

# 学位論文の要約

氏名

松山 紘士

学位論文題目

ジャノメアメフラシ *Aplysia dactylomela* および  
*Agelas* 属海綿由来の二次代謝産物の化学構造と  
生物活性に関する研究

## 第1章 General Introduction

### 1.1 研究背景

海洋生物は、激しい生存競争および過酷な生存環境に晒され、適応してきた。その中でも海洋食物連鎖の下位に位置する海綿や軟体サンゴ、アメフラシ、ホヤなどの海洋無脊椎動物は、逃げたり、攻撃したりと物理的手段で身を守ることができないものが多い。また、海洋環境は陸上環境のように木々や岩場のような外敵から身を隠す障害物も少ないことから、外敵に見つかったらそのまま捕食される運命にあるように思える。しかし、それでも海洋無脊椎動物が絶滅することなく現代まで生き残ってこられたのは、忌避物質や誘引物質などの二次代謝産物を体内で生成し、外敵から身を守るなどの化学的防御手段がその他の生物よりも優れているからだと考えられる。海洋無脊椎動物から単離された二次代謝産物の多くは独特な化学構造や細胞傷害活性など特異な生物活性を持っており、それらの中から抗がん剤のリード化合物として開発されたものもある。そのため、医薬品開発の材料として海洋生物の二次代謝産物は期待されている。

豊富な海洋環境を誇る日本近海の海洋生態系は、天然物化学の宝庫と言える。特に南西諸島（薩南諸島、琉球諸島など）は、コンパクトな海域に火山島、入り組んだ内湾、サンゴ礁隆起島、海洋島と言った島々を取り囲む多種多様な海洋環境が混在しており、そのような海洋環境は世界においても珍しく、そこに生息する海洋生物たちも同様に珍しい二次代謝産物を蓄えていると考えられる。本研究の探索源である沖縄県泡瀬産ジャノメアメフラシ *Aplysia dactylomela* や鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿にも未開発の有用な二次代謝産物がまだまだ数多く含まれていると見込まれる。

### 1.2 ジャノメアメフラシおよびその二次代謝産物

ジャノメアメフラシとは、温帯から熱帯にかけての浅い海域に分布する大型のアメフラシである。体長は約 20 cm 程度で体色は茶色やクリーム色であり、背面全体に蛇の目状の斑点を持つ。また、刺激を与えると紫色の液体を出し外敵から身を守っている。ジャノメアメフラシは *Laurencia* 属紅藻を主食としており、紅藻に由来するテルペノイド、 $C_{15}$ アセトゲニン、ステロール、アルカロイドなどの様々なハロゲン化代謝物を体内に蓄えていることが分かっている<sup>1)</sup>。また、これらのハロゲン化代謝物は、強力な細胞傷害性、抗細菌性、抗真菌性、神経毒性を示すことが数多く報告されている<sup>2)</sup>。紅藻はアメフラシの体内の消化管で消化され、それに含まれる様々な化合物は、中腸線に蓄えられる<sup>4)</sup>。一部の紅藻由来の化合物は、中腸線から皮膚やインク線に輸送されるが、大部分の化合物は中腸線に蓄えられたまま<sup>4)</sup>であるので、ジャノメアメフラシから化合物を抽出するときは、中腸線を用いるのが一般的であり、本研究でも中腸線を用

いている。なお、ジャノメアメフラシが吐く紫色の液体にはハロゲン化物は存在しないことが分かっている<sup>5)</sup>。

### 1.3 *Agelas* 属海綿およびその二次代謝産物

*Agelas* 属海綿とは、世界中の熱帯・亜熱帯海域に生息する海綿動物の 1 つで、現在までに 36 種が知られている<sup>6)</sup>。1970 年代初頭から、世界中の多くの研究グループが *Agelas* 属の研究を行い、これまで 350 種以上の化合物が報告されてきた<sup>7)</sup>。多くの魅力的な二次代謝産物が存在することが明らかになり、特に、プロモピロールアルカロイドが豊富に含まれており、多様な化学構造の宝庫と言える<sup>7)</sup>。また、それらの二次代謝産物は抗がん活性、抗真菌性、抗細菌性、細胞傷害性など様々な生物活性を有することが分かっている<sup>7)</sup>。これらの化合物の多くは、海綿の共生微生物によって生産されていると言われて<sup>8)</sup>が、共生微生物の培養の成功例は非常に少ない。

### 1.4 成人 T 細胞白血病 (ATL) とは

本研究で生物活性試験に用いた S1T 細胞とは、成人 T 細胞白血病 (英名: Adult T-cell leukemia、以下 ATL とする) 患者由来のがん細胞株である。ATL は、HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type I、以下 HTLV-1 と略す) というウイルスが感染することで引き起こされるウイルス性の白血病である。ATL は HTLV-1 が T 細胞に感染後、一般的に約 30~50 年という長い潜伏期間を経て発病する<sup>9)</sup>。キャリアの数は全国で 71.6~82 万人程 (2014~2015 年) 存在し、その約半数が南九州に偏在している<sup>10)</sup>。発症率はキャリアの 3~5% と高くないが<sup>11)</sup>、一度発症すると効果的な化学療法と言われる LSG15 療法を用いても、3 年生存率約 24% と寛解する可能性は低い<sup>12)</sup>。また、抗がん剤や造血幹細胞移植などの治療方法は存在するが、副作用や拒絶反応などの問題も多く、国内においては難治性疾患に分類されている。そのため、新薬の開発および効果的治療法の確立が急務となっている。本研究では、S1T 細胞に対する細胞傷害活性を評価し、化合物の生物活性を調べた。

### 1.5 本研究の目的

前述の通り、ジャノメアメフラシと *Agelas* 属海綿は魅力的な天然物の探索源である。これらの海洋無脊椎動物を用い、多種多様な二次代謝産物を探索するにあたり、2 つの研究目的を立てた。

1 つ目は、新規構造を有する化合物を得ること。特に新規骨格を有する化合物を得ることで、化学構造データベースを拡充し、化合物の多様性に貢献する。

2 つ目は、化合物を生物活性試験 (特に、S1T 細胞に対する細胞傷害活性試験) で評価することで、新規治療薬のリード化合物を発見すること。

このどちらかの目的、あるいはどちらも満たす化合物を単離することを目指して研究を進めた。以下、本研究によって得られた知見について要約した。

## 第2章 沖縄県泡瀬産ジャノメアメフラシ由来の二次代謝産物の単離・構造決定

### 2.1 抽出および単離・精製

ジャノメアメフラシ *A. dactylomela* の中腸腺 (940 g, wet wt.) をメタノール (以下 MeOH と略す) と 50% MeOH/ジクロロメタン (以下 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> と略す) でそれぞれ抽出・ろ過をして、得られた抽出液を減圧濃縮にかけることで抽出物を得た。この抽出物を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> と水 (以下 H<sub>2</sub>O と略す) で二層分配を行い、続けて、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 層をノルマル-ヘキサン (以下 *n*-hexane と略す) と 90% MeOH/H<sub>2</sub>O で二層分配した。H<sub>2</sub>O 層はノルマル-ブタノール (以下 *n*-BuOH と略す) と H<sub>2</sub>O で二層分配した。一次スクリーニングとして、各 4 層の抽出物について S1T 細胞に対する細胞傷害活性を試験したところ、90% MeOH/H<sub>2</sub>O 層に生存率 5% 以下の強力な細胞傷害活性が確認されたため、この層の分離を行うことにした。

90% MeOH/H<sub>2</sub>O 層の一部 (29.4 g 中 9.25 g) をバキュームカラムクロマトグラフィーで分離し、18 個の画分を得た。得られたフラクションのうち強い細胞傷害活性が見られた fr.2、fr.3、fr.4、fr.6、および fr.7 の分離を続けることにした。

**Fr.2** と **fr.3** を混ぜ合わせたもの (410 mg) を分取薄層クロマトグラフィー (英名: Preparative Thin-Layer Chromatography、以下 PTLC と略す) で 11 個のフラクションに分離し、得られた **fr.2-6** (27.3 mg)、**fr.2-7** (55.0 mg) および **fr.2-9** (16.9 mg) を更に分離することにした。

**Fr.2-6** を逆相高速液体クロマトグラフィー (英名: High Performance Liquid Chromatography、以下 HPLC と略す) で分離し、化合物 **13** (1.5 mg) および **fr.2-6-13** (17.8 mg) を得、後者を更に逆相 HPLC で分離することで、化合物 **16** (4.3 mg) を単離した。**Fr.2-7** は、逆相 HPLC で分離し、化合物 **12** (17.4 mg)、化合物 **14** (1.6 mg) および化合物 **22** (0.9 mg) を得た。**Fr.2-9** は、逆相 HPLC で分離し、化合物 **10** (2.2 mg) および化合物 **11** (1.3 mg) を得た。

**Fr. 4** (259 mg) を PTLC で 10 個の画分に分離し、得られた **fr.4-5** (22.2 mg)、**fr.4-6** (61.0 mg)、**fr.4-7** (86.8 mg) および **fr.4-8** (34.2 mg) を更に分離することにした。**Fr.4-5** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **20** (1.3 mg) を得た。**Fr.4-6** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **23** (1.6 mg)、化合物 **24** (0.6 mg)、化合物 **25** (0.8 mg)、化合物 **26** (1.8 mg) を得た。**Fr.4-7** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **1** (12.7 mg)、化合物 **2** (2.9 mg) および化合物 **7** (5.9 mg) を得た。**Fr.4-8** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **27** (1.8 mg)、化合物 **28** (0.7 mg)、化合物 **29** (0.5 mg)、化合物 **30** (1.2 mg) および化合物 **31** (1.7 mg) を得た。

**Fr.6** と **fr.7** を混ぜ合わせたもの (1.70 g) をオープンカラムクロマトグラフィーで分離し、得られた **fr.6-21** (48.0 mg)、**fr.6-23** (31.6 mg)、**fr.6-25** (42.0 mg) および **fr.6-27** (380 mg) を更に分離することにした。**Fr.6-21** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **18** (5.8 mg) を得た。**Fr.6-23** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **19** (3.9 mg) および化合物 **21** (5.5 mg) を得た。**Fr.6-25** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **5** (7.5 mg)、化合物 **15** (3.1 mg) および化合物 **17** (9.3 mg) を得た。**Fr.6-27** を PTLC で 7 個の画分に分離し、得られた **fr.6-27-3** (58.8 mg) を更に逆相 HPLC で分離することで、化合物 **8** (1.0 mg)、化合物 **9** (13.0 mg) および **fr.6-27-3-5** (4.9 mg) を得た。続いて、**fr.6-27-3-5** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **3** (1.4 mg)、化合物 **4** (0.5 mg) および化合物 **6** (0.5 mg) を得た。

以上のように、沖縄県泡瀬産のジャノメアメフラシから 31 種の化合物を単離することができ、そのうち 21 種の化合物について構造解析を行った。非公開情報を含む 4 つの化合物 (3~5、10) を除き、残りの 17 種の化合物について、以下に化学構造を示す。

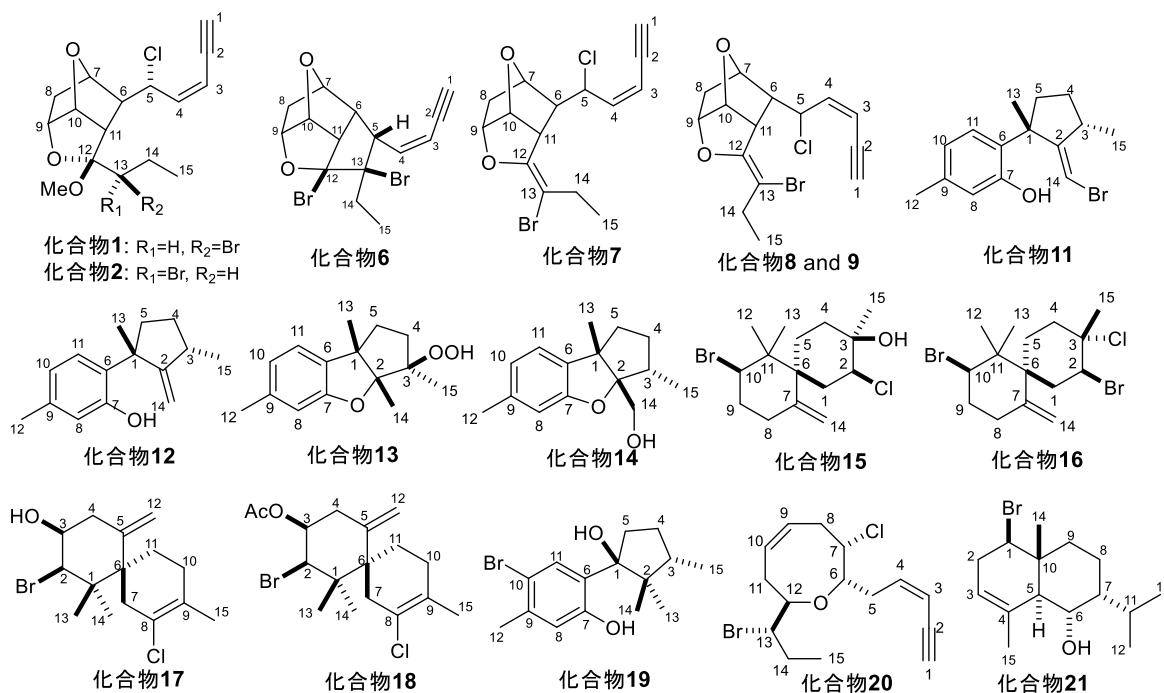


図 1 ジャノメアメフラシから単離した 17 種の化合物の化学構造

## 2.2 構造解析

### 2.2.1 化合物 1 および 2

化合物 1 の  $^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトルにより、共役 enyne や 3 つの oxolane 環を部分構造に持つことが示された。また、oxolane 環と共役 enyne 鎖が C-6 位で結合していることが判明した。続いて、MeO 基が C-12 に結合していることが分かり、更に、C-12 にプロピル基が結合していることが分かった。また、化合物 1 の分子式は HRCIMS で  $m/z$  375.0364  $[M+H]^+$  のイオンピーク、および CIMS の 3 つの同位体ピーク  $m/z$  375、377 および 379 (相対強度 3 : 4 : 1) が観測されることから、塩素原子と臭素原子を 1 つずつ含む  $C_{16}H_{21}BrClO_3$  と決定した。塩素原子と臭素原子の結合位置は化学シフト値から C-5 ( $\delta_C$  58.5、 $\delta_H$  4.84) と C-13 ( $\delta_C$  58.9、 $\delta_H$  3.94) のどちらかであった。CIMS でブロモプロピル基が脱離したフラグメントイオンピーク  $m/z$  253 および 255  $[M-C_3H_6Br]^+$  (相対強度 3:1) が示されたことから C-5 位に塩素原子、C-13 位に臭素原子に結合していることが分かった。以上のように、化合物 1 は oxolane 環、共役 enyne、MeO 基、プロピル基および臭素と塩素を含んだ平面構造を持つと決定した。

化合物 1 の立体化学についても主に NMR 情報を元にして解析した。オレフィン部分の立体配置はカップリング定数  $J_{3,4} = 10.6$  Hz より、*Z* 配置と決定した。次に、oxolane 環部分の相対配置をカップリング定数および NOE 相関を用いて、 $6S^*$ 、 $7R^*$ 、 $9R^*$ 、 $10R^*$ 、 $11S^*$ 、 $12R^*$  と決定した。続いて、化合物 1 の上側の鎖状構造部分の C-5 位の相対配置を検討した。H-5 と H-6 のカップリング定数は 10.2 Hz であり、プロトン間の二面角は  $0^\circ$  または  $180^\circ$  に近いと考えられる。しかし、

0°の場合は、嵩高い側鎖同士が重なるため不安定であることが予想される。実際に、oxolane 環部分の6個の不斉炭素の相対配置を固定し、5位と13位の可能な4つの相対配置 ( $5R, 13R$ )、( $5R, 13S$ )、( $5S, 13R$ ) および ( $5S, 13S$ ) を持つモデル化合物について、複数の初期配座から MM2 計算をしたところ、得られた立体配座の多くは  $180^\circ$  (*trans*型) を取った。また、初期配座を  $0^\circ$  (*cis*型) で MM2 計算をしたところ、スタaggerド配座をとり、かつエネルギーが高く不安定ということが判明したため、*cis*型は取り得ない事が分かった。そのため、H-5 と H-6 は *trans* に位置していると結論付けた。次に、NOESY スペクトルより H-4 と H-11 間に NOE 相関が見られた。5位が *R* 配置の場合は H-4 と H-11 が近づき、*S* 配置の場合は H-4 と H-11 が離れた位置になる。そのため、化合物 **1** の C-5 の相対配置は *R*\* 配置と決定した。下側の鎖状構造についても、Br 基の立体障害の影響で  $13R$  と  $13S$  では異なる安定構造を示すと考えられ、実際、前述の MM2 計算でも得られる安定配座は大きく異なっていた。そこで、化合物 **1** の C-13 位の立体化学を、上側の鎖状構造部分との NOE 相関により検討した。化合物 **1** では、H-3/H-14a、H-14b、H-15 および H-4/H-14a、H-15 間の NOE 相関が観測されることから、両側鎖が近接する安定配座をとると考えられる。実際に、Chem 3D で複数の初期配座を組み MM2 計算をしたところ、 $13R$  の場合は両側鎖が近接する安定配座をとる回数が多く、また、両側鎖が近づかない安定配座を取ったとしてもエネルギーが高く不安定であることが分かった。そのため、化合物 **1** の C-13 位は両側鎖が近接する *R*\* 配置だと決定した。以上により、化合物 **1** の全ての相対配置は  $5R^*$ 、 $6S^*$ 、 $7R^*$ 、 $9R^*$ 、 $10R^*$ 、 $11S^*$ 、 $12R^*$ 、 $13R^*$  と決定した。構造検索の結果、化合物 **1** は新規化合物であることが分かった。

化合物 **2** も同様に構造解析を行い、平面構造、oxolane 環部の相対配置および C-5 位の相対配置は化合物 **1** と同じであると結論付けた。一方、化合物 **2** の2つの鎖状構造部分同士の NOE 相関はほとんど観測されないことから、C-13 位の相対配置が異なると考えた。化合物 **1** と同様に ( $5R, 13S$ ) の立体で、複数の初期配座を組んで MM2 計算を行ったところ、鎖状構造同士が離れる安定構造を示す場合が多数であることが分かった。そのため、化合物 **2** の 13 位は両側鎖が離れる *S*\* 配置だと決定した。以上により、化合物 **2** の全ての相対配置は  $5R^*$ 、 $6S^*$ 、 $7R^*$ 、 $9R^*$ 、 $10R^*$ 、 $11S^*$ 、 $12R^*$ 、 $13S^*$  と決定した。化合物 **2** も新規化合物であった。

## 2.2.2 化合物 3 および 4

非公開

## 2.2.3 化合物 5 および 6

化合物 **5** については非公開。

化合物 **6** の  $^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトルにより、共役 enyne と3つの oxolane 環の存在が判明した。oxolane 環の C-6 と C-11 と C-12 間の三炭素にシクロペンタン環が結合し、シクロペンタン環から側鎖として共役 enyne 鎖とエチレン鎖が結合していることが分かった。また、C-12 ( $\delta_c$  109)、C-13 ( $\delta_c$  91.1) の化学シフト値が、ハロゲンの存在を示唆した。実際、化合物 **6** の分子式は、EIMS により臭素原子を2つ含む  $C_{15}H_{16}Br_2O_2$  と決定した。

オレフィン部分の立体はカップリング定数から *Z* 配置と決定した。oxolane 環部分の6つの相

対配置もカップリング定数により  $6R^*$ ,  $7R^*$ ,  $9R^*$ ,  $10R^*$ ,  $11S^*$ ,  $12S^*$  と決定した。C-5 と C-13 の相対配置は既知化合物 isomaneonene A<sup>13)</sup> との化学シフト値の比較で  $5R^*$ ,  $13R^*$  と決定した。

#### 2.2.4 化合物 7~9

化合物 7~9 は、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルから共役 enyne および 3 つの oxolane 環の存在が分かり、共役 enyne と oxolane 環が C-6 位で結合していることが判明した。また、oxolane 環にビニルエーテルが存在していることが明らかになった。結果、化合物 7~9 は、C<sub>15</sub> アセトゲニンだと明らかになり、それぞれ同じ平面構造をしていることが判明した。化合物 7~9 の分子式は、FABMS により臭素原子と塩素原子を 1 つずつ含む C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と決定した。

化合物 7~9 のオレフィン部分の立体はカップリング定数から *Z* 配置と決定した。化合物 7 の oxolane 環部分の相対配置は、カップリング定数を用いて  $6S^*$ ,  $7R^*$ ,  $9R^*$ ,  $10R^*$ ,  $11S^*$  と決定した。次に、C-12 と C-13 間のオレフィンの幾何異性については、H<sub>2</sub>-14 の 2 つのプロトンの化学シフト値が  $\delta_{\text{H}}$  2.35 と同じであるという特徴を文献値と比較しながら、*Z* 配置と決定した<sup>14)</sup>。

化合物 8 および 9 の相対配置も同様に、カップリング定数を用い  $6R^*$ ,  $7R^*$ ,  $9R^*$ ,  $10R^*$ ,  $11S^*$  と決定した。C-12 と C-13 間のオレフィンの幾何異性については、H<sub>2</sub>-14 の 2 つのプロトンの化学シフト値が  $\delta_{\text{H}}$  2.60 および 2.39 と非等価であるため、*E* 配置と決定した。

化合物 7~9 の C-5 位の立体化学は未決定であるが、*R* と *S* どちらをとったとしても、化合物 7 は *cis*-maneonene B<sup>13)</sup> または *cis*-maneonene D<sup>14)</sup> のどちらかであり、化合物 8 および 9 は *cis*-maneonene A<sup>13-14)</sup> および (12*E*)-lembyne A<sup>15)</sup> であることが分かっている。そのため、化合物 7~9 は全て既知化合物であると決定した。

#### 2.2.5 化合物 10 および 11

化合物 10 については非公開。

化合物 11 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルから三置換ベンゼン環およびエキソメチレンを含んだ五員環を持ち、ベンゼン環と五員環が C-1 と C-6 間で結合していることが判明した。また、C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  115)、C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  102) の化学シフト値から、それぞれハロゲンの存在が示唆された。実際、化合物 11 の分子式は FABMS により臭素 1 つを含んだ C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>BrO と決定した。

次に、化合物 11 の立体化学を NOESY で決定した。C-2 と C-14 のオレフィン部分は *E* 配置を取ることが判明し、また、 $1S^*$ ,  $3S^*$  の相対配置をとることが分かった。以上の結果より、化合物 11 は過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された lauren 型セスキテルペン isolaurenisol<sup>16)</sup> であると判明した。

#### 2.2.6 化合物 12

化合物 12 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、ベンゼン環およびエキソメチレンを含んだ五員環を有することが判明し、ベンゼン環と五員環が C-1 と C-6 間で結合していることが分かった。C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  154) の化学シフト値から OH 基の存在が明らかになった。

C-1 位と C-3 位の不斉炭素の相対配置は、過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された lauren 型セスキテルペン debromisolaurinterol<sup>17)</sup> との化学シフト値の比較で  $1R^*$ ,  $3S^*$  と決定した。

### 2.2.7 化合物 13

化合物 13 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、ベンゼン環および五員環の存在が明らかになり、この二つの環は C-1 と C-6 間で結合することが判明した。C-2 ( $\delta_c$  99.0)、C-3 ( $\delta_c$  94.8)、C-7 ( $\delta_c$  158) の化学シフト値からこれらに酸素が結合していることが分かった。

C-3 位の OOH 基の存在や C-1、C-2 および C-3 の相対配置は、過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された lauren 型セスキテルペン debromo-3 $\beta$ -hydroperoxyaplysin<sup>18)</sup> との化学シフト値の比較で、1*S*<sup>\*</sup>, 2*R*<sup>\*</sup>, 3*R*<sup>\*</sup> と決定した。

### 2.2.8 化合物 14

化合物 14 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、ベンゼン環およびヒドロキシメチル基が結合するシクロペンタン環の存在が明らかになり、この二つの環は C-1 と C-6 間で結合していることが分かった。また、C-2 ( $\delta_c$  99.3)、C-7 ( $\delta_c$  159)、C-14 ( $\delta_c$  63.9) の化学シフト値からこれらに酸素が結合していることが判明した。

C-1、C-2 および C-3 の相対配置は、過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された lauren 型セスキテルペン debromoaplysinol<sup>19)</sup> との化学シフト値の比較で、1*S*<sup>\*</sup>, 2*S*<sup>\*</sup>, 3*S*<sup>\*</sup> と決定した。

### 2.2.9 化合物 15

化合物 15 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、シクロヘキサン環およびエキソメチレンを有するシクロヘキサン環の存在が判明した。この二つのシクロヘキサン環は C-6 で結合するスピロ化合物だと分かった。また、C-2 ( $\delta_c$  67.9)、C-3 ( $\delta_c$  70.4) および C-10 ( $\delta_c$  64.4) の化学シフト値から、OH 基またはハロゲンの存在を示唆した。

化合物 15 の相対配置を NOESY で 2*R*<sup>\*</sup>, 3*S*<sup>\*</sup>, 6*S*<sup>\*</sup>, 10*S*<sup>\*</sup> と決定した。以上の結果より、化合物 15 は、過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された chamigrane 型セスキテルペン hurgadol<sup>20)</sup> と判明した。

### 2.2.10 化合物 16

化合物 16 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、シクロヘキサン環およびエキソメチレンを持つシクロヘキサン環の存在が明らかになった。この二つのシクロヘキサン環は C-6 で結合するスピロ化合物だと分かった。また、C-2 ( $\delta_c$  61.4)、C-3 ( $\delta_c$  71.7) および C-10 ( $\delta_c$  63.6) の化学シフト値から、それぞれ OH 基またはハロゲンの存在を示唆した。

C-2、C-3、C-6、C-10 の相対配置は、過去 *Aplysia* 属アメフラシから単離された chamigrane 型セスキテルペン nidificene<sup>21)</sup> との化学シフト値の比較で、2*S*<sup>\*</sup>, 3*R*<sup>\*</sup>, 6*S*<sup>\*</sup>, 10*R*<sup>\*</sup> と決定した。

### 2.2.11 化合物 17

化合物 17 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、エキソメチレンを持つシクロヘキサン環およびシクロヘキセン環の存在が判明した。この二つの環は C-6 で結合するスピロ化合物であることが分かった。また、C-2 ( $\delta_c$  70.8)、C-3 ( $\delta_c$  72.2) および C-8 ( $\delta_c$  124) の化学シフト値から、OH 基またはハロゲンの存在を示唆した。

C-2、C-3、C-6の相対配置は、過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された chamigrane 型セスキテルペン elatol<sup>22)</sup>との化学シフト値の比較で、 $2R^*$ 、 $3S^*$ 、 $6R^*$ と決定した。

### 2.2.12 化合物 18

化合物 18 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、AcO 基とエキソメチレンが結合しているシクロヘキサン環およびシクロヘキセン環の存在が判明した。この二つの環は C-6 で結合するスピロ化合物であることが分かった。また、C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  73.6) および C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  124) の化学シフト値から、ハロゲンの存在を示唆した。

C-2、C-3、C-6の相対配置は、過去に *Aplysia* 属アメフラシから単離された chamigrane 型セスキテルペン acetyelatol<sup>23)</sup>との化学シフト値の比較で  $2R^*$ 、 $3S^*$ 、 $6R^*$ と決定した。

### 2.2.13 化合物 19

化合物 19 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルより、ベンゼン環およびシクロペンタン環を部分構造に持つことが判明し、この二つ環は C-1 と C-6 間で結合していることが分かった。また、C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  91.7)、C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  154)、C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  113) の化学シフト値から OH 基とハロゲンの存在が示唆された。分子式は、FABMS により臭素 1 つを含む  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrO}_2$  と決定した。

C-1、C-3の相対配置は NOE 相関により  $1S^*$ 、 $3S^*$ と決定した。化合物 19 は過去 *Laurencia* 属紅藻から単離された cuparane 型セスキテルペン laurokamurene D<sup>24)</sup>と判明した。

### 2.2.14 化合物 20

化合物 20 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、二重結合と酸素を一つずつ含んだ不飽和ヘテロ八員環の存在が明らかになった。次に、共役 enyne およびプロピル基が不飽和ヘテロ八員環に結合していることが分かった。C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  64.0) と C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  61.7) の化学シフト値からハロゲンの存在が示唆された。

オレフィン部分の立体はカップリング定数から *Z* 配置と決定した。C-6、C-7、C-12、C-13 の相対配置は、過去 *Laurencia* 属紅藻から単離された  $\text{C}_{15}$  アセトゲニン *Z*-dihydrorhodophytin<sup>25)</sup>との化学シフト値の比較で、 $6S^*$ 、 $3S^*$ 、 $6R^*$ と決定した。

### 2.2.15 化合物 21

化合物 21 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、C-7 にイソプロピル基が結合しているデカリンを部分構造に持つことが分かった。また、C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  67.1) と C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  69.9) の化学シフト値から OH 基とハロゲンの存在が示唆された。実際、化合物 21 の分子式は FABMS により臭素 1 つを含む  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{BrO}$  と決定した。

相対配置を NOESY で  $1R^*$ 、 $5S^*$ 、 $6S^*$ 、 $7R^*$ 、 $10R^*$ と決定した。化合物 21 は、過去に *Laurencia* 属紅藻から単離された eudesmane 型セスキテルペン itomanol<sup>26)</sup>だと判明した。

## 2.3 考察

### 2.3.1 単離化合物の化学構造による分類



今回、沖縄県産ジャノメアメフラシから単離された化合物のうち、化合物 **1**~**5**、**10** の 6 種の化合物は新規化合物であり、それ以外の化合物は過去に *Aplysia* 属アメフラシや *Laurencia* 属紅藻から単離されたことがある既知化合物であることが分かった。これら単離化合物を化学構造で分類すると C<sub>15</sub> アセトゲニン (**1**~**9**)、laurane 型セスキテルペン (**10**~**14**)、chamigrane 型セスキテルペン (**15**~**18**)、cuparane 型セスキテルペン (**19**)、別タイプの C<sub>15</sub> アセトゲニン (**20**)、eudesmane 型セスキテルペン (**21**) に分けられる。

#### 2.3.1.1 C<sub>15</sub>アセトゲニン類

今回単離された C<sub>15</sub>アセトゲニン (**1**~**9**) は、3つの oxolane 環と共役 enyne を持った化合物であり、全てハロゲン化していた。既知化合物である isomaneonene (**6**) および maneonenes (**7**~**9**) を含め、このタイプの C<sub>15</sub>アセトゲニンは、過去 *Aplysia* 属アメフラシや *Laurencia* 属紅藻からその多くが単離されている。

#### 2.3.1.2 Laurane 型セスキテルペン類

今回単離された laurane 型セスキテルペン (**10**~**14**) は、メチルベンゼンとシクロプロパンを持つ化合物であり、ハロゲン化しているものと非ハロゲン化のものが存在している。既知化合物である **11**~**14** のうち、isolaurenisol (**11**) は *Laurencia* 属紅藻と *Aplysia* 属アメフラシの両方から単離されているが、debromoisolaurinterol (**12**)、debromo-3 $\beta$ -hydroperoxyaplysin (**13**)、debromoaplysinol (**14**) は *Aplysia* 属アメフラシから単離されたのは今回が初めてである。

#### 2.3.1.3 Chamigrane 型セスキテルペン類

今回単離された chamigrane 型セスキテルペン (**15**~**18**) は、2つのシクロヘキサンが一つの炭素に結合したスピロ化合物であり、ハロゲンやエキソメチレンを有しているものが多い。過去、nidificene (**16**) および elatol (**17**) は *Laurencia* 属紅藻と *Aplysia* 属アメフラシの両方から単離されているが、hurgadol (**15**) は *Aplysia* 属アメフラシから単離されたのは今回が初めてである。また、acetyelatol (**18**) は *Aplysia* 属アメフラシから単離されたことはあるが、*Laurencia* 属紅藻から単離された報告はなく、アメフラシが elatol を体内でアセチル化している可能性がある。

#### 2.3.1.4 その他の炭素骨格

Cuparane 型セスキテルペン (**19**) はメチルベンゼンとシクロプロパンを持つ化合物である。Laurokamurane D (**19**) は、*Laurencia* 属紅藻から単離報告はあるが、今回アメフラシから単離されたのは初めての報告である。

別タイプの C<sub>15</sub>アセトゲニン (**20**) は、八員環エーテルを部分構造に持っており、そこから側鎖として共役 enyne とプロピル基が結合している。このタイプの C<sub>15</sub>アセトゲニンも過去 *Aplysia* 属アメフラシや *Laurencia* 属紅藻からその多くが単離されている。

Eudesmane 型セスキテルペン (**21**) は、デカリンにイソプロピル基が結合した基本骨格を持つ化合物であり、オレフィンや Br、OH 基を有することが多い。Itomanol (**21**) は、*Laurencia* 属紅藻から単離されているが、アメフラシから単離されたのは今回が初めての報告である。

### 2.3.2 C<sub>15</sub> アセトゲニンの生合成経路

今回単離された新規化合物のうち **1** および **2** は、既知化合物 **7** と類似した化学構造を有していることが分かる。これは、**7** の C-12 と C-13 間のオレフィンが開裂し MeO 基の付加反応がアメンフラシの生体内で起こっているからだと推定した。

## 第 3 章 鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿由来の二次代謝産物の単離・構造決定

### 3.1 抽出および単離・精製

鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿 (2.6 kg, wet wt.) を MeOH と 50% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> でそれぞれ抽出・ろ過をして、得られた抽出液を減圧濃縮にかけることで 193 g の抽出物を得た。この抽出物を AcOEt と H<sub>2</sub>O で二層分配を行い、続けて、AcOEt 層を *n*-hexane と 90% MeOH/H<sub>2</sub>O で二層分配した。H<sub>2</sub>O 層は *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O で二層分配した。得られた 4 つの画分に細胞傷害活性試験を行い、強力な細胞傷害活性が見られた 90% MeOH aq. 層 (約 25 g) について分離を進めることにした。90% MeOH aq. 層の一部 (約 13 g) をバキュームカラムクロマトグラフィーで分離し、13 個の画分を得た。それら画分のうち **fr. 2** (約 1.4 g) に強力な細胞傷害活性が見られたため、オープンカラムクロマトグラフィーで 18 個の画分に分離し、強力な細胞傷害活性を示した **fr. 2-15** (28.3 mg)、化合物 **36** (211 mg) および **fr. 2-28** (206 mg) を得た。**Fr. 2-15** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **32** (1.2 mg)、化合物 **33** (1.6 mg)、化合物 **34** (8.4 mg) を得た。**Fr. 2-28** は、PTLC で分離し、得られた **fr. 2-28-4** (70.2 mg) を更に、分子振るいカラムを取り付けたリサイクル HPLC で分離した。**Fr. 2-28-4-4** を続けて、逆相 HPLC で分離して、化合物 **35** (5.9 mg) を得た。

以上のように、鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿から化合物 **32** (1.2 mg)、**33** (1.6 mg)、**34** (8.4 mg)、**35** (5.9 mg)、**36** (211 mg) の 5 つの化合物を単離することができた。

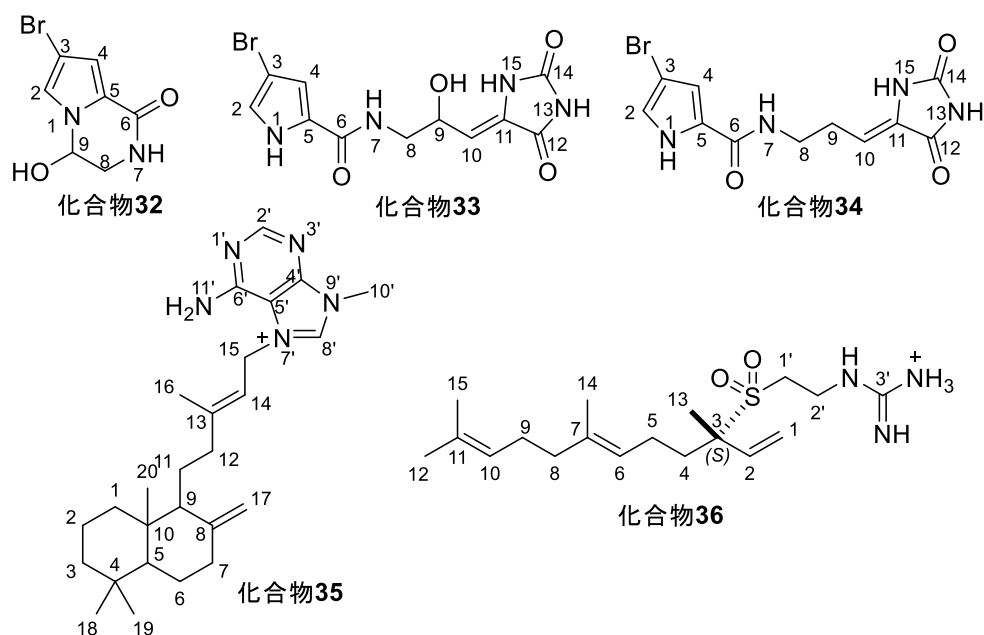


図 2 鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿から単離した 5 種の化合物の化学構造

## 3.2 構造解析

### 3.2.1 化合物 32

化合物 **32** の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、ピロール環および  $\delta$ -ラクタムを部分構造に持つことが分かり、ピロール環と  $\delta$ -ラクタムは N-1 と C-5 間で結合していると結論付けた。また、C-3 ( $\delta$  99.5) と C-9 ( $\delta$  76.8) の化学シフト値からハロゲンと水酸基の存在が示唆された。実際、化合物 **32** の分子式は、FABMS により  $\text{C}_7\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_2$  と決定した。以上の結果より、化合物 **33** は、過去に *Agelas* 属海綿から単離されたブロモピロール型アルカロイド *mukanadin C*<sup>27)</sup> と決定した。

### 3.2.2 化合物 33

化合物 **33** の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、ピロール環およびイミダゾリノン部分を部分構造に持つことが分かり、ピロール環とイミダゾリノンは鎖状構造で繋がっている。また、C-3 ( $\delta$  98.2) と C-9 ( $\delta$  69.3) の化学シフト値からハロゲンと水酸基の存在が示唆された。実際、化合物 **33** の分子式は FABMS により  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrN}_4\text{O}_4$  と決定した。以上の結果より、化合物 **33** は、過去に *Agelas* 属海綿から単離されたブロモピロール型アルカロイド *9-hydroxy mukanadin B*<sup>28)</sup> と決定した。

### 3.2.3 化合物 34

化合物 **34** の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、ピロール環およびイミダゾリノンを部分構造に持つことが分かり、ピロール環とイミダゾリノンは鎖状構造で繋がっている。また、C-3 ( $\delta$  98.2) の化学シフト値からハロゲンの存在が示唆された。実際、化合物 **34** の分子式は FABMS により  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrN}_4\text{O}_3$  と決定した。以上の結果より、化合物 **34** は、過去に *Agelas* 属海綿から単離されたブロモピロール型アルカロイド *mukanadin B*<sup>29)</sup> と決定した。

### 3.2.4 化合物 35

化合物 **35** の HMBC スペクトルにより、エキソメチレンを有するデカリンおよびメチル基が結合したプリン環の存在を明らかにした。続けて、鎖状構造がデカリンとプリン環を繋いでいることが分かった。また、 $\text{H}_3$ -16 ( $\delta$  17.6) の化学シフト値から経験的にオレフィンが *E* 配置と決定した。化合物 **35** の分子式は FABMS により、 $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_5^+$  と決定した。以上の結果より、化合物 **35** は、過去に *Agelas* 属海綿から単離されたテルペンアルカロイド *agelasine D*<sup>30)</sup> と決定した。

### 3.2.5 化合物 36

化合物 **36** の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにより、オレフィンを 3 つ含んだ不飽和の鎖状構造およびグアニジノ基を部分構造に持つことが分かった。化合物 **36** の分子式は HRFABMS により  $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  と決定し、スルホニル基の存在を示唆した。C-3 ( $\delta$  67.9) と C-1' ( $\delta$  45.5) の化学シフト値から、この 2 つの炭素にスルホニル基が結合していることが分かった。以上の結果より、化合物 **36** は、過去に *Agelas* 属海綿から単離されたテルペンアルカロイ

ド agelasidine A<sup>31)</sup>と判明した。

### 3.3 考察

#### 3.3.1 単離された化合物の化学構造による分類

今回、鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿から単離された化合物 **32**~**36** は、過去に *Agelas* 属海綿から単離報告例のある既知化合物であることが分かった。これら単離化合物を化学構造で分類すると mukunadin 類 (**32**~**34**)、agelasine 類 (**35**)、agelasidine 類 (**36**) と分けることができる。

##### 3.3.1.1 Mukunadin 類

Mukunadin 類 (**32**~**34**) は、Br が付加したピロール環を持つプロモピロールアルカロイドであり、今回 mukunadin C (**32**)、9-hydroxy mukunadin B (**33**)、mukunadin B (**34**) を単離した。これら以外にもピロール環に Br が 2 つ以上付加した化合物 (mukunadin D)<sup>32)</sup>、末端にグアニジノ基が結合している化合物 (mukunadin E)<sup>33)</sup> など数多くの mukunadin 類が過去発見されている。

##### 3.3.1.2 Agelasine 類

Agelasine 類は、プリン環とデカリンを部分構造に持つテルペンアルカロイドであり、今回は agelasine D (**35**) を単離した。化合物 **35** 以外にもデカリン内にオレフィンを持つ化合物 (agelasine C)<sup>34)</sup>、デカリンに OH 基が結合する化合物 (agelasine I)<sup>35)</sup> など数多くの agelasine 類が発見されている。

##### 3.3.1.3 Agelasidine 類

Agelasidine 類は、スルホニル基、グアニジノ基および炭化水素鎖を部分構造に持つテルペンアルカロイドであり、今回は agelasidine A (**36**) を単離した。化合物 **36** 以外にも炭化水素鎖の末端に環を持つ化合物 (agelasidine C)<sup>36)</sup>、環構造に更にアルデヒドが結合している化合物 (agelasidine F)<sup>37)</sup> など数多くの agelasidine 類が *Agelas* 属海綿から単離されている。

## 第 4 章 単離された化合物の生物活性

非公開

## 第 5 章 General Discussion

### 5.1 今後の研究課題

今回単離された化合物のうち構造解析を行っていない化合物 **22**~**31** の平面構造と立体について解析を行う必要がある。また、ジャノメアメフランからは、まだ有望な化合物が単離できると見込んでいるため、更なる分離・精製が必要である。

新規化合物および強い活性を示した既知化合物について、絶対配置の決定が必要である。エッ

クス線結晶回析法、有機合成および ECD などを用いて、絶対配置を決定する。

次に、今回 S1T 細胞に対して強い細胞傷害活性が見られた化合物は、その作用機序、抗腫瘍効果、毒性プロファイルを解明するための追加研究が必要である。今後、ATL 治療のための新規薬剤開発の研究として、活性化 T 細胞（正常細胞）との毒性の比較、S1T 細胞以外の ATL 細胞や多剤耐性株への傷害活性試験を行うことで抗腫瘍特性の解明をしていく必要がある。また、ウェスタンブロット法や RT-PCR 法を用いた caspase や PARP などのアポトーシス関連たんぱく質および遺伝子の発現試験や DNA ヒストグラムを用いた細胞周期試験により、アポトーシス誘導メカニズムの解明を行う必要性がある。以上が、本研究に残された課題である。

## 5.2 総括

沖縄県泡瀬産ジャノメアメフラシと鹿児島県竹島産 *Agelas* 属海綿の MeOH 抽出物を分離・精製していき、36 種の化合物を単離することができた。このうち 26 種の化合物を二次元 NMR や MS を用いて構造解析を行うことで、6 種類の新規化合物と 20 種類の既知化合物を得ることができた。立体についてはカップリング定数、NOE 相関を用い、相対配置を明らかにした。既知化合物である化合物 **12**、**13**、**14**、**19**、および **21** は *Aplysia* 属アメフラシから単離された初めての報告である。次に、21 種の化合物の生物活性試験を行い、幾つかの化合物は S1T 細胞に対して強い細胞傷害活性を有していることが分かった。以上が本研究の要約である。

## References

- 1) D.W. Ginsburg et al., Chemical defenses in the sea hare *Aplysia parvula*: importance of diet and sequestration of algal secondary metabolites, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **2001**, *215*, 261–274.
- 2) A. Ianora et al., New trends in marine chemical ecology, *Estuaries Coasts*, **2006**, *29*, 531–551.
- 3) C. Avila, Natural products of opisthobranch molluscs: a biological review, *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **1995**, *33*, 487–559.
- 4) 神尾道也, 総説 アメフラシ類の化学防御機構: 捕食者と同種個体の化学感覚に働く複数の化学物質, *比較生理生化学*, **2012**, *29*, 11–17.
- 5) 鈴木稔, 総説 房総半島に生息する紅藻ソゾ属の化学的多様性, *千葉中央博研究報告特別号*, **2021**, *11*, 25-33.
- 6) M. Jun. Chu et al., Secondary metabolites from marine sponges of the genus *Agelas*: a comprehensive update insight on structural diversity and bioactivity, *RSC Adv.*, **2022**, *12*, 7789–7820.
- 7) H. Zhang et al., Bioactive secondary metabolites from the marine sponge genus *Agelas*, *Mar. Drugs*, **2017**, *15*, 351–379.
- 8) H. Zhang et al., Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms, *Mar. Drugs*, **2017**, *15*, 68.
- 9) O. Hermine et al., A review of new findings in Adult T-cell Leukemia–Lymphoma: a focus on

- current and emerging treatment strategies, *Adv. Ther.*, **2018**, *35*, 135–152.
- 10) 浜口功, 平成 28 年度医療研究開発推進事業補助金成果報告書「HTLV-1 疫学研究及び検査法の標準化に関する研究」
  - 11) 石塚賢治, 成人 T 細胞白血病の診断と治療, *日本内科学会雑誌*, **2017**, *106*, 1397–1403.
  - 12) M. J. M. Rodriguez-Zuniga et al., Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. Review of the Literature, *Actas Dermosifiliogr.*, **2018**, *109*, 399–407.
  - 13) S. M. Waraszkiewicz, C<sub>15</sub> halogenated compounds from the Hawaiian marine alga *Laurencia nidifica*. Maneonenes and isomaneonenes, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 3194–3204.
  - 14) S. E. Nasr et al., Bioactive C<sub>15</sub> Acetogenins from the Red Alga *Laurencia obtuse*, *Chem. Pharm. Bull.*, **2011**, *59*(10), 1294–1298.
  - 15) C. S. Vairappan et al., Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species, *Phytochemistry*, **2001**, *58*, 517–523.
  - 16) J.W. Blunt et al., Sesquiterpenes from the marine red alga *Laurencia distichophylla*, *Phytochemistry*, **1984**, *23*(9), 1951–1954.
  - 17) D. A. Z. Pinet et al., Cytotoxic compounds from *Laurencia pacifica*, *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, *4*, 8.
  - 18) X. L. Li et al., New laurane-type sesquiterpenoids from the Chinese red alga *Laurencia okamurai* Yamada, *Journal of Asian Natural Products research*, **2015**, *17*, 1146–1152.
  - 19) M. S. Chun et al., Sesquiterpenes from Chinese red alga *Laurencia okamurai*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, **2010**, *8*, 321–325.
  - 20) S. E. N. Ayyad et al., Three halogenated metabolites from *Laurencia obtuse*, *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 3193–3196.
  - 21) K. L. Mcphail et al., New halogenated sesquiterpenes from south African specimens of the circumtropical sea hare *Aplysia dactylomela*, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 1618–1623.
  - 22) A. O. Santos et al., Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*, *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 2733–2743.
  - 23) T. Dias et al., Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*, *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 1677–1679.
  - 24) X.Q. Yu et al., A seco-laurane sesquiterpene and related laurane derivatives from the red alga *Laurencia okamurai* Yamada, *Phytochemistry*, **2014**, *103*, 162–170.
  - 25) C. S. Vairappan et al., C-15 halogenated acetogenin with antibacterial activity against food pathogens, *Malaysian Journal of Science*, **2009**, *28*, 263–268.
  - 26) M. Suzuki et al., Brominated metabolites from an Okinawan *Laurencia intricate*, *Phytochemistry*, **2002**, *60*, 861–867.
  - 27) T. Hertiani et al., From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*, 1297–1311.
  - 28) A. Aiello et al., Novel bioactive bromopyrrole alkaloids from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, *14*, 17–24.

- 29) H. Uemoto et al., Mukanadin A-C, new bromopyrrole from marine sponge *Agelas nakamurai*, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 1581–1583.
- 30) L. L. Gundersen, Synthesis and biological activities of marine terpene-adenine hybrids and synthetic analogs, *Phytochem. Rev.*, **2013**, *12*, 467–486.
- 31) H. Nakamura et al., Agelasidine-A, a novel sesquiterpene possessing antispasmodic activity from the okinawa sea sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron Letters*, **1983**, *24* (38), 4105–4108.
- 32) J. F. Hu et al., Bromopyrrole alkaloids from the Jamaican sponge *Didiscus oxeata*, *Journal of chemical research*, **2005**, 427–428.
- 33) T. Yasuda et al., Bromopyrrole Alkaloids from Marine Sponges of the Genus *Agelas*, *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 488–491.
- 34) H. Wu et al., Structures of Agelasines, diterpenes having a 9-methyladeninium chromophore isolated from Okinawan marine sponge *Agelas nakamurai* Hoshino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, *59*, 2495–2504.
- 35) X. Fu et al., Agelasines H and I, 9-methyladenine-containing diterpenoids from an *Agelas* sponge, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 548–550.
- 36) H. Nakamura et al., Agelasidines. Novel hypotaurocyamine derivatives from the okinawan sea sponge *Agelas nakamurai* Hoshino, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2494–2497.
- 37) E. P. Stout et al., Antifungal diterpene alkaloids from the caribbean sponge *Agelas citrina*: Unified configurational assignments of agelasidines and agelasines, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 5131–5135.