

MS によりキノコ類の機能性分子の構造を探る¹⁾

沢辺昭義*, 岡本 忠**

Characterization of Functional Molecules Isolated from Mushrooms by Mass Spectrometry

Akiyoshi SAWABE* and Tadashi OKAMOTO**

Synopsis

Fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry is a powerful tool for analyzing the structure of natural functional molecules. Analyses in the positive and negative ion modes, provide different data. Although some of structural information is available from routine FAB mass spectra, more detailed information is provided by the linked scan spectra. In this communication, recent advances in this field are briefly reviewed focussing on the structural elucidation of functional molecules isolated from mushrooms by FAB mass spectrometry.

I はじめに

大昔から人間は、微生物を生体触媒として利用してきた。発酵工業はその一例であり、酒・味噌・醤油をはじめ抗生物質など有用物質を生産する産業である。つまり、微生物の2次代謝産物として、人間にとって有用な物質、他の生体機能を調節・制御する分子を種々生産している。その中には、複雑な構造の分子も多数含まれる。キノコは、菌類の形成する子実体（胞子形成器官）であって、多数の複雑な成分が含まれており、多くの報告がある。最近、多くのキノコが、機能性食品などの食品素材や薬品開発素材として注目され、バイオ技術の導入対象として期待されている。

近年、化学成分の分離分析が高度に発展し、化学構造の解析技術が発達するにともなう、複雑な化合物の構造が容易にわかるようになってきた。本稿では、その一例として、最近、生化学や分子生物学の分野において有用性が増しているMS（質量分析）

法を用いたキノコ成分の構造解析について、著者らの研究事例を挙げながら、MSがどのように利用されるかを紹介する。

II MS（質量分析）とは

質量分析（Mass Spectrometry, MS）法^{2,3)}とは、分子をイオン化してできる親イオン（分子イオン）とそれが開裂して生ずる種々のフラグメントイオンの質量数およびその強度を測定し、分子量、分子式および結合の開裂様式の推定を通じて分子構造の決定を行う分析法である。質量分析法の利点は、ng~μg (10^{-9} ~ 10^{-6} g) オーダーの試料で測定できることであり、生化学や天然物化学分野では非常に有用な機器である。また、他の分析手段、例えばNMR（核磁気共鳴）と併用すると、構造決定は信頼度も向上し、より容易となる。

これまでに質量分析は、主に気化できる低分子の有機化合物の構造解析、定量に用いられてきたが、

* 近畿大学 農学総合研究所 (Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)

** 近畿大学農学部 農芸化学科 (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, and Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)

Table 1. Soft ionization

方 法	発見者	年代	略称
1. 電子衝撃 (electron ionization/electron impact)	Dempster	1921	EI
2. レーザー脱離 (laser desorption)	Honig, Woolston	1963	LD
3. 化学イオン化 (chemical ionization)	Field, Munson	1965	CI
4. 電界脱離 (field desorption)	Beckey	1969	FD
5. エレクトロハイドロダイナミックイオン化 (electrohydrodynamic ionization)	Evance	1974	EHD
6. 分子二次イオン質量分析 (secondary ion mass spectrometry)	Berninghoven	1975	SIMS
7. 液体イオン化 (liquid ionization)	Tsuchiya	1978	LI
8. サーモスプレー (thermospray ionization)	Vestal	1980	TSI
9. 高速原子衝突 (fast atom bombardment)	Barbar	1981	FAB

近年ソフトイオン化法 (Table 1) の進歩により、タンパク質のような分子量数万ないし数十万の巨大分子の分子量の決定、ペプチドや多糖類の構成単位の配列決定にも応用されるようになった。従来の電子衝撃 (electron ionization もしくは electron impact, EI) 法は、揮発性の化合物の場合は構造解析に対して情報量が多いという利点があり、GC (ガスクロマトグラフィー) と EI を直結した GC/EI 法が多用されて、ステロイドのような生理活性をもつ低分子化合物に適用される。しかし、難揮発性の化合物 (複合脂質や糖関連化合物) の場合、EI 法で測定するには揮発性を向上させるために誘導体化や分解を行わなければならなかった。その後、分子量が大きく、難揮発性、熱的不安定な化合物に適用できる方法として、1969年 Beckey らにより FD (field desorption, 電界脱離) 法が開発され、天然物化学で多用されてきた。しかし、操作上でフィラメントがよく切れるといった欠点があり、1981年 Barber らにより発見された FAB (fast atom bombardment, 高速原子衝突) 法あるいは Dole, Fenn らにより発見された ESI (electrospray ionization) 法が現在もっとも多く使用されている。FAB 法は、分子量が3000以下の化合物について利用され、構造情報を与えるフラグメントイオンが検出される。ESI 法は、分子量が15万以下のタンパク質のような化合物に利用されるが、一般にフラグメントイオンは検出されず、分子量の決定に有用である。ソフトイオン化による MS 法は、ほかの構造解析法と比較して化合物を誘導体化や分解せずそのままの状態での測定できる分析

法として、最近、生化学や分子生物学の分野における有用性が増している。

III CID-MS/MS 法と B/E 一定リンクド スキャン法

FAB/MS スペクトルでは、一般にフラグメントイオンを検出するが、低質量領域には多数のマトリックス由来のイオンが出現し、試料由来のフラグメントイオンを確認しにくいことが多い。CID-MS/MS や B/E 一定リンクドスキャン法はフラグメントイオンの解析に有用である。

タンデム MS (MS/MS) とは、2 台の質量分析計 (MS) を用いて、1 台目の MS で親イオンを選別して、そのイオンだけを 2 台目の MS で測定する方法である。また、タンデム MS で 2 台目の MS を測定する前にヘリウムあるいはアルゴンなどの不活性ガスと衝突室中で衝突させて強制的に解離させ (Collision-induced dissociation, CID)、生じたイオンを 2 台目の MS で測定する方法を CID-MS/MS 法と呼ぶ。

B/E 一定リンクドスキャン法とは、電場電圧と磁場強度を連動させてスキャンすることにより、1 台の二重収束質量分析計を用いて MS/MS を可能にする方法である。

IV 発芽誘導物質

キノコは、栄養増殖期では普通のカビと同じ菌糸の状態で成長し、光・温度・湿度・栄養などの一定の条件が満たされると子実体を形成する。Fig. 1に

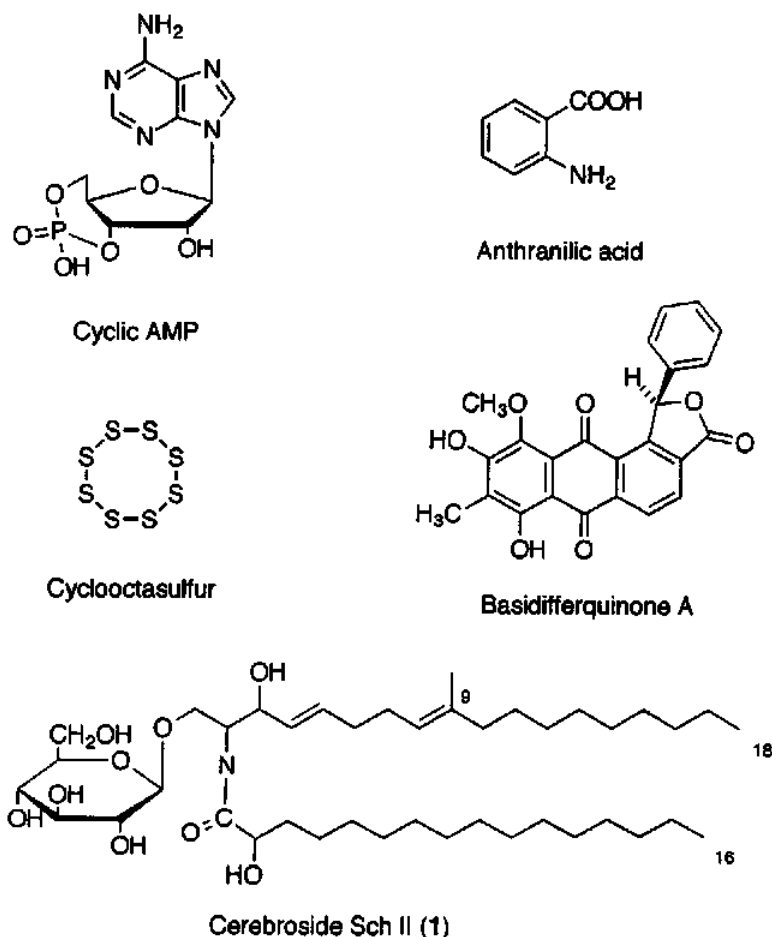


Fig. 1. Compounds having a property to induce fruiting of mushroom.

子実体形成因子として今まで知られている物質の例を示す。その中で、セブレロシド Sch II (1) は、1982 年 Kawai ら⁴⁻⁷⁾ により、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) の培養中にアオカビ (*Penicillium funiculosum* A-1) が混入生育すると、両菌の接触部分にスエヒロタケの子実体が多数形成されるという現象から見出された。結果としてアオカビの菌糸、スエヒロタケの菌糸、両菌に子実体形成を誘導する物質が存在することを発見された。このセブレロシド Sch II (1) は、20 ng/ml の濃度でスエヒロタケの子実体形成を誘導する。

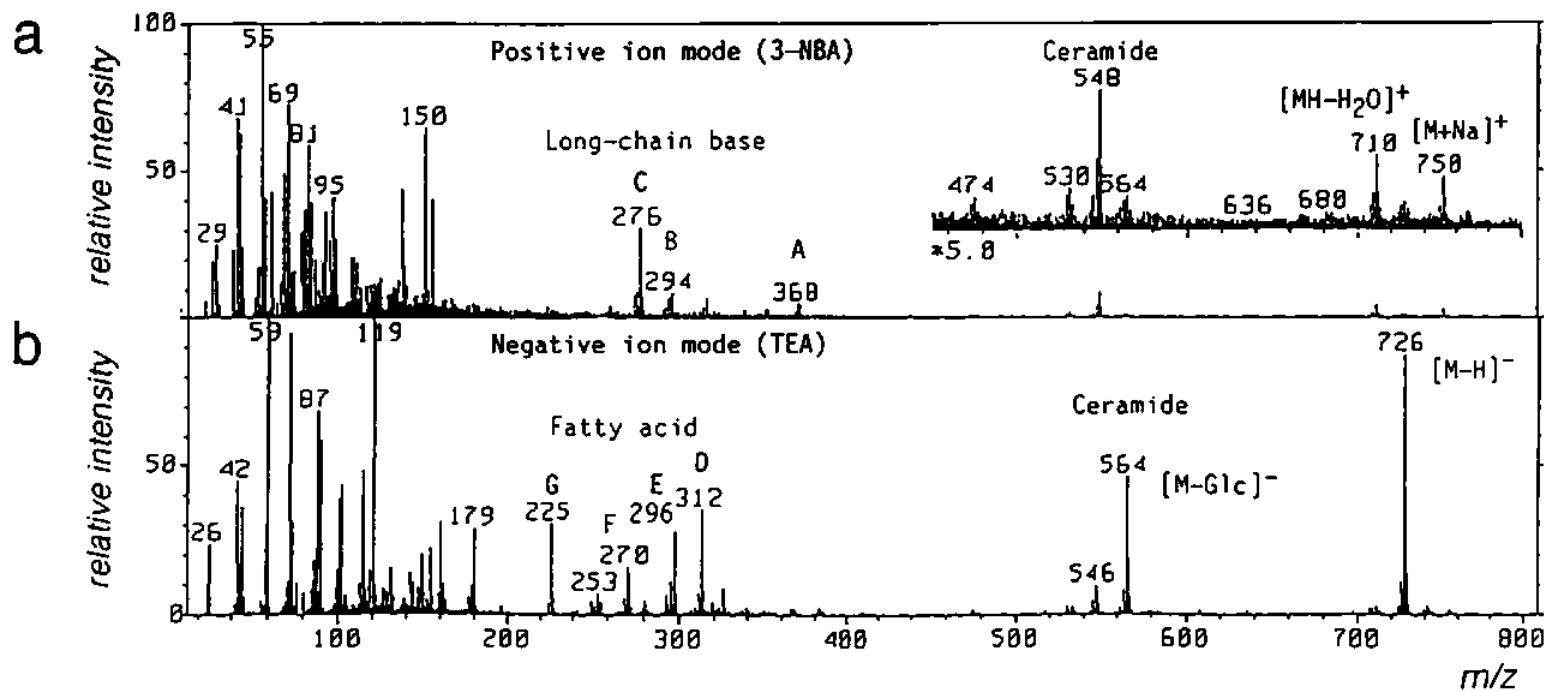
著者らもブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) あるいは楡黄麻 (*Pleurotus citrinopileatus*) より、このセブレロシド Sch II (1) を得、その構造解析を

FAB/MS によって行った⁸⁾。

Fig. 2 にセブレロシド (1) の正および負イオン FAB/MS スペクトルを示す。スフィンゴ脂質の場合^{9,10)}、正イオンモードの FAB/MS スペクトル (Fig. 2a) には

- (i) 分子量を示すイオン (または偽分子イオン)
 - (ii) セラミドを示すイオン
 - (iii) Long-chain base を示すイオン
- の 3 つのイオンが特徴的に観測される。

化合物 1 の場合、(i) の偽分子イオンは、 m/z 750 に $[\text{M}+\text{Na}]^+$ のイオン、 m/z 710 に $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ のイオンとして観測される。通常は $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観測されるのが、天然物より分離した場合は $[\text{M}+\text{Na}]^+$ のイオンとして観測されることが多い。



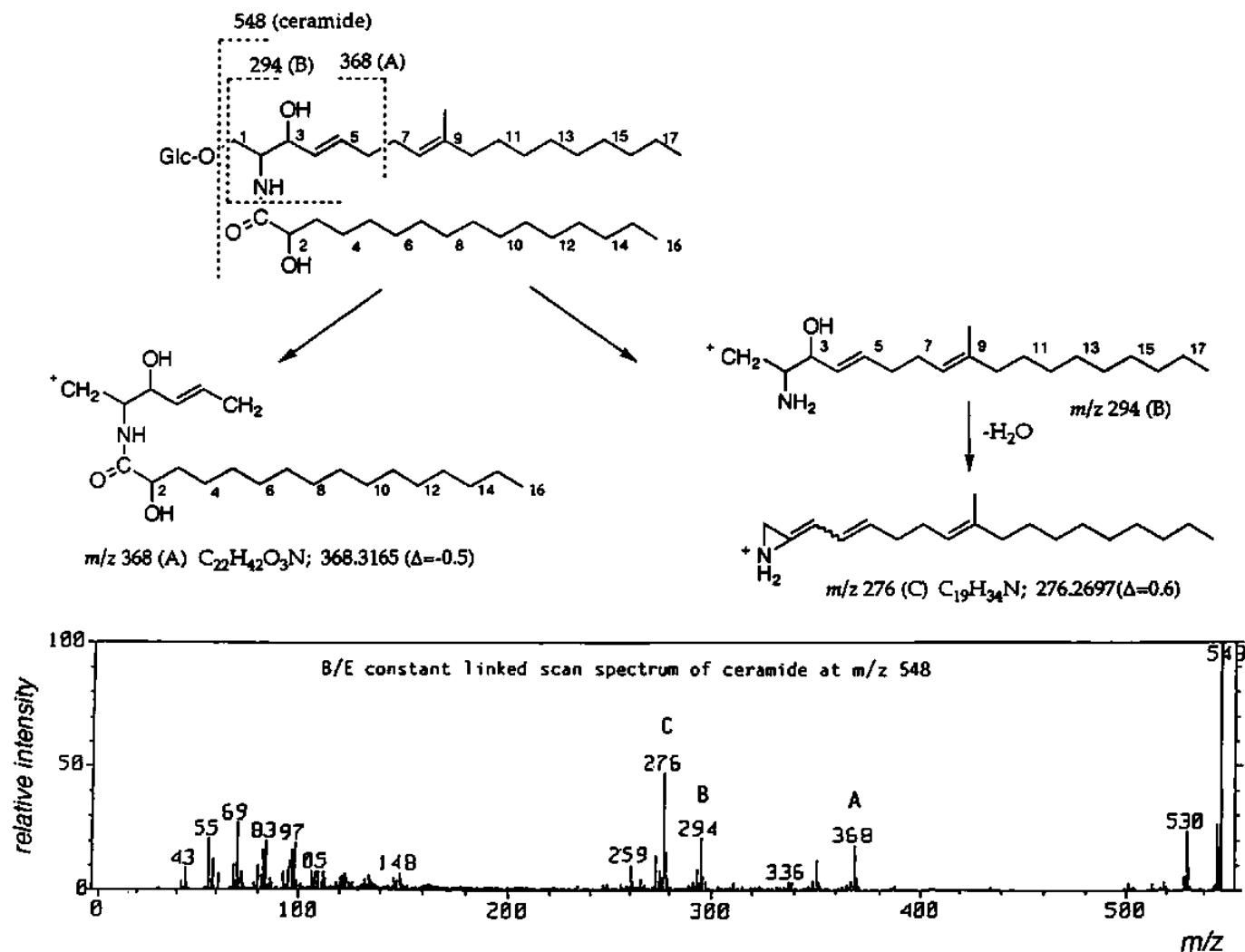


Fig. 3. B/E constant linked scan spectrum of $[MH-GlcOH]^+$ ion at m/z 548 in positive ion mode FAB mass spectrum of 1.

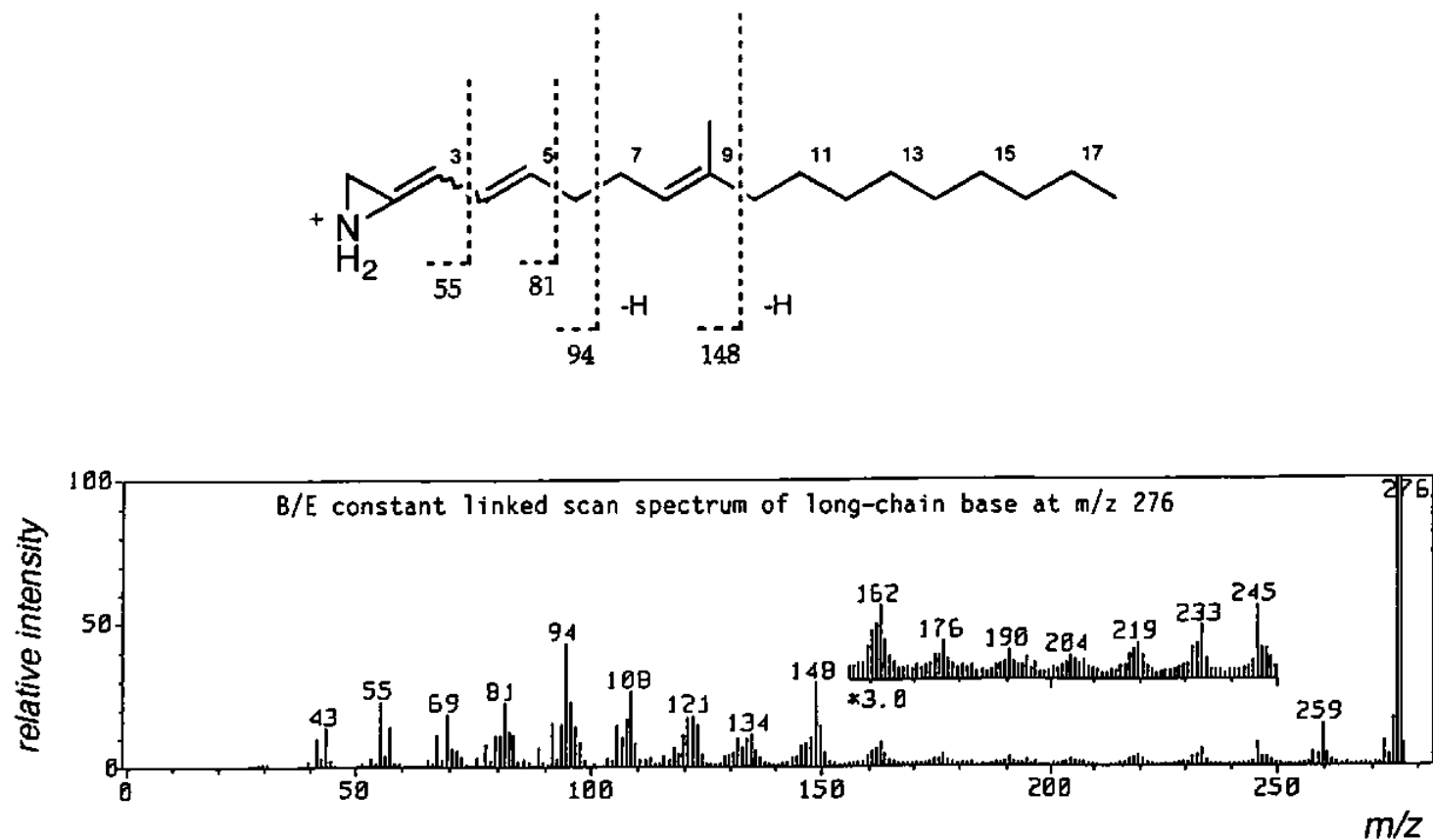


Fig. 4. B/E constant linked scan spectrum of $[C_{19}\text{-sphingadienine} + H-H_2O]^+$ ion at m/z 276 in positive ion mode FAB mass spectrum.

したがって、分子量は727と推定される。化合物1では、(ii)のセラミドを示すイオンは、偽分子イオンより180少ない m/z 548に $[MH-GlcOH]^+$ として観測されている。このセラミドイオン (m/z 548) の B/E 一定リンクドスキンを測定すると Fig. 3 に示すように2個の二重結合の各々のアリル位に相当する位置の結合の開裂が m/z 368(A)に、またアミド位の開裂が m/z 294(B)に、さらに脱水により m/z 276(C)にそれぞれ特徴的なイオンピークが認められる。これらの部分構造を確認する目的で、HR-FAB/MS(高分解能 FAB/MS)を測定した結果、 m/z 368は $C_{22}H_{42}O_3N$ の組成を、 m/z 276は $C_{18}H_{34}N$ の組成を有することが判明し、Fig. 3 に示す開裂構造を有することが確かめられる。(iii)の Long-chain baseを示すイオンは、化合物1の場合、 m/z 294に $[C_{18}\text{-sphingadienine}+H]^+$ のイオン、 m/z 276に $[C_{18}\text{-sphingadienine}+H-H_2O]^+$ のイオンとして観測される。また、HR-FAB/MSの結果は、Long-chain baseに二重結合を2個もつ部分構造があることを示している。このことは化合物1の 1H - 1H COSY スペクトルからも確認される。すなわち、 δ 1.50 ppm (3H, s, C19) にビニルメチル基、1.97 ppm (4H, C6 and C7) にアリル位のメチレンが観測されるほか、5.20 (1H, br. s, C8), 5.39 (1H, dd, $J=15.5, 7.1$ Hz, C4) および5.66 ppm (1H, br. d, $J=15.5$ Hz, C5) にオレフィンプロトンが観測される。つぎに二重結合の位置を決定する目的で m/z 276の B/E 一定リンクドスキンスペクトルを測定した。Fig. 4 に示すように m/z 94, 148のイオンが他のイオンに比べて強い強度で認められるほか、 m/z 55, 81のイオンが認められ、長鎖アルキル基の不飽和結合の位置をよく反映していることから、

Long-chain baseの構造は9-methyl- C_{18} -sphinga-4,8-dienineと決定される。

負イオンモードの FAB/MS (Fig. 2b) スペクトルには

- (i) 分子量を示すイオン (または偽分子イオン)
- (ii) セラミドを示すイオン
- (iii) 脂肪酸を示すイオン

の3つの特徴的なイオンが観測される。

(i)の偽分子イオンは、化合物1の場合、Fig. 2b に示すように m/z 726に $[M-H]^-$ のイオンとして観測され、分子量は727と確認される。(ii)のセラミドを示すイオンは、化合物1の場合、 m/z 564に $[M-Glc]^-$ のイオン、 m/z 546に $[M-H-GlcOH]^-$ のイオンとして観測される。(iii)の脂肪酸を示すイオンは、化合物1の場合、Fig. 5 に示すように m/z 312 (D), 296(E), 270(F), 225(G)に観測され、それぞれの HR-FAB/MS の測定結果からも分かるように化合物1の脂肪酸部は2-hydroxyhexadecanoic acidと判定される。

以上の諸事実から、化合物1は(4E, 8E)-*N*-2-hydroxyhexadecanoyl-1-*O*- β -glucopyranosyl-9-methyl- C_{18} -sphinga-4, 8-dienine (セブレロシド Sch II) と決定される。

なお、著者らは、化合物1のセブレロシドの FAB/MS の構造解析に際して、菌類などに広く分布している9-methyl- C_{18} -sphinga-4, 8-dienineを有するセブレロシド¹¹⁻¹⁴⁾の構造決定を、簡単に行うことができる情報を得た¹⁵⁾。その概略を下記する。

- (1) 正イオンモードの m/z 276および294のフラグメントイオンピークは9-methyl- C_{18} -sphinga-4, 8-dienineの存在を示す。
- (2) 9-methyl- C_{18} -sphinga-4, 8-dienineをもつセ

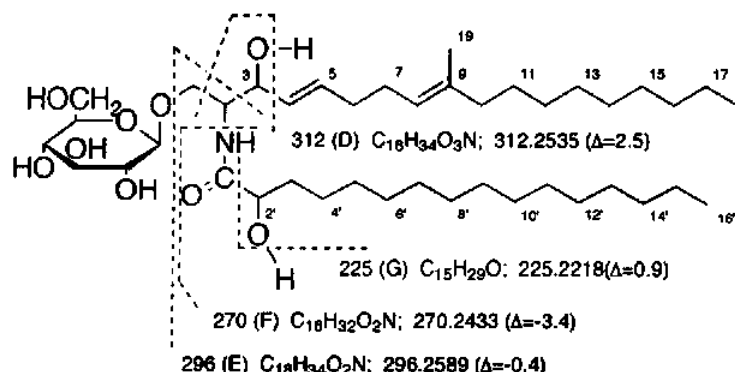


Fig. 5. Negative ion mode FAB data and HR-FAB mass spectra of 1.

レプロシドにおける脂肪酸の炭素数は正イオンモードの [ceramide-180]⁺ のフラグメントイオンから計算することができる。

また、著者らはブナシメジから新しいタイプのスフィンゴリン糖脂質¹⁰⁾ (Fig. 6) を見出し、上述の方法で構造解析に成功した。同時に、それらの構造に関わる MS スペクトルの特性を得ることができた。すなわち、B/E 一定リンクドスキャン法を用いた FAB/MS スペクトルでホスホジヘキソースおよびホスホヘキソースを含むファイトスフィンゴシンは、特徴的なイオンピークをそれぞれ m/z 421 および 720 に与えることが明らかとなった。それらの生理活性について現在検討を行っている。

V 発光物質

キノコの発光は、古くから知られていた生物現象である。Fig. 7 にキノコの発光物質の例を示す。ツキ

ヨタケ (*Lampteromyces japonicus*) の発光物質は、Nakanishi ら¹⁷⁻²⁰⁾ によりラテンブテオールや ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one であると報告された。最近、Isobe ら²¹⁻²⁶⁾ は、ツキヨタケの発光物質が不安定な緑色の蛍光物質、ランブテロフラビンであることを見出した。この物質の構造を、Isobe らは FAB/MS および CID-MS/MS を用いて容易に決定している。すなわち、Fig. 8 に示すように化合物 6 の正イオンモードの FAB/MS には m/z 509 に偽分子イオン $[M+H]^+$ に基づくイオンピークが認められ、分子量は 508 と確認される。この偽分子イオン m/z 509 の CID-MS/MS には m/z 377 には [riboflavin]⁺ に、376 には [riboflavin+H]⁺ に、また 243 には [isoalloxazine ring]⁺ に由来するイオンが観測された。また、化合物 6 の酸加水分解を行って、得られた加水分解物 6a の正イオンモード FAB/MS には、 m/z 377 に偽分子イオン $[M+H]^+$

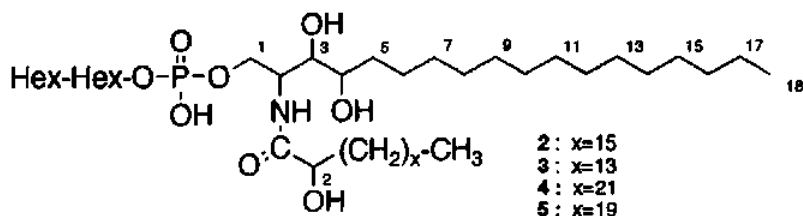


Fig. 6. Structures of glycosyl phosphosphingolipids.

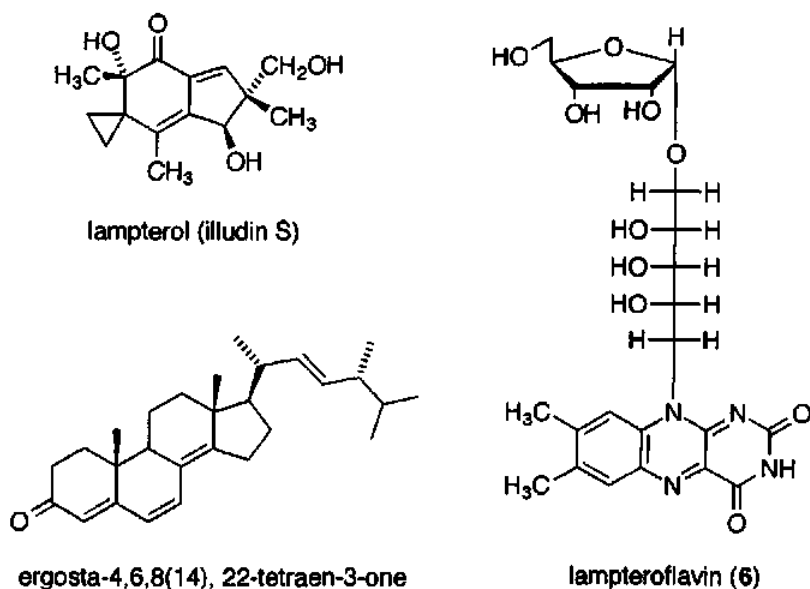


Fig. 7. Light emitters in bioluminescence of moon night mushroom.

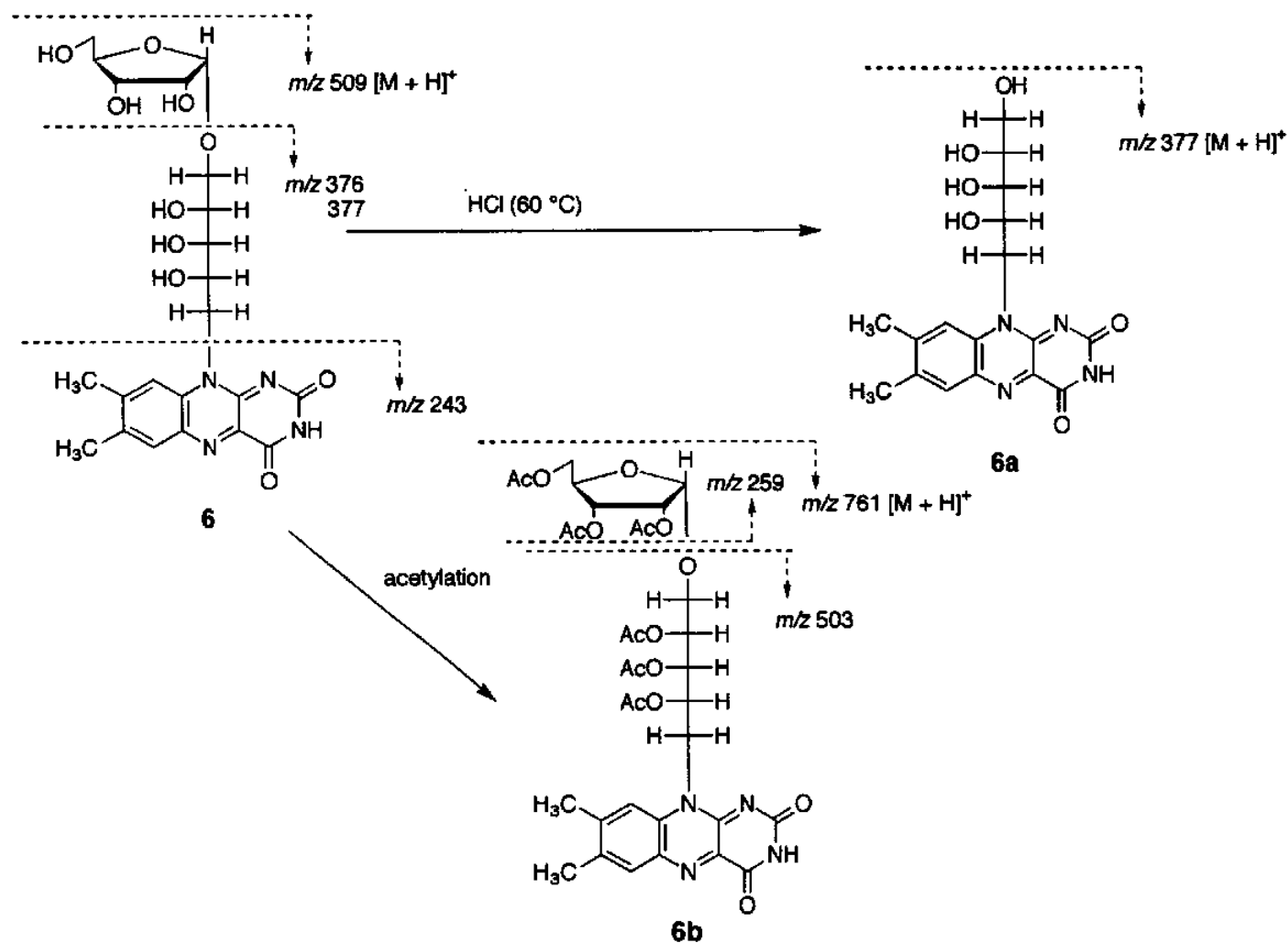


Fig. 8. FAB data for lampteroflavin (6).

に基づくイオンピークが認められることから, 6a の分子量は376と確認される。6a の分子量は, 上述した化合物6の分子量より132少ないことからデヒドロペントースの存在が確認される。さらに化合物6のアセチル化で得られたアセチル体6bのFAB/MSには $[M+H]^+$ に由来するイオンが m/z 761に, $[\text{riboflavin triacetate}+H]^+$ に由来するイオンが m/z 503に, および $[\text{deacetoxy-pentose acetate}]^+$ に由来するイオンが m/z 259に, それぞれ認められた。 m/z 259フラグメントのCID-MS/MSは, 標品の ribofuranoside と比較した結果, 強度比が一致した。

以上の諸事実ならびにNMRスペクトルから, 化合物6はリボフラビンの5'位にリボースが α -結合した構造と決定している。

このIsobeらの研究により, Nakanishiらの報告中にあるツキヨタケの発光物質がラテンブテオール(イルジルS)でなく, その構造は新たに見出された5'- α -D-ribofuranosyl flavin(ランブテロフラビン)と確認された。

VI 苦味物質

苦味を有するキノコには, 霊芝(マンネンタケ, *Ganoderma lucidum*), コフキサルノコシカケ(*Ganoderma applanatum*), オオワライタケ(*Gymnopilus spectabilis*), ヒトクチャタケ(*Cryptoporus volvatus*), ケロウジ(*Sarcodon scabrosus*), ニガクリタケ(*Naematoloma fasciculare*)などがある。Fig. 9にそれらの苦味物質の例を示す。その中で, ギムノピリン類は, 1983年Nozoeら²⁰⁾ならびにAoyagiら²¹⁾により, ほぼ同時期に, 神経系統を侵し幻覚作用を引き起こす毒キノコ, オオワライタケの苦味物質として見出された。ギムノピリンは, 直鎖のポリイソブレンポリオールの基本構造を有し, 末端の水酸基は3-メチル-3-ヒドロキシグルタル酸とエステル結合を形成しており, 上記毒性を示さない。また, きほど強くないが抗腫瘍活性を有するとの報告がある^{22,23)}。

著者らは, プナシメジ(*Hypsizygus marmoreus*)よりギムノピリンの前駆体と考えられる物質 (Fig. 10)を得ており, その構造解析をFAB/MSによって

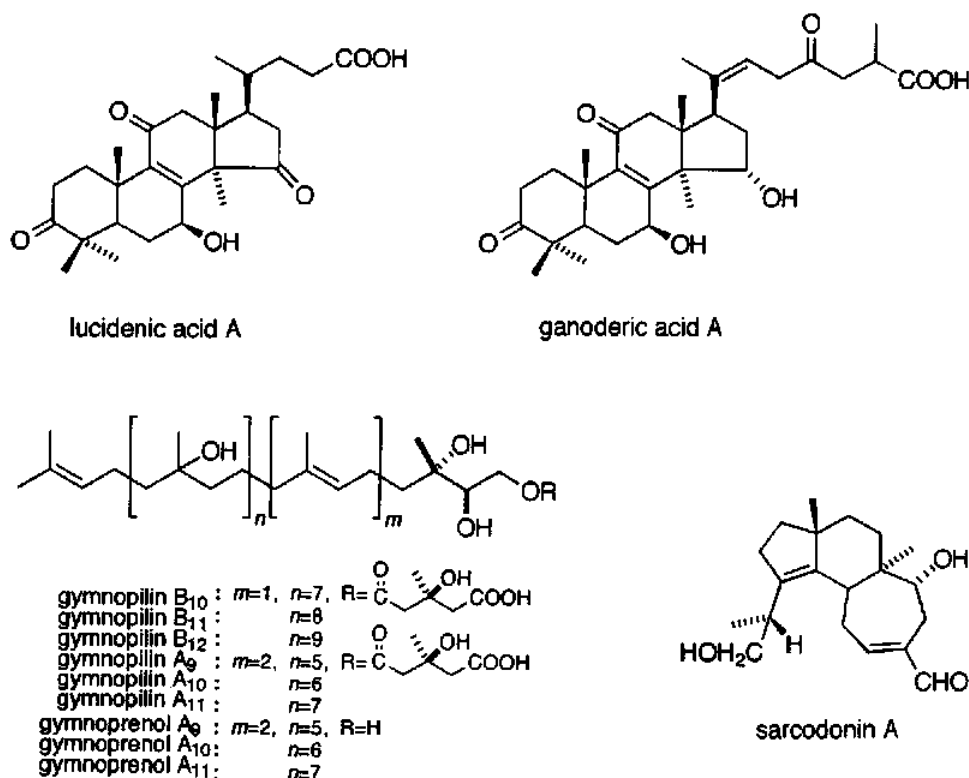
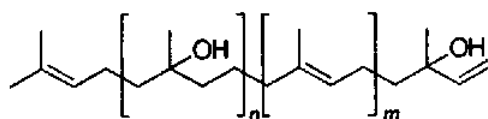


Fig. 9. Compounds having a bitter principle of mushroom.



7a:	m=1, n=5	hypsiziprenol A ₉
b:	n=6	hypsiziprenol A ₉
c:	n=7	hypsiziprenol A ₁₀
d:	n=9	hypsiziprenol A ₁₂
e:	n=10	hypsiziprenol A ₁₃
f:	n=11	hypsiziprenol A ₁₄
8a:	m=2, n=4	hypsiziprenol B ₉
b:	n=5	hypsiziprenol B ₉
c:	n=6	hypsiziprenol B ₁₀
d:	n=8	hypsiziprenol B ₁₂
9a:	m=3, n=4	hypsiziprenol C ₉

Fig. 10. Structures of precursor of gymnopilins (polyisoprenepolyols).

行った³⁰⁾。

Fig. 11にポリイソブレンポリオール7bの正および負イオンFAB/MSスペクトルを示す。化合物7bの負イオンモードのFAB/MSスペクトル (Fig. 11a) には

- (i) 分子量を示すイオン(または偽分子イオン)
- (ii) 脱86を示すイオン

の2つのイオンが特徴的に観測される。

(i)の偽分子イオンは、化合物7bの場合、 m/z 737に $[M-H]^-$ のイオンとして観測され、分子量は738と確認される。(ii)の脱86を示すイオンは、化合物7bの場合、 m/z 469 $[M-H-182-86]^-$ のイオン、 m/z 383 $[M-H-182-(86)_2]^-$ のイオンとして観測される。このことと一致して、化合物7bの¹³C-NMRスペクトルには δ 18.08(t), 26.94(q), 42.30(t)および72.80(s)にポリイソブレンの部分構造を示すシグナルが、他のシグナルと比べて強い強度で認められる。つぎにイソブレンの配列を決定する目的で m/z 737のB/E一定リンクドスキャンスペクトルを測定した。その結果、 m/z 667, 555, 469, 383, 297, 213, 153, 125, 57に特徴的なイオンが認められた。帰属をFig. 12に示す。

正イオンモードのFAB/MS (Fig. 11b) スペクトルには

- (i) 分子量を示すイオン(または偽分子イオン)
- (ii) 脱水を示すイオン

の2つの特徴的なイオンが観測される。

(i)の偽分子イオンは、化合物7bの場合、Fig. 11bに示すように m/z 739に $[M+H]^+$ のイオンとして観測され、分子量は738と確認される。(ii)の脱水を示すイオンは、化合物7bの場合、 m/z 613に観測される。このことは、Fig. 13に示すように偽分子イオン m/z 739のB/E一定リンクドスキャンスペクトルから確認され、また、 m/z 613のHR-FAB/MSの測定結果からも明らかである。したがって、化合

物7bの m/z 613のイオンは、 $[MH-(H_2O)_7]^+$ と帰属され、化合物7bの水酸基の数が、7個と判明する。

以上の諸事実ならびにNMRスペクトルに基づいて構造を決定し、化合物7bをhypsiziprenol A₉と命名した。他の関連化合物についても同様に構造解析を行った結果、Fig. 10に示すように炭素数40~70のイソブレンの同族体であることが判明した。

なお、著者らは、Fig. 10に示す化合物の構造解析から、ポリイソブレンポリオール類の構造決定を簡単に行うことができる情報を得た。その概略を下記する。

- (1) 従来NMRスペクトルでは得られなかったイソブレンの数のイソブレンの配列は、負イオンモードのFAB/MSおよびB/E一定リンクドスキャン法によって容易に求めることができる。
- (2) ポリイソブレンポリオールの水酸基の数は、正イオンモードの $[MH-(H_2O)_n]^+$ のフラグメントイオンから計算することができる。

VII おわりに

キノコ類の機能性分子の構造解析において、FAB/MSが有効な手法であることを示した。また、FAB/MSを用いることによって、上述の化合物の構造特性を探ることができる。すなわち、従来は化合物を誘導体化や分解し、EI法で測定していたが、本方法ではそのままの状態でも測定できる。さらに正、負イオンモードによってそれぞれ異なる情報を得ることができ、その情報を総合的に利用して構造解析が行える。本方法は上述の化合物以外にも、核酸やペプチド、タンパク質の構造解析にも適用され、その有用性が認められている³¹⁻⁴²⁾。

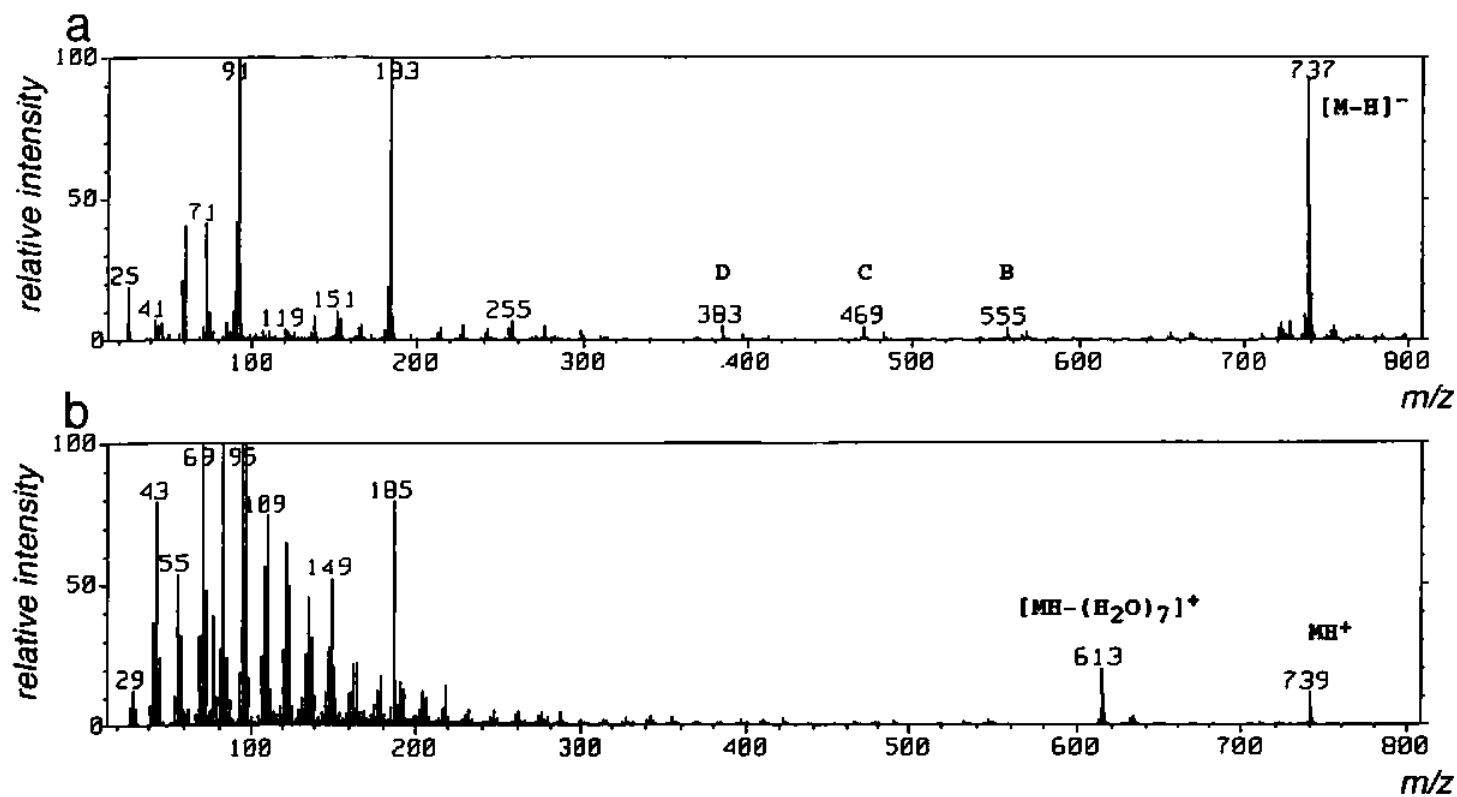


Fig. 11. FAB mass spectra of polyisoprenepolyol 7b: (a) negative ion mode (matrix: glycerol), (b) positive ion mode (matrix: glycerol).

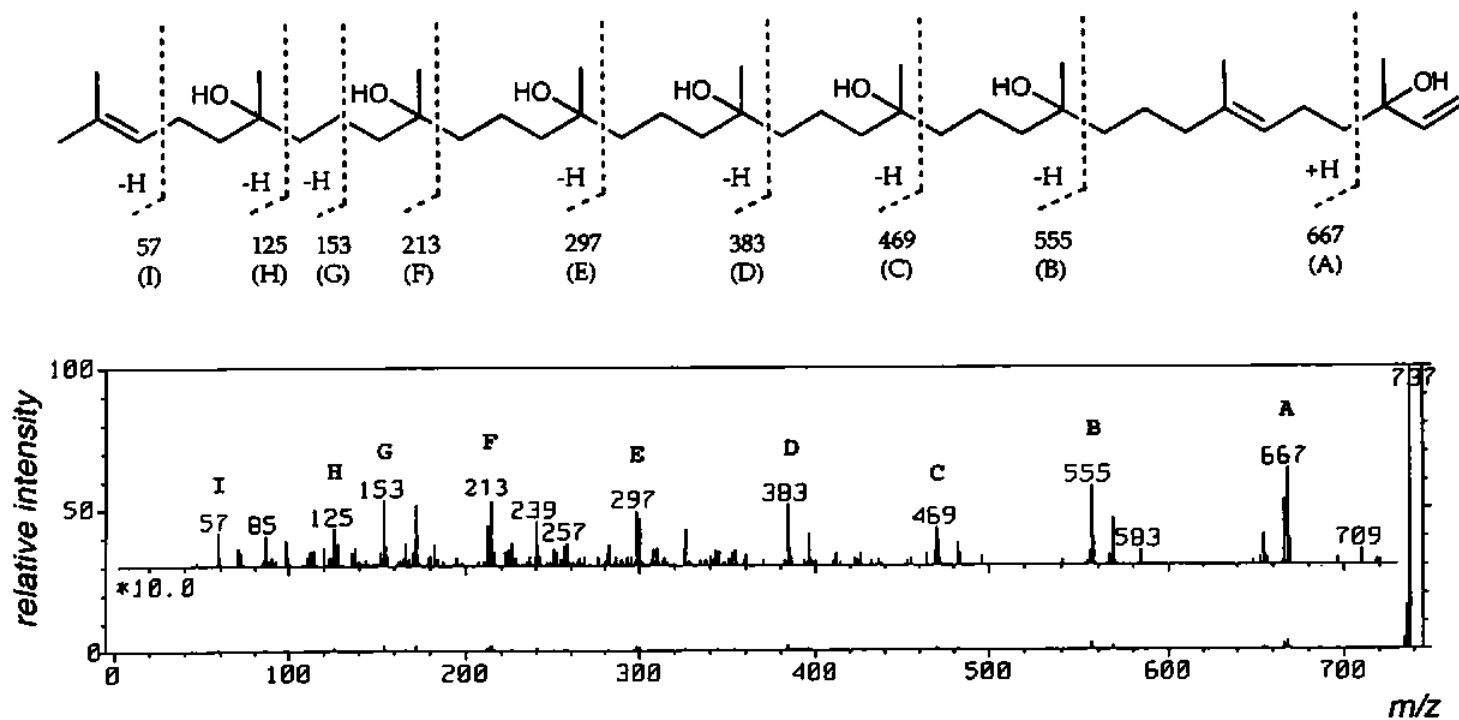


Fig. 12. *B/E* constant linked scan spectrum of $[M-H]^-$ ion at m/z 737 in negative ion mode FAB mass spectrum of 7b.

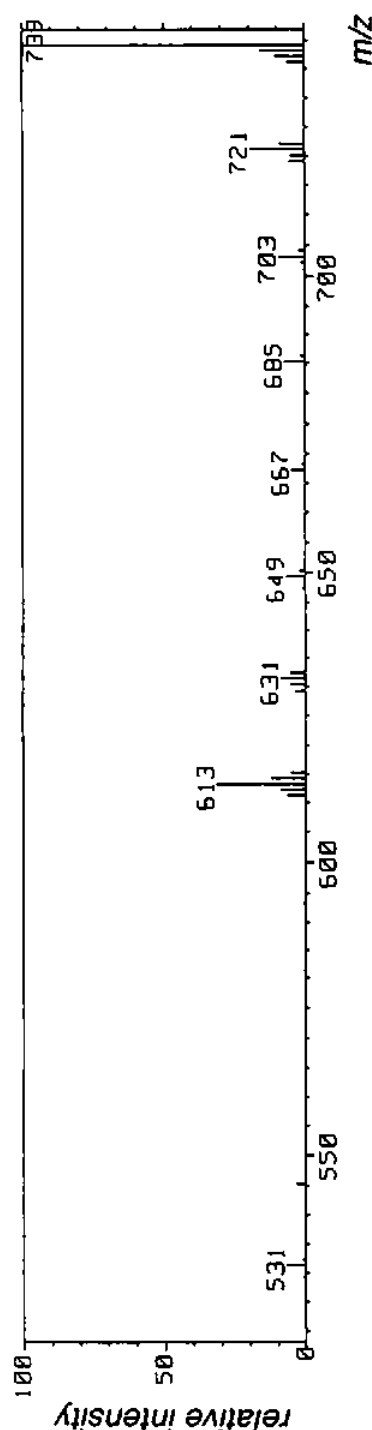


Fig. 13. B/E constant linked scan mass spectrum of $[M+H]^+$ ion at m/z 739 in positive ion mode FAB mass spectrum of 7b.

引用文献

- 1) 沢辺昭義, 岡本 忠: *New Food Industry*, 38, 45(1996).
- 2) "Methods in Enzymology: Mass Spectrometry", Vol. 193, ed. by J.A. McCloskey, Academic Press, San Diego (1990).
- 3) a) 土屋正彦, 大橋 守, 上野民夫 編: "質量分析法の新展開", 東京化学同人(1988). b) 丹羽利充 編著: "最新のマススペクトロメリー: 生化学・医学への応用", 化学同人(1995).
- 4) G. Kawai and Y. Ikeda: *Biochim. Biophys. Acta*, 754, 243(1983).
- 5) G. Kawai and Y. Ikeda: *J. Lipid. Res.*, 26, 338(1985).
- 6) Y. Funaki, G. Kawai, and K. Mori: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 615(1986).
- 7) 川合源四郎: *農化*, 60, 1027(1986).
- 8) A. Sawabe, M. Morita, T. Okamoto, and S. Ouchi: *Biol. Mass Spectrom.*, 23, 660(1994).
- 9) J. Adams and Q. Ann: *Mass Spectrom. Rev.*, 12, 51(1993).
- 10) C.E. Costello and J.E. Vath: in "Methods in Enzymology", Vol. 193, ed. by J.A. McCloskey, Academic Press, San Diego (1990), p. 738.
- 11) A. Ballio, C.G. Casinovi, M. Framondino, G. Marino, G. Nota, and B. Santurbano: *Biochim. Biophys. Acta*, 573, 51(1979).
- 12) G. Kawai, Y. Ikeda, and K. Tubaki: *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2137(1985).
- 13) T. Matsubara, A. Hayashi, Y. Banno, T. Morita, and Y. Nozawa: *Chem. Phys. Lipids*, 43, 13(1987).
- 14) G. Kawai: *Biochim. Biophys. Acta*, 1001, 185(1989).
- 15) 沢辺昭義, 森田全律, 稲葉和功, 大内成志, 岡本 忠: *きのこの科学*, 2, 157(1995).
- 16) A. Sawabe, M. Morita, S. Ouchi, and T. Okamoto: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 43, 115(1995).
- 17) K. Nakanishi, M. Tada, Y. Yamada, M. Ohashi, N. Komatsu, and H. Terakawa: *Nature*, 197, 292(1963).
- 18) K. Nakanishi, M. Tada, Y. Yamada, M. Ohashi, N. Komatsu, and H. Terakawa: *Tetra-*

- hedron*, 21, 1231(1965).
- 19) T. Matsumoto, H. Shirahama, A. Ichihara, Y. Fukuoka, Y. Takahashi, Y. Mori, and M. Watanabe: *Tetrahedron*, 21, 2671(1965).
- 20) M. Endo, M. Kajiwara, and K. Nakanishi: *Chem. Commun.*, 1970, 309.
- 21) M. Isobe, D. Uyakul, and T. Goto: *J. Chemiluminescence Bioluminescence*, 1, 181(1987).
- 22) M. Isobe, D. Uyakul, and T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, 29, 1169(1988).
- 23) D. Uyakul, M. Isobe, and T. Goto: *Bioorg. Chem.*, 17, 454(1989).
- 24) D. Uyakul, M. Isobe, and T. Goto: *Tetrahedron*, 46, 1367(1990).
- 25) M. Isobe, H. Takahashi, and T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, 31, 717(1990).
- 26) S. Nozoe, Y. Koike, G. Kusano, and H. Seto: *Tetrahedron Lett.*, 24, 1735(1983).
- 27) F. Aoyagi, S. Maeno, T. Okuno, H. Matsumoto, M. Ikura, K. Hikichi, and T. Matsumoto: *Tetrahedron Lett.*, 24, 1991(1983).
- 28) 野副重男: *ファルマシア*, 27, 543(1991).
- 29) 野副重男: “きのこの基礎科学と最新技術”, 武丸恒雄編, p. 140, 農村文化社(1991).
- 30) A. Sawabe, M. Morita, S. Ouchi, and T. Okamoto: *J. Mass Spectrom.*, 31, 921(1996).
- 31) D.L. Slowikowski and K.H. Schram: *Nucleosides & Nucleotides*, 4, 309(1985).
- 32) H. Moser and G.W. Wood: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 15, 547(1988).
- 33) L. Grotjahn, R. Frank, and H. Blocker: *Nucleic Acids Res.*, 10, 4671(1982).
- 34) R.S. Johnson, S.A. Martin, K. Biemann, J.T. Stults, and J.T. Watson: *Anal. Chem.*, 59, 2621(1987).
- 35) R.S. Johnson and K. Biemann: *Biochemistry*, 26, 1209(1987).
- 36) K. Hirayama, R. Takahashi, S. Akashi, K. Fukuhara, N. Oouchi, A. Murai, M. Arai, S. Murao, K. Tanaka, and I. Nojima: *Biochemistry*, 26, 6483(1987).
- 37) S. Akashi, K. Hirayama, T. Seino, S. Ozawa, K. Fukuhara, N. Oouchi, A. Murai, M. Arai, S. Murano, K. Tanaka, and I. Nojima: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 15, 541(1988).
- 38) S. Akashi, K. Hirayama, A. Murai, M. Arai, and S. Murao: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158, 514(1989).
- 39) M. Furuya, S. Akashi, and K. Hirayama: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163, 1100(1989).
- 40) R.S. Johnson and K. Biemann: *Biochemistry*, 26, 1209(1987).
- 41) R.S. Johnson, S.A. Martin, K. Biemann, J.T. Stults, and J.T. Watson: *Anal. Chem.*, 59, 2621(1987).
- 42) K.M. Downard and K. Biemann: *J. Mass Spectrom.*, 30, 25(1995).