合物のAChE阻害活性には8位の修飾が重要であると考えられる。ライフステージ別ホヤのLC-MS分析においてシロボヤモドキに含まれる主要な二次代謝物である**1, 3, 5, 12**は成体に特に多く、幼若体、幼生、卵にはわずかに含まれるのみであったが、**5**のみ卵において比較的多く検出された (Figure 85, J)。グアニン類は265 nm付近に極大吸収波長 ( $\lambda_{\max}$ ) を持つが、<sup>88</sup> イソグアニン類では290 nm付近、<sup>76</sup> **5**を含むオキソイソグアニン類では310 nm付近<sup>68,86</sup>に $\lambda_{\max}$ を持つ。310 nm付近に $\lambda_{\max}$ を持つ化合物としては紫外線吸収物質として機能していると考えられているマイコスポリン類が挙げられる。<sup>89</sup> したがって、**5**は海水中に放出され、太陽光に晒される卵を紫外線から守る機能を担っている可能性が考えられる。

### 3-4. チラミン

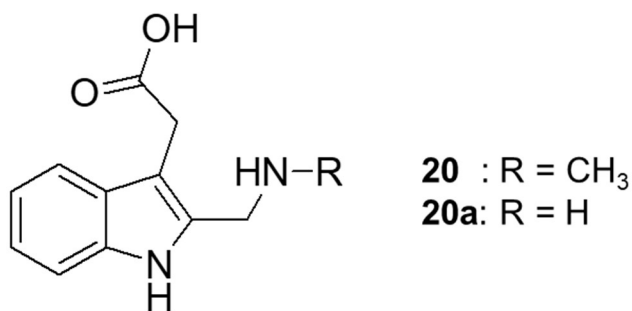
3-Bromotyramine (**17**) は同属のホヤ *C. bicornuta* から単離されており、マウス白血病細胞、P-388細胞に対する弱い細胞毒性が報告されている。<sup>71</sup> 3-Chlorotyramine (**16**) は化学合成されており、ドーパミン D2 受容体リガンドとして報告されているが、<sup>90</sup> 天然物としての報告は

今回が初である. **16, 17** はともに HeLa 細胞に対する弱い細胞毒性を示した (**Table 18**). 一方で 3-bromotyramine-*O*-sulfate (**18**) に細胞毒性は見られず, **16, 17** の細胞毒性にはフェノール性水酸基が関与していると考えられる.

チラミン-*O*-硫酸エステル化合物 **18, 19** は細胞毒性を示さなかった一方で, マウスに対する神経活性を示したため (**Table 19**), 神経活性には硫酸エステル基が重要である. Tyramine-*O*-sulfate (**19**) はチラミンの代謝物としてヒトに含まれる化合物であり, 弱いながらも神経活性が見られたことは非常に興味深い. 3 位がブロモ化された **18** は **19** よりも強い活性を示した. さらに **18** の活性は投与直後だけでなく, 1 週間後に死に至るまで自発行動の抑制が続いた. また一部のマウスは常時前傾姿勢を取り, 突進するように前進する様子が観察された. この様子はパーキンソン病における突進歩行の症状とよく似ており, **18** の活性とパーキンソン病の関連性を想像させられる. パーキンソン病における自発行動の抑制はドーパミン D1 受容体を介した神経伝達の減少により引き起こされることが D1 受容体ノックダウンマウスを用いた実験により示されている.<sup>91</sup> 作用標的の同定など, **18, 19** の神経活性メカニズムに関する研究が進展することで **10** と同様, 神経科学の発展への寄与が期待される.

### 3.5. インドール-3-酢酸誘導体

Cneiremine A (**20**) と同じ骨格を持つ 2-(aminoethyl)-1*H*-indole-3-acetic acid (**20a**, **Figure 87**) が合成品として存在するが、天然物としてこの骨格を持つ化合物は報告されていない。うつ病や片頭痛に関連するセロトニン受容体に作用するインドールアルカロイドが海洋生物から数種類報告されており、これらの疾患に対する治療薬のリード化合物として期待されている。<sup>92</sup> 天然物として新たな骨格を有するインドールアルカロイドである **20** の活性メカニズムは興味深い。しかし、**20** は比較的不安定で変性してしまうため、サンプルの確保が課題である。現在、化学合成による供給を試みている。

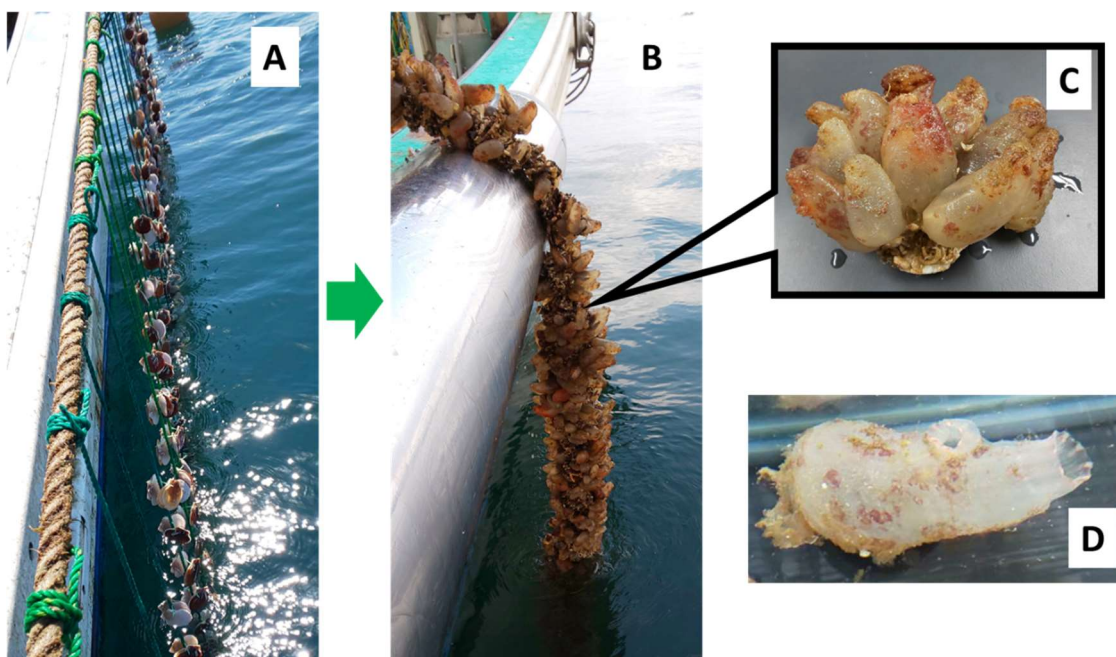


**Figure 87.** The structures of **20** and **20a**.

## 第2章

### 有害外来種ヨーロッパザラボヤ *Asciidiella aspersa* に含まれる脂肪族硫酸エステル化合物

ヨーロッパザラボヤ (*Asciidiella aspersa*) はマメボヤ目 (Phlebobranchia), ナツメボヤ科 (Asciidiidae) に属するヨーロッパ原産の単体性のホヤである。本種は数か国で外来種として確認されており, 侵入先で大規模なコロニーを形成することが知られている。在来水産種および水産有用種への影響が懸念されるため国際自然保護連合によりグローバル侵入種データベースに登録されている。<sup>12</sup> 2008年以降, 北海道八雲町のホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* 養殖場においてヨーロッパザラボヤが養殖貝に大量に付着・増殖し, 多大な漁業被害を与えている (Figure 88)。<sup>12</sup> 養殖現場ではホヤに触れると肌荒れが起きるなどの被害が報告されており, ホヤ由来の代謝物による生態系およびヒトへの影響が懸念される。しかしながら本種の化学成分に関する研究は極めて少ない。



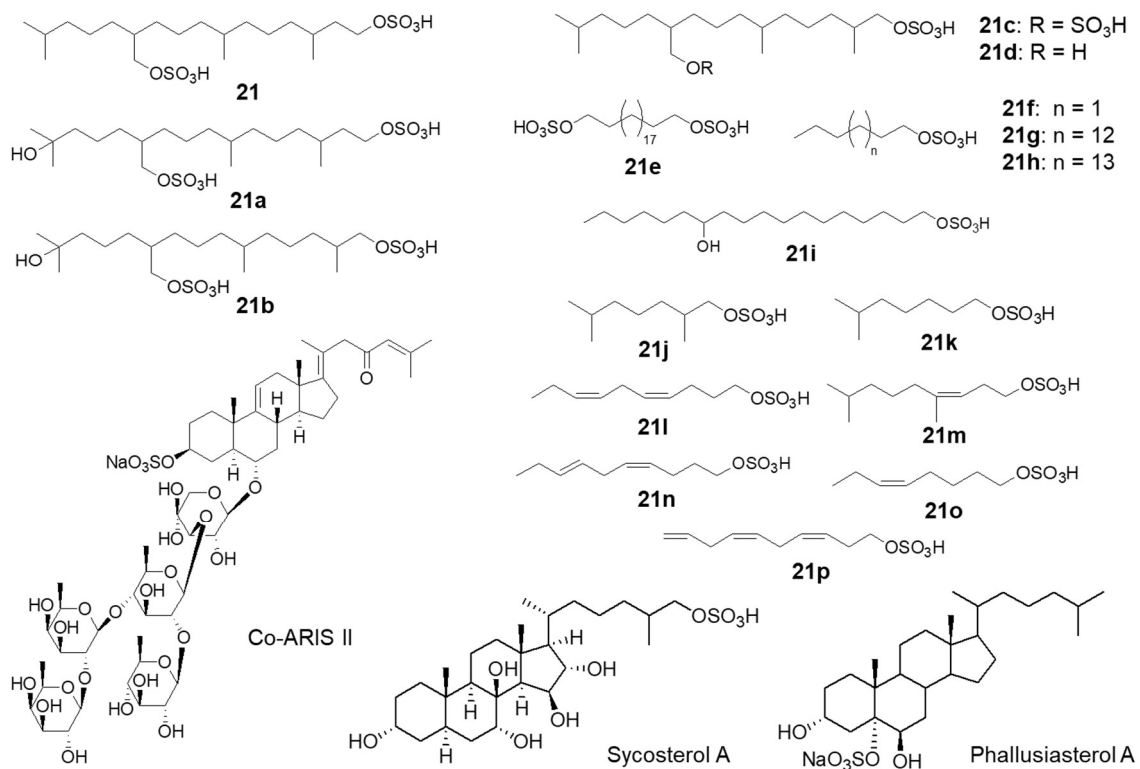
**Figure 88.** (A-C) *A. aspersa* growing on cultured scallop *M. yessoensis* in Funka bay and (D) *A. aspersa* in laboratory aquarium.

ごく最近、八雲町のホタテガイに付着しているヨーロッパザラボヤのメタノール抽出物中に直鎖ジテルペン骨格を有する硫酸アルカン 3,7,11,15-tetramethylhexadecan-1,19-disulfate (**21**) が含まれていることが報告された (**Figure 89**).<sup>93</sup> **21** は血球溶血活性を示すが、ブラインシュリンプおよびホタテガイに対しほとんど毒性を示さない。また **21** はヨーロッパザラボヤに多量に含まれていることから、ホヤが **21** を特定の組織に蓄えて海水中に放出することで生態系において優位性を得ていると考えられているが、**21** のホヤにおける挙動については不明である。

脂肪族硫酸エステル化合物はこれまでに海洋生物から多数報告されており、カイメン、ホヤ、ヒトデ類、クモヒトデ類、ウニなどからテルペン型、ステロイド型、フェノール型の硫酸エステル化合物が単離・構造決定されている。<sup>94</sup> なかでもステロイド型の化合物が多く、140 種を超える化合物が海洋生物から単離されている。<sup>95</sup> ホヤからは序論で述べた精子誘

引・活性化物質 SAAFs<sup>61,63</sup>, 神経疾患の原因となる $\alpha$ -cynuclein の凝集を抑制する作用を示す sycosterol A,<sup>96</sup> プレグナン X 受容体に作用する phallusiasterol A<sup>97</sup> とその類縁体<sup>98</sup> などが報告されている。テルペン型やステロイド型と比べると報告例は少ないが直鎖アルカン・アルケン・アルキン型の硫酸エステル化合物がホヤをはじめ、カイメン、ヒトデ、クモヒトデ、ウニ、ナマコ、ミジンコから報告されている。<sup>99</sup> アルカン型硫酸エステル化合物はヨーロッパザラボヤ以外のホヤからも報告されており、**21** に加えて **21a-21i** が単離されている (**Figure 89**).<sup>100-103</sup> 興味深いことにこれらの化合物を含むホヤはいずれもマメボヤ目もしくはマンジュウボヤ目のホヤである。マボヤ目からも **21j-21p** のような硫酸アルキル化合物の単離が報告されているが、<sup>104-106</sup> それらはいずれも炭素数が 11 以下であり、硫酸エステルを二つ持つ化合物は報告されていない (**Figure 89**)。したがって **21** のような高級アルコールの硫酸ジエステル化合物はマメボヤ目、マンジュウボヤ目のホヤに特異的な代謝物である可能性が高く、何らかの形でホヤの生理・生態に関与していると考えられる。

脂肪族硫酸エステル化合物は海洋生物中に比較的多量に含まれており、多くの場合、捕食動物に対して摂餌阻害を示すことから、付着生物における化学防御の役割を担うと考えられている。しかしごく一部の化合物では含有生物の生理現象に関わることが知られている。ヒトデの一種 *Asterias amurensis* に含まれる Co-ARIS (**Figure 89**, ARIS: acrosome reaction-inducing substance) と名付けられたステロイドサポニンの硫酸エステル化合物は糖タンパク質である ARIS の補酵素として機能し、精子の先体反応を引き起こす。<sup>107-109</sup> また、序論で述べた SAAFs はホヤの卵から分泌されるステロール硫酸エステル化合物であり、Ca<sup>2+</sup>チャネルを活性化することで精子を誘引する。<sup>110</sup> さらに SAAFs は 8 位の水酸基の有無によって属レベルの特異性を示す (**Figure 5**).<sup>63</sup> これらの研究例から、脂肪族硫酸エステル化合物は化学防御だけでなく、海洋生物の生理・生態において重要な役割を有していると考えられる。



**Figure 89.** Sulfated alkane and alkene from ascidians belonging to phlebobranchia (**21**, **21a-21h**), stolidobranchia (**21i-21o**). Co-ARIS II, the sulfated steroid saponin from *Asterias amurensis* and sulfated steroids from tunicates.

本研究では養殖業に甚大な被害を与えている有害種ヨーロッパザラボヤを研究対象として本種の化学成分を網羅的に調べるとともに、硫酸アルキル化合物 **21** をはじめとした二次代謝物のホヤにおける機能に関する知見を得ることを目的とした。

## 1. 実験材料・方法

### 1-1. 生物試料

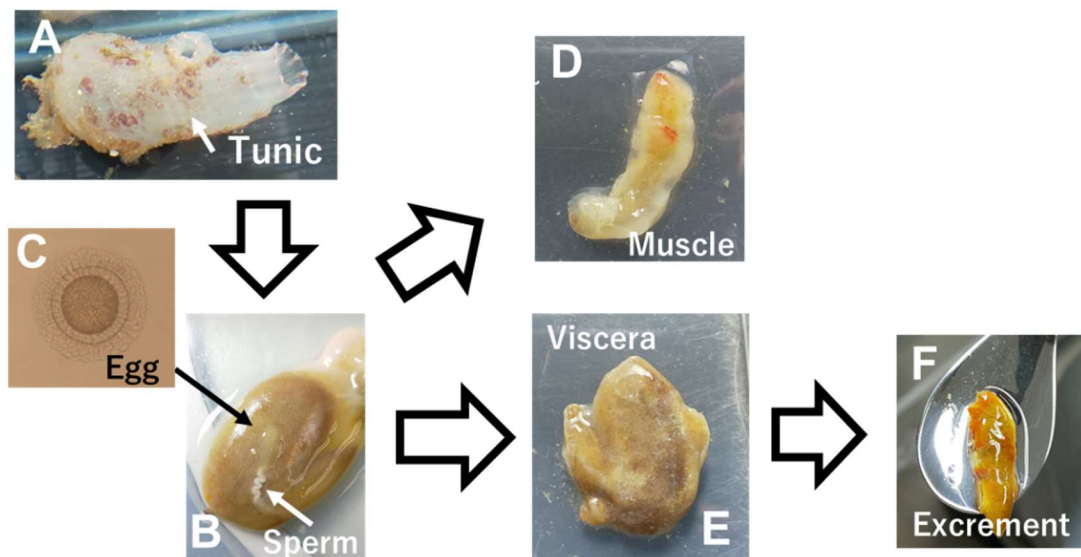
#### 1-1-1. ヨーロッパザラボヤ成体

ヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*) 生物試料は 2019 年-2020 年に八雲町の八雲漁港沖、もしくは落部漁港沖のホタテガイ養殖場にて、北海道立総合研究機構函館水産試験場の金森誠研究員、夏池研究員、八雲漁協組合の安千谷大輔氏、落部漁業協同組合の澤口正臣氏のご協力のもと、ホタテガイに付着しているホヤを採集し、抽出、飼育および解剖を行った。飼育はシロボヤモドキと同様に行った。ホヤの同定は同試験場の金森誠研究員により行われた。<sup>111</sup>

#### 1-1-2. ヨーロッパザラボヤの解剖

2020 年 6 月、または 2021 年 6 月に八雲町にて採集したヨーロッパザラボヤを用いた。以下のように解剖し、被囊、筋膜体、内臓、フン、卵、精子、血しょう、血球細胞の全 8 種類の部位別試料を調製した。

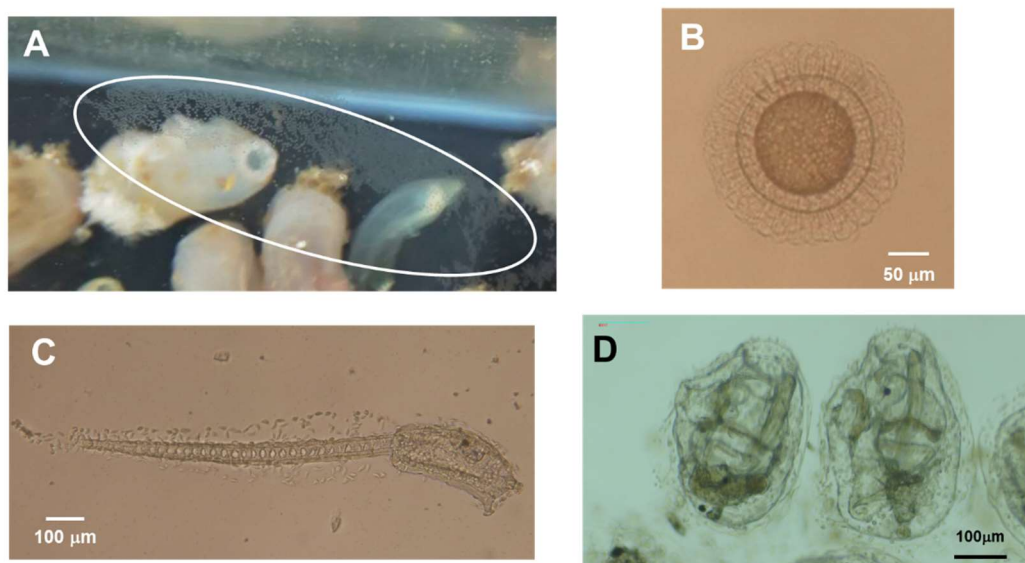
解剖ハサミで内臓を傷つけないよう注意を払い、被囊を取り除いた。背側 (入水口および出水口側) を左向きにホヤの側面を見ると、筋膜体を透かして心臓が見えるので、他の臓器を傷つけないよう心臓をハサミで切開し、あふれ出る血液を採集した。シロボヤモドキの血液と同様に血しょうと血球細胞に分離した。次に背側を右向きにホヤを置き、筋膜体の表面に見える輸卵管をハサミ、もしくはピンセットで破り、卵を採集した。この際、輸卵管の裏側に輸精管が並走しているので (**Figure 90**)、これを傷つけないように卵を採集する必要がある。卵を採集後、同様に精子を採集した。最後に、筋膜体から内臓を分離し、腸管からフンを押し出し、採集した。



**Figure 90.** Dissection of *A. aspersa* and each body parts. (A) Tunic, (B-C) eggs and sperm, (D) muscle (E) viscera, and (F) excrement.

### 1-1-3. ヨーロッパザラボヤ幼生および幼若体

ヨーロッパザラボヤを飼育中、放精・放卵を確認した。シロボヤモドキと異なり、卵が海水表面に浮いていた (**Figure 91, A-B**)。卵を採集し、実体顕微鏡下で観察したところ、受精卵であることを確認できたため、6 穴プラスチックプレート内に移し、海水中でインキュベートした。受精から約 18 時間後、幼生が孵化したためこれを採集し、抽出および変態アッセイに用いた (**Figure 91, C**)。抽出用サンプルの処理はシロボヤモドキと同様に行った。また、一部の幼生を海水中でインキュベートし続けたところ、孵化後約 50 時間には変態が完了して内臓の形成が確認され、心臓の鼓動も見られた。孵化後 7 日目にははっきりとホヤの形が見えるまでに成長した (**Figure 91, D**)。この時点でホヤを採集し、幼若体試料とした。ホヤ同士が付着した二つのコロニーを採集し、コロニー当たりの匹数は 29 匹, 44 匹であった。



**Figure 91.** (A) *A. aspersa* eggs floating on the surface of aquarium and micrographs of (B) an egg, (C) a larva, and (D) juvenile animals.

#### 1-1-4. 各種生物試料の抽出

部位別試料 (被囊, 筋膜体, 内臓, フン, 卵, 精子) は (1) 改良 Brigh-Dyer 法, (2) 50%メタノール抽出, (3) 水抽出および残渣のメタノール抽出の 3 通りの方法で抽出した。

(1) 3 個体のホヤから得られた部位別試料を凍結乾燥して粉末状とし, 抽出サンプルとした。約 5 mg の抽出サンプルを 150  $\mu$ L/mg dry weight のクロロホルム:メタノール:水 (2:5:2) の混合溶媒に懸濁し, 氷冷下, 超音波ホモジナイザーを用いて 2 分間抽出した。ただし, 卵は 2 分では十分に破碎できなかったため, 適宜顕微鏡で破碎具合を確認しながら約 5 分間抽出した。抽出液を遠心分離し, 上清にクロロホルム:メタノール:水 (2:5:6) となるように水を加えてさらに遠心分離し, 上層の水溶性画分と下層の脂溶性成分を得た。遠心エバポレーターで溶媒を留去後, 水溶性, 脂溶性の乾燥サンプルをそれぞれ水, クロロホルム:メタノール (1:1) の混合溶液に再溶解した後, 水, メタノールで 0.05 mg/mL に希釈し, LC-MS 分析に供した。内部標準物質として 50 ng/mL となるように (S)-(+)-camphor-10-sulfonic acid (CSA) を加えた。

(2)(1) で調製した乾燥試料を 50%メタノールに懸濁し、氷冷下、超音波ホモジナイザーを使用して抽出した。抽出液を (1) と同様の処理を行い 0.02 mg/mL (50 ng/mL CSA) に調製し、LC-MS 分析に供した。得られたデータは化合物 **21-23**, **24**, **28** およびエイコサペンタエン酸 (EPA) の定量に使用した。各化合物濃度を 5-8 段階の任意の濃度に調製し、LC-MS 分析に供した。解析ソフトウェアに MultiQuant (Sciex) を用いて定量を行った。

(3)(1), (2) とは異なる 3 個体のホヤを解剖して得られた部位別試料を凍結乾燥せず、直接イオン交換水で抽出した。被囊、筋膜、内臓はホモジナイザーペッスルですり潰したのち、氷冷下、超音波ホモジナイザーで抽出した。フン、卵、精子はイオン交換水に懸濁し、超音波ホモジナイザーで抽出した。抽出液を遠心分離し、上清を凍結乾燥し、水抽出物を得た。水抽出残渣をメタノールで懸濁し、氷冷下、超音波ホモジナイザーを用いて抽出した。抽出液を遠心分離し、上清のメタノールを留去してメタノール抽出物を得た。

幼生および血球細胞は 上記 (3) と同様に抽出した。幼若体はサンプル量が微量であったため抽出溶媒に 50%メタノールを用いて超音波ホモジナイザーで抽出し、水-メタノール抽出物とした。これらのサンプルは微量にしか得られなかったため、組織別抽出物との成分プロファイルを比較することができなかった。

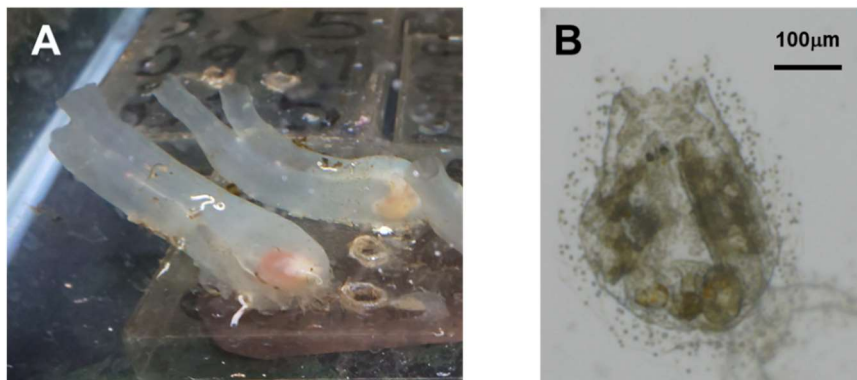
#### 1-1-5. カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の解剖, 抽出

カタユレイボヤ成体, 幼若体 (受精後 8 日目) (**Figure 92**) は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) が運営するナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) からの提供を受けた.

ヨーロッパザラボヤと同様に 3 個体の成体を解剖し, 被囊, 筋膜体, 内臓, 卵巢, 卵, 精子の全 6 種類の部位別試料を得た. 解剖時に腸管内にフンが見られず, 採集することができなかった. また, 個体サイズが小さいためか十分量の血液を採集することができなかった. ヨーロッパザラボヤと異なり, 卵巢が目視で識別できたため卵とは別に採取した.

部位別試料を凍結乾燥し, 粉末状の乾燥サンプルとした. 内臓の乾燥試料を 1-1-4. (2) と同様に 50%メタノールで抽出し, LC-MS サンプルを調製した.

幼若体は凍結乾燥したのち, メタノールに懸濁し, 超音波ホモジナイザーを用いて抽出した.



**Figure 92.** (A) Adult and (B) juvenile animals of *C. intestinalis*.

#### 1-1-6. その他のホヤの抽出

ヨーロッパザラボヤ採集時に得られた3種のホヤ, ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*), アカボヤ (*Halocynthia aurantium*), エボヤ (*Styela clava*) (Figure 93) を各1個体ずつ, 解剖せずに抽出した. 1-1-4. (3) と同様に水抽出を行い, 抽出残渣をメタノールで抽出した. 各抽出物のLC-MS分析を行い, そのデータをヨーロッパザラボヤと比較した.

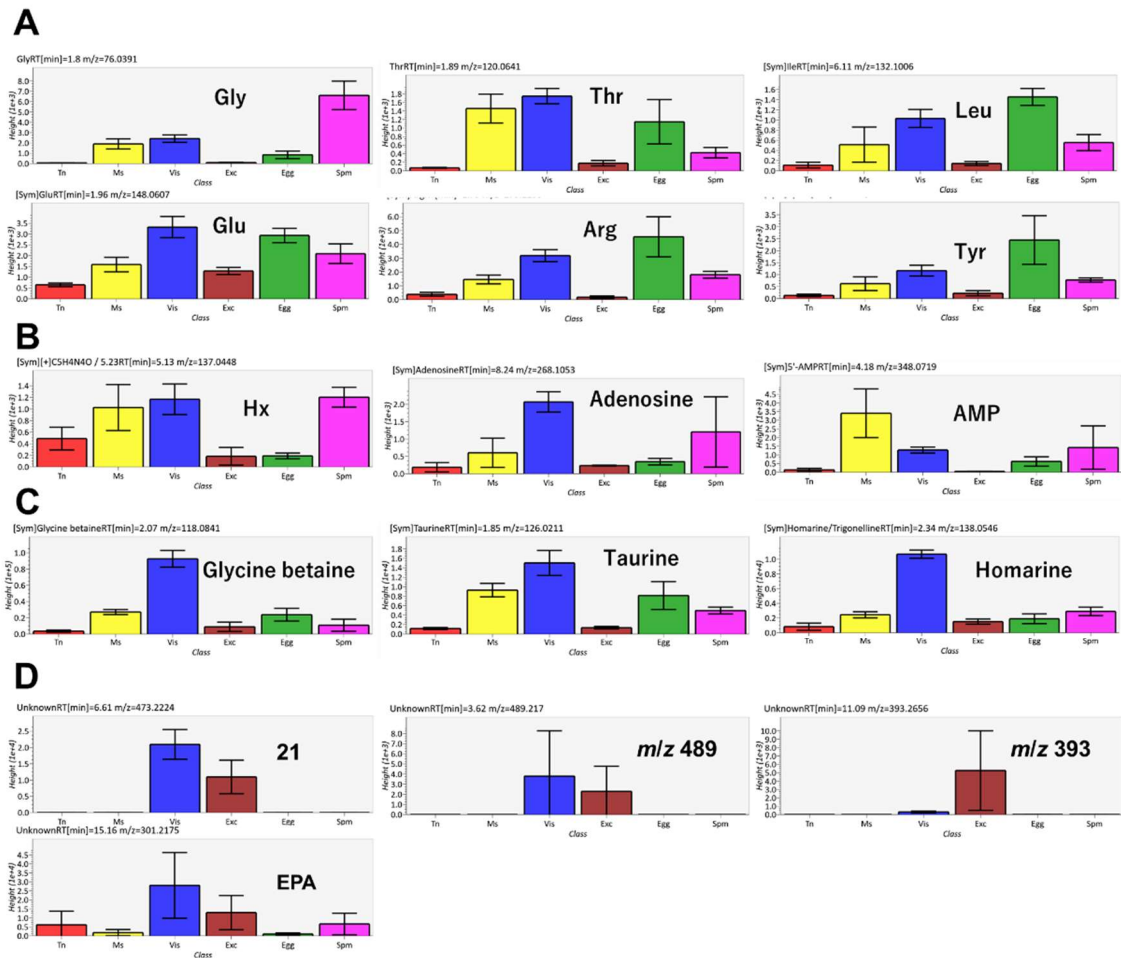


**Figure 93.** Tunicates collected at Funka-bay. (A) *C. savignyi* and frozen sample of (B) *H. aurantium* and (C) *S. clava*.

## 2. 結果

### 2-1. ヨーロッパザラボヤ組織別抽出物のメタボロミクス解析

二次代謝物とホヤの生理との関わりを探るうえで、化合物の分布から重要なヒントが得られると期待できる。改良 Bligh-Dyer 法による抽出で得られた組織別の水溶性抽出物および脂溶性抽出物の LC-MS 解析を行い、33 種類の代謝物を同定した。Figure 94 に結果の一部を示す。シロボヤモドキとは異なり、アミノ酸 (Figure 94, A) や核酸関連物質 (Figure 94, B) などの一次代謝物や適合溶質 (Figure 94, C) がほとんどすべての組織に検出された。一方で内臓およびフンに特異的に含まれる成分として、エイコサペンタエン酸 (EPA) に加え、硫酸アルカン **21**<sup>93</sup> ( $m/z$  473, Formula:  $C_{20}H_{42}O_8S_2$ , Figure 94, D) と分子式が一致する化合物を見出した。さらに推定分子式から **21** 関連物質と思われる化合物も見出した ( $m/z$  489, Formula:  $C_{20}H_{42}O_9S_2$ ;  $m/z$  393, Formula:  $C_{20}H_{42}O_5S$ , Figure 94, D)。このうち  $m/z$  393 のみが内臓よりもフンに多く検出された。これらの化合物の機能を探るにあたり、化合物の同定を行った。次にそれらの詳細について述べる。



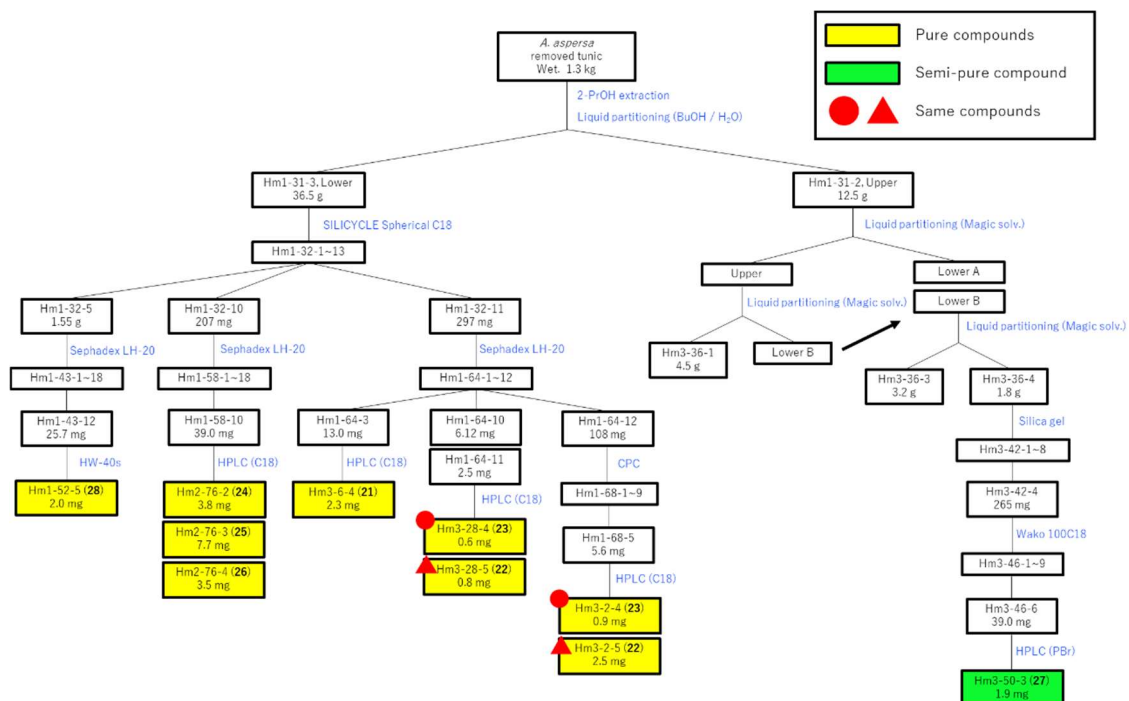
**Figure 94.** (A-C) Identified metabolites and (D) two metabolites related to sulfated alkane **21** and EPA in *A. aspersa*. (A) Amino acids, (B) nucleic acid related metabolites, and (C) osmolytes. Vertical axis, ion height; horizontal axis, body part samples (Red, tunic. Yellow, muscle. Blue, Viscera. Brown, excrement. Green, egg. Magenta, sperm).

## 2-2. 抽出および化合物 21-28 の分離・精製

### 2-2-1. ヨーロッパザラボヤの抽出および抽出物の分離

化合物 21-28 の分離スキームを Scheme 3 に示す。

**Scheme 3.** Separation scheme for compounds 21-28.



八雲町のホタテガイ養殖場にて採集したヨーロッパザラボヤの被囊を取り除き、筋膜・内臓・フン・卵・精子を含む試料を得た (Wet. 1.3 kg). この試料を 2-プロパノールで抽出し (500 mL × 4), 遠心分離後 (11400 × g, 10 min), 上清をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し抽出物を得た. 次に 1-ブタノール/水で液-液分配を行い脂溶性抽出物 (Hm1-31-2, 12.5 g) と水溶性抽出物 (Hm1-31-3, 36.5 g) に分離した.

水溶性抽出物 (Hm1-31-3, 36.5 g) を C<sub>18</sub> 逆相カラムクロマトグラフィーに供し (SILICYCLE, 5.5 cm I.D. × 28 cm, H<sub>2</sub>O-MeOH グラジエント溶出, 後流し: 0.05% TFA MeOH, 2.0 mL/min), 13 画分に分離した (Hm1-32-1~13). 次に脂溶性抽出物 (Hm1-31-2, 9.5 g) をマジックソルベント (ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (4:7:4:3)) を用いて液-液分配し, 上層の低極性画分 (Hm3-36-1, 4.5 g; Hm3-36-3, 3.2 g) と下層の高極性画分 (Hm3-36-4, 1.8 g) を得た. 高極性画分 (1.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し (Merck, Silica gel 60, 3.0 cm I.D. × 32 cm, CHCl<sub>3</sub>-MeOH, ステップワイズ溶出, 後流し: 0.05% TFA MeOH, 4 mL/min), 8 画分に分離した (Hm3-42-1~8).

#### 2-2-2. 化合物 **21-23** の分離・精製

水溶性分画物 Hm1-32-11 (297 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーに供し (Sephadex LH-20, 2.5 cm I.D. × 100 cm, MeOH 溶出, 後流し: 0.1% ギ酸 MeOH, 0.5 mL/min), 12 画分に分離した (Hm1-64-1~12). 分画物 Hm1-64-3 (13 mg) を分取 HPLC により精製し (SHISEIDO CAPCELLPAK C<sub>18</sub> 10 mm I.D. × 250 mm, 2-PrOH/MeCN/H<sub>2</sub>O (2:3:5), 250 mM NaClO<sub>4</sub>), **21** (Hm3-6-4, 2.3 mg) を得た. HPLC の検出には RI 検出器を用いた. 後述の化合物 **22-27** の分取 HPLC にはすべて RI 検出器を用いた. 分画物 Hm1-64-12 (108 mg) を遠心液液分配クロマトグラフィー (CPC) で分離し (1-BuOH-MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1:1), 固定相: 上層, 移動相: 下層, 下降法, 1.0 mL/min), 9 画分を得た (Hm1-68-1~9). この際, CPC により **21** 含有フラクションと **22, 23** 含有フラクションを効率的に分離することができた. 分画物 Hm1-68-5 (5.6 mg) を分取 HPLC

(SHISEIDO CAPCELLPAK C<sub>18</sub> 10 mm I.D. × 250 mm, 2-PrOH/MeCN/H<sub>2</sub>O (2:4:4), 250 mM NaClO<sub>4</sub>) に供し, **22** (Hm3-2-5, 2.5 mg), **23** (Hm3-2-4, 0.9 mg) を得た. **22**, **23** のサンプル量を確保するため, さらに分離を行った. 分画物 Hm1-64-10 (6.1 mg), -11 (2.5 mg) を HPLC で精製し, **22** (Hm3-28-5, 0.8 mg), **23** (Hm3-28-4, 0.6 mg) を得た.

### 1. 化合物 **24-26** の分離・精製

水溶性分画物 Hm1-32-10 (207 mg) をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し (Sephadex LH-20, 2.5 cm I.D. × 100 cm, H<sub>2</sub>O-MeOH ステップワイズ溶出, 後流し: 0.1% ギ酸 80% MeOH, 0.5 mL/min), 18 画分を得た (Hm1-58-1~18). 分画物 Hm1-58-10 (39 mg) を HPLC で精製し (SHISEIDO CAPCELLPAK C<sub>18</sub> 10 mm I.D. × 250 mm, 2-PrOH/MeCN/H<sub>2</sub>O (2:3:5), 250 mM NaClO<sub>4</sub>), **24** (Hm2-76-2, 3.8 mg), **25** (Hm2-76-3, 7.7 mg), **26** (Hm2-76-4, 3.5 mg) を得た.

### 2. 化合物 **27** の分離・精製

脂溶性分画物 Hm3-42-4 (265 mg) を逆相 C<sub>18</sub> クロマトグラフィーに供し (Wako 100C<sub>18</sub>, 2.5 cm I.D. × 42.5 cm, MeCN/H<sub>2</sub>O (1:4) – 2-PrOH/MeCN/H<sub>2</sub>O (4:3:3), 250 mM NaClO<sub>4</sub>, グラジエント溶出, 後流し: MeOH), 9 画分を得た (Hm3-46-1~9). 分画物 Hm3-46-6 (17.6 mg) を HPLC で分離し (Cosmosil PBr 10 mm I.D. × 250 mm, 2-PrOH/MeCN/H<sub>2</sub>O (18:37:45), 250 mM NaClO<sub>4</sub>), **27** を主要に含む分画物 (Hm3-50-3, 1.9 mg) を得た.

### 3. 化合物 **28** の分離・精製

分画物 Hm1-32-5 (1.55 g) をゲルろ過クロマトグラフィーに供し (Sephadex LH-20, 5.5 cm I.D. × 60 cm, H<sub>2</sub>O 溶出, 後流し: 0.05% TFA 50% MeOH, 1.0 mL/min), 21 画分に分離した (Hm1-43-1~21). 分画物 Hm1-43-12 (25.7 mg) をさらにゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し (HW-40S, 1.5 cm I.D. × 74 cm, H<sub>2</sub>O 溶出, 後流し: 0.05% TFA 20% MeOH, 0.2 mL/min), **28** (Hm1-

52-5, 2.0 mg) を得た. HPLC の検出には PDA 検出器を用いた.

### 2-3. 化合物 21-28 の構造決定

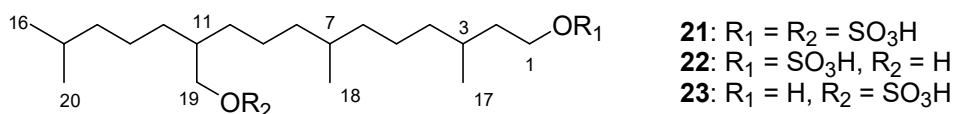
**2-3-1.** 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate (**21**, **Figure 95**), 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate (**22**, **Figure 95**), 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-19-sulfate (**23**, **Figure 95**) の構造決定

3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate (**21**), 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate (**22**), 3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-19-sulfate (**23**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた。

3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate (**21**):  $[\alpha]^{20}_D$  -0.4 (*c*: 0.019, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3431, 2924, 2856, 1633, 1222, 1069, 469  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) shown in **Figure 96-97** and **Table 21**; HRESIMS:  $m/z$  473.2249  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{S}_2$ ,  $m/z$  473.2248); HRESIMS/MS:  $m/z$  393.2690  $[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{S}$ ,  $m/z$  96.9600  $[\text{HSO}_4]^-$ ).

3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-1-sulfate (**22**):  $[\alpha]^{20}_D$  4.7 (*c*: 0.019, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3441, 2920, 2851, 1633, 1222, 1080, 463  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) shown in **Figure 98-99** **Table 21**; HRESIMS:  $m/z$  393.2677  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{S}$ ,  $m/z$  393.2680); HRESIMS/MS:  $m/z$  96.9597  $[\text{HSO}_4]^-$ .

3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecan-19-sulfate (**23**):  $[\alpha]^{20}_D$  7.7 (*c*: 0.0074, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3431, 2920, 2851, 1075, 469  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) shown in **Figure 100-101** and **Table 21**; HRESIMS:  $m/z$  393.2673  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{S}$ ,  $m/z$  393.2680); HRESIMS/MS:  $m/z$  96.9598  $[\text{HSO}_4]^-$ .



**Figure 95.** The structure of **21-23**.

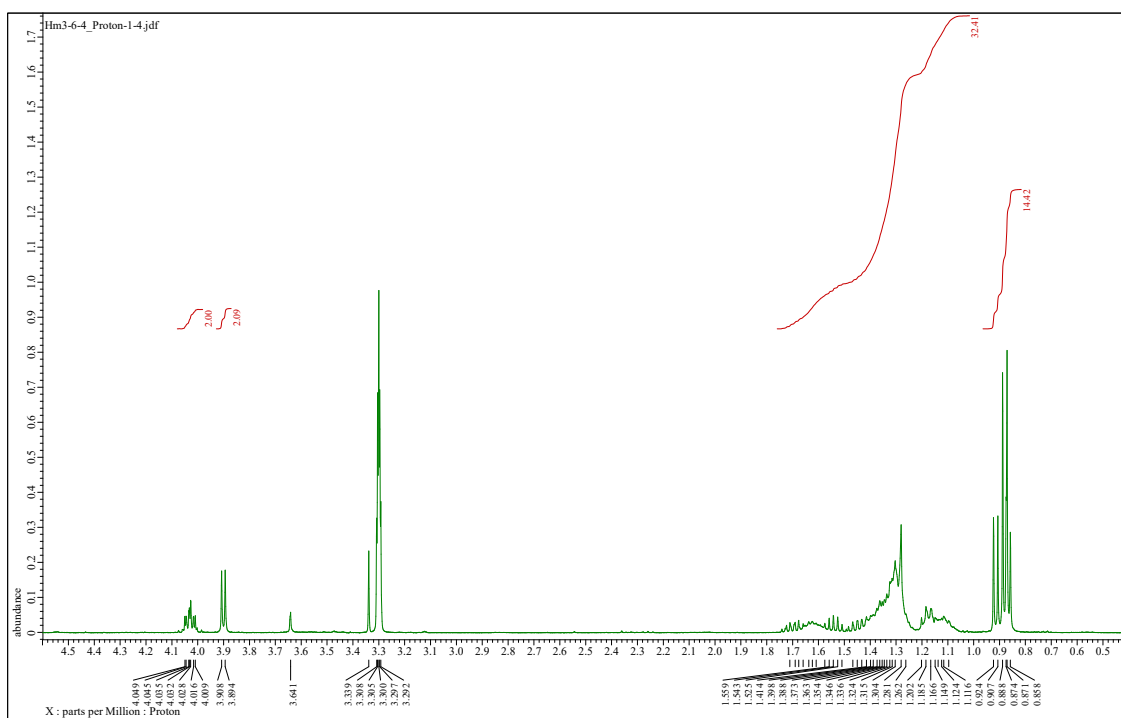


Figure 96.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **21**.

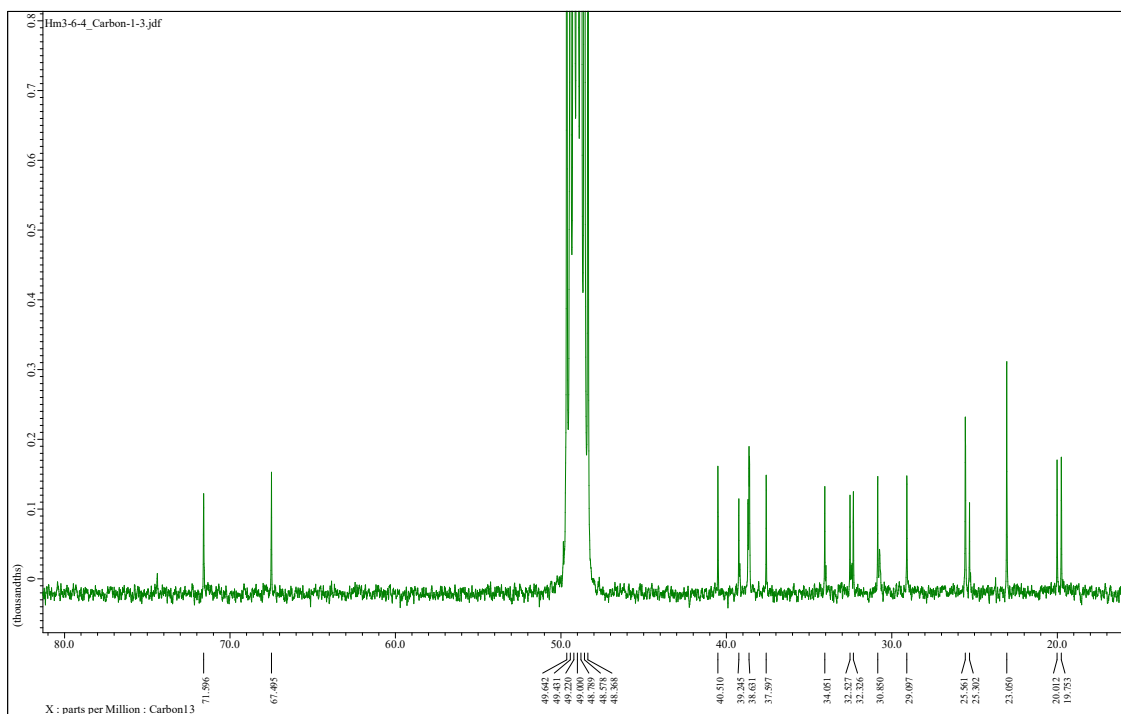
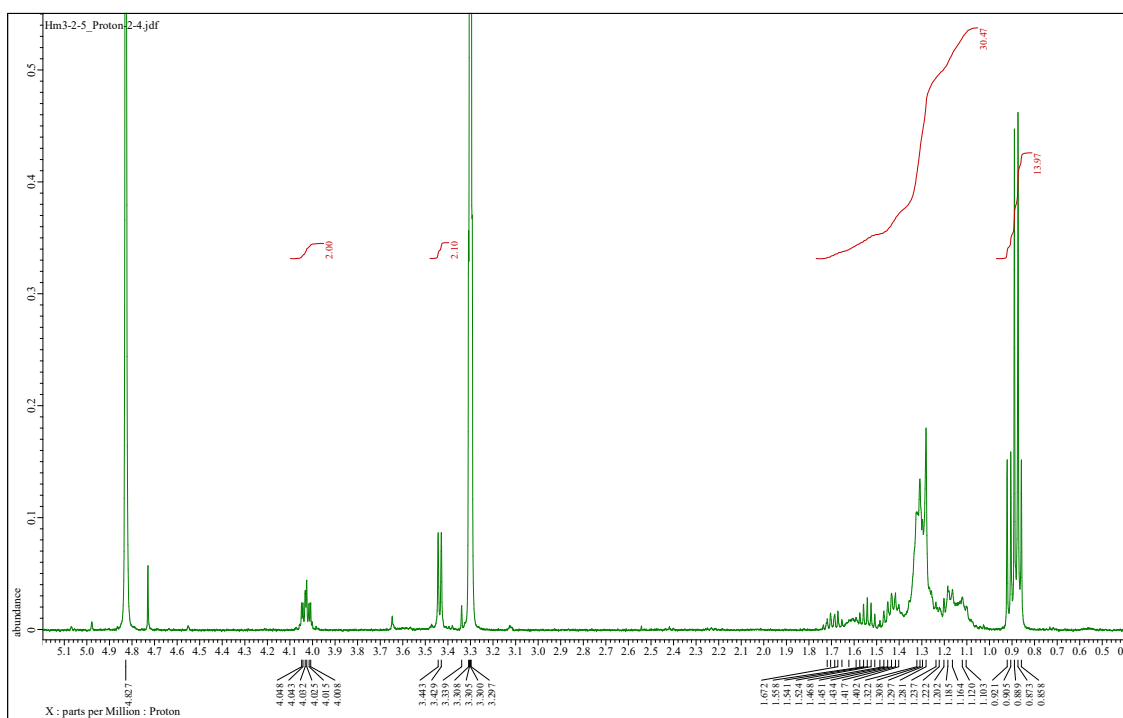
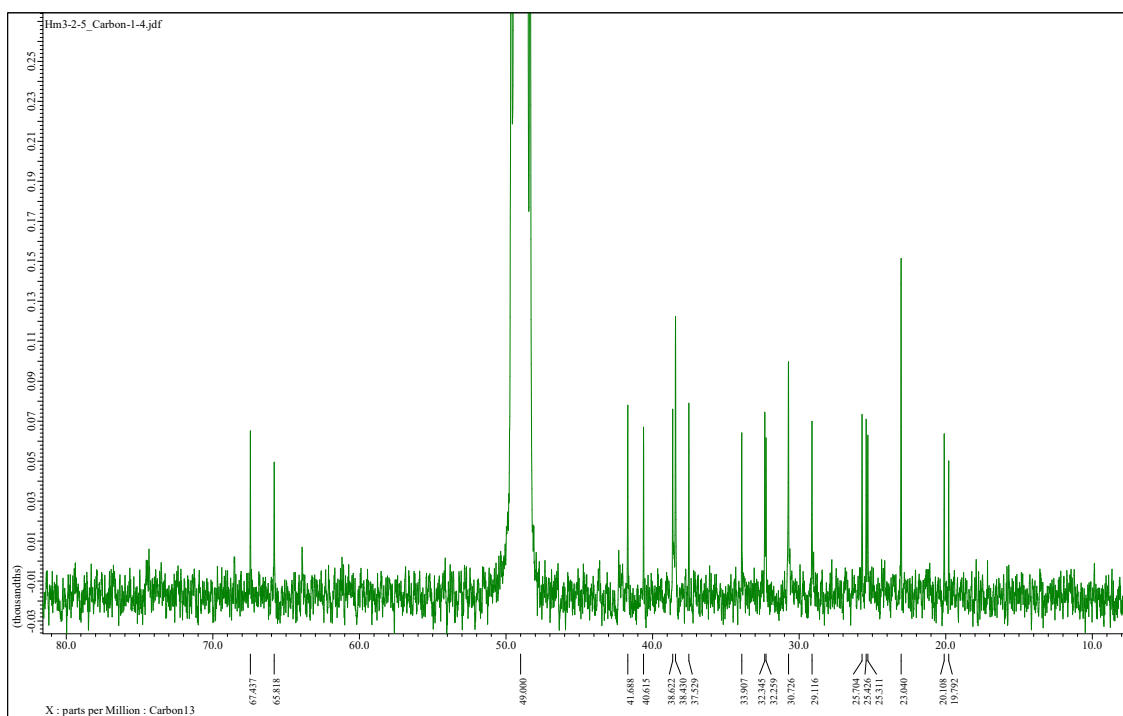


Figure 97.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **21**.

化合物 **21** は白色個体として得られた。HRESIMS データより分子式を  $C_{20}H_{42}O_8S_2$  と推定した。HRESIMS/MS スペクトルにおいて  $[M-H-SO_3]^-$  のフラグメントイオンが観測されたことから硫酸エステルの存在が示唆された。また  $^1H$  NMR (**Figure 96**),  $^{13}C$  NMR (**Figure 97**), DEPT, HSQC スペクトル解析により 4 個のメチル基 ( $\delta_H/\delta_C$  0.87/20.0, 0.87/20.0, 0.88/23.1, 0.92/19.8), 2 個のオキシメチレン ( $\delta_H/\delta_C$  3.90/71.6, 4.03/67.5), メチレンエンベロープ ( $\delta_H/\delta_C$  1.13-1.70/25.3-40.5), 4 個のメチン ( $\delta_H/\delta_C$  1.39/34.1, 1.54/29.1, 1.60/30.9, 1.64/39.2) の存在が示された (**Table 21**)。これらの分光学的データは 1997 年に地中海産ホヤ *Ascidia mentula* から報告されている 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate<sup>101</sup> のそれと良い一致を示したことから, **21** を 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate であると同定した。



**Figure 98.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **22** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 99.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **22** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

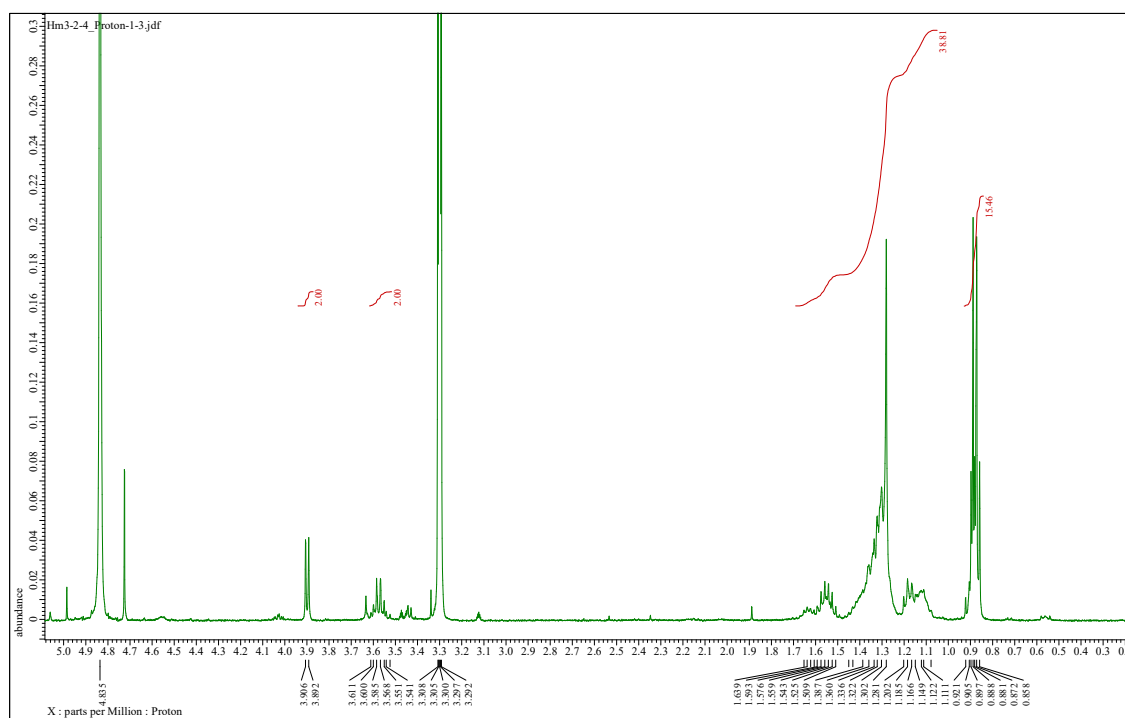


Figure 100.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **23** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

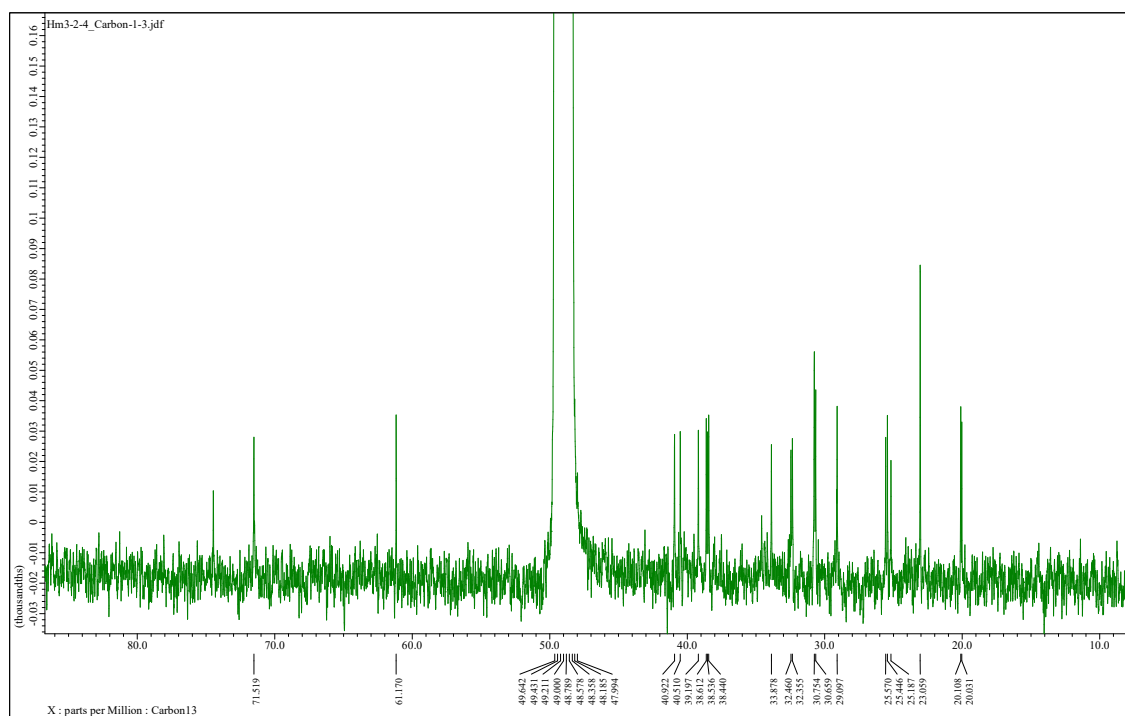
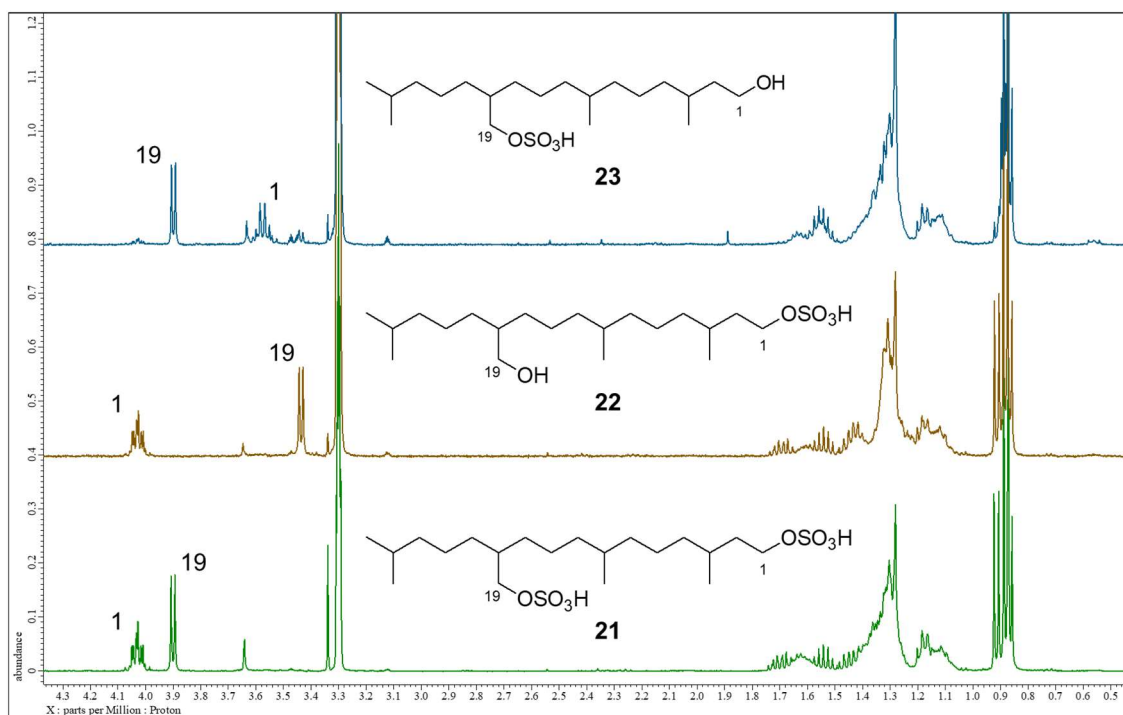
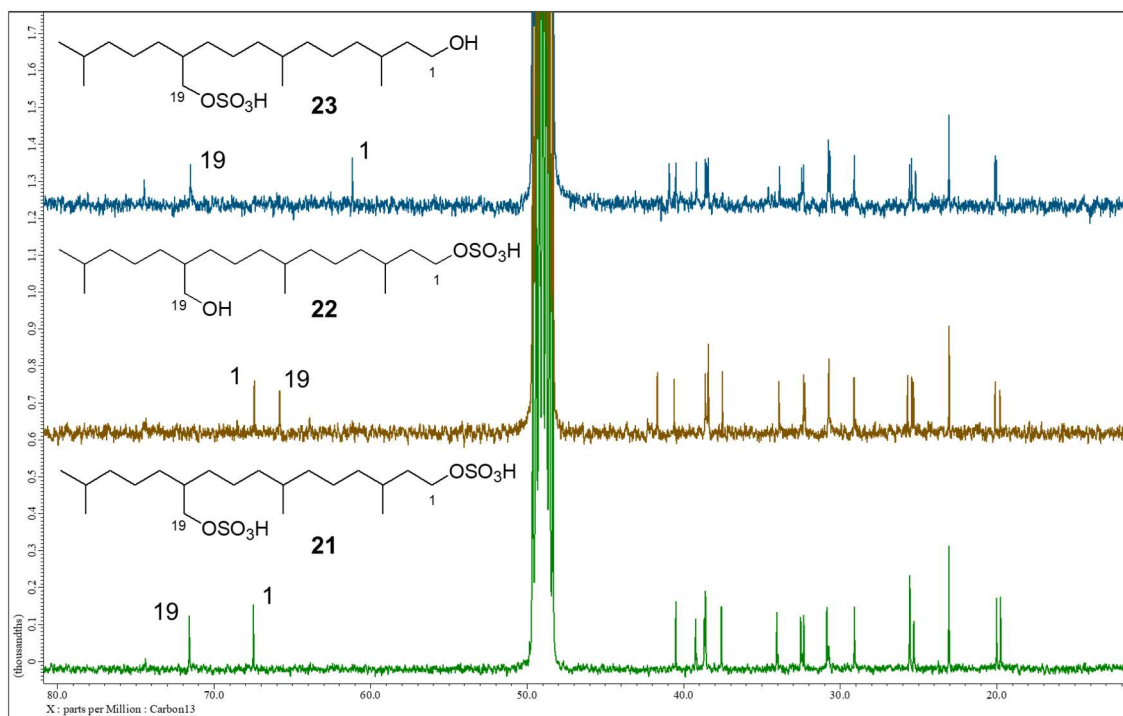


Figure 101.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **23** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

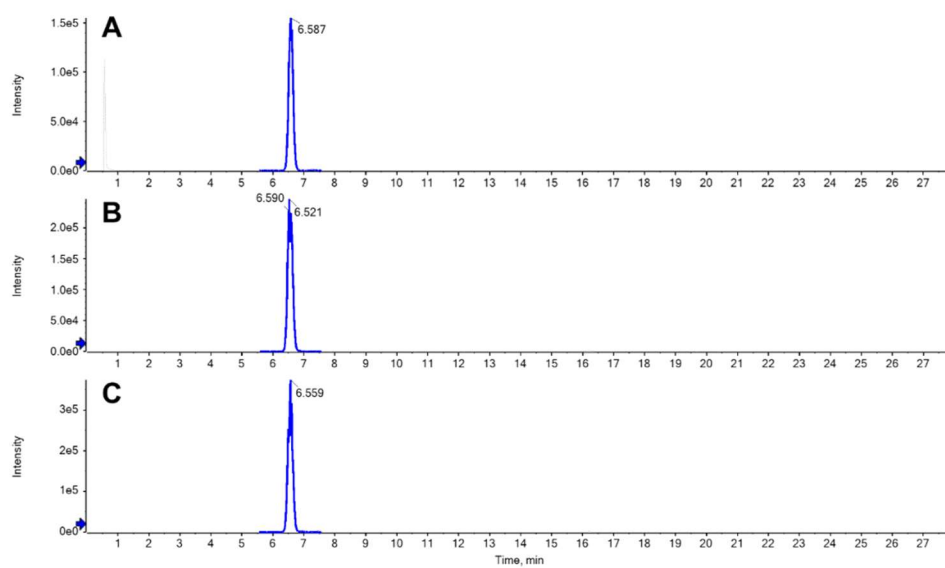
化合物 **22** および **23** は白色個体として得られた。HRESIMS データから両化合物の分子式を  $C_{20}H_{42}O_5S_2$  と推定した。また、**21** と同様に HRESIMS/MS スペクトルにおいて  $HSO_4^-$  のフラグメントイオンが観測され、硫酸エステル基の存在が示唆された。**22** および **23** は **21** と非常によく似た  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR スペクトルを示し (Figure 102-103), それぞれオキシメチレン (doublet,  $\delta_H/\delta_C$  3.44/65.8; multiplet,  $\delta_H/\delta_C$  3.58/61.2) の高磁場シフトが見られた。これらのデータから **22** は **21** の 19 位硫酸エステルが、**23** は **21** の 1 位硫酸エステルが加水分解を受けた化合物であることが示唆された。各種二次元 NMR 解析によって構造解析を試みたが、 $^1H$  NMR スペクトルにおけるシグナルの重複によってピークを帰属することができず、構造決定には至らなかった。そこで **21-23** を酸加水分解に付してジオールを調製し (6 M HCl, 120°C, 3h), それぞれの加水分解物について LC-HRESI-MS/MS 分析を行った。その結果、いずれの加水分解物も同一の分子式、保持時間、MS/MS スペクトルを示したことから (Figure 104-105), **21-23** は同一のアルコール骨格を有していることが示された。NMR のケミカルシフトから 1 位, 19 位に硫酸エステルを帰属し, **22**, **23** を 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-19-sulfate であると同定した。



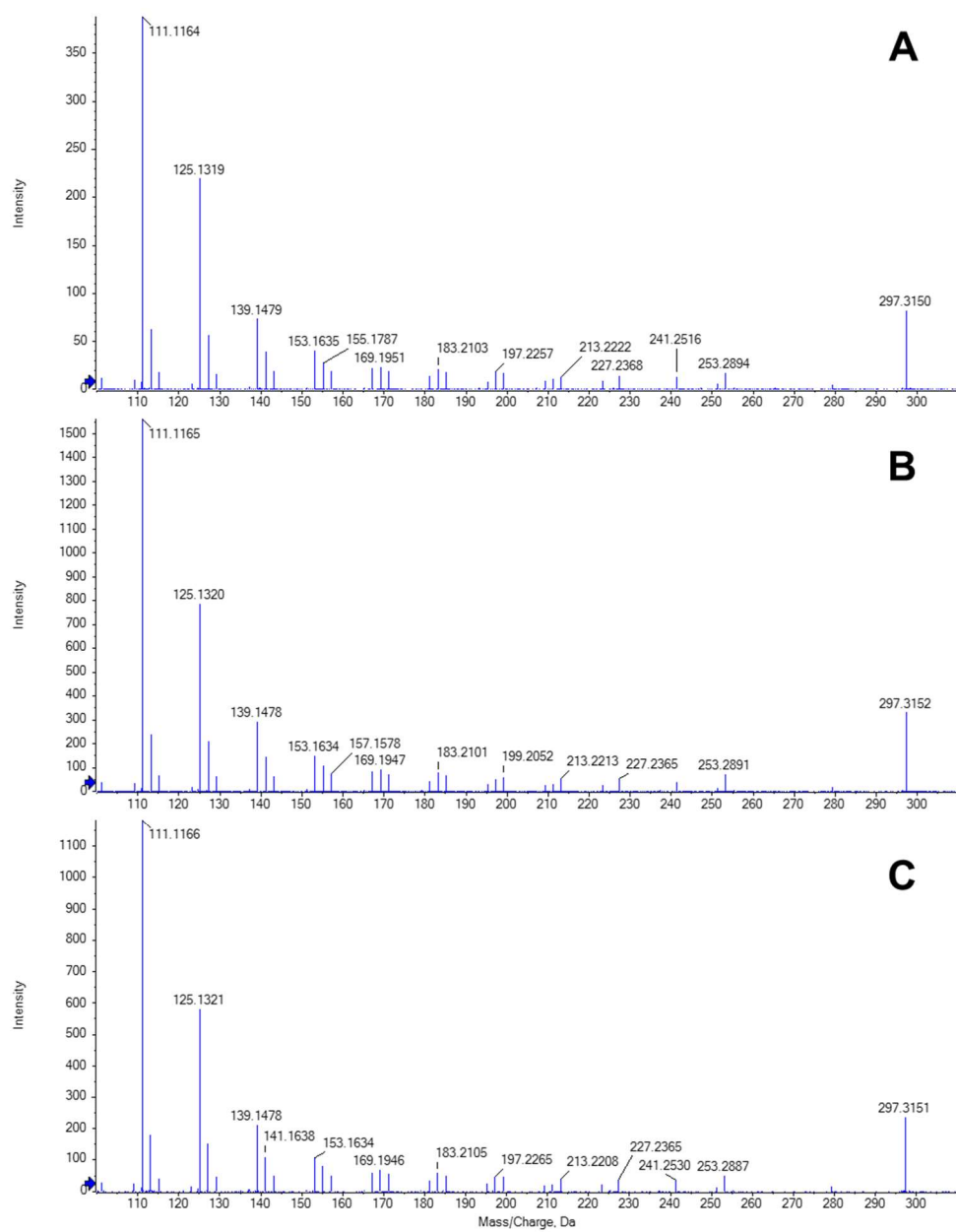
**Figure 102.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of **23** (upper), **22** (middle) and **21** (lower).



**Figure 103.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **23** (upper), **22** (middle) and **21** (lower).



**Figure 104.** Extracted ion chromatograms for hydrolysis products ( $m/z$  315  $[M+H]^+$  calcd for  $C_{20}H_{42}O_2$ ) of (A) **21**, (B) **22** and (C) **23**.



**Figure 105.** Positive mode HRESI-MS/MS spectra of hydrolysis products of (A) **21**, (B) **22** and (C) **23**.

**Table 21.** NMR data for **21-23** in CD<sub>3</sub>OD.

#C	<b>21</b>		<b>22</b>		<b>23</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)
1	67.5, CH <sub>2</sub>	4.03, m	67.4, CH <sub>2</sub>	4.03, m	61.2, CH <sub>2</sub>	3.58, m
2	37.6, CH <sub>2</sub>	1.43 <sup>c</sup>	37.5, CH <sub>2</sub>	1.44, m	40.9, CH <sub>2</sub>	1.33 <sup>o</sup>
		1.70, m		1.69, m		1.57 <sup>p</sup>
3	30.9, CH	1.60 <sup>d</sup>	30.7, CH	1.61, m	30.7, CH	1.56 <sup>p</sup>
4	38.6 <sup>a</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>c</sup>	38.4 <sup>e</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>i</sup>	30.8, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>o</sup>
5	25.3, CH <sub>2</sub>	1.31-1.33 <sup>c</sup>	25.3 <sup>f</sup> , CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>h</sup>	25.2 <sup>k</sup> , CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>o</sup>
6	38.6 <sup>a</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>c</sup>	38.4 <sup>e</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>i</sup>	38.4-38.6, CH <sub>2</sub>	1.30 <sup>o</sup>
7	34.1, CH	1.39 <sup>c</sup>	33.9, CH	1.41 <sup>j</sup>	33.9, CH	1.40
		1.12 <sup>b</sup>		1.13 <sup>h</sup>		
8	38.7 <sup>a</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>c</sup>	38.6 <sup>e</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>i</sup>	38.4-38.6, CH <sub>2</sub>	1.13 <sup>n</sup>
		1.31-1.33 <sup>c</sup>		1.32 <sup>i</sup>		1.30 <sup>o</sup>
9	25.6, CH <sub>2</sub>	1.31-1.33 <sup>c</sup>	25.4 <sup>f</sup> , CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>i</sup>	25.4 <sup>k</sup> , CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>o</sup>
10	32.5, CH <sub>2</sub>	1.31-1.35 <sup>c</sup>	32.3, CH <sub>2</sub>	1.24 <sup>g,i</sup>	32.4 <sup>l</sup> , CH <sub>2</sub>	1.29-1.34 <sup>o</sup>
11	39.2, CH	1.64 <sup>d</sup>	41.7, CH	1.43 <sup>j</sup>	39.2, CH	1.64, m
12	32.3, CH <sub>2</sub>	1.31-1.35 <sup>c</sup>	32.3, CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>g,i</sup>	32.5 <sup>l</sup> , CH <sub>2</sub>	1.29-1.34 <sup>o</sup>
13	25.6, CH <sub>2</sub>	1.31-1.33 <sup>c</sup>	25.7, CH	1.32 <sup>i</sup>	25.6 <sup>k</sup> , CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>o</sup>
14	40.5, CH <sub>2</sub>	1.17 <sup>b</sup>	40.6, CH <sub>2</sub>	1.18 <sup>h</sup>	40.5, CH <sub>2</sub>	1.18 <sup>n</sup>
15	29.1, CH	1.54 <sup>b</sup>	29.1, CH	1.54, sep (6.6)	29.1, CH	1.55 <sup>p</sup>
16	23.1, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.9)	23.0, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.4)	23.1, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.4)
17	19.8, CH <sub>3</sub>	0.92, d (6.9)	19.8, CH <sub>3</sub>	0.91, d (6.4)	20.1 <sup>m</sup> , CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.4)
18	20.0, CH <sub>3</sub>	0.87, d (6.4)	20.1, CH <sub>3</sub>	0.87, d (6.0)	20.0 <sup>m</sup> , CH <sub>3</sub>	0.87, d (6.4)
19	71.6, CH <sub>2</sub>	3.90, d (5.5)	65.8, CH <sub>2</sub>	3.44, d (5.5)	71.5, CH <sub>2</sub>	3.90, d (6.0)
20	23.1, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.9)	23.0, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.4)	23.1, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.4)

Measured in CD<sub>3</sub>OD. <sup>a,e,f,g,k,l,m</sup>Chemical shifts are interchangeable. <sup>b,c,d,h,i,j,m,o,p</sup>Overlapped with each other.

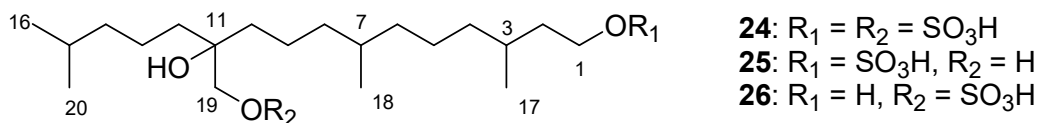
**2-3-2.** 11-Hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate (**24**, **Figure 106**), 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate (**25**, **Figure 106**), 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-19-sulfate (**26**, **Figure 106**) の構造決定

11-Hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate (**24**), 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate (**25**), 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-19-sulfate (**26**) は以下に示す物理学・分光学の性質を与えた.

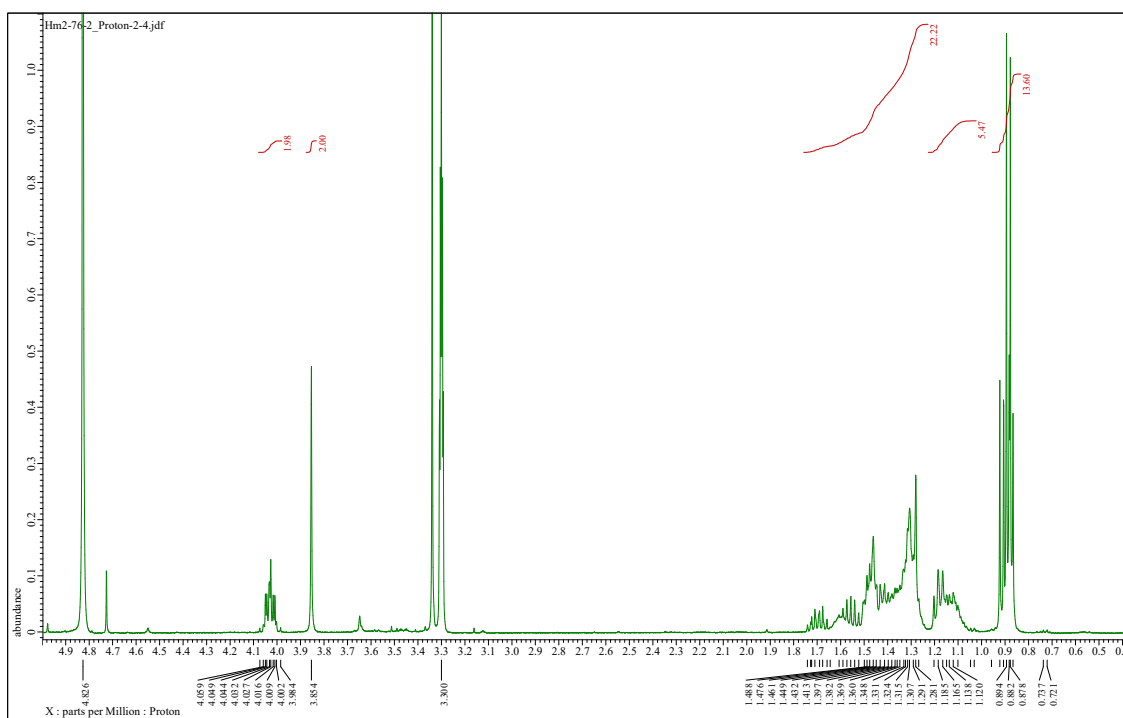
11-Hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate (**24**):  $[\alpha]^{20}_D$  -0.2 (*c*: 0.038, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3436, 2924, 1639, 1222, 1074, 463  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) shown in **Figure 107-108** and **Table 23**; HRESIMS:  $m/z$  489.2209  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_9\text{S}_2$ ,  $m/z$  489.2198); HRESIMS/MS:  $m/z$  409.2645  $[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{S}$ ),  $m/z$  96.9602  $[\text{HSO}_4]^-$ .

11-Hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate (**25**):  $[\alpha]^{20}_D$  -1.8 (*c*: 0.074, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3441, 2920, 2851, 1633, 1075, 463  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  and  $\text{DMSO}-d_6$ ) shown in **Figure 109-110**, **Table 22** ( $\text{DMSO}-d_6$ ) and **23**( $\text{CD}_3\text{OD}$ ); HRESIMS:  $m/z$  409.2620  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{S}$ ,  $m/z$  409.2629); HRESIMS/MS:  $m/z$  96.9600  $[\text{HSO}_4]^-$ .

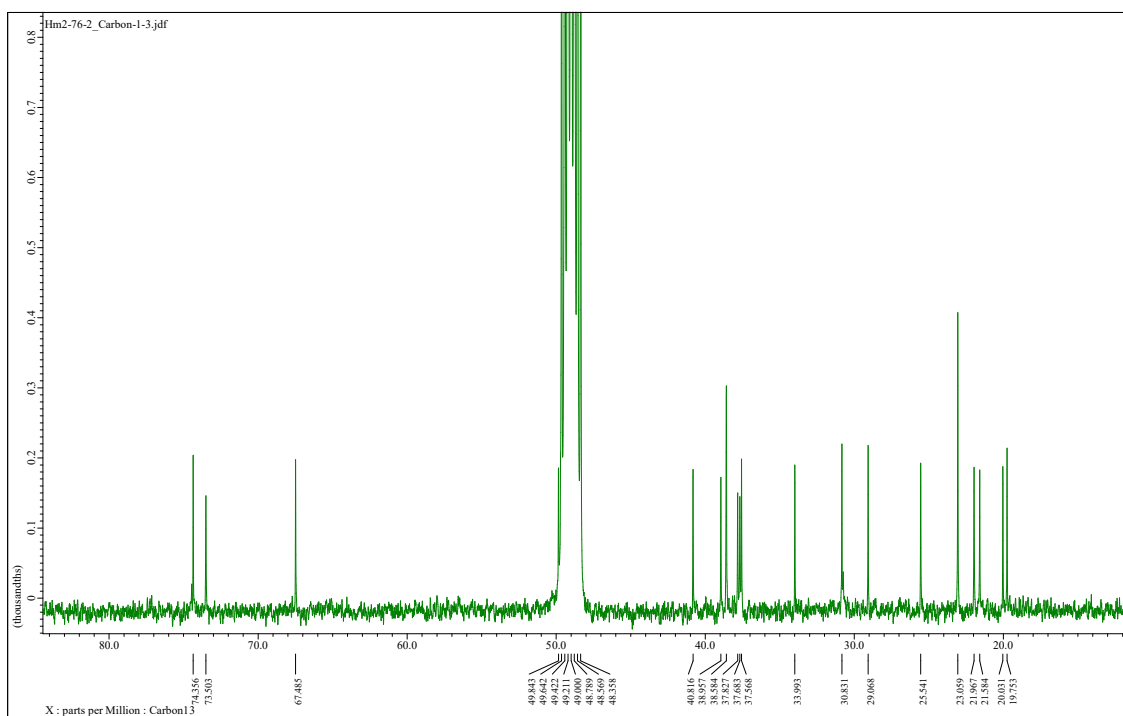
11-Hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-19-sulfate (**26**):  $[\alpha]^{20}_D$  3.4 (*c*: 0.026, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3431, 2920, 2845, 1639, 1069, 469  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) shown in **Figure 111-112** and **Table 23**; HRESIMS:  $m/z$  409.2629  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{S}$ ,  $m/z$  409.2629); HRESIMS/MS:  $m/z$  96.9601  $[\text{HSO}_4]^-$ .



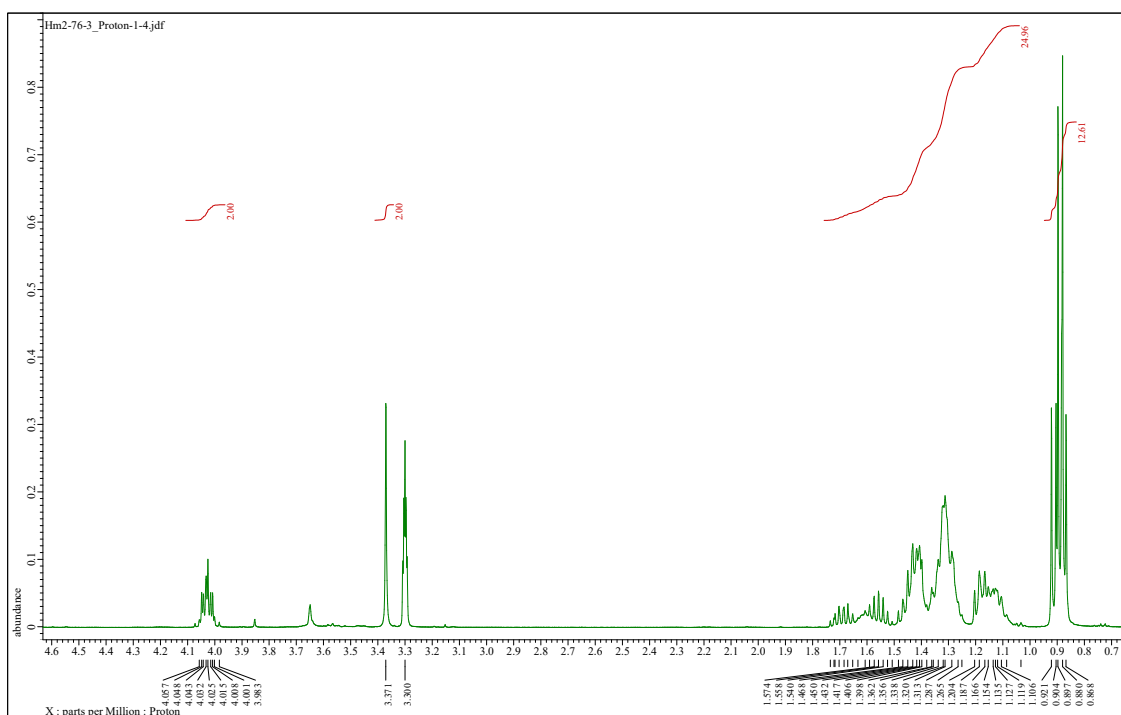
**Figure 106.** The structure of **24-26**.



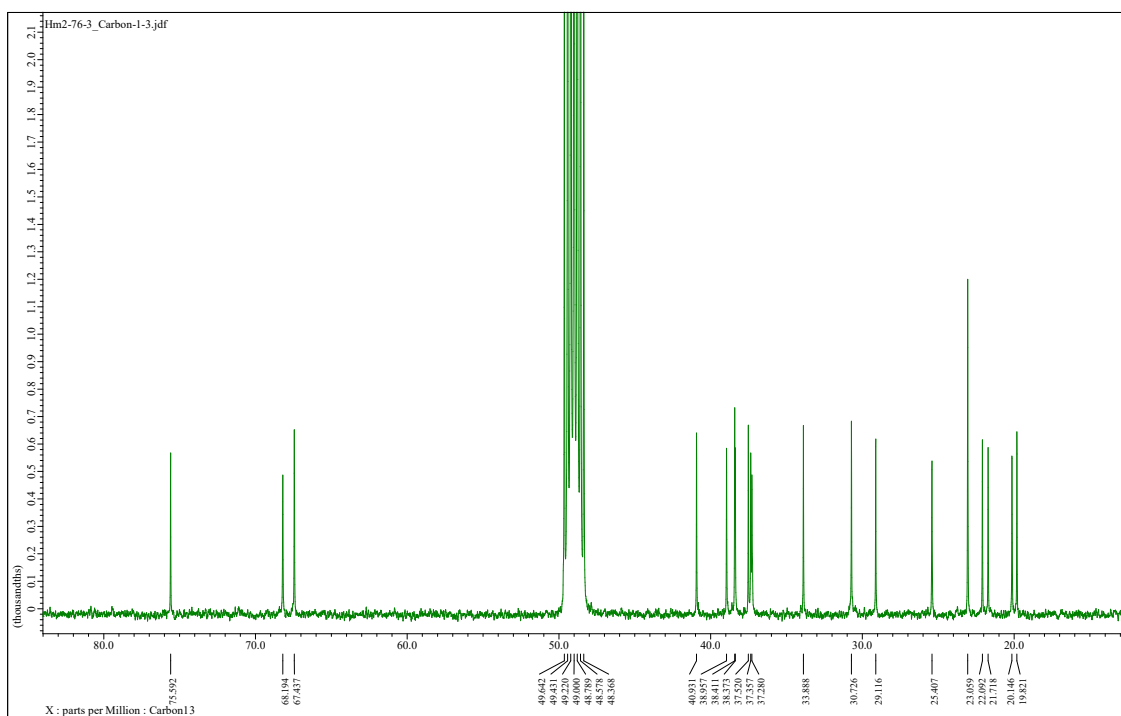
**Figure 107.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **24** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



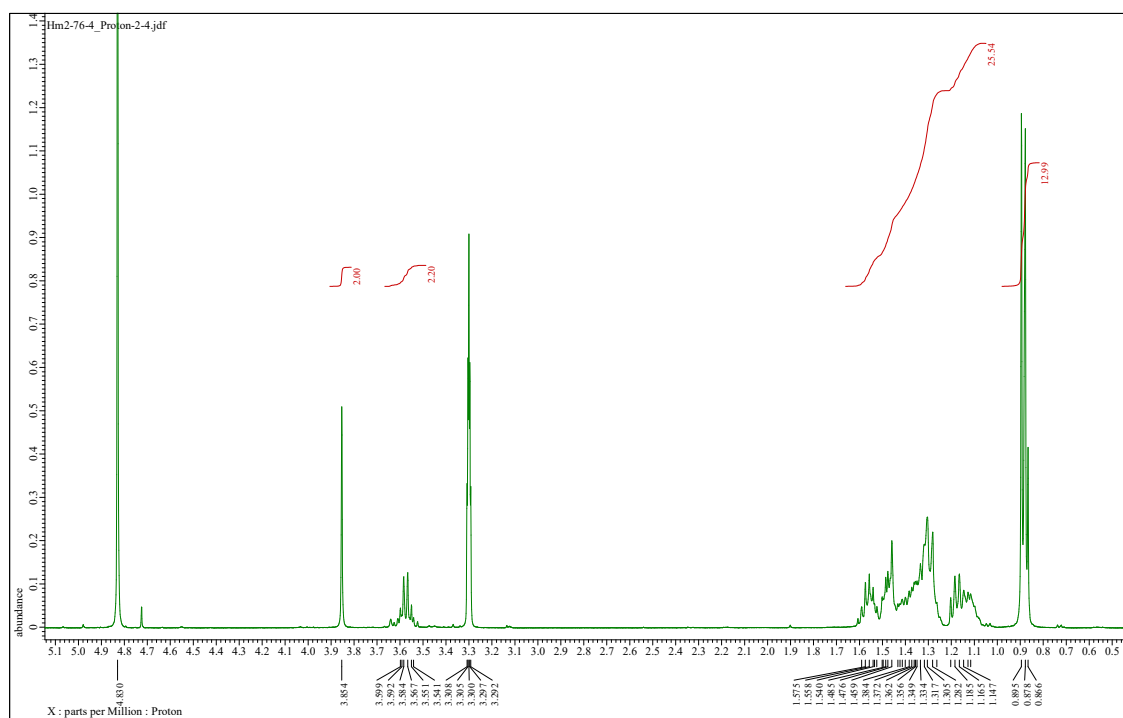
**Figure 108.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **24** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



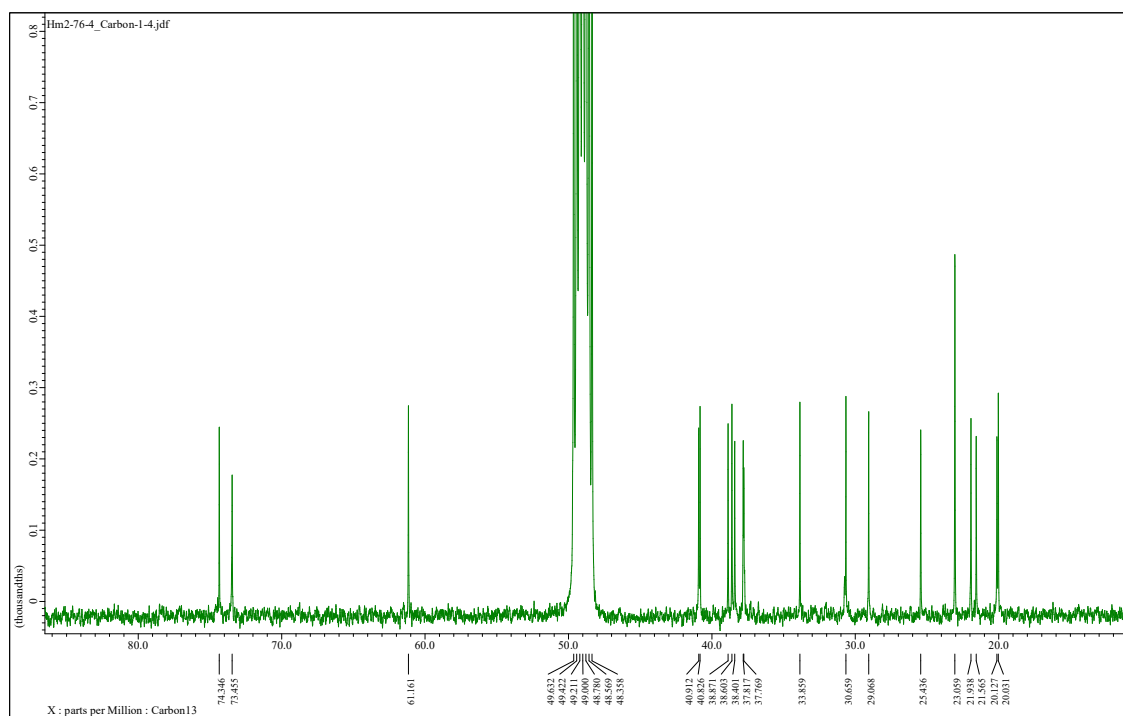
**Figure 109.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **25** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 110.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **25** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

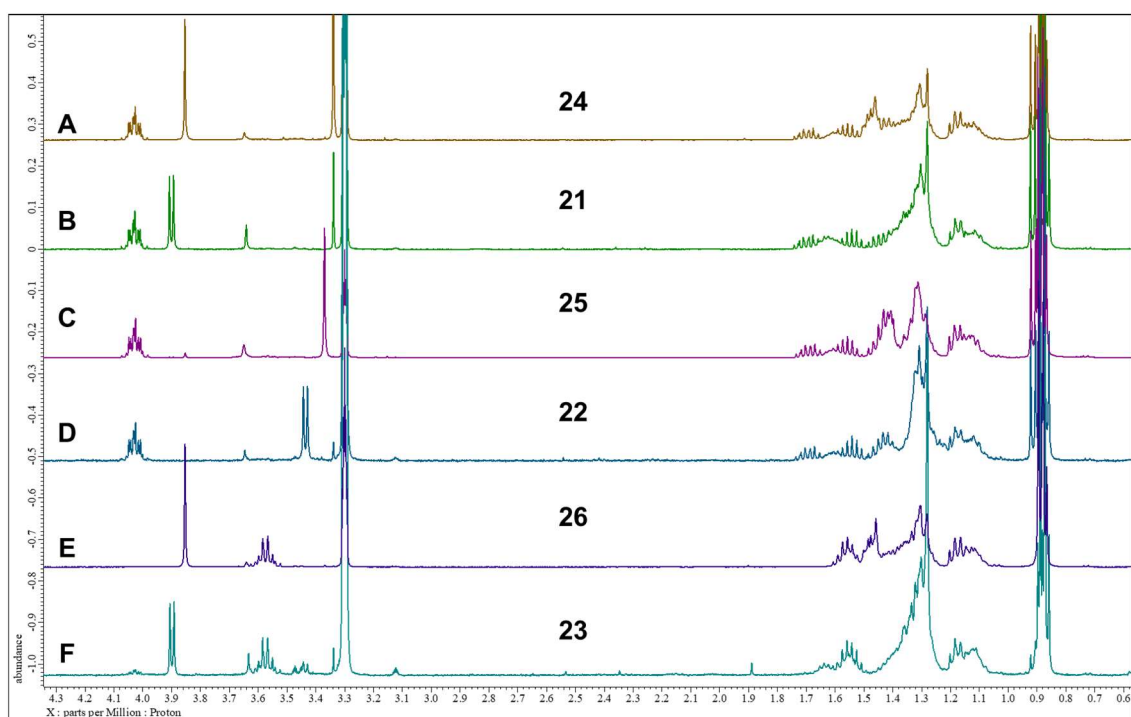


**Figure 111.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **26** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

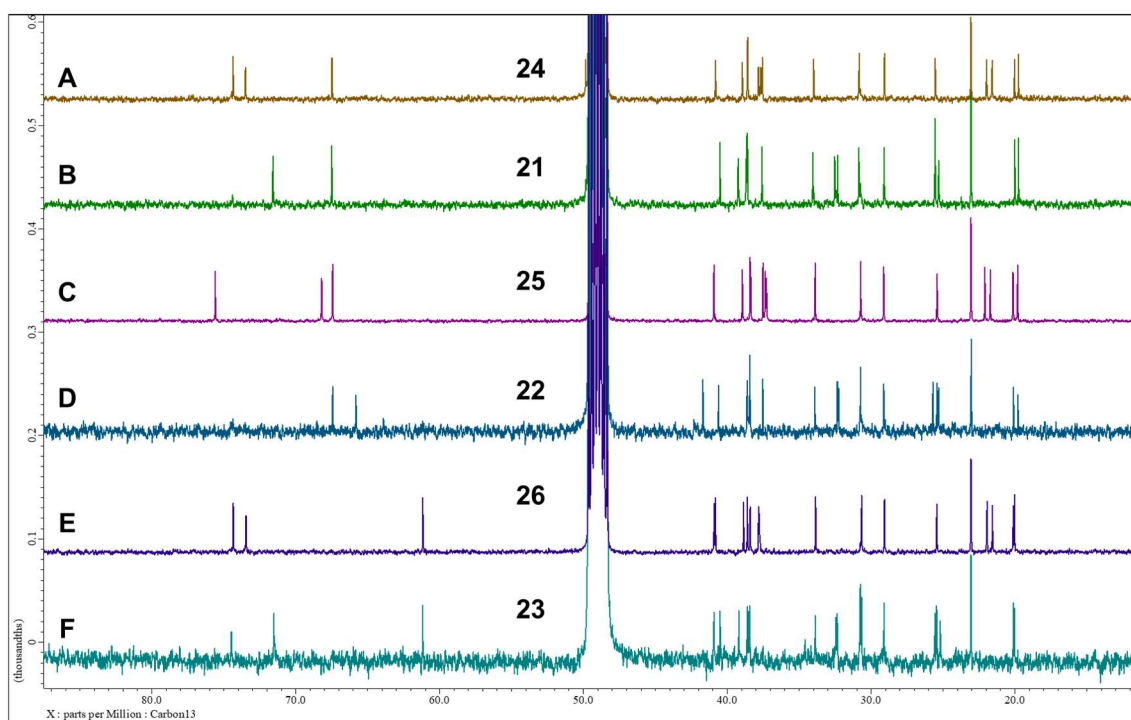


**Figure 112.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **26** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

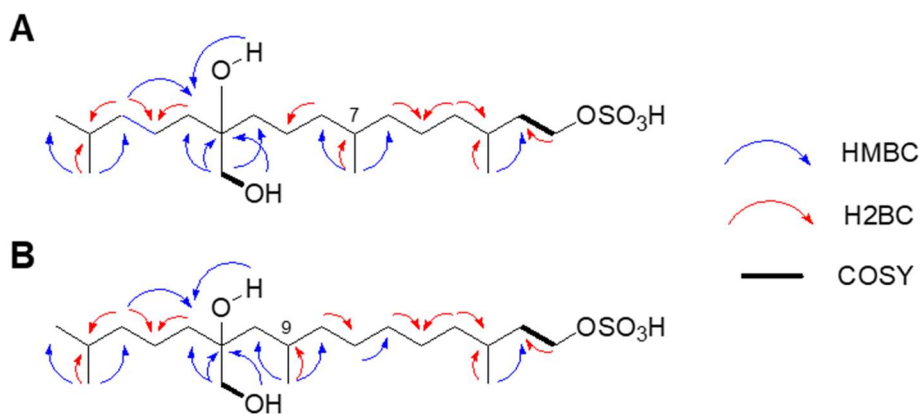
化合物 **24-26** は無色油状物質として得られた。HRESIMS 分析の結果から **24** の分子式を  $C_{20}H_{42}O_9S_2$ , **25-26** の分子式を  $C_{20}H_{42}O_6S$  と推定した。HRESI-MS/MS スペクトルにおいて **24** では  $[M-H-SO_3]$  のフラグメントイオンが, **25-26** では  $HSO_4^-$  のフラグメントイオンが観測された。また **24, 25, 26** はそれぞれ **21, 22, 23** とよく似た  $^1H$  NMR および  $^{13}C$  NMR スペクトルを示した (Figure 113-114)。これらのデータより **24-26** は **21-23** と同様, ジテルペン骨格を持つ高級アルコールの硫酸エステル化合物であることが示唆された。しかし, **24-26** の分子式が **21-23** よりも酸素原子 1 個分多いこと,  $^1H$  NMR スペクトルにおいて **21-23** で見られたオキシメチレンダブレットが見られず, オキシメチレンシングレットが見られたこと,  $^{13}C$  NMR スペクトルにおいて  $\delta_c$  74 ppm 付近に 4 級炭素が見られる点が **21-23** と異なっていた。このことから **24-26** は **21-23** の 11 位に水酸基が付加した化合物であると推察された。各種二次元 NMR 分析により詳細な構造解析を試みたが, これらの化合物もまた  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR スペクトルにおいてメチレン由来のシグナルが激しくオーバーラップしており MeOH- $d_4$  中での NMR 解析では構造決定には至らなかった。しかし, 幸運にも重溶媒に DMSO- $d_6$  を用いた各種二次元 NMR 解析 (HSQC, HMBC, H2BC) により **25** のみ 2 つの候補構造を導くことができた (Figure 115, A-B)。次に **25** の HRESI-MS/MS スペクトルを解析したところ, 末端の硫酸エステルをトリガーとしたチャージリモートフラグメンテーションパターンが観測された (Figure 116)。すなわち C-10-C-11 で開裂したイオン  $m/z$  263 を起点とした連続する 14 マスユニット (mu) 差のフラグメントイオンが観測され (Figure 116, 緑色両矢印), 続いて 28 mu 差のフラグメントイオン (Figure 116, ピンク色両矢印), さらに連続する 14 mu 差のフラグメントイオン (Figure 116, 緑色両矢印) が観測された。これらの開裂パターンは **25** が 7 位にメチル基を有すること, すなわち **25** の構造が Figure 115 における候補構造 A であることを強く支持するものであった。以上より, **25** の構造を 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1-sulfate と決定した。



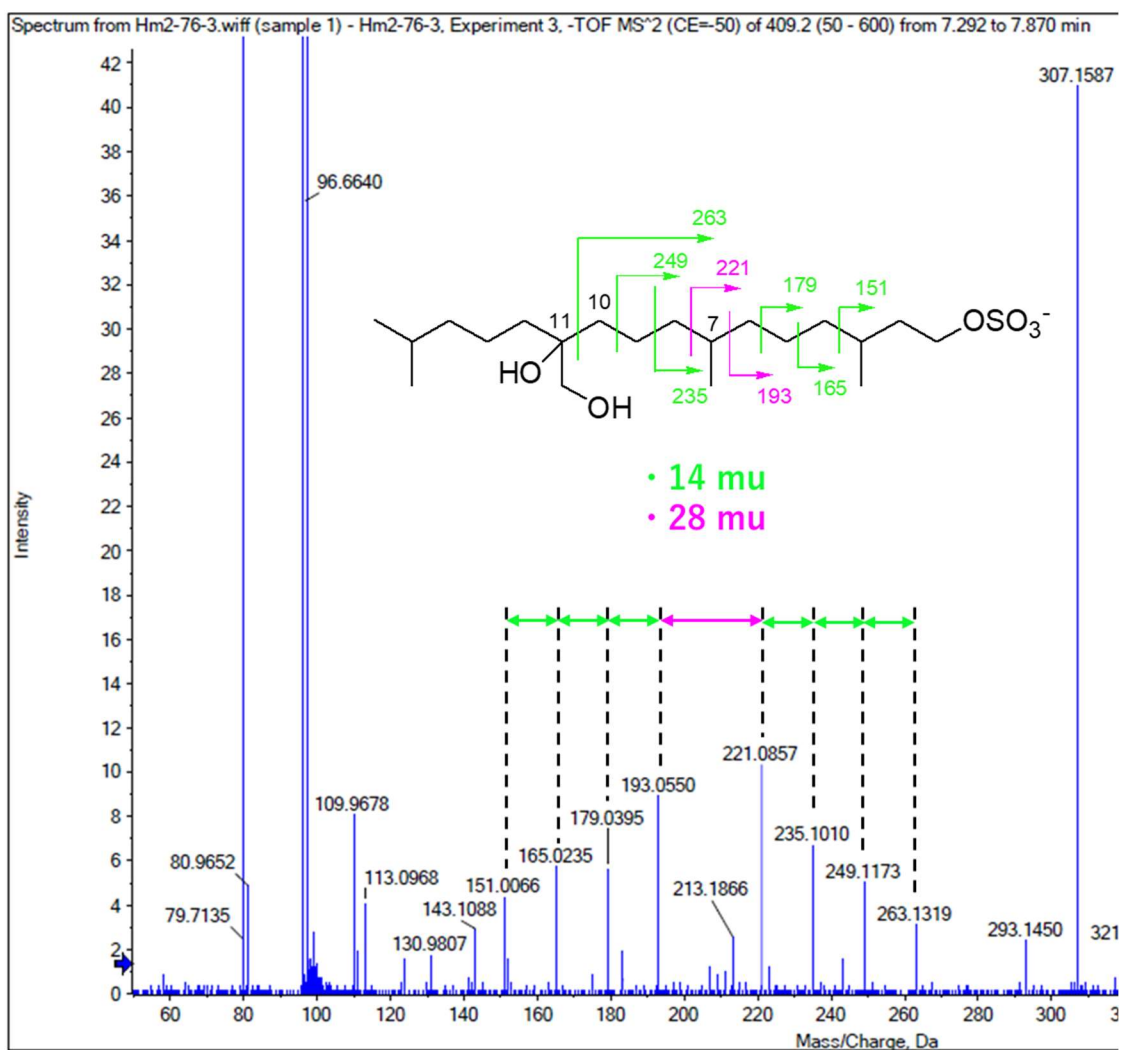
**Figure 113.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of 21-26 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 114.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of 21-26 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 115.** Key 2D NMR correlations in DMSO- $d_6$  for candidate structures of **25**.



**Figure 116.** Negative mode HRESI-MS/MS analysis of **25**.

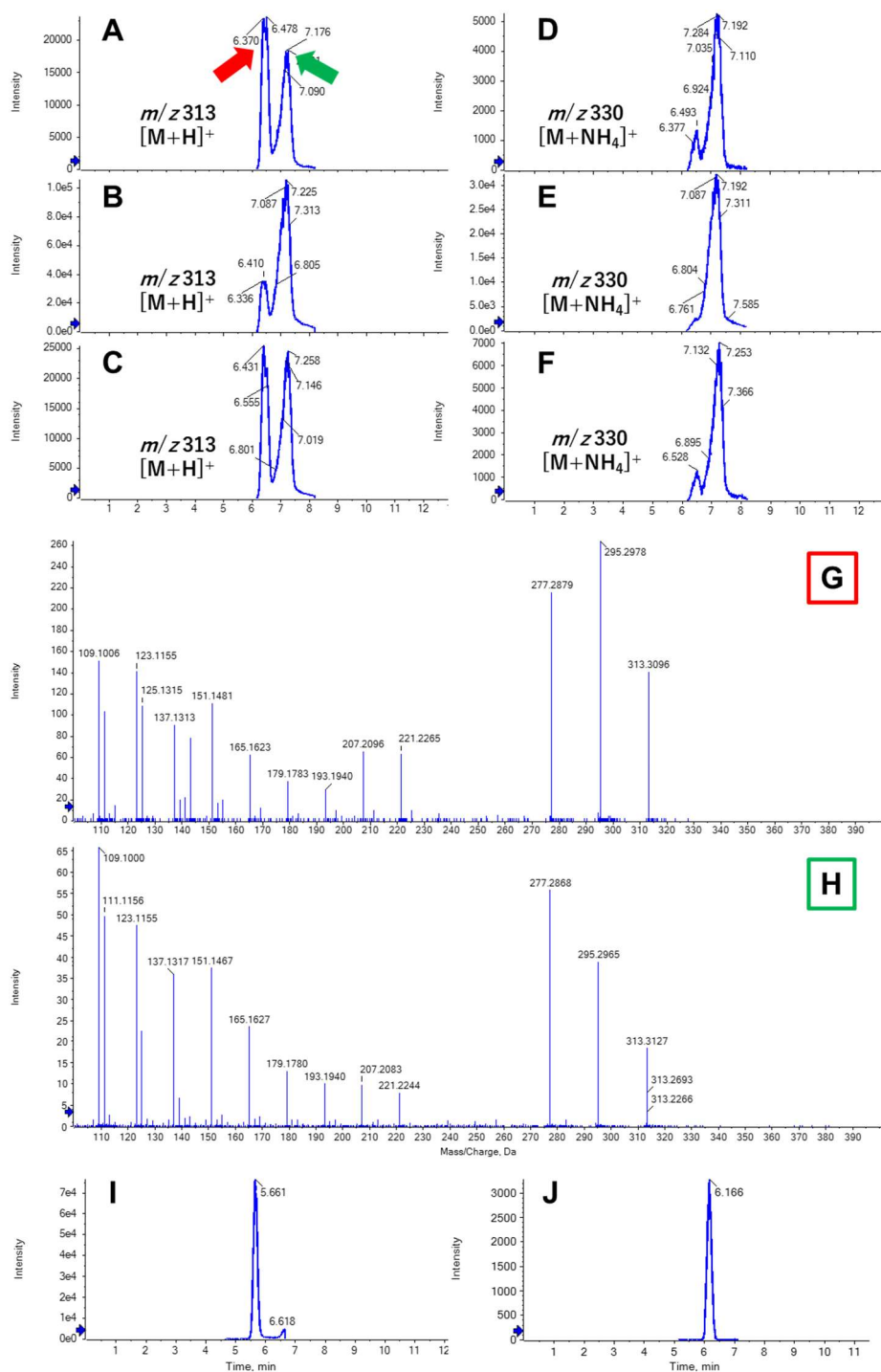
**Table 22.** NMR data for **25** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	COSY	H2BC	HMBC
1	63.7, CH <sub>2</sub>	3.70, m	2	2	
2	36.1, CH <sub>2</sub>	1.25 <sup>a</sup>	1	1	3, 4, 17
		1.49 <sup>b</sup>		1	3, 17
3	29.1, CH	1.48 <sup>b</sup>		2, 17	
4	36.8, CH <sub>2</sub>	1.06 <sup>c</sup>		5	3, 5
		1.08 <sup>c</sup>		3	
5	23.8, CH <sub>2</sub>	1.23 <sup>a</sup>			
6	36.7, CH <sub>2</sub>	1.23-1.25 <sup>a</sup>		5, 7	
7	32.1, CH	1.35, m		6, 18	
8	37.4, CH <sub>2</sub>	1.04 <sup>c</sup>		7	7, 18
		1.22 <sup>a</sup>		9	
9	20.1, CH <sub>2</sub>	1.25 <sup>a</sup>			
10	36.6, CH <sub>2</sub>	1.23-1.25 <sup>a</sup>			9
11	73.1, C				
11-OH		3.76, s			10, 11, 12, 19
12	36.5, CH <sub>2</sub>	1.25 <sup>a</sup>		13	
13	20.5, CH <sub>2</sub>	1.25 <sup>a</sup>		14	
14	39.1, CH <sub>2</sub>	1.09 <sup>c</sup>		13, 15	12, 13, 15, 16, 20
		1.22 <sup>a</sup>			
15	27.4, CH	1.49 <sup>b</sup>		14, 16, 20	
16	22.5, CH <sub>3</sub>	0.83, d (6.9)		15	14, 15, 20
17	19.3, CH <sub>3</sub>	0.82 <sup>d</sup>		3	2, 3
18	19.6, CH <sub>3</sub>	0.82 <sup>d</sup>		7	6, 7, 8
19	66.6, CH <sub>2</sub>	3.15, d (5.5)	19-OH		10, 11, 12
19-OH		4.32, t (5.5)	19	19	11, 19
20	22.5, CH <sub>3</sub>	0.83, d (6.9)		15	14, 15, 16

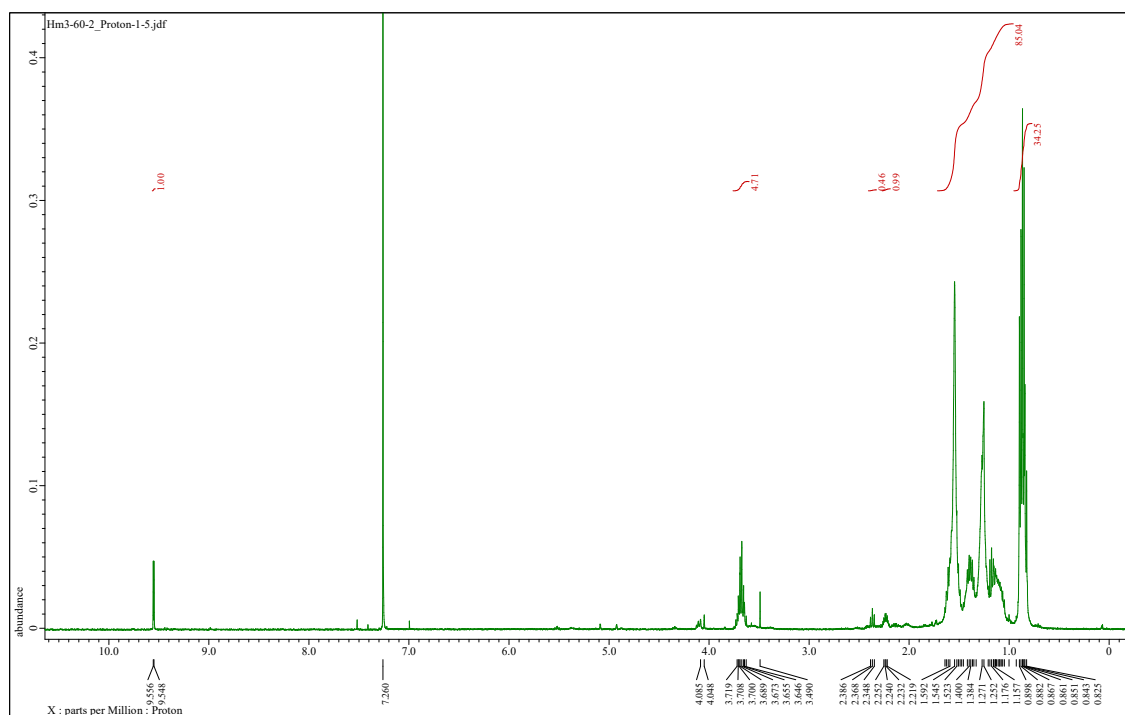
Measured in DMSO-*d*<sub>6</sub>. <sup>a,b,c,d</sup>Overlapped with each other.

次に **24, 26** の構造決定を行った。**21-23** と同様に **24-26** の加水分解物を調製した後、それぞれ LC-HRESI-MS/MS 分析に供し、分子式、保持時間、MS/MS スペクトルを比較した。しかし、いずれの反応物においてもポジティブモードにおいて予想される加水分解産物であるトリオール  $C_{20}H_{42}O_3$  由来のイオン ( $m/z$  315.3258) が見られず、加水分解に伴い脱水反応が起きた化合物由来と考えられる二つのイオンが主要成分として検出された ( $t_R$  6.4, 7.2 min;  $m/z$  313.3102  $[M+H]^+$ , calcd. for  $C_{20}H_{40}O_2$ , **Figure 117, A-C**)。またマイナー成分として炭素数 19 の化合物のイオンが検出された ( $t_R$  5.7 min;  $m/z$  299.2950  $[M+H]^+$ , calcd. for  $C_{19}H_{38}O_2$ , **Figure 117, I**)。ネガティブモードにおいてはカルボン酸と考えられるイオン ( $t_R$  6.2 min;  $m/z$  327.2904  $[M-H]^-$ , calcd. for  $C_{20}H_{40}O_3$ , **Figure 117, J**) が検出された。そこで反応生成物を同定するため NMR 分析による構造解析を行ったところ  $^1H$  および  $^{13}C$  NMR スペクトル, DEPT スペクトルにおいてアルデヒド由来と考えられるピーク ( $\delta_H$  9.55, doublet,  $J=3.2$ ;  $\delta_C$  205.8, **Figure 118-119**) が観測された。COSY, HSQC スペクトル解析の結果、アルデヒドはメチン ( $\delta_H/\delta_C$  2.24/52.1) に隣接していることが確認された。これらの LC-MS, NMR データから、**24-26** の酸加水分解反応により生じたトリオール (**25a**, Scheme 4, A) の C-11-C-19 において 3 級水酸基の脱離による脱水が起こりエノール (**25b**) が生成したのち、ケトエノール互変異性化によりアルデヒドが生じ(**25c**)、さらに一部のアルデヒドが酸化されカルボン酸を生じたと考えられる。また、HMBC スペクトルにおいてマイナー成分由来のトリプレットピーク ( $\delta_H$  2.37) からケトン由来と考えられる炭素 ( $\delta_C$  212.0) への相関が見られたことから、一部のトリオールにおいてメタノールが脱離し炭素数 19 のケトンが生じたと推察した (Scheme 4, B)。LC-MS 分析ではギ酸アンモニウムを含む移動相を用いたため、アンモニウムイオンによりエノラートイオンが安定化することでアルデヒド/エノールの平衡状態がエノール側へ移動した結果、ポジティブモードにおいてエノールとアルデヒド由来の二つのイオンが観測されたと考えられる。この仮説はこれらのイオンが非常によく似た MS/MS スペクトルを示すこと (**Figure 117, A, G, H**)、二つの分子のうち片方の分子の  $[M+NH_4]^+$  イオンがより強く検出

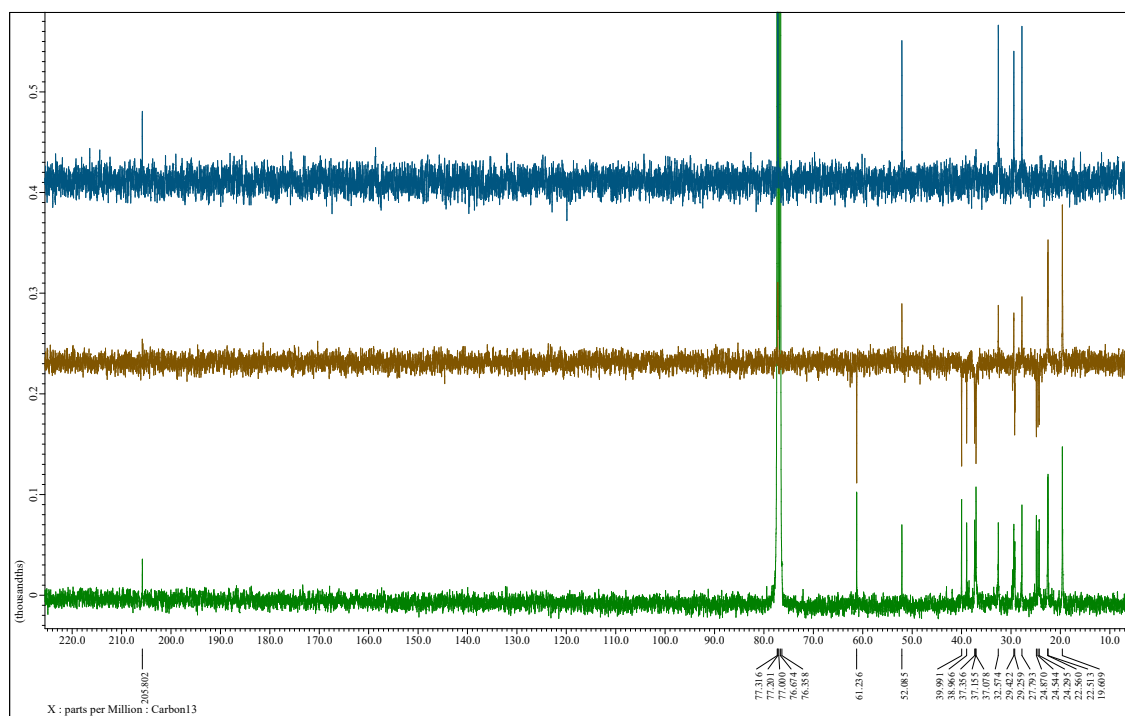
されたことから支持された (Figure 117, D-F). 以上の結果から, **24-26** は酸加水分解により同一の生成物を生じたため, いずれも同一のアルコール骨格を有していることが示された. 最後にオキシメチレンのケミカルシフトから **24** の 1 位, 19 位, **26** の 19 位に硫酸エステルを帰属し, **24, 26** をそれぞれ 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-1,19-disulfate, 11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-hexadecan-19-sulfate と決定した.



**Figure 117.** Extracted ion chromatograms for  $m/z$  313  $[M+H]^+$ , 330  $[M+NH_4]^+$ , hydrolysate of (A, D) **24**, (B, E) **25**, (C, F) **26** and MS/MS spectra of  $m/z$  313 at (D)  $t_R$  6.4 min (red arrow) and (E) 7.2 min (green arrow). Two ions (I)  $m/z$  299  $[M+H]^+$  and (J)  $m/z$  327  $[M-H]^-$  were detected as minor hydrolysis products

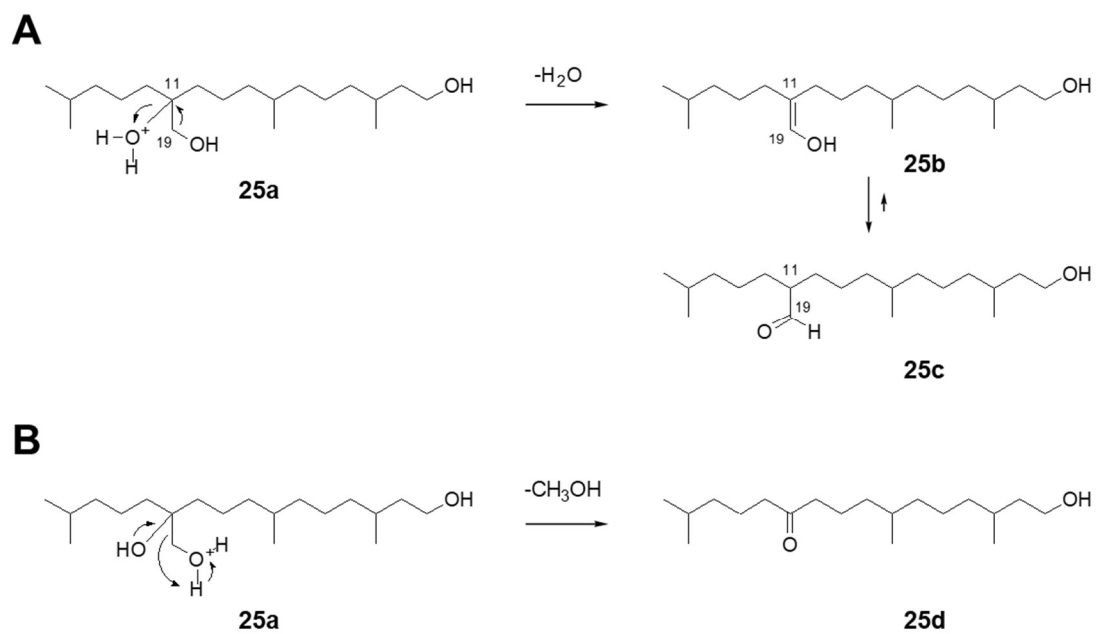


**Figure 118.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of hydrolysis products of **25** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Figure 119.**  $^{13}\text{C}$  NMR (lower) and DEPT (upper, DEPT 90; middle, DEPT 135) spectra of hydrolysis products of **25** in  $\text{CDCl}_3$ .

**Scheme 4.** Putative (A) dehydration reaction of triol followed by generation of aldehyde and (B) elimination reaction of triol.



**Table 23.** NMR data for **24-26** in CD<sub>3</sub>OD.

#C	24		25		26	
	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)
1	67.5, CH <sub>2</sub>	4.03, m	67.4, CH <sub>2</sub>	4.03, m	61.2, CH <sub>2</sub>	3.58, m
2	37.6, CH <sub>2</sub>	1.47 <sup>c</sup> 1.69, m	37.5, CH <sub>2</sub>	1.42 <sup>h</sup> 1.70, m	40.9, CH <sub>2</sub>	1.33 <sup>m</sup> 1.56 <sup>p</sup>
3	30.8, CH	1.61 <sup>d</sup>	30.7, CH	1.61 <sup>i</sup>	30.7, CH	1.55 <sup>p</sup>
4	39.0, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>c</sup>	38.4, CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>g</sup>	38.6, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>m</sup>
5	25.5, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>c</sup>	25.4, CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>g</sup>	25.4, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>m</sup>
6	38.6, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>c</sup>	39.0, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>g</sup>	38.4 <sup>j</sup> , CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>m</sup>
7	34.0, CH	1.42 <sup>c</sup>	33.9, CH	1.42 <sup>h</sup>	33.9, CH	1.43 <sup>n</sup>
8	38.6, CH <sub>2</sub>	1.12 <sup>b</sup> 1.31 <sup>c</sup>	38.4, CH <sub>2</sub>	1.13 <sup>g</sup> 1.32 <sup>g</sup>	38.9 <sup>j</sup> , CH <sub>2</sub>	1.13 <sup>l</sup> 1.31 <sup>m</sup>
9	21.6, CH <sub>2</sub>	1.46 <sup>c</sup>	21.7, CH <sub>2</sub>	1.32 <sup>g</sup> 1.42 <sup>h</sup>	21.6, CH <sub>2</sub>	1.46 <sup>o</sup>
10	37.7 <sup>a</sup> , CH <sub>2</sub>	1.47 <sup>a,c</sup>	37.3 <sup>e</sup> , CH <sub>2</sub>	1.42 <sup>h</sup>	37.8, CH <sub>2</sub>	1.46 <sup>o</sup>
11	74.4, C		75.6, C		74.3, C	
12	37.8 <sup>a</sup> , CH <sub>2</sub>	1.46 <sup>a,c</sup>	37.4 <sup>e</sup> , CH <sub>2</sub>	1.42 <sup>h</sup> 1.33 <sup>g</sup>	37.8, CH <sub>2</sub>	1.46 <sup>o</sup>
13	22.0, CH <sub>2</sub>	1.36 <sup>c</sup>	22.1, CH <sub>2</sub>	1.40 <sup>h</sup> 1.18 <sup>g</sup>	21.9, CH <sub>2</sub>	1.37 <sup>n</sup>
14	40.8, CH <sub>2</sub>	1.17 <sup>b</sup>	40.9, CH <sub>2</sub>	1.31 <sup>g</sup> 1.55 <sup>i</sup>	40.8, CH <sub>2</sub>	1.18 <sup>l</sup> 1.55 <sup>p</sup>
15	29.1, CH	1.55 <sup>d</sup>	29.1, CH	1.55 <sup>i</sup>	29.1, CH	1.55 <sup>p</sup>
16	23.1, CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.4)	23.1, CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.9) <sup>f</sup>	23.1, CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.9)
17	19.8, CH <sub>3</sub>	0.92, d (6.4)	19.8, CH <sub>3</sub>	0.91, d (6.9)	20.0, CH <sub>3</sub>	0.88 <sup>k</sup>
18	20.0, CH <sub>3</sub>	0.87, d (6.4)	20.1, CH <sub>3</sub>	0.88, d <sup>f</sup>	20.1, CH <sub>3</sub>	0.88 <sup>k</sup>
19	73.5, CH <sub>2</sub>	3.85, s	68.2, CH <sub>2</sub>	3.37, s	73.5, CH <sub>2</sub>	3.85, s
20	23.1, CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.4)	23.1, CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.9) <sup>f</sup>	23.1, CH <sub>3</sub>	0.89, d (6.9)

Measured in CD<sub>3</sub>OD. <sup>a,e,j</sup>Chemical shifts are interchangeable. <sup>b-i,k-p</sup>Overlapped with each other.



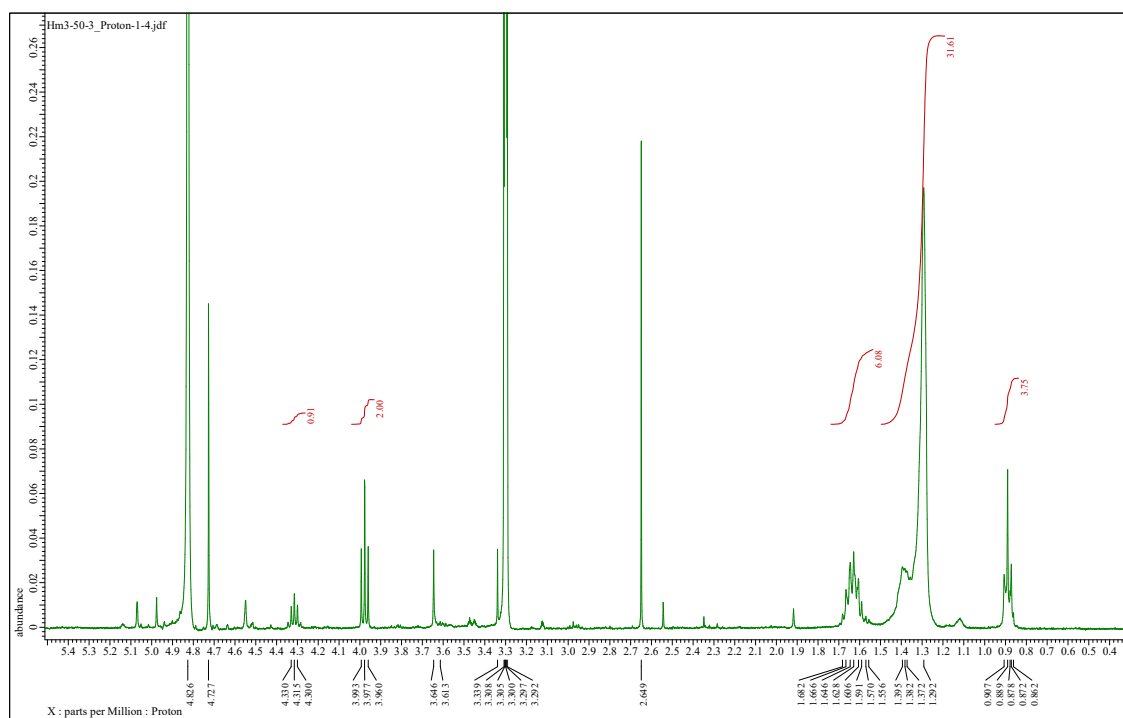


Figure 121.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 27.

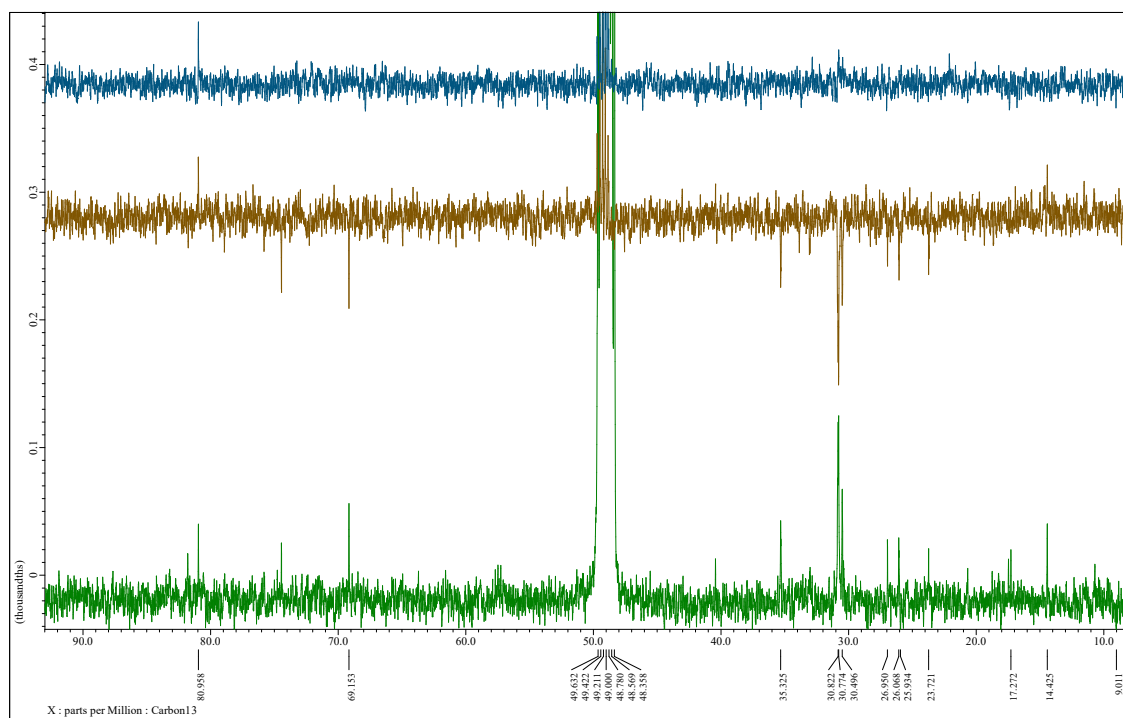


Figure 122.  $^{13}\text{C}$  NMR (lower), DEPT 135 (middle) and DEPT 90 (upper) spectra of 27.

化合物 **27** は無色油状物質として得られた。HRESIMS スペクトルにおいて  $m/z$  473.2250  $[M-H]^-$  のピークが観測されたこと、HRESIMS/MS スペクトルにおいて  $[M-SO_3]^-$  のピークが観測されたことから、**27** は **21** と同様に分子式  $C_{20}H_{42}O_8S_2$  であり、硫酸エステル基を有することが示唆された。 $^1H$  NMR (Figure 121),  $^{13}C$  NMR (Figure 122), DEPT (Figure 122), HSQC スペクトル解析により 1 個のオキシメチン ( $\delta_H/\delta_C$  4.32/81.0), 1 個のオキシメチレン ( $\delta_H/\delta_C$  3.98/69.2), 1 個の末端メチル基 ( $\delta_H/\delta_C$  0.89/14.4), 6 個のメチレン ( $\delta_H/\delta_C$  1.38/26.1, 1.38/26.1, 1.38/27.0, 1.63/35.3, 1.63/35.3, 1.65/30.5) およびシグナルがオーバーラップした多数のメチレン ( $\delta_H/\delta_C$  1.30/23.7-33.1) を帰属した。これらの NMR データおよび分子式より **27** は直鎖状の炭素骨格であり、1 級および 2 級水酸基をひとつずつ有することが示唆された。COSY および HMBC スペクトルより 3 つの部分構造が確認されたが (Figure 123), 2 級水酸基の位置を決定することはできなかつたため、次に MS/MS 解析による 2 級水酸基の帰属を試みた。**27** をネガティブモードの MS/MS 分析に供したところ、 $[M-H-SO_3]^-$  および  $[HSO_4]^-$  のフラグメントイオンが検出されるのみであり、構造解析に有用なフラグメントイオンは検出されなかつた。**27** を加水分解反応に付してジオールを調製し、さらにクロム酸酸化により 1 級、2 級水酸基をそれぞれカルボキシ基、ケトンへと変換することで MS/MS 分析において末端のカルボン酸をトリガーとした構造解析に有用なチャージリモートフラグメンテーションパターンの MS/MS スペクトルが得られると考えられる。しかしサンプル量の制限から 2 級水酸基の位置および立体化学を決定することはできなかつた。現在、**27** の構造決定に向けた化合物の増量を検討中である。

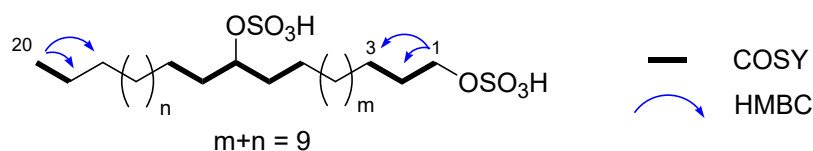
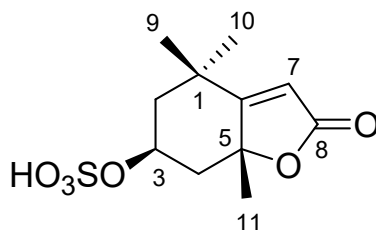


Figure 123. 2D NMR correlations for **27**.

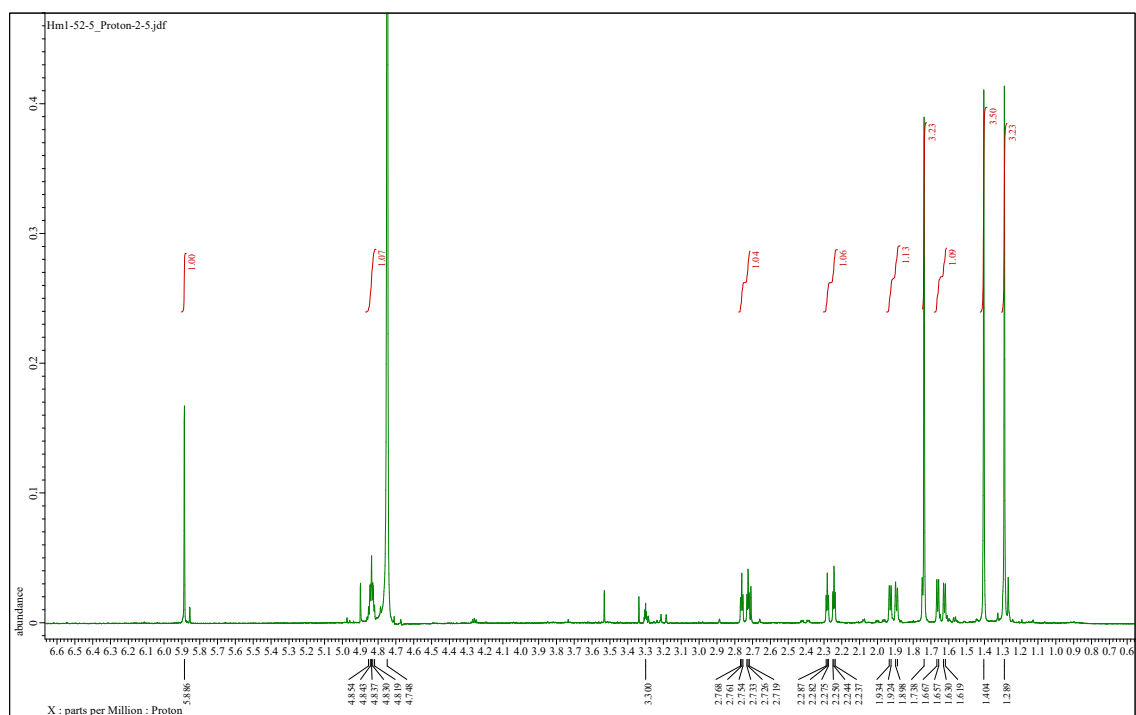
**2-3-4. (-)-Loliolide-3-sulfate (28, Figure 124) の構造決定**

(-)-Loliolide-3-sulfate (**28**) は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた.

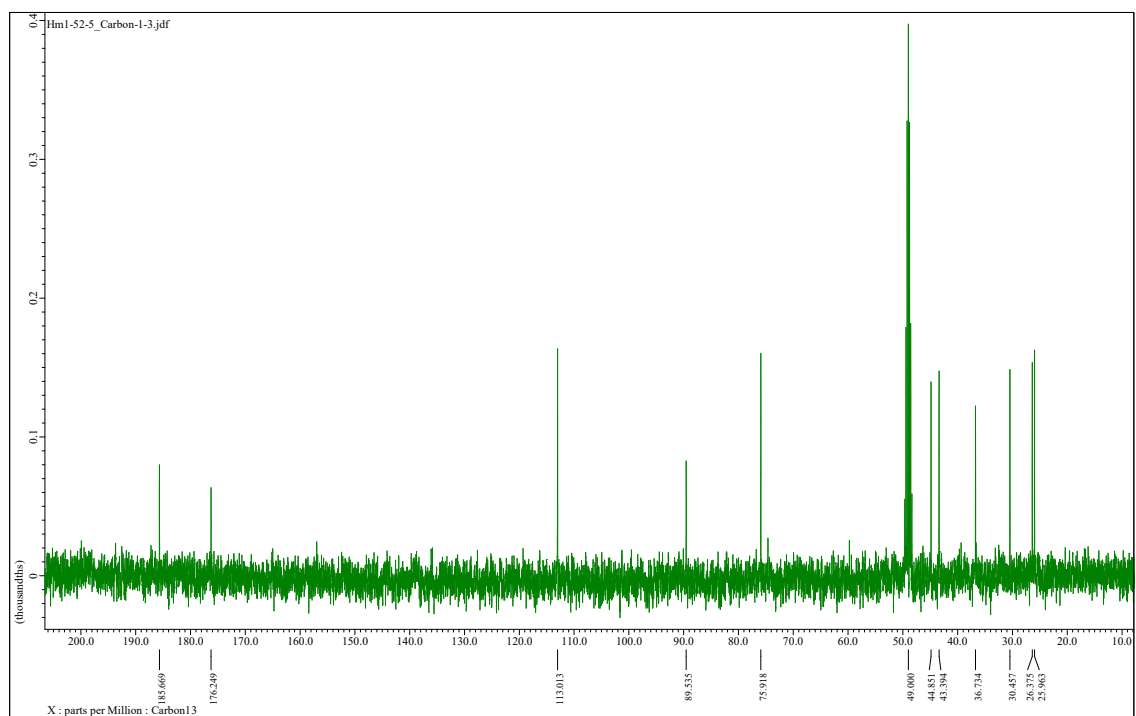
(-)-Loliolide-3-sulfate (**28**):  $[\alpha]^{20}_D$  -32 (*c* 0.011, H<sub>2</sub>O); UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 211 (4.04) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  3436, 2920, 2845, 1739, 1633, 1075, 474 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, D<sub>2</sub>O with a drop of CD<sub>3</sub>OD) shown in **Figure 125-126** and **Table 24**; HRESIMS: *m/z* 275.0596 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>S, *m/z* 275.0595); HRESIMS/MS: *m/z* 96.9589 [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>.



**Figure 124.** The structure of (-)-loliolide-3-sulfate (**28**).

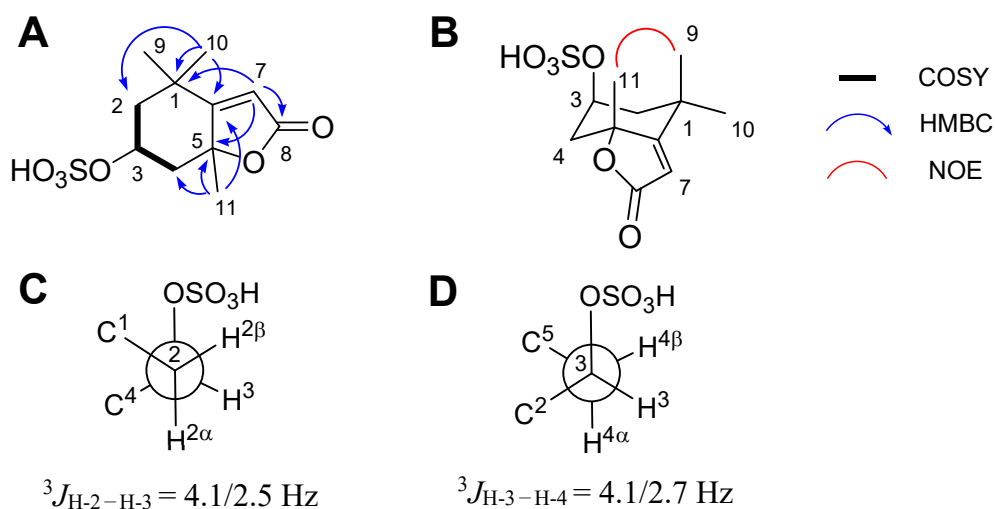


**Figure 125.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **28** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figure 126.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **28** in  $\text{D}_2\text{O}$  with a drop of  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

化合物 **28** は白色個体として得られた。<sup>13</sup>C NMR スペクトルにおいて 11 本のピークが観測されたこと (**Figure 126**), HRESIMS 分析の結果, 分子式が C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>S と推定されたことから分子式を決定した。また, HRESI-MS/MS スペクトルにおいて HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> のフラグメントイオンが見られたことから硫酸エステルの存在が示唆された。<sup>1</sup>H NMR (**Figure 125**), HSQC スペクトルでは 1 個の sp<sup>2</sup> メチン (δ<sub>H</sub> 5.89), 1 個のオキシメチン (δ<sub>H</sub> 4.84), 2 個のメチレン (δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 1.64/2.26, 1.91/2.74), 3 個のメチル基 (δ<sub>H</sub> 1.29, 1.40, 1.74) を観測した。また <sup>13</sup>C NMR および HSQC スペクトルにおいて 3 個の sp<sup>2</sup> 炭素 (δ<sub>C</sub> 113.0, 176.2, 185.7), 8 個の sp<sup>3</sup> 炭素 (δ<sub>C</sub> 26.0, 26.4, 30.5, 36.7, 43.4, 44.9, 75.9, 89.5) を観測した (**Figure 126, Table 24**)。COSY スペクトルから -CH<sub>2</sub>-2-CH(X)-3-CH<sub>2</sub>-4- のスピンスystem を帰属した。HMBC スペクトルにおいてメチルシグレット (H<sub>3</sub>-9, H<sub>3</sub>-10) から C-1, C-2, C-6 への相関が, もう一つのメチルシグレット (H<sub>3</sub>-11) から C-4, C-5, C-6 への相関が観測されたことから, 1 位に二つのメチル基 (CH<sub>3</sub>-9, CH<sub>3</sub>-10), 5 位に一つのメチル基 (CH<sub>3</sub>-11), そして 6 位に 4 級 sp<sup>2</sup> 炭素 (C-6, δ<sub>C</sub> 185.7) を帰属し, 3 個のメチル基および C-1-C-6 の六員環構造を帰属した (**Figure 127, A**)。オレフィンシグレット (H-7) から C-1, C-5 への相関が見られたことから C-6-C-7 にオレフィンを帰属した。また, HMBC スペクトルにおいてオレフィンシグレット (H-7) からカルボニル炭素 (C-8, δ<sub>C</sub> 176.2) への相関が見られたこと, C-5 のケミカルシフト (δ<sub>C</sub> 89.5), 不飽和度が 4 であることから 8 位にカルボニル炭素を帰属し, C-5-C-6-C-7-C-8-O-C-5 のラク톤を帰属した (**Figure 127, A**)。最後に, 3 位 (δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 4.84/75.9) に硫酸エステルを帰属し, **28** の平面構造を決定した。差 NOE スペクトルにおいて δ<sub>H</sub> 1.74 (H<sub>3</sub>-11) の照射による δ<sub>H</sub> 1.40 (H<sub>3</sub>-9) のシグナルの増強が見られたことからこれらのメチル基はアキシアルに配置していることを確認した (**Figure 127, B**)。さらに *J*カップリング解析において <sup>3</sup>J<sub>H-2-H-3</sub> (4.1/2.5 Hz), <sup>3</sup>J<sub>H-3-H-4</sub> (4.1/2.7 Hz) の値が確認されたことから 3 位のプロトンはエクアトリアルに, 硫酸基はアキシアルに配置しており, C-1-C-6 六員環はイス型配座であることが示唆された (**Figure 127, C-D**)。



**Figure 127.** (A) Key 2D NMR and (B) 1D NOE correlations for **28**. (C) Newman projections for (C) C2/C3 and (D) C3/C4.

**Table 24.** NMR data for **28** in D<sub>2</sub>O.

#C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. ( $J$ in Hz)	COSY	HMBC	NOE
1	36.7, C				
2	44.9, CH <sub>2</sub>	a: 1.64, dd (15.1, 4.1) b: 2.26, dt (15.1, 2.5)	2b, 3 2a, 4b(w)	1(w), 4, 6, 10(w)	2b <sup>a</sup> 2a <sup>a</sup>
3	75.9, CH	4.84, m	2a, 2b, 4a, 4b		2a, 2b, 4a, 4b <sup>a</sup>
4	43.4, CH <sub>2</sub>	a: 1.91, dd (14.2, 4.1) b: 2.74, dt (14.2, 2.7)	3, 4b 2b(w), 4a	5, 11 2(w), 3, 5, 6	4b <sup>a</sup> 4a <sup>a</sup>
5	89.5, C				
6	185.7, C				
7	113.0, CH	5.89, s		1(w), 5, 6(w), 8	10 <sup>a</sup>
8	176.2, C				
9 <sup>a</sup>	26.0, CH <sub>3</sub>	1.40, s		1, 2, 6, 10	11 <sup>b</sup>
10 <sup>a</sup>	30.5, CH <sub>3</sub>	1.29, s		1, 2, 6, 9	7 <sup>a</sup>
11	26.4, CH <sub>3</sub>	1.74, s		4, 5, 6	9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Detected in the 2D NOESY spectrum. <sup>b</sup> $\delta_H$  1.40 (CH<sub>3</sub>-9) was enhanced by irradiation at  $\delta_H$  1.74 (CH<sub>3</sub>-11) in the 1D difference NOE spectrum. w = weak signals.

次に絶対立体化学の決定を行った。28 の 3 位の硫酸基に代わって水酸基が置換した化合物 loliolide がアメフラシ、褐藻および陸上植物から単離が報告されており,<sup>112-115</sup> その構造から loliolide はカロテノイドの代謝物であると考えられている。Loliolide は 2 個の不斉中心を持ち、(±)-loliolide, (±)-isololiolide の 4 種類の立体異性体が存在する (Figure 129)。28 を酸性条件下での加水分解に付してアルコール体 (28a) を調製し、<sup>1</sup>H NMR データおよび比旋光度、CD スペクトルを loliolide, isololiolide の文献値と比較することで立体構造の決定を試みた。

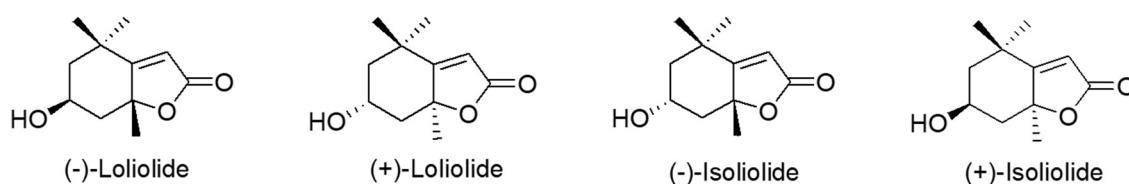


Figure 128. Enantiomers of loliolides and isololiolides.

加水分解物 28a は以下に示す物理学・分光学的性質を与えた。

(-)-Loliolide (28a):  $[\alpha]_D^{20} = -199$  (*c*: 0.001, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) shown in Table 25; HRESIMS: *m/z* 197.1164 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>, *m/z* 197.1172).

28a の <sup>1</sup>H NMR データおよび比旋光度の符号が (-)-loliolide と良い一致を示した (Table 25,  $[\alpha]_D^{15} = -97.2^{116}$ ). したがって 28 の構造を (-)-loliolide-3-sulfate と決定した。

**Table 25.** <sup>1</sup>H NMR data for **28a**, loliolide and isololiolide.

#C	<b>28a<sup>a</sup></b>	Loliolide <sup>c</sup>	Isololiolide <sup>c</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( <i>J</i> in Hz)
2	1.53 <sup>b</sup>	1.53, dd (14.7, 3.7)	1.33, dd (12.1, 12.1)
	1.97, dt (14.6, 2.7)	1.97, ddd (14.5, 3.0, 2.3)	2.03, ddd (12.9, 4.4, 2.2)
3	4.33, quin (3.4)	4.33, quin (3.4)	4.13, tt (11.6, 4.5)
4	1.79, dd (12.8, 3.7)	1.78, dd (13.5, 3.7)	1.51, dd (11.7, 11.5)
	2.46, dt (12.8, 2.7)	2.46, ddd (14.0, 3.2, 2.3)	2.53, ddd (11.5, 4.0, 2.2)
7	5.70, s	5.69, s	5.71, s
9	1.47, s	1.47, s	1.26, s
10	1.27, s	1.27, s	1.31, s
11	1.78, s	1.78, s	1.58, s

<sup>a</sup>Measured in CDCl<sub>3</sub> at 400 MHz.Kimura *et al.* *J. Nat. Prod.* **2002**.<sup>113</sup><sup>b</sup>Overlapped with HDO.<sup>c</sup>Measured in CDCl<sub>3</sub> at 500 MHz.

## 2-4. ヨーロッパザラボヤにおける脂肪族硫酸エステル化合物の挙動

### 2-4-1. ヨーロッパザラボヤに含まれる化合物 **21-28** の分布

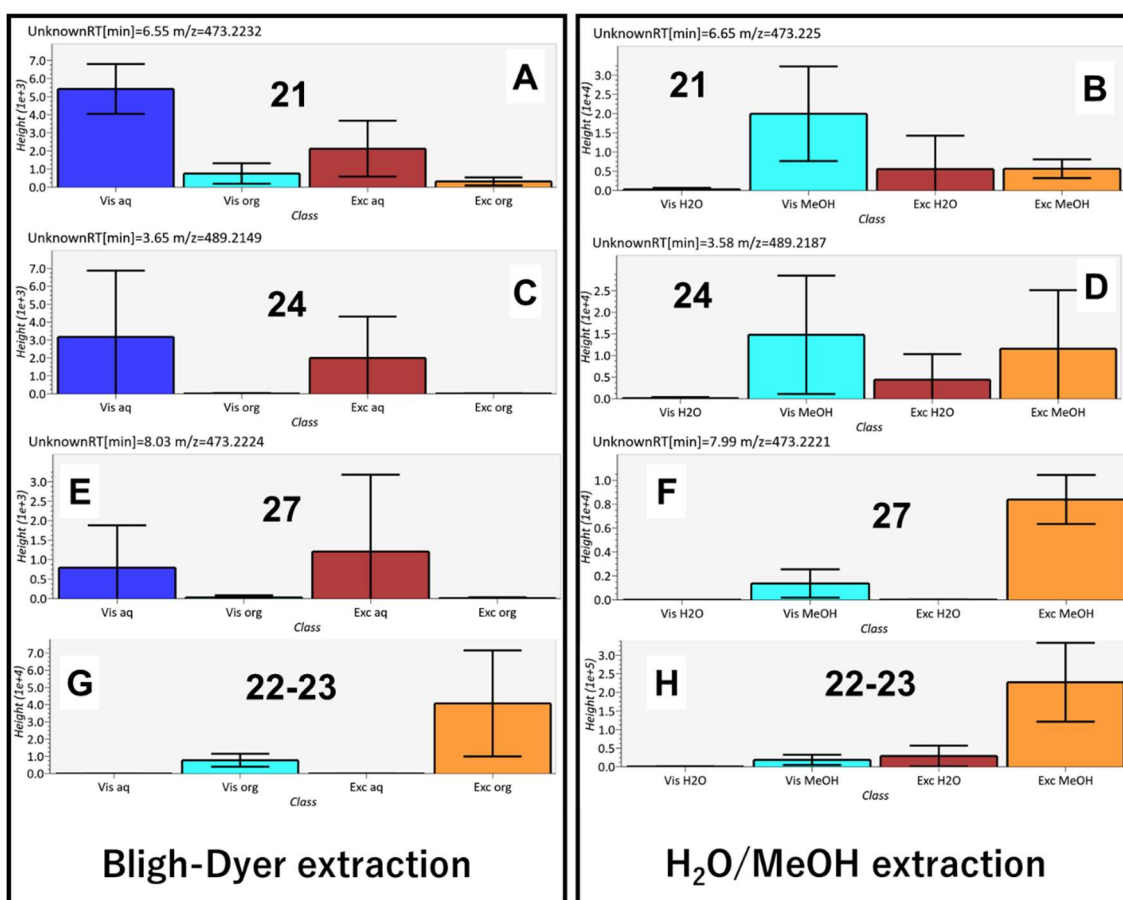
ホヤ組織別抽出物の LCMS 解析の結果から、内臓およびフンに硫酸エステル化合物が特異的かつ多く含まれることを見出した。LC-MS データを用いて定量分析を行ったところ、内臓には硫酸ジエステル **21** が多く含まれる一方で、モノエステル **22, 23** はフンに多く含まれていた (Table 26)。

**Table 26.** Calculated amounts of alkyl sulfates **21-24, 28** and EPA in *A. aspersa*.

Calculated amount ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry sample)		
Compound\Sample	Viscera	Excrement
<b>21</b>	5.6	2.3
<b>22, 23</b>	0.46	1.4
<b>24</b>	1.06	0.75
<b>28</b>	0.082	N. D.
EPA	0.36	0.06

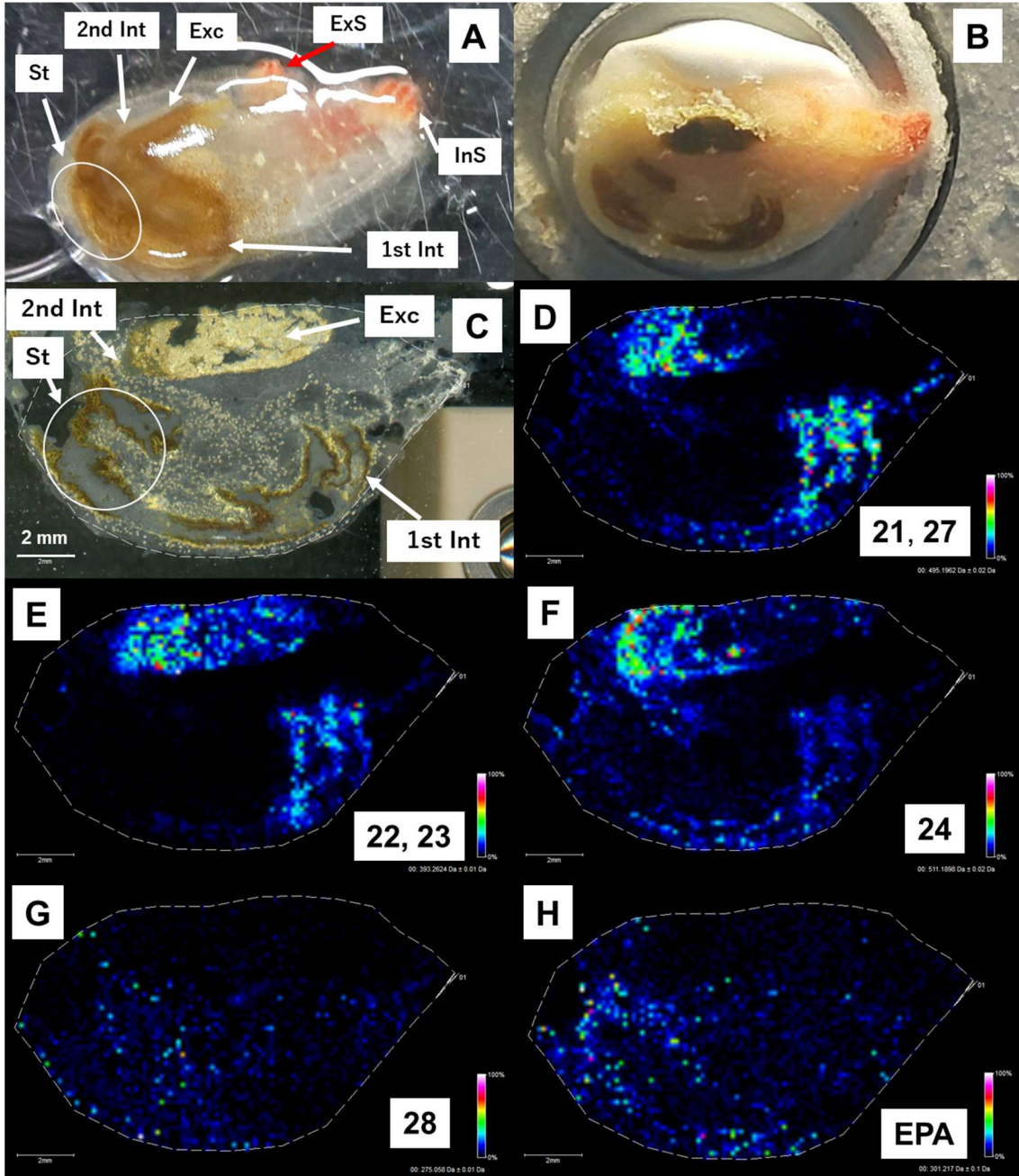
N.D. Not detected.

興味深いことにホヤ内臓を改良 Bligh-Dyer 法で抽出した際は硫酸ジエステル **21, 24, 27** は水溶性画分に分配されたが (Figure 130, A, C, E), 内臓を水で抽出した場合、抽出物に硫酸ジエステルは検出されず、抽出残渣のメタノール抽出物中に検出された (Figure 130, B, D, F)。これらのデータからヨーロッパザラボヤ内臓には硫酸ジエステル化合物を保持するメカニズムが備わっている可能性が考えられ、硫酸ジエステルとホヤの生理との関連性が窺われる。次にヨーロッパザラボヤ内臓における硫酸エステル化合物のより詳細な分布を調べるためホヤにおける硫酸エステル化合物のマスイメージング解析を行った。

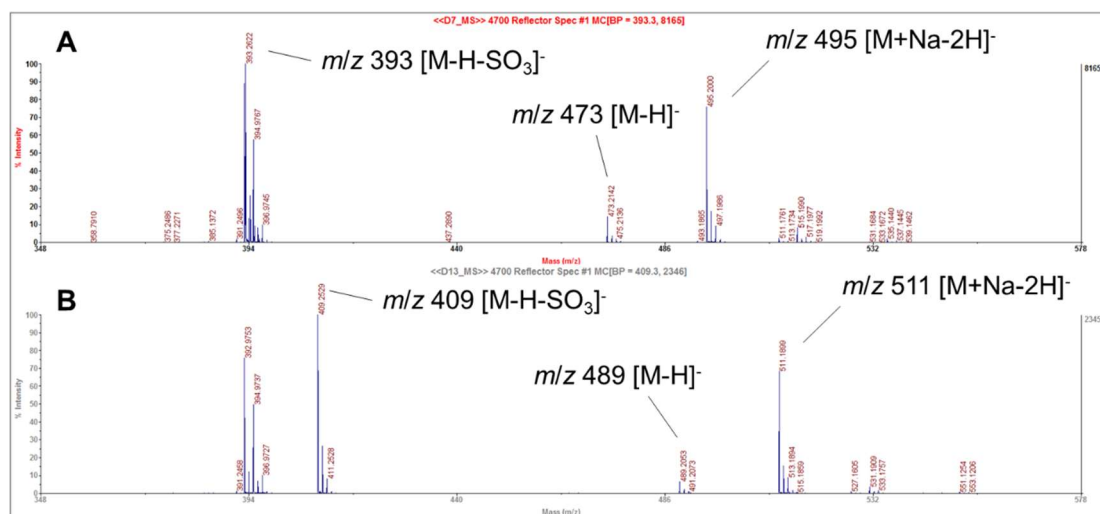


**Figure 129.** LC-MS data for disulfates (A-B) **21**, (C-D) **24**, (E-F) **27**, and mono sulfates (G-H) **22-23**. Left column (A, C, E, G) and right column (B, D, F, H) show results of Bligh-Dyer extraction and H<sub>2</sub>O/MeOH extraction, respectively. Left column: Blue and light blue bars show aqueous and organic extracts of viscera. Brown and orange bars show aqueous and organic extracts of excrement. Right column: Blue and light blue bars show water and methanol extracts of viscera. Brown and orange bars show aqueous and organic extracts of excrement.

マスイメージング解析の結果、内臓のうち腸管の表面に硫酸ジエステル **21**, **24**, **27** およびモノエステル体 **22**, **23** 由来のイオンが腸管表面に、フンにモノエステル体 **22**, **23** 由来のイオンが観測された (**Figure 131, D-F**). 一方で **28** 由来のイオンは内臓全体に分布していた (**Figure 131, G**). また EPA 由来のイオンは胃に多く検出され、内臓全体にも少量検出された (**Figure 131, H**). マスイメージング解析において硫酸ジエステル **21**, **24**, **27** がフンに検出されなかった点は LCMS 解析の結果と矛盾した (**Figure 94, D, Table 26**). これはフンを採集する際、ホヤから排出されたフンではなく、ホヤを解剖して腸管からフンを掻きとって採集したため、腸管表面に存在する **21**, **27** が一部コンタミネーションしてしまった結果であり、実際にはフンに含まれる **21**, **27** の量は内臓よりも少ないと考えている. また、マスイメージングにおいてモノエステル体がフンのみならず腸管にも同程度の強度で検出されたことも LCMS 解析の結果とは異なる. これはマスイメージングで腸管に見られたモノエステル体のイオンがジエステル体 **21** のフラグメントイオンとして検出されたのではないかと考えた. そこで硫酸ジエステル **21**, **24** の MALDI-TOFMS スペクトルを測定したところ、予想通りジエステル体では親イオンと同程度の強度でモノエステル体のイオンがフラグメントイオンとして観測されたため (**Figure 132**), マスイメージング解析において腸管に見られたモノエステル体のイオンの大部分はジエステル体のフラグメンテーションによるものと考えられる.



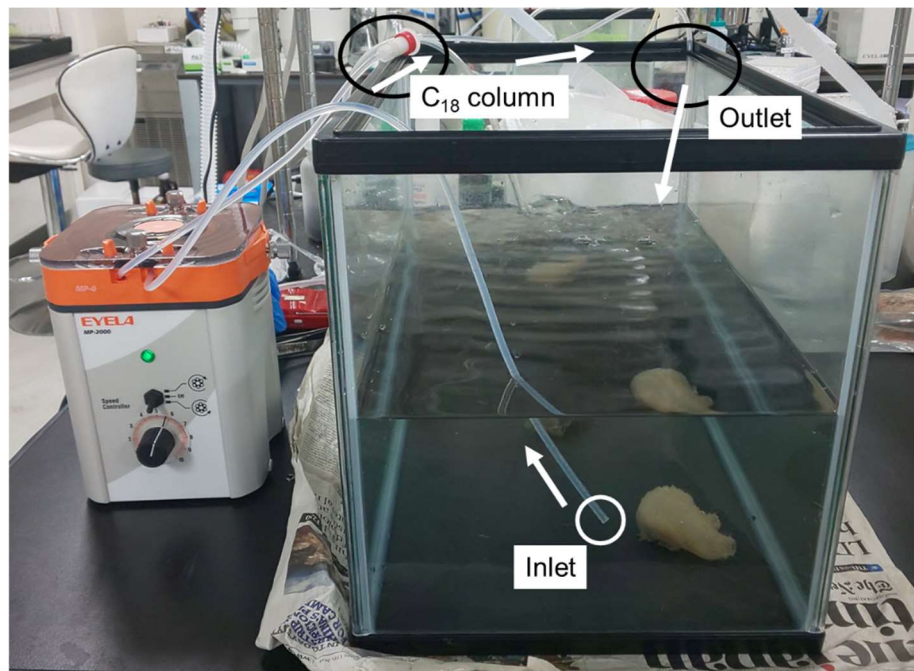
**Figure 130.** MS imaging analysis for (D) **21** and **27**, (E) **22** and **23**, (F) **24**, (G) **28** and (H) EPA. (A) *A. aspersa* before being frozen. (B) The section for MS imaging analysis. (C) Optical image of the consecutive section. InS, internal siphon. ExS, External siphon. St, stomach. 1st Int, 1st internal loop. 2nd Int, 2nd internal loop. Exc, excrement.



**Figure 131.** MALDI-TOF-MS spectra of (A) **21** and (B) **24**.

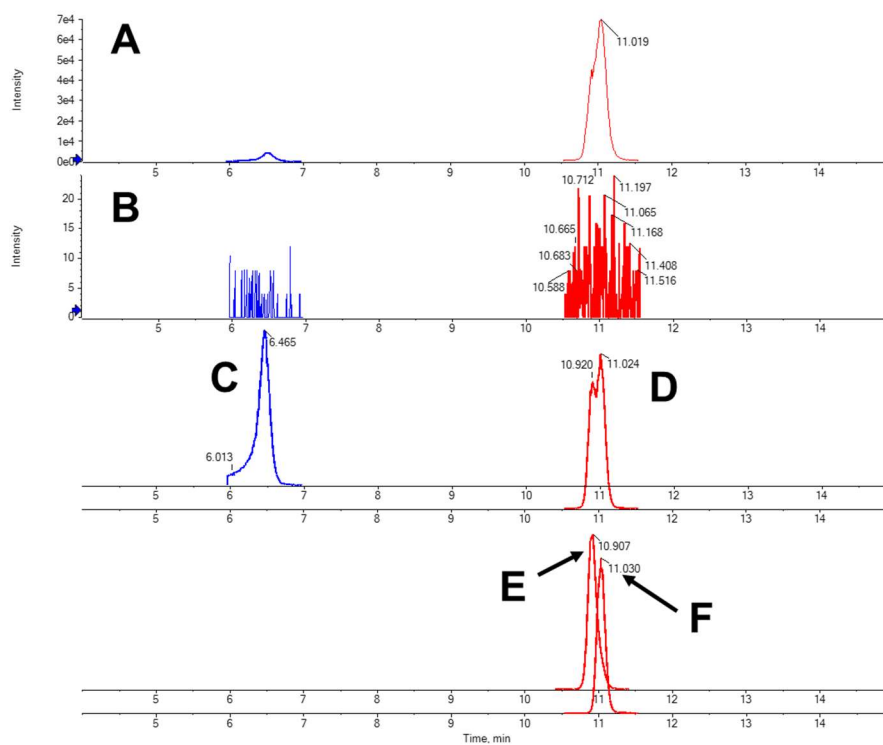
#### 2-4-2. ヨーロッパザラボヤ飼育水の分析

MS イメージング解析の結果から、今回ヨーロッパザラボヤより見出した硫酸エステル化合物のうち硫酸ジエステル体 **21**, **24** は消化管の壁面に、硫酸モノエステル体 **22**, **23** はフンにおいて局在が確認された。これらの化合物はフンなどの排出物とともに海水中へ放出されている可能性が考えられる。そこでホヤを水槽内で飼育し、その飼育水中にこれらの化合物が含まれるかを調べた。ホヤの飼育水をペリスタポンプを用いて循環させ、逆相 C<sub>18</sub> カラムカートリッジに飼育水中の脂溶性成分を吸着させた (**Figure 133**)。カラムをイオン交換水にて脱塩後、メタノールで脂溶性成分を溶出し LC-MS 分析に供した。対照実験として海水にホヤを入れずに同様の実験を行った。また、この実験は別個体のホヤを2匹ずつ用いて3回行った。



**Figure 132.** Seawater circulation and adsorption of hydrophobic compounds. White arrow indicates water flow.

LC-MS 分析の結果, 3 回すべての飼育実験において飼育海水中にモノエステル体 (22-23) が検出された (Figure 134).



**Figure 133.** Extracted ion chromatograms (EICs) for **21** ( $m/z$  473), **22**, and **23** ( $m/z$  393) detected from the breeding sea water (BSW). (A) EICs for **21**, **22** and **23** in breeding sea water. (B) EICs for **21**, **22** and **23** in control sea water. EICs for (C) **21**, (D) co-injected **22** and **23**, (E) pure **22** and (F) **23**.

この結果から、ジエステル体 **21** はホヤ体内においてほとんど消化管壁面に保持されている一方で、モノエステル体 **22** および **23** はフンとともに海水中へ放出されていることが示唆された。この結果からもマスイメージング解析の結果と同様にフンに含まれる硫酸ジエステル **21**, **24**, **27** は内臓に比べて非常に少ないものと考えられる。海水中におけるジエステル **21** およびモノエステル **22**, **23** の化合物の定量したところ、12 L の海水中でホヤ 1 匹当たりそれぞれ 0.16  $\mu\text{g}$ , 0.76  $\mu\text{g}$  の濃度で検出された (Table 27)。

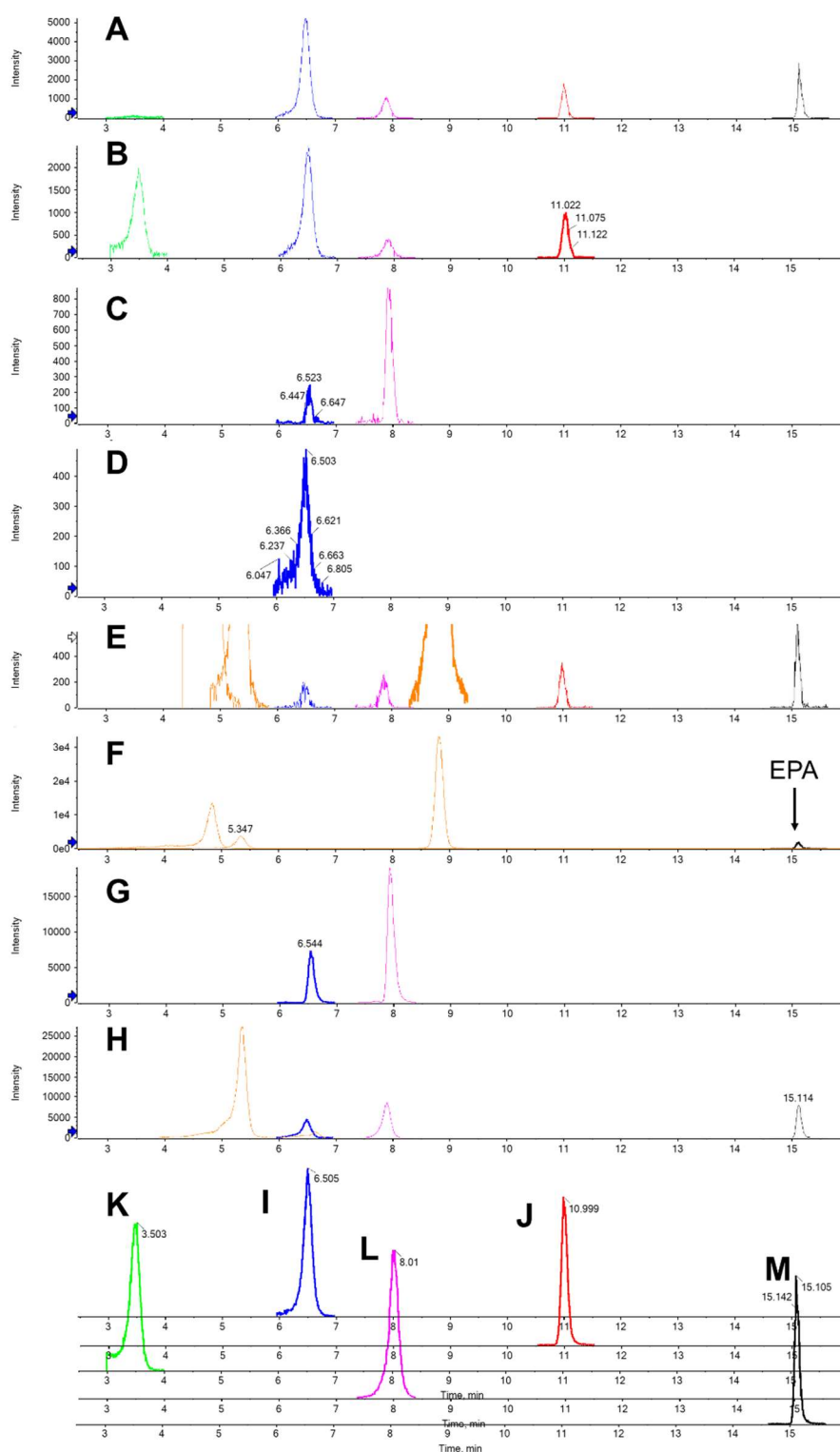
**Table 27.** Calculated amounts of **21-23**.

Compound	Content in samples ( $\mu\text{g}/\text{tunicate}$ )		
	Sea water	Viscera	Excrement
<b>21</b>	0.16	2800	36
<b>22-23</b>	0.76	230	23

### 2-4-3. ヨーロッパザラボヤ幼生・幼若体・体液およびその他のホヤ類に含まれる長鎖アルキル硫酸の分析

ヨーロッパザラボヤ組織別抽出物の LCMS 解析, MS イメージング解析の結果から長鎖アルキル硫酸のうちジエステル体 (**21**, **27**) とモノエステル体 (**22**, **23**) ではホヤ体内において異なる局在性を示し, ホヤの生理機能と何らかの関与がある可能性が示唆された. 次に, ホヤのライフステージにおいてどの時期から長鎖アルキル硫酸が蓄積されるかを調べるためヨーロッパザラボヤ幼生・幼若体抽出物の LCMS 解析を行った. 受精後 14 時間の幼生および受精後 14 日目の幼若体をメタノールで抽出し, LC-MS 分析に供したところ幼生においては **21** が, 幼若体においては **21** および **27** のピークが検出された(**Figure 135, C-D**). 興味深いことに成体では **21** が多量に含まれる一方で **27** が微量にのみ含まれるのに対し, 幼若体においてはそのピーク強度が逆転していた (**Figure 135, A, C**). 次にヨーロッパザラボヤ以外のホヤ類に長鎖アルキル硫酸が含まれるかを調べた. ヨーロッパザラボヤと同じサンプリング地点で採集した三種類のホヤ, ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*), アカボヤ (*Halocynthia aurantium*), エボヤ (*Styela clava*), 松前沖の渡島小島にて採集したシロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*), およびモデル生物であるカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) を対象として分析を行った. カタユウレイボヤについては幼若体も分析することができた. 各ホヤ抽出物の LC-MS 分析の結果, ヨーロッパザラボヤと同目であるマメボヤ目 (Phlebobranchia) に属するユウレイボヤ, カタユウレイボヤ成体, 幼若体に **21**, **27** が検出された (**Figure 135, E, G**). しかしながらマボヤ目 (Stolidobranchia) に属するアカボヤ, エボヤ, シロボヤモドキにおいては **21-27** はいずれも検出されなかった, もしくはトレースレベルで検出されるのみであった. これらの結果から, ホヤ類における長鎖アルキル硫酸はマメボヤ目およびマンジュウボヤ目のホヤに特異的に含まれる可能性が示唆された. カタユウレイボヤおよびユウレイボヤにおける **21**, **27** の含有量はヨーロッパザラボヤに比べて少なかったが, 未知の硫酸アルキル (**29**, **30**, **31**) が多量に検出された (**Figure 135, F**). 推定分子式

(**29**, C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>; **30**, C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>S, **31**, C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) から **30** は **29** の硫酸エステルがひとつ加水分解を受けた化合物であると推測される. MS/MS スペクトル解析から **29** は (i) ジテルペン骨格を持たないこと, (ii) 末端に硫酸エステルを持つこと, (iii) 13 位に水酸基を持つことが示唆された. 化合物 **31** については MS/MS データから構造情報は得られなかった. 現在, 詳細な構造解析のためこれらの化合物の分離・精製を進めている. マメボヤ目, マンジュウボヤ目のホヤに特徴的な生命現象としては血球細胞におけるバナジウム濃縮が挙げられる. そこでヨーロッパザラボヤ血液を血漿画分と血球画分に分離して抽出し, それぞれ LC-MS 分析に供した. その結果, 血球のメタノール抽出物において硫酸ジエステル **21**, **24**, **27** およびモノエステル **22**, **23** が検出された (**Figure 135, B**).



**Figure 134.** EICs (negative mode) for alkyl sulfates detected in (A) viscera, (B) blood cells, (C) juvenile and (D) larvae of *A. aspersa* and (F) viscera, (H) juvenile of *C. intestinalis* and (I) whole body of *C. savignyi*. (E) Expansion EIC-(F). EICs of purified (I) **21**, (J) **22**, (K) **24**, (L) **27** and (M) authentic EPA. Orange colored chromatograms show unknown alkyl sulfates.

## 2-5. 生理活性試験

ここまでの実験結果から、特異的な挙動を示した化合物はホヤの生理・生態と関わっている可能性が示唆された。化合物 **21** についてはこれまでに血球溶血活性、ブラインシュリンプに対する弱い毒性<sup>93</sup>、弱い細胞毒性<sup>101</sup>を示すことが報告されている。そこで今回得られた新規類縁体の溶血活性および細胞毒性について調べるとともに、フェロモン様活性を調べるため *A. aspersa* 幼生に対する作用について調べた。すべてのアッセイ系において比較対象として代表的な陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた。

### 2-5-1. 血球溶血活性試験

今回得られた化合物について、ウサギ血球に対する血球溶血試験を行った。化合物 **28** を除き、硫酸アルカン類はすべて溶血活性を示した (**Table 28**)。興味深いことに、**21** の 11 位に水酸基が付加した **24** では **21** に比べて溶血活性が大きく低下した。

**Table 28.** Hemolytic activity of compounds **21-26** and SDS.

Compound	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	SDS
EC <sub>50</sub> (μM)	88	73	35	>610	120	110	128

### 2-5-2. 細胞毒性試験

次に HeLa 細胞に対する細胞毒性試験を行った。化合物 **23** および SDS が細胞生存率を 60%程度に抑えたものの、いずれの化合物も終濃度 200 μM の高濃度においても顕著な細胞毒性は示さなかった。

### 2-5-3. *A. aspersa* 幼生変態促進試験

硫酸モノエステル **21-23** は海水中へ放出されていることが確認されたため、これらの化合物の *A. aspersa* 幼生の変態を促進するフェロモン様活性を検討した。

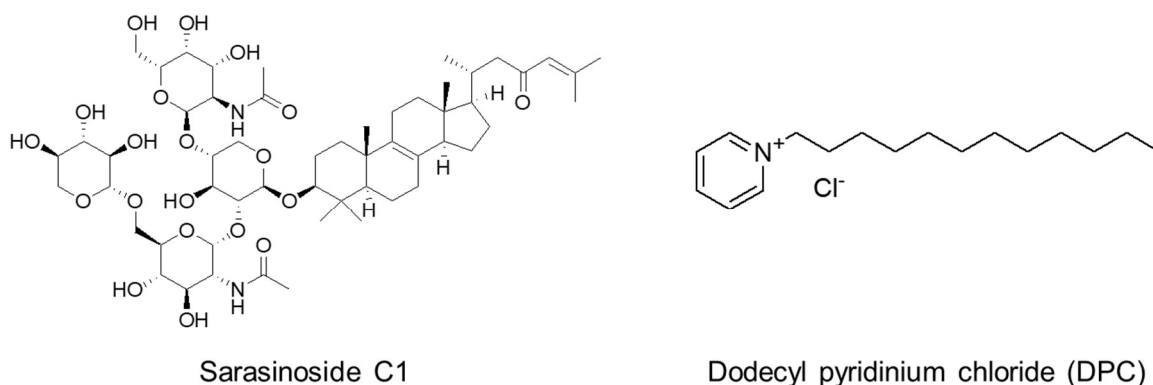
100  $\mu\text{M}$  の **21** および SDS で幼生を処理したところ、3 時間後にはコントロール (MeOH 処理) 群で 13%程度が尾部吸収を開始したのに対し、化合物 **21** 処理群では 80%, SDS 処理群では 100%の幼生が尾部吸収を開始した (Figure 136, A, D). 7 時間後、33 時間後では化合物 **21** 処理群では尾部吸収が完了している個体が見られたのに対し (Figure 136, B), SDS 処理群では尾部吸収が停止している幼生が観察された (Figure 136, E). 33 時間後のコントロール群では変態が始まっていない個体から尾部吸収が完了している個体まで観察された (Figure 136, G, H). コントロール群において尾部吸収が完了した個体では内臓の形成が進みホヤ全体が楕円形になっているのに対し (Figure 136, H), 化合物 **21** 処理群において尾部吸収が完了した個体では内臓の形成は確認できず、丸い形態をとっており、発生が進んでいない様子が見られた (Figure 136, C). この結果から、SDS および化合物 **21** は 100  $\mu\text{M}$  の濃度では変態促進活性ではなく、幼生に対し毒性を示していると考えられた。また、20  $\mu\text{M}$  の化合物 **21** で処理した幼生の変態への影響を調べたところ、毒性は見られなかったものの、顕著な変態促進活性は見られなかった。



**Figure 135.** Larval phenotypes induced by (A-C) **20**, (D-F) SDS and (G-H) methanol as negative control.

21 以外の化合物についても同様に幼生の変態に対する影響を調べたところ、22-26 処理群では化合物 21 および SDS と同様に発生が進んでいない様子が観察された。化合物 24 のみ尾部吸収が進まずに幼生が死んでしまう活性が見られた。血球溶血試験においても化合物 24 のみ活性が弱かったため、幼生に対する活性もほかの硫酸テルペン類よりも弱く、幼生の表現型に違いが見られたものと考えられる。また、28 には幼生に対する活性は見られなかった。

次に、21-27 や SDS とは異なる界面活性剤についても同様に幼生に対する活性を調べた。カチオン性の界面活性化合物としてドデシルピリジニウムクロリド (DPC, Figure 137)、非イオン性の界面活性化合物として強力な細胞毒性および溶血活性を持つ海綿由来のサポニン sarasinocide C1<sup>117</sup> (Figure 137) を含むサポニン混合物を用いた。DPC 処理群では硫酸アルキル化合物よりも活性発現に時間がかかったものの、「尾部吸収を促進するがその後の発生を抑制する」といった化合物 21 と同様の活性を示した。サポニン混合物処理群では終濃度 1 µg/mL の低濃度においても 100 µM (48 µg/mL) の化合物 21 と同程度の活性を示した。以上の結果から、界面活性を有する化合物はヨーロッパザラボヤ幼生の変態の初期イベントである尾部吸収を促進する活性を示すと考えられる。したがって硫酸アルカン類 21-26 の幼生に対する活性は構造特異的なものとは考えられない。また界面活性化合物で処理した幼生は尾部吸収に伴う臓器形成が進まず発生が止まること、この活性は溶血活性の強さと相関が見られることから界面活性化合物は幼生の変態に影響を与えているのではなく幼生に対し毒性を示しているものと考えられる。



**Figure 136.** The structures of sarasinoside C1 and dodecyl pyridinium chloride.

### 3. 考察

ヨーロッパザラボヤ組織別抽出物の LC-MS 分析およびマスイメージング解析の結果、今回ヨーロッパザラボヤより見出した長鎖アルキル硫酸ジエステル化合物 **21**, **24**, **27**, 硫酸モノエステル化合物 **22-23** が内臓、フンおよび血球細胞に含まれていることを見出した。さらにジエステル化合物は内臓に、モノエステル化合物はフンに多く含まれており、フンとともに海水中に放出されていることを明らかにした。これらの硫酸エステル化合物が消化器官に含まれることから、ホヤにとって不要な代謝物が硫酸抱合化を受け、フンとともに排出されている可能性が考えられる。しかし、モノエステル **22-23** が海水中へ排出されている一方で、より高極性なジエステル **21**, **24**, **27** は腸管に保持されていること、また血球細胞に含まれることから少なくともジエステルはホヤの生理・生態に関与していると考えられる。これらの化合物には顕著な細胞毒性や血球溶血作用が見られなかったため、ホヤの外敵に対する防御物質としての機能を有するとは考えにくい。

ヨーロッパザラボヤの内臓を Bligh-Dyer 改良法で抽出すると硫酸ジエステル **21**, **27** は水溶性画分に分配された。すなわちこれらの化合物は比較的高極性な化合物であると考えられる。一方で内臓を水で抽出した際の抽出物に **21**, **27** は含まれておらず、残渣のメタノール

抽出物に含まれていた。これらの観察結果からヨーロッパザラボヤの腸管表面には硫酸ジエステル **21**, **27** を保持するシステム, 例えば結合タンパク質が存在すると推察される。

世代別にヨーロッパザラボヤの抽出物を分析すると, 卵抽出物には **21** が検出されなかったにも関わらず, 幼生抽出物からは検出された。一般に幼生期のホヤは餌をとらず, 変態し消化管などの臓器が形成されたのち餌をとり始める。<sup>2</sup> したがって **21** はホヤ自身が生合成している可能性が高く, ホヤの生理・生態に関与していると考えられる。**21-24** の生合成経路は不明であるが, ホヤが生合成していると仮定した場合, いずれの化合物もジテルペン構造を有するためメバロン酸経路で産生されると考えられる。メバロン酸経路由来ゲラニルゲラニオール の C-11, C-19 の水酸化, 二重結合の還元, 水酸基の硫酸エステル化により生成すると推察されるが詳細は不明である。数種のホヤから炭素数 19 のノルジテルペン骨格を持つ硫酸アルキルが炭素数 20 の硫酸アルキルと同時に単離されており,<sup>100,102</sup> どのようにノルジテルペン骨格が生成されるのか興味を持たれる。

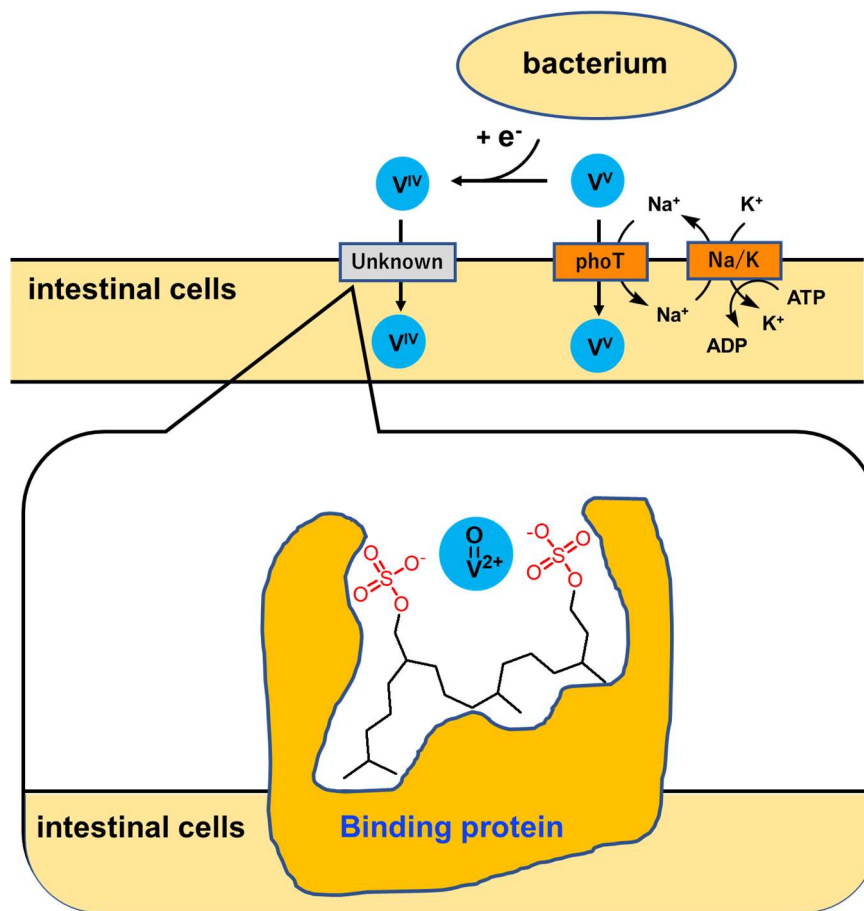
ヨーロッパザラボヤ以外のホヤではマメボヤ目のユウレイボヤ, カタユウレイボヤの抽出物に **21**, **27** が検出されたが, マボヤ目のアカボヤ, エボヤ, シロボヤモドキの抽出物には検出されなかった。硫酸アルキル化合物は複数のホヤから報告されており, **21** を含む長鎖ビス硫酸アルキル化合物 (C<sub>19</sub>-C<sub>21</sub>) がマメボヤ目に属する *Ascidia mentula*,<sup>101</sup> *Ciona edwardsi*<sup>100</sup>, マンジュウボヤ目の *Sidnyum turbinatum*,<sup>102</sup> *Aplidium elegans*<sup>100</sup> から単離されている。他方, 短鎖モノ硫酸アルキルおよびアルケン (C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub>) がマボヤ目に属する *Halocynthia roretzi* (マボヤ),<sup>104</sup> *Halocynthia papillosa*,<sup>106</sup> *Microcosmus vulgaris*,<sup>105</sup> *Styela clava*<sup>118</sup> から単離・構造決定されている。今回の結果とこれらの報告例から, 長鎖ビス硫酸アルキル化合物はマメボヤ目およびマンジュウボヤ目に特異的な代謝物であると考えられる。

ホヤは海水中のバナジウムイオンを血球細胞に高濃度に濃縮することで知られているが, バナジウムを高濃度で含むホヤはいずれもマメボヤ目, もしくはマンジュウボヤ目のホヤである。<sup>16</sup> スジキレボヤにおいては血球細胞のみならず腸管細胞においても高濃度のバナジ

ウムが検出されており、腸管におけるバナジウムの吸収を起点としたホヤにおけるバナジウム濃縮モデルが提唱されている。<sup>10,21</sup> 海水中のバナジウムは主な化学種であるバナジン酸イオン ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ,  $\text{HVO}_4^{2-}$ ) としてリン酸トランスポーターを介して海水中からホヤ体内へ吸収されていると考えられている。<sup>10</sup> 高濃度のリン酸イオン存在下でホヤのバナジウムの取り込みは抑制されるが、完全には阻害されないことから、一部のバナジウムは還元された4価のバナジルカチオン ( $\text{VO}^{2+}$ ) が硫酸イオンと複合体を形成してホヤに吸収されている可能性が指摘されている。<sup>119</sup> また、カタユウレイボヤのゲノム中に存在するリン酸/バナジウム輸送体の候補遺伝子から推定されるタンパク質のバナジン酸イオンに対する親和性が低く、海水中のバナジウム (35 nM)<sup>84,120</sup> を大量に取り込むことは不可能であると考えられている。<sup>21</sup> 近年、スジキレボヤの腸内から9種類のバナジウム耐性細菌が単離され、このうち *Vibrio* 属と *Shewanella* 属の細菌がバナジウムを高度に濃縮することが報告された。<sup>21</sup> *Shewanella* 属細菌はグラム陰性の嫌気性細菌であり、*Shewanella oneidensis* MR-1 株は5価のバナジウムを4価へと還元して嫌気呼吸を行うことが知られている。<sup>121</sup> これらの報告例から、ホヤ腸内の共生細菌がバナジウムを濃縮・還元し、ホヤの腸細胞が5価および4価のバナジウムを取り込む手助けをしているという仮説が提唱され、研究が進められている。<sup>21</sup>

今回見出した長鎖硫酸アルキル化合物はバナジウムを濃縮するマメボヤ目、マンジュウボヤ目のホヤに特異的に含まれている可能性が高い。また高濃度のバナジウムを含むことが知られているヨーロッパザラボヤ<sup>83</sup>の腸管および血球細胞に局在することから、バナジウム濃縮と関連している可能性が考えられる。現在、4価のバナジルイオン ( $\text{VO}^{2+}$ ) が硫酸イオンと複合体を形成してホヤに取り込まれるという仮説を作業仮説とし、結合タンパク質によってホヤの腸管表面に保持された **21**, **24**, **27** がバナジルイオンをキレートすることでホヤの腸管細胞内へ取り込んでいるのではないか？という仮説を立て、**21** のバナジルイオンに対する親和性、**21** 結合タンパク質について検討中である (**Figure 138**)。このような仮説を検証するうえでモデル生物であるカタユウレイボヤに **21**, **27** をはじめとした硫酸アルキ

ル化合物が含まれることを見出したことは重要な発見である。結合タンパク質のような関連タンパク質を見出すことができれば、分子生物学的手法を用いてカタユウレイボヤにおける関連遺伝子について調べることで長鎖硫酸アルキル化合物のホヤにおける生理機能の解明、さらには新たな生命現象の発見やその理解につながることを期待される。



**Figure 137.** Putative interaction between vanadyl cation and alkyl sulfate 21.

## 総合考察

ホヤはその系統学的位置に加え、幼生期におけるコンパクトな体制から種々の生物学の研究分野でモデル生物として活躍している。一方で水産業においてはロープなどの構造体に大量に付着・増殖し、養殖業などに甚大な被害を与える有害生物としての一面を持つ。第2章で研究対象としたヨーロッパザラボヤはその代表例であるが、有効な駆除法は確立されていない。本種の生理・生態の理解が進むことで駆除法の開発へとつながることが期待される。

天然物化学分野においては抗がん剤 ecteinascidin743<sup>41</sup> をはじめとしたホヤ由来の二次代謝物が多数見出されてきたが、これらの研究の多くは構造と生理活性の報告に終わり、ホヤの生理・生態における役割に関する知見は極めて少ない。

しかし、ホヤやヒトデにおいては二次代謝物が受精において重要な役割を持つことが報告されており、<sup>109-110</sup> 様々な生物種から成り立つ海洋生態系において二次代謝物が持つ機能は想像以上に重要である可能性が高い。

そこで本研究では未知物質の分離・精製、構造解析などの天然物化学的手法を基盤テクニックとして、得られた化合物の生物学的側面を調べるアプローチで二次代謝物のホヤにおける役割に関する知見を得ることを目指した。

第1章では、マボヤ目、シロボヤ科に属するシロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*) の血液が蛍光を示すこと、本種には多様な芳香族化合物が含まれていることに着目し、これら芳香族化合物のホヤにおける機能に関する知見を得ることを目的とした。シロボヤモドキには多くの未知物質が含まれており、これらの中からタウロアミド類、プテリン類、ヌクレオシド、核酸塩基類、チラミン類などの化合物群を同定した。これらの二次代謝物とホヤの関連性を調べたところ、主要な二次代謝物は成体のホヤにのみ多く含まれていること、また蛍光物質 **1, 3** が血液の血漿に、蛍光物質 **12** が血球細胞に局在することを見出し、(Figure 85,

**A-B, E-F)** これらの化合物とホヤの生理の関連性が強く示唆された。

第2章ではマメボヤ目、ナツメボヤ科に属するヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*) に含まれる長鎖硫酸アルキル化合物に着目した。部位別抽出物およびホヤ飼育水の LC-MS 分析、マスイメージング解析の結果、硫酸ジエステル化合物 (**21, 24, 27**) はホヤ腸管表面に局在すること、硫酸モノエステル化合物 (**22-23**) はフンとともに海水中へ放出されていることを見出した。さらにこれらの化合物がマメボヤ目、マンジュウボヤ目のホヤに特異的な代謝物である可能性を見出し、これらのホヤに特有のバナジウム濃縮に関与しているという仮説を立てた。

以上、本研究では局在性を軸とした化合物の生物学的側面に着目することでホヤの生理への関与が示唆される二次代謝物を見出した。これらの結果は「ホヤはなぜ二次代謝物を作り、保有するのか？」という「問い」に迫るための手掛かりになると考えられる。今後、この手掛かりをもとにこれらの化合物とホヤの関連性をより詳細に調べることで、ホヤにおける二次代謝物の機能解明およびホヤの生理・生態の理解につながり、さらにはホヤのケミカルコントロール技術の開発に寄与することが期待される。

本研究の基盤となっているのは未知物質の単離・構造解析、いわゆる「モノトリ」である。何度も述べてきたように、天然物の探索研究は主に医薬品開発などを目的としたものである。モノトリの魅力は人知の及ばない新奇な骨格と生理活性を有する化合物の発見が期待できることにあるが、近年はそのような化合物を見出しにくくなっていることに加え、多様な化合物を一挙に合成することができるコンビナトリアルケミストリーによる研究が見られる。<sup>122</sup> 一方、天然物化学的アプローチは創薬科学の視点のみならず、生物学的視点から重要な意味を持つことを本研究で示すことができたと考えている。今後、生物学的視点を加えた天然物化学研究がさらに進展し、ホヤをはじめ、多くの生物種における生命現象の

解明に貢献することを期待したい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門生物資源科学講座の酒井隆一教授に深甚なる感謝の意を表します。研究に関する助言、ご指導をいただいた北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門生物資源科学講座の藤田雅紀准教授に深く感謝いたします。

第1章で研究対象としたシロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*) の採集はパラオ共和国サザンマリナラボラトリー主宰の坂上治郎博士にご協力いただきました。ホヤの同定は東邦大学理学部生物学科系統分類学研究室の西川輝昭教授に行っていただきました。放射性同位体標識化合物を用いたイオンチャンネル型グルタミン酸受容体結合試験は大阪市立大学大学院理学研究科分子変換学研究室の品田哲郎教授、保野陽子助教 (現在は九州大学理学研究院生物有機化学研究室, 助教) に行っていただきました。ご協力いただいた皆様のご厚意に深く感謝いたします。

第2章で研究対象としたヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*) の採集は北海道立総合研究機構函館水産試験場調査研究部の金森誠博士、夏池真史博士、八雲町漁業協同組合の安千谷大輔氏、落部漁業協同組合の澤口正臣氏の多大なご協力のもと行うことができました。また、金森博士にはヨーロッパザラボヤの同定に加え、ホヤの解剖についてもご指導いただきました。皆様のご厚意に深く感謝いたします。イメージングマス測定においては日本大学生物資源科学部生物機能化学研究室の井上菜穂子准教授、大学院博士後期課程2年森笹瑞季さん、北海道大学高等教育推進機構の早坂孝宏博士に多大なご協力をいただきました。深く感謝いたします。また、イメージングマス測定試料の凍結切片作成においては北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門海洋生物学講座の田中啓之助教にご協力いただきました。深く感謝いたします。

ヨーロッパザラボヤの採集およびマウス脳室内投与試験においては当研究室の大学院生、4年生のご協力のもと行うことができました。深く感謝いたします。

最後に、9年間学生生活を続けた私に対し、一度も反対することなく、最後まで温かく見守っていただき、また多大な支援をいただいた両親と妹に心から感謝いたします。

令和4年1月 宮古 圭

## 参考文献

- (1) Tsagkogeorga, G.; Turon, X.; Hopcroft, R. R.; Tilak, M.-K.; Feldstein, T.; Shenkar, N.; Loya, Y.; Huchon, D.; Douzery, E. J.; Delsuc, F. An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. *BMC Evolutionary Biology* **2009**, *9* (1), 1-16.
- (2) Nakayama-Ishimura, A.; Chambon, J.-p.; Horie, T.; Satoh, N.; Sasakura, Y. Delineating metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Developmental Biology* **2009**, *326* (2), 357-367.
- (3) Shoguchi, E.; Hamada, M.; Fujie, M.; Satoh, N. Direct examination of chromosomal clustering of organ-specific genes in the chordate *Ciona intestinalis*. *Genesis* **2011**, *49* (8), 662-672.
- (4) Dehal, P.; Satou, Y.; Campbell, R. K.; Chapman, J.; Degnan, B.; De Tomaso, A.; Davidson, B.; Di Gregorio, A.; Gelpke, M.; Goodstein, D. M. The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **2002**, *298* (5601), 2157-2167.
- (5) Matthyssse, A. G.; Deschet, K.; Williams, M.; Marry, M.; White, A. R.; Smith, W. C. A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (4), 986-991.
- (6) Sasakura, Y.; Nakashima, K.; Awazu, S.; Matsuoka, T.; Nakayama, A.; Azuma, J.-i.; Satoh, N. Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (42), 15134-15139.
- (7) Azumi, K.; Ishimoto, R.; Fujita, T.; Nonaka, M.; Yokosawa, H. Opsonin-independent and-dependent phagocytosis in the ascidian *Halocynthia roretzi*: galactose-specific lectin and complement C3 function as target-dependent opsonins. *Zoological Science* **2000**, *17* (5), 625-632.
- (8) Azumi, K.; Yokosawa, H.; Ishii, S. Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry* **1990**, *29* (1), 159-165.
- (9) Hata, S.; Azumi, K.; Yokosawa, H. Ascidian phenoloxidase: Its release from hemocytes, isolation, characterization and physiological roles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, *119* (4), 769-776.
- (10) Ueki, T.; Yamaguchi, N.; Isago, Y.; Tanahashi, H. Vanadium accumulation in ascidians: A system overview. *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, *301*, 300-308.
- (11) Ishii, T.; Nakai, I.; Numako, C.; Okoshi, K.; Otake, T. Discovery of a new vanadium accumulator, the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*. *Naturwissenschaften* **1993**, *80* (6), 268-270.
- (12) Kanamori, M.; Baba, K.; Konda, Y.; Goshima, S. Distribution of the invasive ascidian *Asciidiella aspersa* (Müller, 1776)(Urochordata, Ascidiacea) in Hokkaido, Japan. *Japanese Journal of Benthology*

2014, 69 (1), 23-31.

- (13) Watanabe, H.; Nakai, M.; Komazawa, K.; Sakurai, H. A new orally active insulin-mimetic vanadyl complex: bis (pyrrolidine-N-carbodithioato) oxovanadium (IV). *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37 (7), 876-877.
- (14) Hayashi, Y.; Kimura, T. The effects of vanadium compounds on the activation of adenylate cyclase from rat adrenal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1986**, 869 (1), 29-36.
- (15) Macara, I. G.; McLeod, G.; Kustin, K. Vanadium in tunicates: oxygen-binding studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **1979**, 62 (4), 821-826.
- (16) Michibata, H.; Terada, T.; Anada, N.; Yamakawa, K.; Numakunai, T. The accumulation and distribution of vanadium, iron, and manganese in some solitary ascidians. *The Biological Bulletin* **1986**, 171 (3), 672-681.
- (17) Goldberg, E. D.; McBLAIR, W.; Taylor, K. M. The uptake of vanadium by tunicates. *The Biological Bulletin* **1951**, 101 (1), 84-94.
- (18) Bowman, B. Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system II. *Journal of Bacteriology* **1983**, 153 (1), 286-291.
- (19) Bowman, B. J.; Allen, K. E.; Slayman, C. W. Vanadate-resistant mutants of *Neurospora crassa* are deficient in a high-affinity phosphate transport system. *Journal of Bacteriology* **1983**, 153 (1), 292-296.
- (20) Yoshinaga, M.; Ueki, T.; Yamaguchi, N.; Kamino, K.; Michibata, H. Glutathione transferases with vanadium-binding activity isolated from the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2006**, 1760 (3), 495-503.
- (21) Ueki, T.; Fujie, M.; Satoh, N. Symbiotic bacteria associated with ascidian vanadium accumulation identified by 16S rRNA amplicon sequencing. *Marine Genomics* **2019**, 43, 33-42.
- (22) Ueki, T.; Uyama, T.; Kanamori, K.; Michibata, H. Isolation of cDNAs encoding subunits A and B of the vacuolar-type ATPase from the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Zoological Science* **1998**, 15 (6), 823-829.
- (23) Ueki, T.; Uyama, T.; Kanamori, K.; Michibata, H. Subunit C of the vacuolar-type ATPase from the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea* rescued the pH sensitivity of yeast *vma5* mutants. *Marine Biotechnology* **2001**, 3 (4), 316-321.
- (24) Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U. V.; Gunshin, Y.; Romero, M. F.; Boron, W. F.; Nussberger, S.; Gollan, J. L.; Hediger, M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **1997**, 388 (6641), 482-488.
- (25) Ueki, T.; Furuno, N.; Michibata, H. A novel vanadium transporter of the Nramp family expressed at the vacuole of vanadium-accumulating cells of the ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2011**, 1810 (4), 457-464.
- (26) Ueki, T.; Furuno, N.; Xu, Q.; Nitta, Y.; Kanamori, K.; Michibata, H. Identification and biochemical

- analysis of a homolog of a sulfate transporter from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2009**, 1790 (10), 1295-1300.
- (27) Kanda, T.; Nose, Y.; Wuchiyama, J.; Uyama, T.; Moriyama, Y.; Michibata, H. Identification of a vanadium-associated protein from the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Zoological Science* **1997**, 14 (1), 37-42.
- (28) Yamaguchi, N.; Kamino, K.; Ueki, T.; Michibata, H. Expressed sequence tag analysis of vanadocytes in a vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Marine Biotechnology* **2004**, 6 (2), 165-174.
- (29) Yoshihara, M.; Ueki, T.; Watanabe, T.; Yamaguchi, N.; Kamino, K.; Michibata, H. VanabinP, a novel vanadium-binding protein in the blood plasma of an ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **2005**, 1730 (3), 206-214.
- (30) Yoshihara, M.; Ueki, T.; Yamaguchi, N.; Kamino, K.; Michibata, H. Characterization of a novel vanadium-binding protein (VBP-129) from blood plasma of the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2008**, 1780 (2), 256-263.
- (31) Ueki, T.; Adachi, T.; Kawano, S.; Aoshima, M.; Yamaguchi, N.; Kanamori, K.; Michibata, H. Vanadium-binding proteins (vanabins) from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **2003**, 1626 (1-3), 43-50.
- (32) Kawakami, N.; Ueki, T.; Amata, Y.; Kanamori, K.; Matsuo, K.; Gekko, K.; Michibata, H. A novel vanadium reductase, Vanabin2, forms a possible cascade involved in electron transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2009**, 1794 (4), 674-679.
- (33) Ueki, T.; Uwagaki, M.; Yamamoto, S.; Michibata, H. Participation of thioredoxin in the V (V)-reduction reaction by Vanabin2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2014**, 1840 (11), 3238-3245.
- (34) Uyama, T.; Kinoshita, T.; Takahashi, H.; Satoh, N.; Kanamori, K.; Michibata, H. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Is a 45-kDa Antibody Specific to Vanadocytes in the Vanadium-Rich Ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *The Journal of Biochemistry* **1998**, 124 (2), 377-382.
- (35) Uyama, T.; Yamamoto, K.; Kanamori, K.; Michibata, H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway is localized in vanadocytes of the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Zoological Science* **1998**, 15 (4), 441-446.
- (36) Menna, M.; Fattorusso, E.; Imperatore, C. Alkaloids from marine ascidians. *Molecules* **2011**, 16 (10), 8694-8732.
- (37) Palanisamy, S. K.; Rajendran, N. M.; Marino, A. Natural products diversity of marine ascidians (tunicates; ascidiacea) and successful drugs in clinical development. *Natural Products and Bioprospecting* **2017**, 7 (1), 1-111.
- (38) Uchimasu, H.; Matsumura, K.; Tsuda, M.; Kumagai, K.; Akakabe, M.; Fujita, M. J.; Sakai, R. Mellpaladines and dopargimine, novel neuroactive guanidine alkaloids from a Palauan Didemnidae tunicate. *Tetrahedron* **2016**, 72 (45), 7185-7193.

- (39) Paguigan, N. D.; Tun, J. O.; Leavitt, L. S.; Lin, Z.; Chase, K.; Dowell, C.; Deering-Rice, C. E.; Lim, A. L.; Karthikeyan, M.; Hughen, R. W.; Zhang, J.; Peterson, R. T.; Reilly, C. A.; Light, A. R.; Raghuraman, S.; McIntosh, J. M.; Olivera, B. M.; Schmidt, E. W. Nicotinic acetylcholine receptor partial antagonist polyamides from tunicates and their predatory sea slugs. *ACS Chemical Neuroscience* **2021**, *12*, 2693-2704.
- (40) Paguigan, N. D.; Yan, Y.; Karthikeyan, M.; Chase, K.; Carter, J.; Leavitt, L. S.; Lim, A. L.; Lin, Z.; Memon, T.; Christensen, S.; Bentzen, B. H.; Schmitt, N.; Reilly, C. A.; Teichert, R. W.; Raghuraman, S.; Olivera, B. M.; Schmidt, E. W. The tunicate metabolite 2-(3, 5-diiodo-4-methoxyphenyl) ethan-1-amine targets ion channels of vertebrate sensory neurons. *ACS Chemical Biology* **2021**, *16*, 1654-1662.
- (41) Rinehart, K. L. Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews* **2000**, *20* (1), 1-27.
- (42) Schmidt, E. W.; Nelson, J. T.; Rasko, D. A.; Sudek, S.; Eisen, J. A.; Haygood, M. G.; Ravel, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (20), 7315-7320.
- (43) Rinehart, K. L.; Kobayashi, J.; Harbour, G. C.; Hughes Jr, R. G.; Mizensak, S. A.; Scahill, T. A. Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106* (5), 1524-1526.
- (44) Ota, Y.; Chinen, T.; Yoshida, K.; Kudo, S.; Nagumo, Y.; Shiwa, Y.; Yamada, R.; Umihara, H.; Iwasaki, K.; Masumoto, H. Eudistomin C, an antitumor and antiviral natural product, targets 40S ribosome and inhibits protein translation. *ChemBioChem* **2016**, *17* (17), 1616-1620.
- (45) Tatsuta, T.; Hosono, M.; Rotinsulu, H.; Wewengkang, D. S.; Sumilat, D. A.; Namikoshi, M.; Yamazaki, H. Lissoclibadin 1, a polysulfur aromatic alkaloid from the Indonesian ascidian *Lissoclinum cf. badium*, induces caspase-dependent apoptosis in human colon cancer cells and suppresses tumor growth in nude mice. *Journal of Natural Products* **2017**, *80* (2), 499-502.
- (46) Rath, C. M.; Janto, B.; Earl, J.; Ahmed, A.; Hu, F. Z.; Hiller, L.; Dahlgren, M.; Kreft, R.; Yu, F.; Wolff, J. J. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. *ACS Chemical Biology* **2011**, *6* (11), 1244-1256.
- (47) Xu, Y.; Kersten, R. D.; Nam, S.-J.; Lu, L.; Al-Suwailem, A. M.; Zheng, H.; Fenical, W.; Dorrestein, P. C.; Moore, B. S.; Qian, P.-Y. Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (20), 8625-8632.
- (48) Li, J. L.; Xiao, B.; Park, M.; Yoo, E. S.; Shin, S.; Hong, J.; Chung, H. Y.; Kim, H. S.; Jung, J. H. PPAR- $\gamma$  agonistic metabolites from the ascidian *Herdmania momus*. *Journal of Natural Products* **2012**, *75* (12), 2082-2087.
- (49) McDonald, L. A.; Swersey, J. C.; Ireland, C. M.; Carroll, A. R.; Coll, J. C.; Bowden, B. F.; Fairchild, C. R.; Cornell, L. Botryllamides A-D, new brominated tyrosine derivatives from styelid ascidians of the genus *Botryllus*. *Tetrahedron* **1995**, *51* (18), 5237-5244.

- (50) Lindsay, B. S.; Almeida, A. M.; Smith, C. J.; Berlinck, R. G.; da Rocha, R. M.; Ireland, C. M. 6-Methoxy-7-methyl-8-oxoguanine, an unusual purine from the ascidian *Symplegma rubra*. *Journal of Natural Products* **1999**, *62* (11), 1573-1575.
- (51) Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Iuvone, T. Sulcatin, a novel antiproliferative N-methylpyridinium alkaloid from the ascidian *Microcosmus vulgaris*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63* (4), 517-519.
- (52) Davis, R. A.; Aalbersberg, W.; Meo, S.; da Rocha, R. M.; Ireland, C. M. The isolation and synthesis of polyandrocarpamines A and B. Two new 2-aminoimidazolone compounds from the Fijian ascidian, *Polyandrocarpa* sp. *Tetrahedron* **2002**, *58* (16), 3263-3269.
- (53) Wang, W.; Oda, T.; Fujita, A.; Mangindaan, R. E.; Nakazawa, T.; Ukai, K.; Kobayashi, H.; Namikoshi, M. Three new sulfur-containing alkaloids, polycarpaurines A, B, and C, from an Indonesian ascidian *Polycarpa aurata*. *Tetrahedron* **2007**, *63* (2), 409-412.
- (54) Niwa, H.; Yoshida, Y.; Yamada, K. A brominated quinazolinone from the marine tunicate *Pyura saciformis*. *Journal of Natural Products* **1988**, *51* (2), 343-344.
- (55) Watanabe, K.; Matsunaga, S.; Konosu, S. Studies on the extractive components of ascidians II. Halocynine, a novel betaine isolated from the muscle of ascidian *Halocynthia roretzi*. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25* (19), 2003-2004.
- (56) Bruening, R. C.; Oltz, E. M.; Furukawa, J.; Nakanishi, K.; Kustin, K. Isolation of tunichrome B-1, a reducing blood pigment of the sea squirt, *Ascidia nigra*. *Journal of Natural Products* **1986**, *49* (2), 193-204.
- (57) Ryan, D. E.; Grant, K. B.; Nakanishi, K. Reactions between tunichrome Mm-1, a tunicate blood pigment, and vanadium ions in acidic and neutral media. *Biochemistry* **1996**, *35* (26), 8640-8650.
- (58) Tincu, J. A.; Taylor, S. W. Tunichrome Sp-1: New Pentapeptide Tunichrome from the Hemocytes of *Styela plicata*. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (3), 377-378.
- (59) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. Lumichrome: A larval metamorphosis - inducing substance in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *264* (3), 785-789.
- (60) Tsukamoto, S.; Hirota, H.; Kato, H.; Fusetani, N. Urochordamines A and B: larval settlement/metamorphosis-promoting, pteridine-containing physostigmine alkaloids from the tunicate *Ciona savignyi*. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (30), 4819-4822.
- (61) Yoshida, M.; Murata, M.; Inaba, K.; Morisawa, M. A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (23), 14831-14836.
- (62) Oishi, T.; Tsuchikawa, H.; Murata, M.; Yoshida, M.; Morisawa, M. Synthesis and identification of an endogenous sperm activating and attracting factor isolated from eggs of the ascidian *Ciona intestinalis*; an example of nanomolar-level structure elucidation of novel natural compound. *Tetrahedron* **2004**, *60* (33), 6971-6980.
- (63) Matsumori, N.; Hiradate, Y.; Shibata, H.; Oishi, T.; Shimma, S.; Toyoda, M.; Hayashi, F.; Yoshida, M.; Murata, M.; Morisawa, M. A novel sperm-activating and attracting factor from the ascidian *Ascidia*

*sydneiensis*. *Organic Letters* **2013**, *15* (2), 294-297.

(64) Watanabe, T.; Shibata, H.; Ebine, M.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M.; Yoshida, M.; Morisawa, M.; Lin, S.; Yamauchi, K. Synthesis and complete structure determination of a sperm-activating and-attracting factor isolated from the ascidian *Ascidia sydneiensis*. *Journal of Natural Products* **2018**, *81* (4), 985-997.

(65) Juknaite, L.; Sugamata, Y.; Tokiwa, K.; Ishikawa, Y.; Takamizawa, S.; Eng, A.; Sakai, R.; Pickering, D. S.; Frydenvang, K.; Swanson, G. T.; Kastrup, J. S.; Oikawa, M. Studies on an (S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionic acid (AMPA) receptor antagonist IKM-159: Asymmetric synthesis, neuroactivity, and structural characterization. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56* (6), 2283-2293.

(66) Yasuno, Y.; Hamada, M.; Yoshida, Y.; Shimamoto, K.; Shigeri, Y.; Akizawa, T.; Konishi, M.; Ohfune, Y.; Shinada, T. Structure-activity relationship study at C9 position of kaitocephalin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, (26), 4.

(67) Kawai, M.; Horikawa, Y.; Ishihara, T.; Shimamoto, K.; Ohfune, Y. 2-(Carboxycyclopropyl) glycines: Binding, neurotoxicity and induction of intracellular free Ca<sup>2+</sup> increase. *European Journal of Pharmacology* **1992**, *211* (2), 195-202.

(68) Tadokoro, Y.; Nishikawa, T.; Ichimori, T.; Matsunaga, S.; Fujita, M. J.; Sakai, R. *N*-Methyl- $\beta$ -carbolinium Salts and an *N*-Methylated 8-Oxoisoguanine as Acetylcholinesterase Inhibitors from a Solitary Ascidian, *Cnemidocarpa irene*. *ACS Omega* **2017**, *2* (3), 1074-1080.

(69) Tran, T. D.; Pham, N. B.; Quinn, R. J. Structure determination of pentacyclic pyridoacridine alkaloids from the Australian marine organisms *Ancorina geodides* and *Cnemidocarpa stolonifera*. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, *2014* (22), 4805-4816.

(70) Tran, T. D.; Pham, N. B.; Ekins, M.; Hooper, J. N.; Quinn, R. J. Isolation and total synthesis of stolonines A–C, unique taurine amides from the Australian marine tunicate *Cnemidocarpa stolonifera*. *Marine Drugs* **2015**, *13* (7), 4556-4575.

(71) Lindsay, B. S.; Battershill, C. N.; Copp, B. R. Isolation of 2-(3'-Bromo-4'-hydroxyphenol) ethanamine from the New Zealand Ascidian *Cnemidocarpa bicornuta*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (6), 857-858.

(72) Guerriero, A.; D'Ambrosio, M.; Pietra, F.; Debitus, C.; Ribes, O. Pteridines, sterols, and indole derivatives from the lithistid sponge *Corallistes undulatus* of the coral sea. *Journal of Natural Products* **1993**, *56* (11), 1962-1970.

(73) Rudolph, K. E.; Liberio, M. S.; Davis, R. A.; Carroll, A. R. Pteridine-, thymidine-, choline- and imidazole-derived alkaloids from the Australian ascidian, *Leptoclinides durus*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11* (2), 261-270.

(74) Takikawa, S. I.; Matsuura, S. Enzymatic Synthesis of Four Stereoisomers of 7-Oxo-biopterin and Determination of the Absolute Structure of Ichthyopterine. *Pteridines* **1990**, *2* (3), 151-156.

(75) Schmid, G. H. Determination of erythro and threo configurations by nuclear magnetic resonance

- spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry* **1968**, *46* (21), 3415-3418.
- (76) Copp, B. R.; Wassvik, C. M.; Lambert, G.; Page, M. J. Isolation and Characterization of the New Purine 1, 3, 7-Trimethylisoguanine from the New Zealand Ascidian *Pseudodistoma cereum*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63* (8), 1168-1169.
- (77) Tasdemir, D.; Mangalindan, G. C.; Concepcion, G. P.; Harper, M. K.; Ireland, C. M. 3, 7-Dimethylguanine, a new purine from a Philippine sponge *Zyzya fuliginosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2001**, *49* (12), 1628-1630.
- (78) Fukuhara, T.; Visser, D. Cytidine Derivatives I. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77* (9), 2393-2395.
- (79) Seela, F.; He, Y. 2'-Deoxyuridine and 2'-Deoxyisocytidine as Constituents of DNA with Parallel Chain Orientation: The Stabilization of the iC<sub>d</sub>·G<sub>d</sub> Base Pair by the 5-Methyl Group. *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83* (9), 2527-2540.
- (80) Shibuya, S.; Ueda, T. Pyrimidine S- and N-Cyclonucleosides. Synthesis of 6, 2'(and 5')-S- and N-Cyclouridines (Nucleosides and Nucleotides. XXXII). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1980**, *28* (3), 939-946.
- (81) Werner, E. R.; Blau, N.; Thöny, B. Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and pathophysiology. *Biochemical Journal* **2011**, *438* (3), 397-414.
- (82) Honore, T.; Davies, S. N.; Drejer, J.; Fletcher, E. J.; Jacobsen, P.; Lodge, D.; Nielsen, F. E. Quinoxalinediones: Potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* **1988**, *241* (4866), 701-703.
- (83) Ciereszko, L. S.; Ciereszko, E. M.; Harris, E. R.; Lane, C. A. Vanadium content of some tunicates. *Comparative Biochemistry and Physiology* **1963**, *8* (2), 137-140.
- (84) Cole, P.; Eckert, J.; Williams, K. The determination of dissolved and particulate vanadium in sea water by x-ray fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1983**, *153*, 61-67.
- (85) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. Longamide and 3, 7-dimethylisoguanine, two novel alkaloids from the marine sponge *Agelas longissima*. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36* (43), 7893-7896.
- (86) Sakurada, T.; Gill, M. B.; Frausto, S.; Copits, B.; Noguchi, K.; Shimamoto, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R. Novel N-methylated 8-oxoisoguanines from Pacific sponges with diverse neuroactivities. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (16), 6089-6099.
- (87) Appleton, D. R.; Page, M. J.; Lambert, G.; Copp, B. R. 1, 3-Dimethyl-8-oxoisoguanine, a new purine from the New Zealand ascidian *Pseudodistoma cereum*. *Natural Product Research* **2004**, *18* (1), 39-42.
- (88) Lindsay, B. S.; Battershill, C. N.; Copp, B. R. 1, 3-Dimethylguanine, a new purine from the New Zealand ascidian *Botrylloides leachi*. *Journal of Natural Products* **1999**, *62* (4), 638-639.
- (89) Goto-Inoue, N.; Sato, T.; Morisasa, M.; Yamashita, H.; Maruyama, T.; Ikeda, H.; Sakai, R. Mass spectrometry imaging reveals differential localization of natural sunscreens in the mantle of the giant clam

*Tridacna crocea*. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1), 1-10.

(90) Angelina, E.; Andujar, S.; Moreno, L.; Garibotto, F.; Párraga, J.; Peruchena, N.; Cabedo, N.; Villecco, M.; Cortes, D.; Enriz, R. D. 3-Chlorotyramine Acting as Ligand of the D2 Dopamine Receptor. Molecular Modeling, Synthesis and D2 Receptor Affinity. *Molecular Informatics* **2015**, *34* (1), 28-43.

(91) Chiken, S.; Sato, A.; Ohta, C.; Kurokawa, M.; Arai, S.; Maeshima, J.; Sunayama-Morita, T.; Sasaoka, T.; Nambu, A. Dopamine D1 receptor-mediated transmission maintains information flow through the cortico-striato-entopeduncular direct pathway to release movements. *Cerebral Cortex* **2015**, *25* (12), 4885-4897.

(92) Sakai, R.; Swanson, G. T. Recent progress in neuroactive marine natural products. *Natural Product Reports* **2014**, *31* (2), 273-309.

(93) Nagai, H.; Shibahara, S.; Matsushima, R.; Uchida, H.; Kanamori, M.; Nogata, Y.; Kamio, M. Hemolytic compound 3, 7, 11, 15-tetramethyl-hexadecan-1, 19-disulfate found in the invasive European sea squirt *Asciidiella aspersa*. *Fisheries Science* **2021**, *87* (1), 145-150.

(94) Kornprobst, J.-M.; Sallenave, C.; Barnathan, G. Sulfated compounds from marine organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* **1998**, *119* (1), 1-51.

(95) Carvalhal, F.; Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Pinto, M.; Kijjoo, A. SULFATION PATHWAYS: Sources and biological activities of marine sulfated steroids. *Journal of Molecular Endocrinology* **2018**, *61* (2), T211-T231.

(96) Prebble, D. W.; Xu, M.; Mellick, G. D.; Carroll, A. R. Sycosterol A, an  $\alpha$ -Synuclein Inhibitory Sterol from the Australian Ascidian *Sycozoa cerebriformis*. *Journal of Natural Products* **2021**.

(97) Imperatore, C.; D'Aniello, F.; Aiello, A.; Fiorucci, S.; D'Amore, C.; Sepe, V.; Menna, M. Phallusiasterols A and B: Two new sulfated sterols from the Mediterranean tunicate *Phallusia fumigata* and their effects as modulators of the PXR receptor. *Marine Drugs* **2014**, *12* (4), 2066-2078.

(98) Imperatore, C.; Senese, M.; Aiello, A.; Luciano, P.; Fiorucci, S.; D'Amore, C.; Carino, A.; Menna, M. Phallusiasterol C, A New Disulfated Steroid from the Mediterranean Tunicate *Phallusia fumigata*. *Marine Drugs* **2016**, *14* (6), 117.

(99) Kellner Filho, L. C.; Picão, B. W.; Silva, M. L.; Cunha, W. R.; Pauletti, P. M.; Dias, G. M.; Copp, B. R.; Bertanha, C. S.; Januario, A. H. Bioactive Aliphatic Sulfates from Marine Invertebrates. *Marine Drugs* **2019**, *17* (9), 527.

(100) Imperatore, C.; Aiello, A.; D'Aniello, F.; Luciano, P.; Vitalone, R.; Meli, R.; Raso, G.; Menna, M. New bioactive alkyl sulfates from Mediterranean tunicates. *Molecules* **2012**, *17* (11), 12642-12650.

(101) Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Carnuccio, R.; D'Acquisto, F. Novel antiproliferative alkyl sulfates from the Mediterranean tunicate *Ascidia mentula*. *Tetrahedron* **1997**, *53* (16), 5877-5882.

(102) Aiello, A.; Carbonelli, S.; Fattorusso, E.; Iuvone, T.; Menna, M. New bioactive sulfated metabolites from the Mediterranean tunicate *Sidnyum turbinatum*. *Journal of Natural Products* **2001**, *64* (2), 219-221.

- (103) Fujita, M.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Nishikawa, T.; Fusetani, N. Sodium 1-(12-hydroxy) octadecanyl sulfate, an MMP2 inhibitor, isolated from a tunicate of the family Polyclinidae. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (12), 1936-1938.
- (104) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. Antibacterial and antifungal sulfated alkane and alkenes from the hepatopancreas of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Journal of Natural Products* **1994**, *57* (11), 1606-1609.
- (105) Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Carnuccio, R.; Iuvone, T. A new antiproliferative sulfated alkene from the Mediterranean tunicate *Microcosmus vulgaris*. *Tetrahedron* **1997**, *53* (33), 11489-11492.
- (106) Aiello, A.; Carbonelli, S.; Esposito, G.; Fattorusso, E.; Iuvone, T.; Menna, M. Novel bioactive sulfated alkene and alkanes from the Mediterranean ascidian *Halocynthia papillosa*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63* (11), 1590-1592.
- (107) Fujimoto, Y.; Yamada, T.; Ikekawa, N.; NISHIYAMA, I.; MATSUI, T.; Hoshi, M. Structure of acrosome reaction-inducing steroidal saponins from the egg jelly of the starfish, *Asterias amurensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1987**, *35* (5), 1829-1832.
- (108) Nishikawa, I.; Matsui, T.; Fujimoto, Y.; Ikekawa, N.; Hoshi, M. Correlation between the molecular structure and the biological activity of Co-ARIS, a cofactor for acrosome reaction-inducing substance. *Development, Growth & Differentiation* **1987**, *29* (2), 171-176.
- (109) Naruse, M.; Suetomo, H.; Matsubara, T.; Sato, T.; Yanagawa, H.; Hoshi, M.; Matsumoto, M. Acrosome reaction-related steroidal saponin, Co-ARIS, from the starfish induces structural changes in microdomains. *Developmental Biology* **2010**, *347* (1), 147-153.
- (110) Yoshida, K.; Shiba, K.; Sakamoto, A.; Ikenaga, J.; Matsunaga, S.; Inaba, K.; Yoshida, M. Ca<sup>2+</sup> efflux via plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase mediates chemotaxis in ascidian sperm. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 16622.
- (111) 金森誠; 馬場勝寿; 長谷川夏樹; 西川輝昭. 外来種ヨーロッパザラボヤ *Ascidiella aspersa* (Mueller, 1776) の生物学的特徴と簡易識別および同定について. **2012**.
- (112) Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Ode, R. H.; Brown, P.; Gust, D. J.; Michel, C. The isolation of loliolide from an Indian ocean opisthobranch mollusc. *Journal of Natural Products* **1980**, *43* (6), 752-755.
- (113) Kimura, J.; Maki, N. New loliolide derivatives from the brown alga *Undaria pinnatifida*. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (1), 57-58.
- (114) Fernández, I.; Pedro, J. R.; Vidal, R. Norisoprenoids from *Centaurea aspera* and *C. salmantica*. *Phytochemistry* **1993**, *34* (3), 733-736.
- (115) Hodges, R.; Porte, A. The structure of loliolide: A terpene from *Lolium perenne*. *Tetrahedron* **1964**, *20* (6), 1463-1467.
- (116) Isoe, S.; Hyeon, S. B.; Katsumura, S.; Sakan, T. Photo-oxygenation of carotenoids. II. The absolute configuration of loliolide and dihydroactinidiolide. *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (25), 2517-2520.
- (117) Kitagawa, I.; Kobayashi, M.; Okamoto, Y.; Yoshikawa, M.; Hamamoto, Y. Structures of sarasinoides

A1, B1, and C1; new norlanostane-triterpenoid oligoglycosides from the Palauan marine sponge *Asteropus sarasinosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1987**, *35* (12), 5036-5039.

(118) Yun, S.-M.; Jang, J.-H.; Ryu, J.-E.; Choi, B.-D.; Lee, J.-S. Antibacterial sulfated alkene from a tunicate, *Styela clava*. *Natural Product Sciences* **2007**, *13* (2), 132-134.

(119) Kalk, M. Absorption of vanadium by tunicates. *Nature* **1963**, *198* (4884), 1010-1011.

(120) Collier, R. Particulate and dissolved vanadium in the North Pacific Ocean. *Nature* **1984**, *309* (5967), 441-444.

(121) Carpentier, W.; De Smet, L.; Van Beeumen, J.; Brigé, A. Respiration and growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 using vanadate as the sole electron acceptor. *Journal of Bacteriology* **2005**, *187* (10), 3293-3301.

(122) 松永茂樹. 海洋天然物化学の過去, 現在, 未来. *化学と生物* **2002**, *40* (12), 813-819.