

人工培養された食用藍藻が産生する

強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する多糖の解析

Analysis of the polysaccharide having high hyaluronidase
inhibition from cultured edible blue-green algae

2015 年度

岐阜大学大学院工学研究科

物質工学専攻

山 口 裕 司

目 次

序 論	1
第1章 人工培養した <i>Nostochopsis lobatus</i> のヒアルロニダーゼ 阻害活性物質の単離と同定	
はじめに	3
第 1 節 <i>Nostochopsis lobatus</i> の培養	5
第 2 節 <i>Nostochopsis lobatus</i> 熱水抽出物の作製とヒアルロニダーゼ 阻害活性画分の精製	12
第 3 節 ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定	17
第 4 章 <i>Nostochopsis lobatus</i> 熱水抽出物からの精製物の 化学的分析	21
第 5 節 薄層クロマトグラフィーによる未同定物質の 単離と構造解析	26
第 6 節 摘要	41
第 2 章 人工培養した食用 <i>Nostoc</i> 属 4 種 5 株のヒアルロニダーゼ 阻害活性と糖組成の比較	
はじめに	43
第 1 節 <i>Nostoc</i> 属 4 種 5 株の培養	46
第 2 節 <i>Nostoc</i> 抽出物の作製	52
第 3 節 <i>Nostoc</i> 抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性の測定	55

第 4 節	<i>Nostoc</i> 抽出物の糖組成分析	60
第 5 節	摘要	64
要 約		66
参考文献		68
謝 辞		74

序 論

藍藻は藻類に分類される生物群だが、原核生物にも属するグループで、地球上で最初の光合成生物とも言われている。¹⁾ 数種の藍藻は日本をはじめ、世界中で古くから食用にされてきた。その例として、スピルリナ (*Spirulina platensis*)、^{2, 3)} 髪菜 (*Nostoc flagelliforme*)、⁴⁻⁶⁾ イシクラゲ (*Nostoc commune*)、^{5, 7, 8)} アシツキ (*Nostoc verrucosum*)、^{8, 9)} スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*)、^{5, 10, 11)} Lon (*Nostochopsis lobatus*)、¹²⁻¹⁴⁾ Cushuro (*Nostoc sphaericum*) ^{15, 16)} が知られている。

その中で、人工培養が確立され、商業利用されている種はスピルリナのみである。スイゼンジノリは日本固有種で、江戸時代には将軍家への献上品とされていたが、生育環境の悪化により、天然物はほとんど見られなくなり、国の天然記念物に指定されている。現在では、福岡県の人工河川によって僅かに栽培されているが、その流通量も限られている。^{10, 11)}

食用藍藻は細胞の直径が 5 μm 前後の単細胞生物なので、藻類の中でも微細藻類として扱われている。食用藍藻は糸状体を形成することや、寒天質の細胞外多糖を放出することでコロニーを形成するため、コロニーを肉眼で観察することができる。しかし、その生息地域は限定されているため、認知度は低く、長い食経験がありながら、一部の種を除いてその有用性についての研究は少ない。

商業利用が可能となったスピルリナは数多くの有用性が明らかとなり、^{2, 3)} 健康食品などに広く利用されているように、上述の食用藍藻についても、その有用性が明らかとなり、人工培養が確立されれば、広く利用される可能性は高い。そこで、筆者らは自然界から分離した微細藻類の単離株を純粋培養し、大量培養が可能となった種についてはその有用性を調査してきた。

その有用性の一つとして、著者らが報告した種々微細藻類のヒアルロニダーゼ阻害活性がある。¹⁷⁾ ここでは、複数種の微細藻類熱水抽出物のエタノール不溶性画分にヒアルロニダーゼ阻害活性を認めているが、抗アレルギー薬として使用されている陽性対照物質のクロモグリク酸ナトリウム (DSCG) と比べ活性は低かった。ヒアルロニダーゼは血管新生、¹⁸⁾ 発癌、^{19, 20)} 炎症、^{21, 22)} I 型アレルギーにおける脱顆粒反応などに関わっている酵素である。²³⁾ 中でも、I 型アレルギー反応においては、アレルゲンによってマスト細胞が刺激された時、ヒアルロニダーゼが活性化されてヒスタミンなどの放出（脱顆粒）が生じる。したがって、ヒアルロニダーゼの活性化を阻害することは、アレルギー抑制につながるため、抗アレルギー物質の検索のために、ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定が利用されている。^{24, 25)} Katsube らは大型藻のワカメ胞子葉に DSCG 以上の強いヒアルロニダーゼ阻害活性があることを報告²⁶⁾ していることから、藻類にはヒアルロニダーゼ阻害活性物質が含まれている可能性がある。しかし、これまでには藻類由来のヒアルロニダーゼ阻害物質についての解析・同定は行われていない。そこで、本研究では、大量培養に成功した藍藻類の中でも食経験を有し、安全性が担保されている *Nostochopsis lobatus* や *Nostoc* 属 4 種のヒアルロニダーゼ阻害活性を調べ、その化学的解析を行うことを目的にした。

第1章 人工培養した *Nostochopsis lobatus* のヒアルロニダーゼ

阻害活性物質の単離と同定

はじめに

Nostochopsis lobatus はタイ王国北部の河川、例えば、Fig. 1 に示したナン省を流れるナン川上流などに生息していることが知られており、地域名は Lon と呼ばれている。¹²⁻¹⁴⁾ *N. lobatus* が生育する地域では“Yum Lon”というサラダ (Fig. 2) として食べられている。しかし、採取可能な地域も限られており、その時期は乾季のみである。¹³⁾

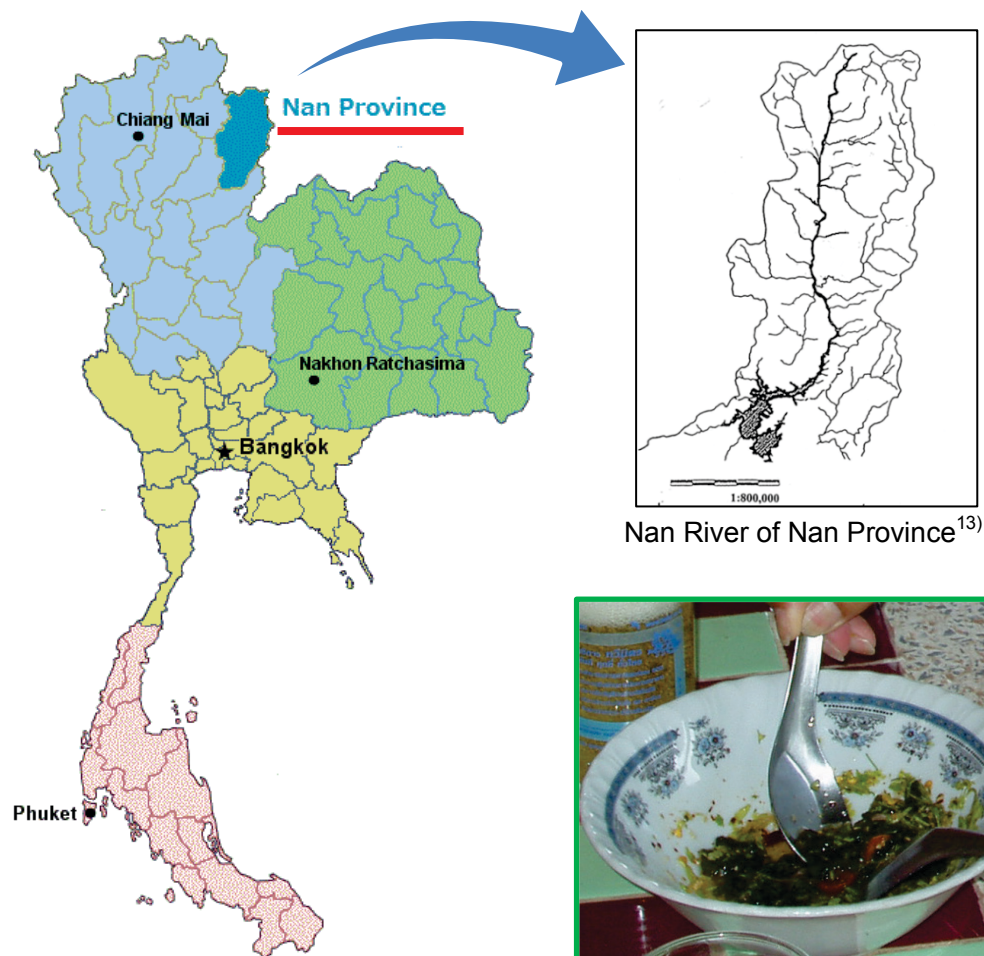


Fig. 1 Thailand map

Fig. 2 Salad dish of “Yun Lon”

N. lobatus の生理作用については Peerapornpisal ら¹²⁾ や Thiamdao ら¹³⁾ によって、抗酸化作用、抗炎症作用、胃潰瘍抑制作用などが報告されているのみである。

筆者らはタイのナン川から *N. lobatus* を採取、単離した後、その細胞を大量培養して生理作用を調べてきた。その結果、*N. lobatus* はビタミン B1 合成能があること²⁷⁾ やその熱水抽出物にはチロシナーゼ精製抑制作用が認められたこと²⁸⁾ を報告してきた。さらに、熱水抽出物をエタノール処理して生じた沈殿物には DSCG より強いヒアルロニダーゼ阻害活性が認められたこと²⁹⁾ を報告したが、その活性物質の同定には至っていなかった。したがって、医薬品より活性の強い *N. lobatus* のヒアルロニダーゼ阻害物質を同定することは有意義なことである。ワカメ胞子葉のヒアルロニダーゼ阻害物質は熱水抽出物をエタノール処理して得られた多糖であったことから、²⁶⁾ *N. lobatus* のヒアルロニダーゼ阻害物質も多糖であることが予測されるので、藻類の多糖の精製法³⁰⁾ を参考にして活性物質の精製を行った。

第1節 *Nostochopsis lobatus* の培養

Nostochopsis lobatus はタイ王国の北部などの河川に生息している藍藻の一種で、食用にされているが、市場に出ているものは天然物のみで、大量培養物利用の報告はない。*N. lobatus* の生理活性に関する研究やその実用化を拡大するためには、人工培養が必要である。本節では、*N. lobatus* の野生株から単離を行い、大量培養を行った。

材料と方法

野生株からの単離

2008年4月タイのナン川から採取した *N. lobatus* の野生のコロニーを水で洗浄した後、ガラスホモジナイザーですり潰した。パスツールピペットの先端の口径を Fig. 3 のように 50 - 200 μm に加工し、40 倍の倍率の倒立顕微鏡下で、*N. lobatus* の細胞を吸い取り、窒素源を除いた BG-11 培地³¹⁾ (BG11-N) を入れた 96 穴マイクロプレートに移した。18 - 25°C、蛍光灯下（光量：40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16 時間明/8 時間暗）で培養し、*N. lobatus* 以外の藻類を含まないホルの細胞を集めた。

単離した培養物は 2 週間毎に培地交換、あるいは培養器の拡張を行い、スケールアップした。



Fig. 3 Pasteur pipette for isolation

Upper: processed pipette

Under: normal pipette

大量培養

最終的には 180 L 容円筒形アクリル製水槽を用いて大量培養を行なった。培地は BG11-N、光源は 96W ツイン蛍光灯（Panasonic 製）を 2 本使用し、蛍光灯に最も近い水槽表面の光量は $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。培養温度は 20–25°C、空気をバブリングすることにより酸素、窒素の供給と攪拌を兼ねた。

培養した藻体は沈殿させて回収し、プランクトンネットを用いて培地を除き、さらに水道水で洗浄した後に凍結乾燥し、研究材料とした。

結 果

ナン川での *N. lobatus* の採取風景を Fig. 4 に示した。*N. lobatus* は暖かい乾季によく自生するため、¹²⁻¹⁴ 雨季に入る前の 4 月は Fig. 5a、b のように浅瀬の石に付着した大きなコロニーを確認することができたが、生息場所は限定的であった。雨季では川の水量が増え、水が濁るため、コロニーが流されたり、川底まで十分な太陽光が届かず、生長できないため、コロニーが消失すると考えられる。

N. lobatus は細胞外に寒天様物質を放出して、コロニーを形成するが、そのコロニーには Fig. 6 のように、矢印で示した珪藻などの他の藻類も混在していた。したがって、*N. lobatus* の細胞を単離する際は他の藻類をピペットで吸わないように注意しなければならない。珪藻のような長径が $10 \mu\text{m}$ 以上あるような比較的大型の微細藻は 40 倍の倒立顕微鏡でも確認は容易だが、細胞径が 2–5 μm の微細藻は特に注意が必要であった。



Fig. 4 Collection of *Nostochopsis lobatus*



Fig. 5a *Nostochopsis lobatus* in the river



Fig. 5b Wild colonies of *Nostochopsis lobatus*

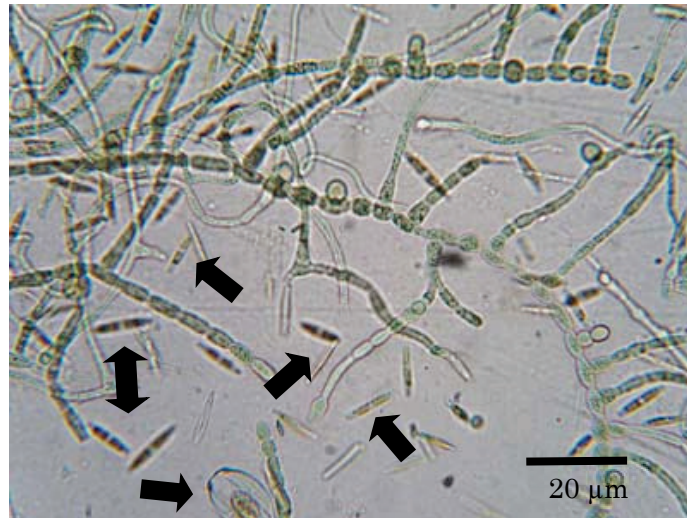


Fig. 6 Microscopic picture of wild *Nostochopsis lobatus* colony

パスツールピペットで吸い取った細胞を 96 穴プレートの別々の 15 穴に移し、単離作業後 10 日目に他の藻類が観察されなかったのは 4 穴であった。2 週間後に古い培地をピペットで吸い取り、新しい培地を追加し、単離 4 週間後にもさらに他の藻類が観察されなかったのは 2 穴で、これらを集めたものを *N. lobatus* MAC0804NAN 株とした。その後、培地交換と培養器の拡大を繰り返し、スケールアップした。

最終的な大量培養に使用した 180 L 円筒形水槽での培養の様子を Fig. 7 に示した。この培養規模では水道水を使用したため、水道水中の塩素などによって、*N. lobatus* はダメージを受けたため、市販のカルキ抜き・水質調整剤をあらかじめ規定量添加する必要がある。

培養された *N. lobatus* の顕微鏡写真を Fig. 8 に示した。*N. lobatus* は *Spirulina* や *Nostoc* 属などの食用藍藻と同様に糸状体を形成するが、それが所々分枝するのが他の食用藍藻にはない特徴である。また、細胞外に寒天様物質（多糖）を多く放出し、柔軟なコロニーを形成する。人工培養ではエアレーション

によって、コロニーは常に攪拌されているため、Fig. 9 のような球形あるいは楕円形のコロニーを形成することもあり、このような藻体は回収が容易であった。しかし、回収した *N. lobatus* は多量の細胞外多糖によって、保水力も高く、藻体の水分含有率は 98% 以上であった。

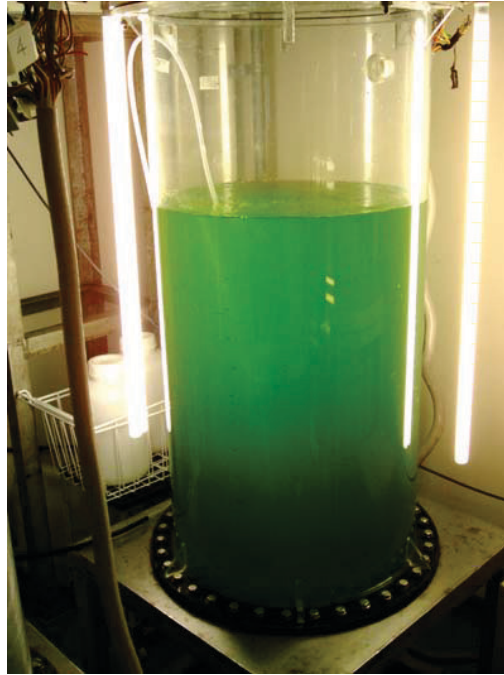


Fig. 7 180 L tank culture of *Nostochopsis lobatus*



Fig. 8 Microscopic picture of cultured *Nostochopsis lobatus*

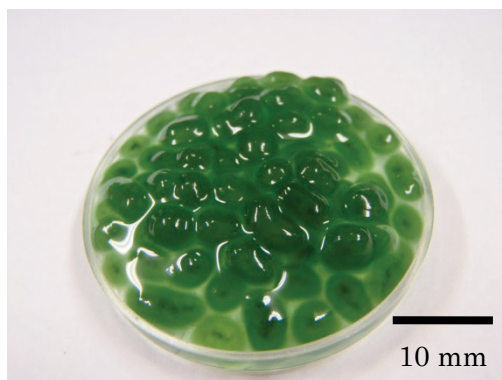


Fig. 9 Large colony of cultured *Nostochopsis lobatus*

考 察

Pandy ら³¹⁾ や Motham ら¹⁴⁾ は 5 L 以下のスケールで *N. lobatus* の培養を行ったが、*N. lobatus* は *Spirulina* のように商業的大量培養はされておらず、100 L 以上の大量培養の報告もこれまでになかった。したがって、抗酸化作用、抗炎症作用あるいは抗チロシナーゼ作用など、複数の生理活性^{12, 13, 28)} を有する優れた食材でありながら、天然物が入手可能な地域での利用に限られている。微細藻類の培養を行う際、小スケールの培養では培地を滅菌し、純粋培養は容易だが、それ以上の規模ではファーマンターなどを使用しない限り、培養装置や培地の殺菌は容易でない。しかし、それは培養コストの上昇につながり、実用化の障害となる。実際に、*Chlorella* (クロレラ) や *Spirulina* の商業的大量培養は屋外での開放的な培養法で行われており、培養コストが実用化に強く関係している。本研究でも、単純な構造の装置での大量培養を目的としており、*N. lobatus* においても、それが可能なことが明らかとなった。*N. lobatus* は数 mm 大のコロニーを形成するため、*Chlorella* や *Spirulina* の様に遠心分離で回収する必要もなく、回収のためのエネルギーコストは低くできる。さらに、糸状体の中に異形細胞、あるいは異質細胞と呼ばれる窒素固定能を有する細胞が

存在し、それが空気中の窒素を固定し、自らの窒素源としている。したがって、培地に窒素源を入れる必要はないことも特徴で、培養コストの低減につながる。

一方、水道水をそのまま使用した場合にはダメージを受けたことから、水質の影響を受けやすい種であることも分かった。また、培養には他の微細藻より強い光量を必要としないことも分かった。つまり、筆者らは本研究で使用した 180 L 円筒水槽で他の微細藻を培養した時の蛍光灯は 4 本以上使用する必要があったが、*N. lobatus* の場合、4 本使用の場合は光障害を受け、増殖率が低下した。すなわち、弱い光でも培養が可能なので、光エネルギーの支出を抑えることにもつながる。

これらのことから、*N. lobatus* の大量培養の成功によって、様々な生理活性を有する食材としての活用が可能となる。本研究では *N. lobatus* の生理活性の一つであるヒアルロニダーゼ阻害活性を調べ、その活性物質の解析を行うことにした。

第2節 *Nostochopsis lobatus* 熱水抽出物の作製とヒアルロニダーゼ阻害活性画分の精製

筆者らは、人工培養した *Nostochopsis lobatus* の熱水抽出物を 80%エタノール処理し、生じた沈殿物には抗アレルギー薬として使用されている DSCG より強いヒアルロニダーゼ阻害活性が認められたこと²⁹⁾を報告したが、その活性物質の同定には至っていなかった。大型藻であるワカメ胞子葉の熱水中抽出物をエタノール処理して得られた多糖にも強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有していたこと²⁶⁾から、*N. lobatus* のヒアルロニダーゼ阻害物質も多糖であることが予測されるので、本節では、食用藍藻の多糖の精製法³⁰⁾を参考にしてヒアルロニダーゼ阻害活性物質の精製を行うことにした。

材料と方法

凍結乾燥した *N. lobatus* 10 g を 1 L の熱水 (90~95℃) で 1 時間攪拌抽出した。抽出物を遠心分離 (10,000 rpm、15 分) した後、ガラス繊維ろ紙 GA-100 (ADVANTEC 製) を用いて、吸引ろ過し、そのろ液をエバポレーターで 1/3 量に濃縮した。濃縮した抽出液に 4 倍量のエタノールを加えて凝集物を生成させ、5℃で 1 晩放置した。凝集物をさらに遠心分離 (3,000 rpm、10 分) によって、回収し、なるべく少ない量の水に再溶解した。これを透析用セルロースチューブ (分画分子量 12,000-14,000、VISKASE SALES 製) に入れ、水道水の流水で 1 昼夜透析後、さらに、イオン交換水で 24 時間透析した。

透析チューブ内の内容物を陰イオン交換樹脂カラム (DEAE Toyopearl-650M, φ2×50 cm, 東ソー製) に注入し、5 ml/min の流速で、100 ml の水で溶出した

後、0–1.5 M の塩化ナトリウムの濃度勾配をつけ溶出した。分画物はさらにゲルろ過カラム (Toyopearl HW-75M, ϕ 2.5×95 cm, 排除限界分子量: 2×10^7 , 東ソー製) に注入し、0.1 M 塩化ナトリウムで 10 ml/min の流速で溶出した。陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーいずれの場合も 10 ml ずつ分取し、それらをフェノール硫酸法³²⁾ による 470 nm の吸光度から糖濃度を測定し、溶出の様子を確認した。

結 果

N. lobatus を 100 倍量の熱水にて抽出後、遠心分離とろ過により回収した熱水抽出物の収率は乾燥藻体 (10 g) に対して、41.6% (4.16 g) であった。これをさらに 80%エタノールで処理し、生成した凝集物を回収し、水で透析した結果、その収率は 39.5% (3.95 g) であった。

N. lobatus 抽出物の 80%エタノール処理–透析物 (242 mg) を陰イオン交換クロマトグラフィーで分画した結果、Fig. 10 に示したように、3 つのフラクション Fr.1、Fr.2、および Fr.3 を得た。それぞれの収量は 34.8 mg、27.1 mg、および 98.6 mg で、注入量に対する収率はそれぞれ、14.4%、11.2%、および 40.7% であった。得られたフラクションの中で、Fr.3 の収量が最も高かった。

さらに、それぞれのフラクションをゲルろ過で分画した結果、Fig. 11 に示したように、いずれのフラクションも 1 ピークで、それぞれを Fr. I、Fr. II、および Fr. III とした。これらはいずれもほとんどカラムに保持されずに溶出したことから、これらのフラクションの分子量は排除限界分子量の 2×10^7 以上であると推定した。

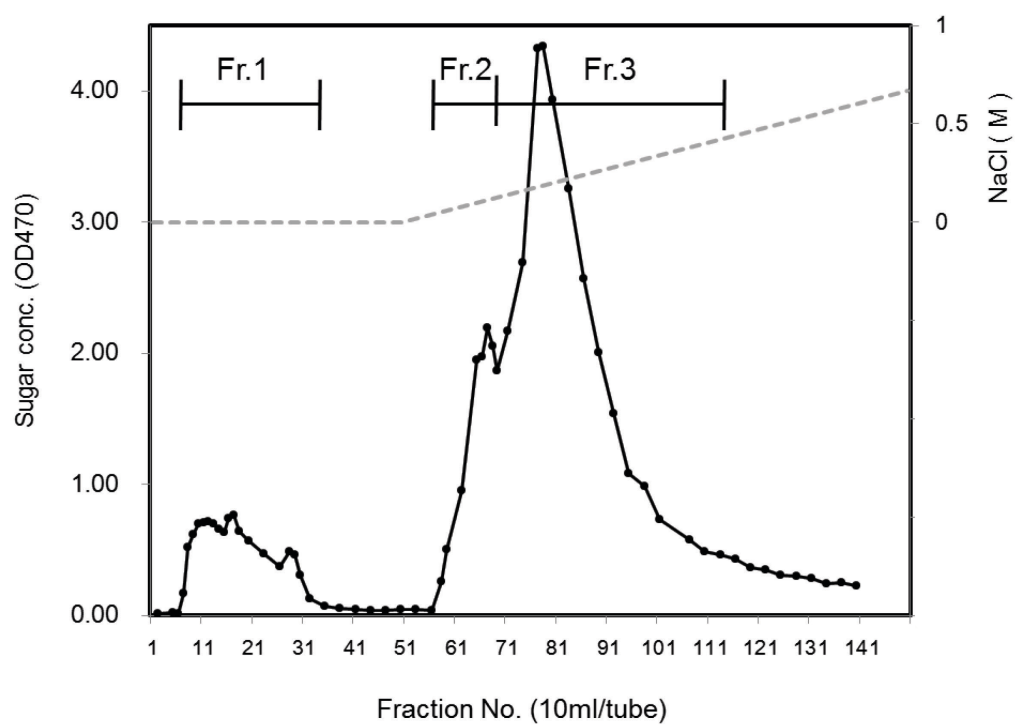


Fig. 10 Elution profile from anion-exchange column chromatography (DEAE Toyopearl-650M, $\phi 2 \times 50$ cm) of the extract of *Nostochopsis lobatus*.
 Eluent : 5 ml/min of deionized water for 100 min followed by linear gradient of 0 – 1.5 M NaCl. Fractionation : 10 ml/ tube, Detect : Phenol – H₂SO₄ method (470 nm)

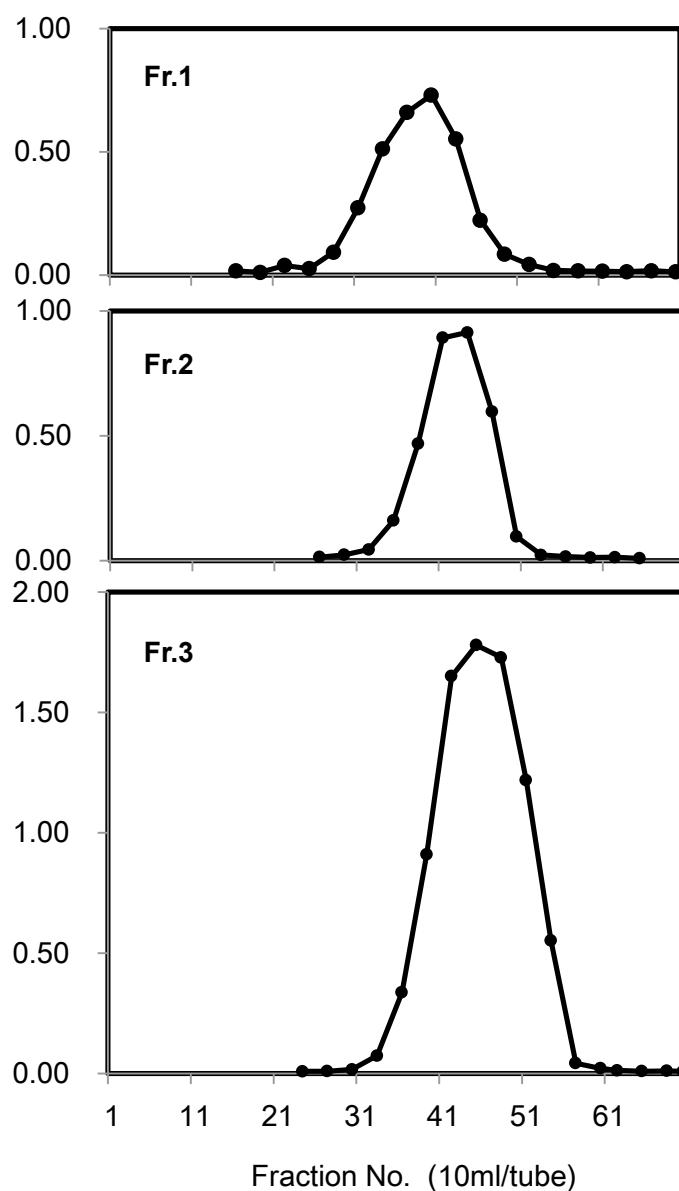


Fig. 11 Elution profile from gel filtrate column chromatography (Toyopearl HW-75M, $\phi 2.5 \times 95$ cm, exclusion limit : 2×10^7) of the extract of *Nostochopsis lobatus*.

Eluent : 10 ml/min of 0.1 M NaCl, Fractionation: 10 ml/ tube. Detect : Phenol – H_2SO_4 method (470 nm)

考 察

N. lobatus の熱水抽出物の収率は 41.6%で、その後、エタノール処理と透析を行った抽出物の収率は 39.5%と近似していたので、*N. lobatus* の熱水抽出物の多くが高分子化合物であることが予想された。

陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、各フラクション中の糖を測定するフェノール硫酸法でモニタリングし、分取物の 50%以上が水では溶出されなかったことから、*N. lobatus* の熱水抽出物には多くの酸性糖が含まれているものと推測された。

さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画物を排除限界分子量が 2×10^7 のゲルろ過カラムで溶出したが、3 つの分画物のいずれも、溶出時間は近似して、ほとんど保持されていない溶出時間であった。このカラム以上の排除限界分子量を有するゲルろ過カラムを使用し、それに適合した分子量標準物質を使用することで、これらの分画物の分子量を推測することができると考えられるが、適したカラムと標準物質を入手することができなかった。したがって、*N. lobatus* の熱水抽出物から得られた 3 つのフラクションはいずれも 2×10^7 以上の分子量を有していると推定された。

第3節 ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定

ヒアルロニダーゼは血管新生、¹⁸⁾ 発癌、^{19, 20)} 炎症、^{21, 22)} あるいは I 型アレルギーにおける脱顆粒反応などに関わっている酵素である。²³⁾ I 型アレルギー反応においては、アレルゲンによってマスト細胞が刺激された時、ヒアルロニダーゼが活性化されてヒスタミンなどの放出（脱顆粒）が生じる。したがって、ヒアルロニダーゼの活性化を阻害することは、アレルギー抑制につながるため、抗アレルギー物質の検索のために、ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定が利用されている。その陽性対照物質としては抗アレルギー薬の DSCG が使用されている。

筆者らは *Nostochopsis lobatus* の熱水抽出物には DSCG より強いヒアルロニダーゼ阻害活性のあることを報告したが、その活性物質の解析には至っていなかった。²⁹⁾ そこで、第2節において、*N. lobatus* 熱水抽出物からカラムクロマトにて、3つのフラクションを精製したので、本節では、それらのヒアルロニダーゼ阻害活性を測定することにした。

材料と方法

ヒアルロニダーゼ（牛精巣由来，タイプ IV-S）とコンパウンド 48/80 はシグマ製、クロモグリク酸ナトリウム（DSCG）は Enzo Life Sciences 製を使用した。ヒアルロン酸ナトリウム、ならびにその他の試薬は和光純薬工業製を使用した。

ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロニダーゼ、コンパウンド 48/80、塩化カルシウム、および塩化ナトリウムは 0.1 M 酢酸緩衝液（pH4.0）に溶解した。

試料溶液 50 μ l、酢酸緩衝液 50 μ l、および 4000 unit/ml のヒアルロニダ

ーゼ溶液 50 μ l の混合液を 37°C で 20 分インキュベーションした後、0.5 mg/ml のコンパウンド 48/80、12.5mM 塩化カルシウム、および 0.75M 塩化ナトリウムの混合液を 0.1 ml 加えて、37°C で 20 分インキュベーションした。さらに、0.8 mg/ml のヒアルロン酸ナトリウムを 0.25 ml 加えて、37°C で 40 分インキュベーションした後、0.4 M 水酸化ナトリウムを 0.1 ml 加えて反応を止め、氷冷した。10 分後、Morgan-Elson 法³³⁾で遊離したアセチルグルコサミンを測定した。すなわち、氷冷した試料反応液にホウ酸試液（ホウ酸 4.95 g に水 50 ml を加え、1M 水酸化ナトリウムで pH を 9.1 に調整後、水で 100 ml にした液）を 0.1 ml 加えて沸騰水中で 3 分加熱した後、10 分再氷冷した。*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液（10 M 塩酸 12.5 ml を酢酸で 100 ml にした溶液で *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 10 g を溶解し、使用直前に酢酸で 10 倍に希釈した液）を 3ml 加え、37°C で 20 分インキュベーションした後、585 nm における吸光度を測定した。

ヒアルロニダーゼ阻害率の計算法は以下の通りであった。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(A-B)-(C-D)\}/(A-B) \times 100$$

A：試料の代わりに緩衝液を加えたときの OD₅₈₅

B：試料とヒアルロニダーゼの代わりに緩衝液を加えたときの OD₅₈₅

C：試料の入った OD₅₈₅

D：ヒアルロニダーゼの代わりに緩衝液を加えたときの OD₅₈₅

結 果

N. lobatus の熱水抽出物を 80%エタノール処理と透析を行った抽出物および陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過によって精製された 3 つのフラク

ション (Fr. I、Fr. II、Fr. III) のヒアルロニダーゼに対する阻害率を測定し、その結果を Fig. 12 に示した。

この結果から求められた精製前の抽出物、Fr. I、Fr. II、Fr. III、および陽性対照物質である DSCG のヒアルロニダーゼに対する 50%阻害濃度 IC_{50} はそれぞれ、12.3、22.0、10.9、7.2、および 104.4 $\mu\text{g/ml}$ であった (Table 1)。つまり、カラム精製による収率が最も高かった Fr. III はヒアルロニダーゼに対する阻害活性も最も高かった。

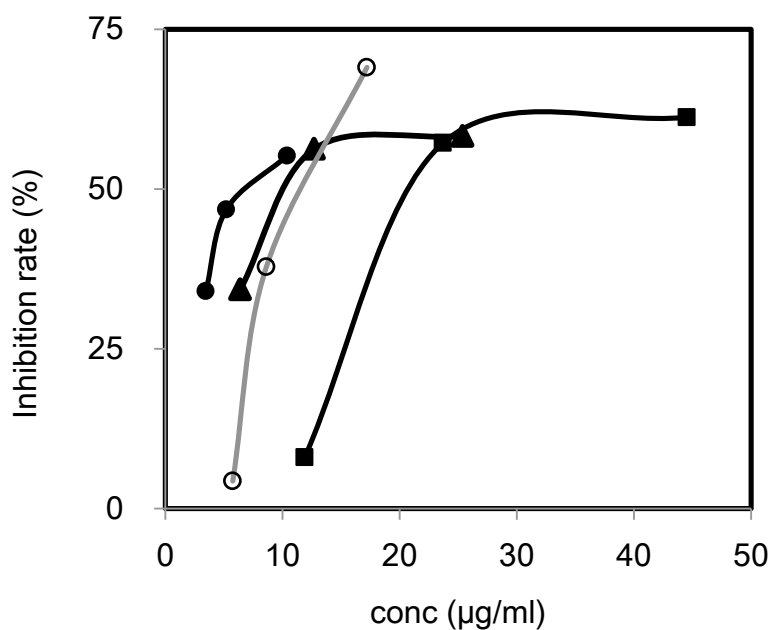


Fig. 12 Inhibition ratio of purified fractions on hyaluronidase

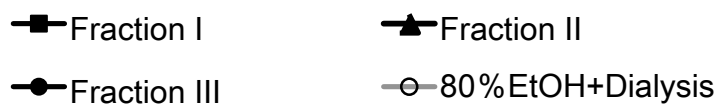


Table 1 IC₅₀ of purified fractions against hyarulonidase

Fraction	IC ₅₀ (μg/ml)
80%EtOH+Dialysis	12.3
I	22.0
II	10.9
III	7.2
DSCG	104.4

考 察

N. lobatus からの精製物のヒアルロニダーゼ阻害活性は Fr. III、Fr. II、Fr. I の順に強く、Fr. III と Fr. II は精製前の抽出物より活性が上昇した。

活性が最も低かった Fr. I でもヒアルロニダーゼに対する IC₅₀ は DSCG の 4.7 倍あり、活性が最も高かった Fr. III は DSCG の 14.5 倍高かった。

筆者らは天然物、あるいは人工培養物の種々微細藻類のヒアルロニダーゼ阻害活性を報告¹⁷⁾し、その中では培養されたスピルリナ熱水抽出物の 80%エタノール処理物の活性が最も強かったが、それは DSCG と同程度の活性であった。一方、Katsube らが報告したワカメ胞子葉から精製された多糖の IC₅₀ は 12.1 μg/ml で、²⁶⁾ 藻類由来の多糖の中では最も活性が強かったが、本研究において、*N. lobatus* から精製し、最も活性の強かった多糖は 7.2 μg/ml であり、ワカメ胞子葉から精製された多糖の IC₅₀ の報告例よりも強いものであった。さらに、その高活性を有する多糖の収率は乾燥 *N. lobatus* の 17.9%で、天然物由来活性物質の収率としては極めて多い値だった。したがって、*N. lobatus* は強いヒアルロニダーゼ阻害物質を多く産生することが示唆された。

第 4 節 *Nostochopsis lobatus* 熱水抽出物からの精製物の

化学的分析

Katsube らは医薬品の DSCG よりも強い活性を有する多糖をワカメ胞子葉から得ているが、²⁶⁾ その物質の解析には至っていなかった。筆者が *Nostochopsis lobatus* 熱水抽出物からカラムクロマトにより精製して得た 3 つのフラクションはいずれも、DSCG よりも活性が強い多糖で、最も活性が強かったフラクションは Katsube らが得た多糖よりも活性は高かった。そこで、本節では、強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する物質の構造を明らかにするために、化学的分析を行うことにした。

Motham らは TLC 分析によって、天然の *N. lobatus* には中性糖の他に、ウロン酸であるグルクロン酸も含まれることを報告した。¹⁴⁾ そこで、本研究での糖分析はウロン酸も同時分析できる方法を用いて分析することにした。

材料と方法

タンパク質測定

N. lobatus からの精製物中のタンパク質はプロテインアッセイ（バイオ・ラッド ラボラトリーズ製）を用いた Bradford 法³⁴⁾ で測定した。

糖組成分析

精製物の糖組成分析は秋山らの方法³⁵⁾ を引用し、GS-MS を用いて分析した。糖の同定には市販の標準品を用いた。

スクリーキャップ付ガラス試験管に 10 mg の精製物 (Fr. I、Fr. II、Fr. III)

と 0.85 ml の水を加え、窒素ガスを吹き込んで、試験管内の空気を窒素に置換した後、0.15 ml のトリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、105℃で 15 時間加水分解した。加水分解物の 0.2 ml を別のスクリーキャップ付ガラス試験管に取り、減圧乾燥した後、エタンチオール-TFA (2 : 1) 混液 0.1 ml を加え、キャップをして室温で 10 分放置した。さらに、室温でピリジン 0.25 ml、ヘキサメチルジシラザン 0.5 ml、および TFA 0.15 ml を順次添加した後、キャップをして時々攪拌しながら 1 時間放置した。試験管を 40℃で加温しながら窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した後、水 0.25 ml とヘキサン 2 ml を加えて、無水硫酸ナトリウムで脱水したヘキサン層を GC-MS で分析した。

その条件は GC-MS (GC : Agilent 6890, MS : JEOL GC mate II) に DB-5MS キャピラリーカラム (30 m×φ 0.25 mm, J&W 製) を装備した。試料注入量は 1 µl とし、スプリットレス法で注入した。分析温度は 165℃で 2 分保持した後、235℃まで 2℃/分で昇温した。

10 mM の単糖の標準液 0.2ml を減圧乾燥した後、同様に処理し、GC-MS のリテンションタイムとマススペクトルから精製物中の糖の同定を行った。さらに、フコース (Fuc)、グルコース (Glc)、マンノース (Man) およびグルクロン酸 (Glc UA) は 1.5、3.0 および 4.5 mM、ガラクトース (Gal) とキシロース (Xyl) は 0.1、0.2 および 0.4 mM の標準物質液を調製し、それらの GC-MS トータルイオン強度から検量線を作成し、精製物中の糖組成比 (重量%) を求めた。

結 果

N. lobatus から精製された 3 つのフラクション Fr. I、Fr. II、および Fr. III に含まれるタンパク質量は 0.17、0.54、および 0.54% で、いずれも 1% 未満であった。

単糖標準品の GC-MS におけるリテンションタイムとマススペクトルから Fr. I、Fr. II、および Fr. III のいずれにもキシロース、フコース、グルコース、マンノース、ガラクトース、およびグルクロン酸が同定された (Fig. 13)。ここに示したように、キシロースのピークの前にリテンションタイムが 18.4 分の大きな未同定のピークが検出された。このピークのマススペクトルは Fig. 14 に示したように、フコースに似たスペクトルを有していたが、リテンションタイムはフコースとは異なっていた。3 つのフラクション (Fr. I、Fr. II、Fr. III) における未同定物質ならびに同定された 6 種類の糖の組成比を Table 2 に示した。

Fig. 13 におけるその他のピークはリテンションタイムとマススペクトルから糖由来のものではなかった。

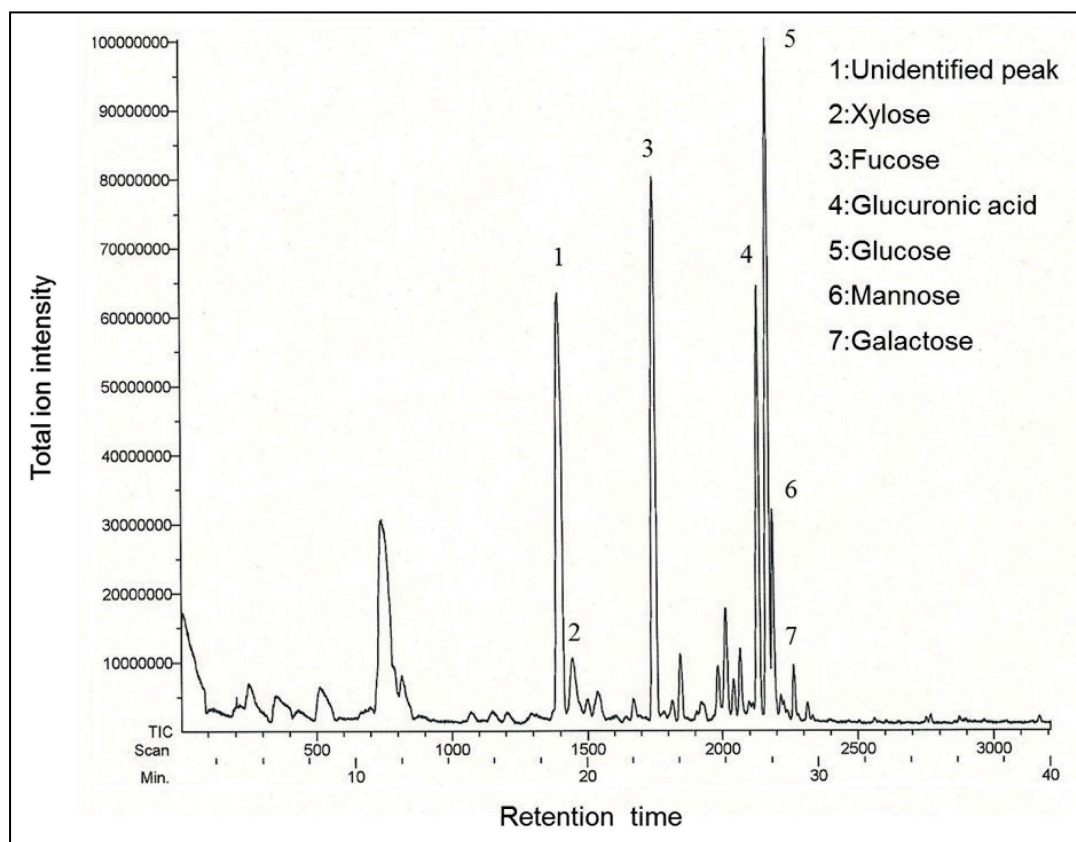


Fig. 13 GC-MS chromatogram of fraction III

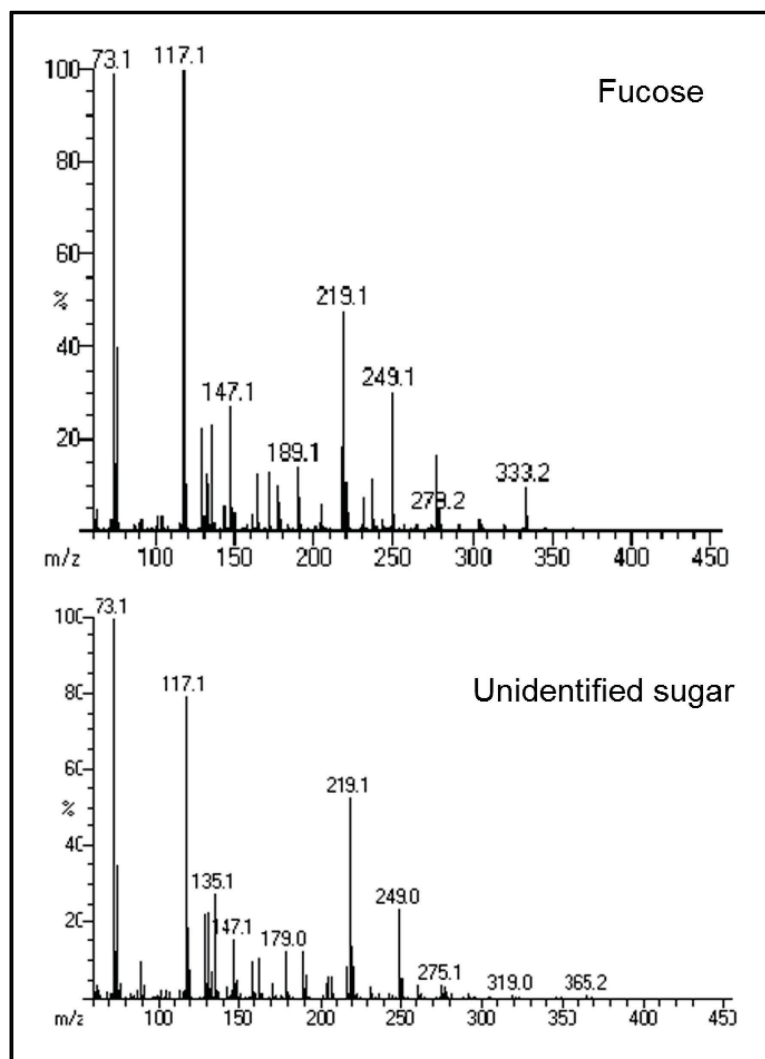


Fig. 14 Mass spectra of fucose and unidentified peak

Table 2 Sugar composition of polysaccharides purified DEAE and gel-filtration chromatography of *Nostochopsis* hot water extract

Sugar composition (%)	Fraction		
	I	II	III
Unidentified peak	19.4	17.8	15.7
Xylose	3.4	3.8	2.6
Fucose	23.4	20.6	20.3
Glucuronic acid	17.8	21.1	22.1
Glucose	23.8	22.8	25.2
Mannose	8.2	10.0	10.2
Galactose	4.1	4.1	3.9

考 察

N. lobatus 抽出物から精製された 3 つのフラクションを構成する糖の種類は同じであったが、その組成比はわずかに異なっていた。

N. lobatus から精製された Fr. I、Fr. II、および Fr. III のグルクロン酸の割合はそれぞれ、17.8、21.1、および、22.1%であった。これらのヒアルロニダーゼに対する IC₅₀ はそれぞれ、22.0、10.9、7.18 $\mu\text{g/ml}$ であった。つまり、グルクロン酸比が多いほどヒアルロニダーゼ阻害活性は強い傾向を示した。Sawabe らはペクチン酸において、ウロン酸の割合に比例してヒアルロニダーゼ阻害活性が強いことを報告したが、³⁶⁾ このことは本研究の結果と一致した。

第5節 薄層クロマトグラフィーによる未同定物質の単離と

構造解析

Nostochopsis lobatus 抽出物から精製された強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する 3 つのフラクションを GC-MS で糖組成比を調べた結果、いずれにもフコースに類似したマススペクトルを持つが、市販の糖の標準物質とは異なる未同定物質が多く含まれていることが分かった。そこで、本節では、この未同定物質を単離し、その構造を調べることにした。

材料と方法

GC-MS 分析用試料と同様に TFA で加水分解した精製前の *N. lobatus* 抽出物をシリカゲル TLC (Silica gel 60F₂₅₄, Merck 製) にスポットし、n-ブタノール/アセトン/水 (4:3:1, v:v:v) の組成の展開溶媒で展開した後、TLC を 60°C で 30 分乾燥させ、n-ブタノール/酢酸エチル/イソプロパノール/水 (8:4:7:3, v:v:v:v) で展開した。GC-MS 分析の結果、糖の組成比が高かった、フコース、グルコース、マンノース、およびグルクロン酸を標準物質として、*N. lobatus* 抽出物の加水分解物と一緒に TLC にスポットし、展開した。展開後、TLC を 5% 硫酸-メタノールを噴霧した後、ホットプレートで加熱し、糖の検出を行った。

GC-MS で同定できなかった未同定物質の単離にはシリカゲル層の厚さが 1 mm の分取用 TLC (PLC Silica gel 60F₂₅₄, 20×20cm, Merck 製) を用いた。展開溶媒は分析用 TLC と同じであった。分取用 TLC による展開後、その一端を切断し、5%硫酸-メタノールで糖を検出した。その後、フコースより高い R_f 値の未同定物質と同じ R_f 値の層を分取した。分取物は水で 3 回振盪抽出し、

濃縮後、15,000rpm で 20 分遠心分離して、不溶物を除去し、構造解析のための試料とした。

未同定物質を含む画分を凍結乾燥後、重水に溶解し、NMR 装置 (JNM-ECS400, JEOL 製) にて ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY、HMQC および HMBC により構造解析を行った。

未同定物質の分子量は FAB-MS (JMS-700 MStation, JEOL 製) を使用して測定した。

結 果

分析用 TLC の結果を Fig. 15 に示した。*N. lobatus* 抽出物中の主構成糖であるフコース、マンノース、グルコース、グルクロン酸を TLC で同定し、未同定物質は Rf 値が最も高いスポットとして確認された。また、硫酸ーメタノールでの発色の状態はフコースの発色と似ていた。

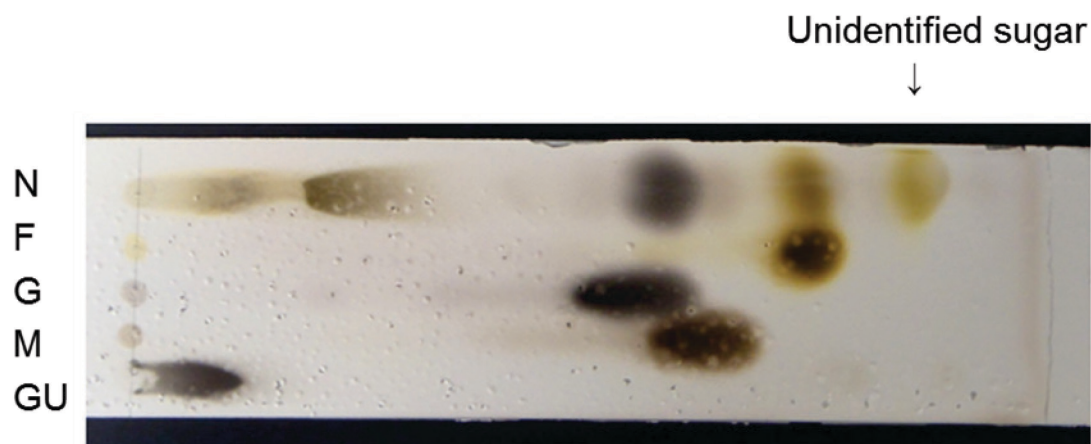


Fig. 15 TLC of hydrolyzed *Nostochopsis lobatus* extract and monosaccharides

N: Hydrolyzed polysaccharide of *N. lobatus*, F: Fucose,
G: Glucose, M: Mannose and GU: Glucuronic acid.

TFA で加水分解した *N. lobatus* 抽出物 (253 mg) を 2 枚の分取用 TLC に塗布し、展開後、一端を切断し、切断したプレートを 5%硫酸-メタノールにて糖を検出した。切断した TLC と未同定物質の画分を掻き取った後の 2 枚の分取 TLC を Fig. 16 に示した。各スポットの分離能は分析用 TLC より劣っていたが、未同定物質のスポットを確認した。未同定物質の Rf 値は最も高かったので、そのスポットを集め、水に溶解して、未同定物質を回収した。

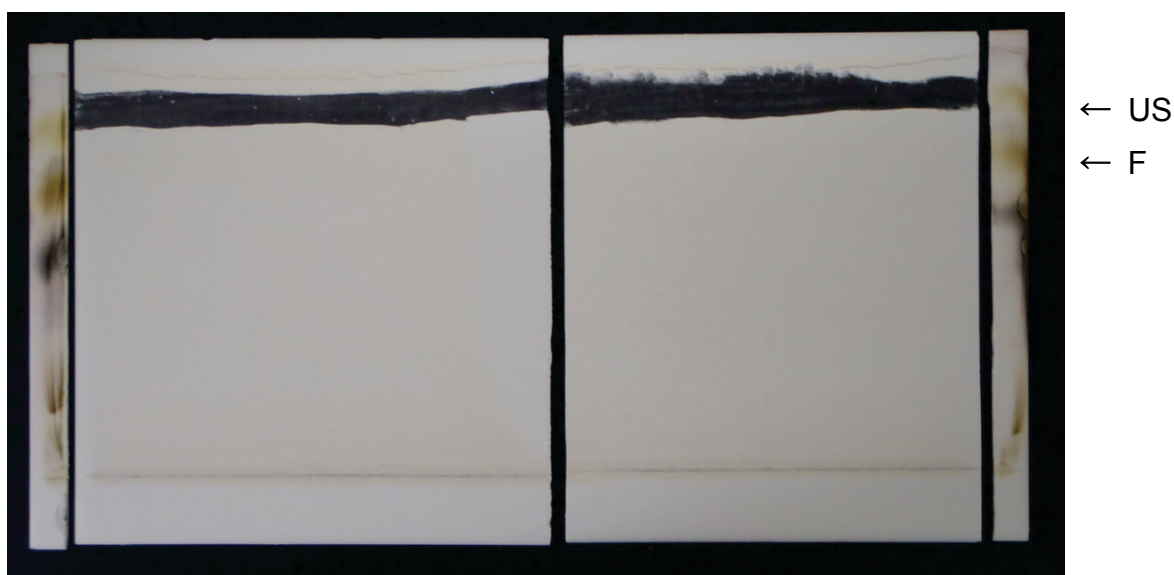


Fig. 16 Preparative TLC of hydrolyzed *Nostochopsis lobatus* extract

US : Unidentified sugar, F : Fucose

分取 TLC で回収した未同定物質の画分を凍結乾燥して求めた収量は 96 mg であったが、重水で再溶解した時はシリカゲルと思われる白色不溶物が認められた。そこで、不溶物を再度、遠心分離で除いてから NMR 分析を行った。

スペクトル解析の結果、未同定物質は Fig. 17 に示した 2-*O*-メチルフコースであると断定した。以下その構造解析に関して解説する。

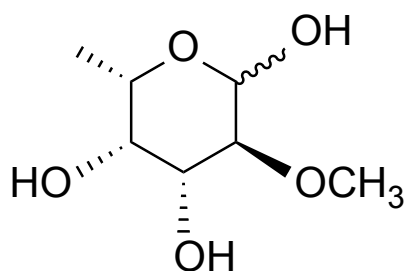


Fig. 17 Chemical structure of 2-O-Methylfucose

Fig. 18 に 2-*O*-メチルフコースでの ^1H NMR スペクトラムを示した。 ^1H NMR の全体像より、糖のアイソマー混合物であった。つまり、 δ_{H} 5.27 (d, $J=3.6$ Hz) および 4.42 (d, $J=8.2$ Hz) がそれぞれ α 体、 β 体のアノマー水素であり、各々の積分値が同程度であることから α 体： β 体=1：1 の等量混合物であることがわかった。さらに、 δ_{H} 3.30 および 3.43 がそれぞれ 3H のシングレットであることからメトキシ基の存在を確認した。高磁場領域 δ_{H} 1.07 および 1.05 が 3H のダブレットであることから 6 位にメチル基を有することがわかり、この物質が GC-MS にて同定したフコースのメトキシ誘導体であった。

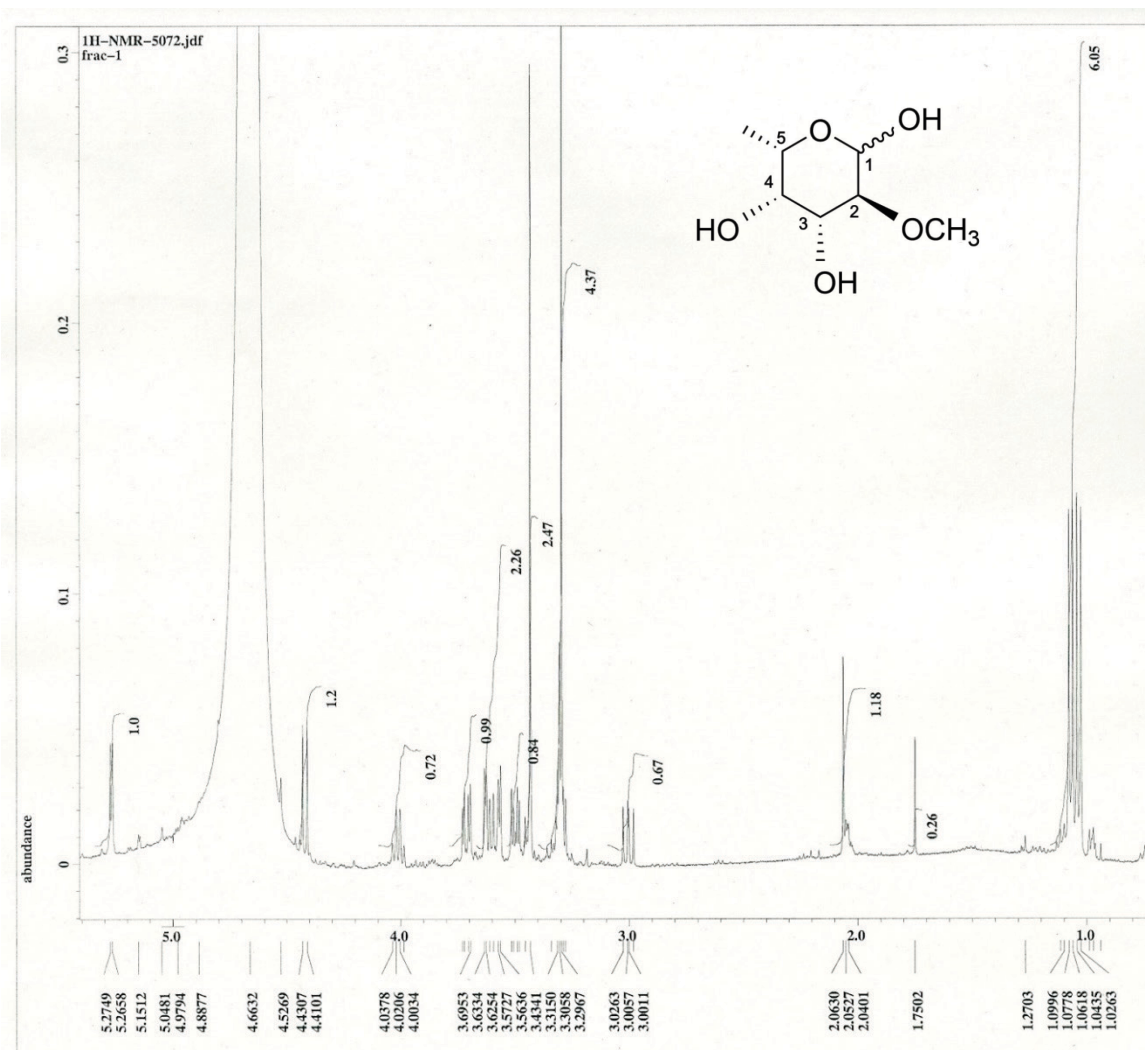


Fig. 18 ^1H NMR spectrum of 2-O-Methylfucose fraction

Fig. 19、20 に α 体、および β 体の COSY による相関図を示した。この結果から、隣接する ^1H - ^1H 相互作用から、 α 体、 β 体の H1 位から H5 位までの繋がりが確認された。

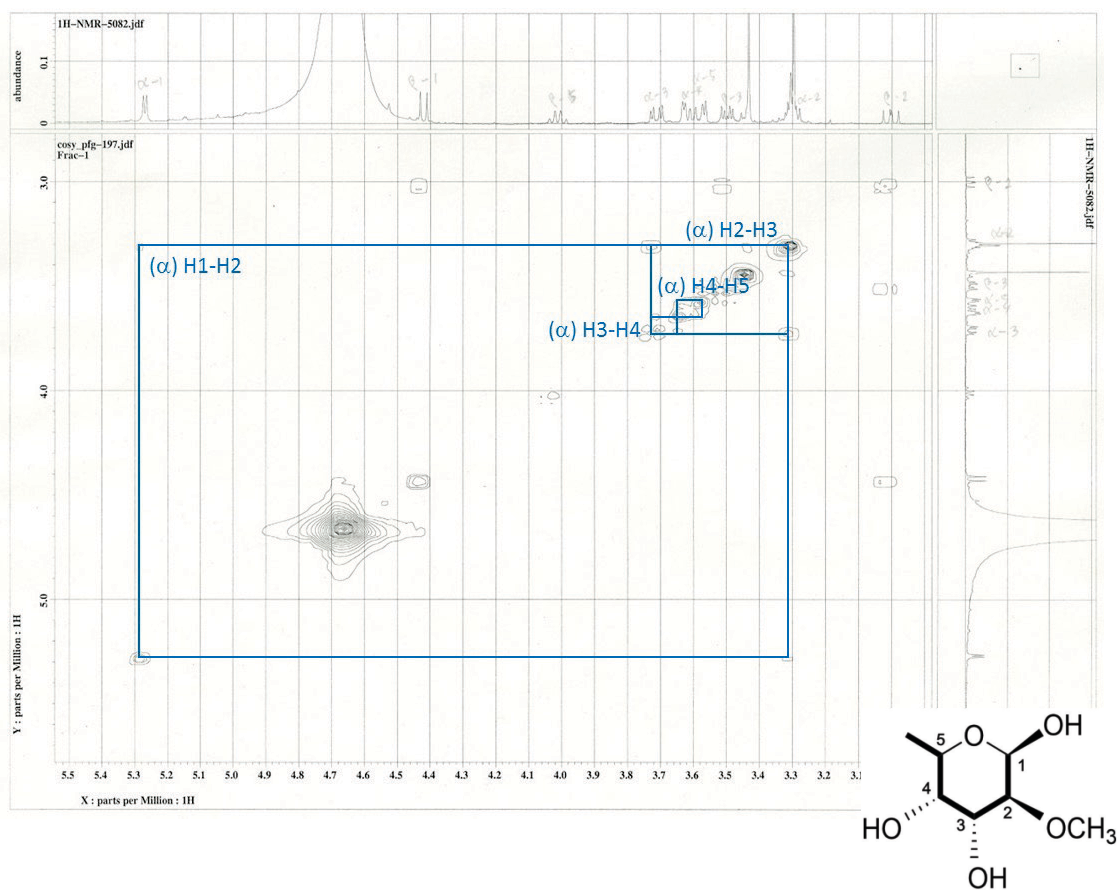


Fig. 19 COSY of α -isomer of 2-O-Methylfucose fraction

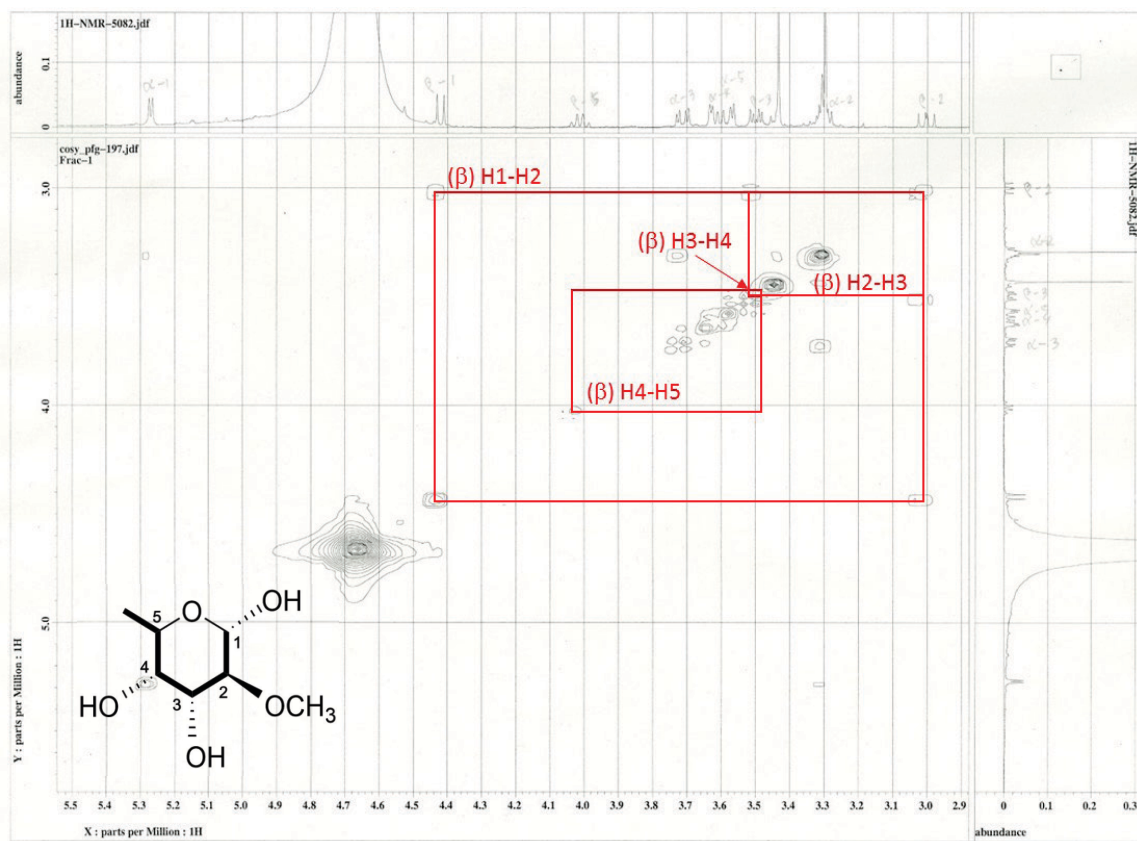


Fig. 20 COSY of β -isomer of 2-O-Methylfucose fraction

次に、メトキシ基の置換位置について、メトキシ基のメチルは酸素を間に挟んで結合しているため COSY では相関関係を確認することはできない。そこで、 ^{13}C NMR および水素-炭素間の遠隔カップリングを観測できる HMBC の測定を行った。Fig. 21、22 にそれぞれ、 ^{13}C NMR、HMBC のスペクトルを示した。

メトキシ基の水素からの相互作用よりメトキシ基は δ_{C} 77.9、および、81.6 の炭素に結合していたので、これら 2 つの炭素の帰属できれば、メトキシ基の位置を決定できることになる。水素は COSY によって既に帰属されているので、その結果から、HMQC を解析した。

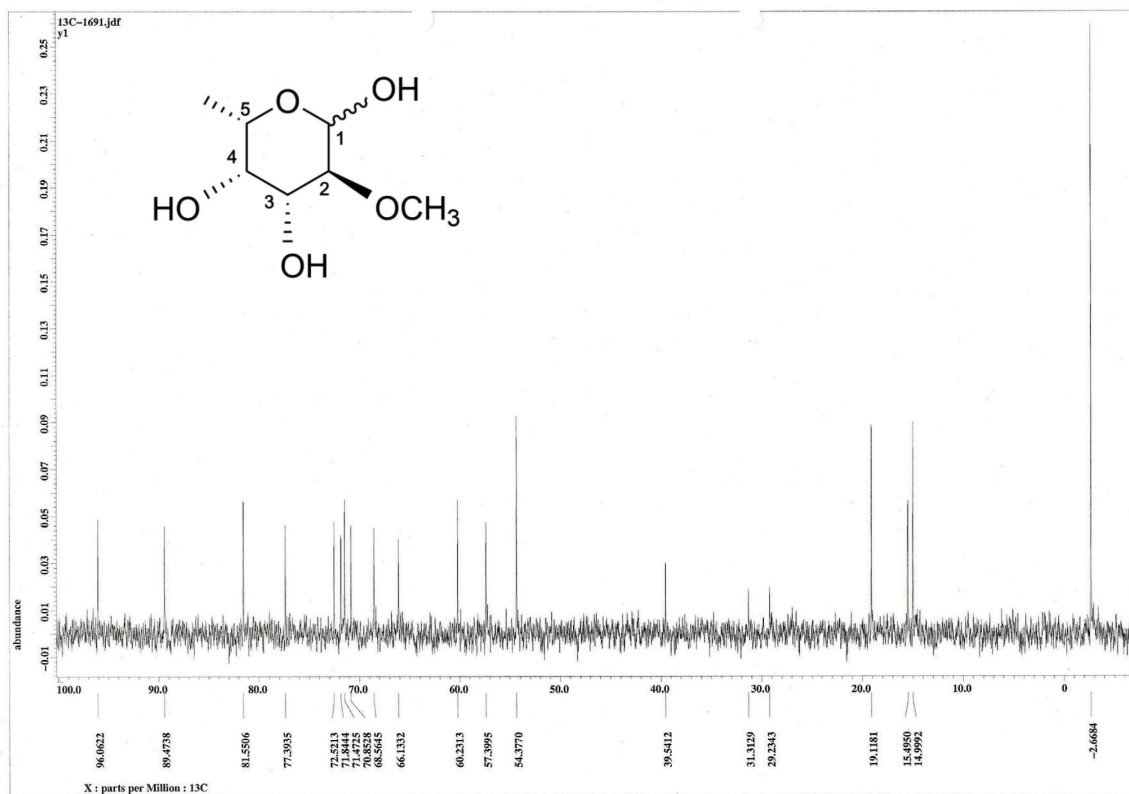


Fig. 21 ^{13}C NMR spectrum of 2-O-Methylfucose fraction

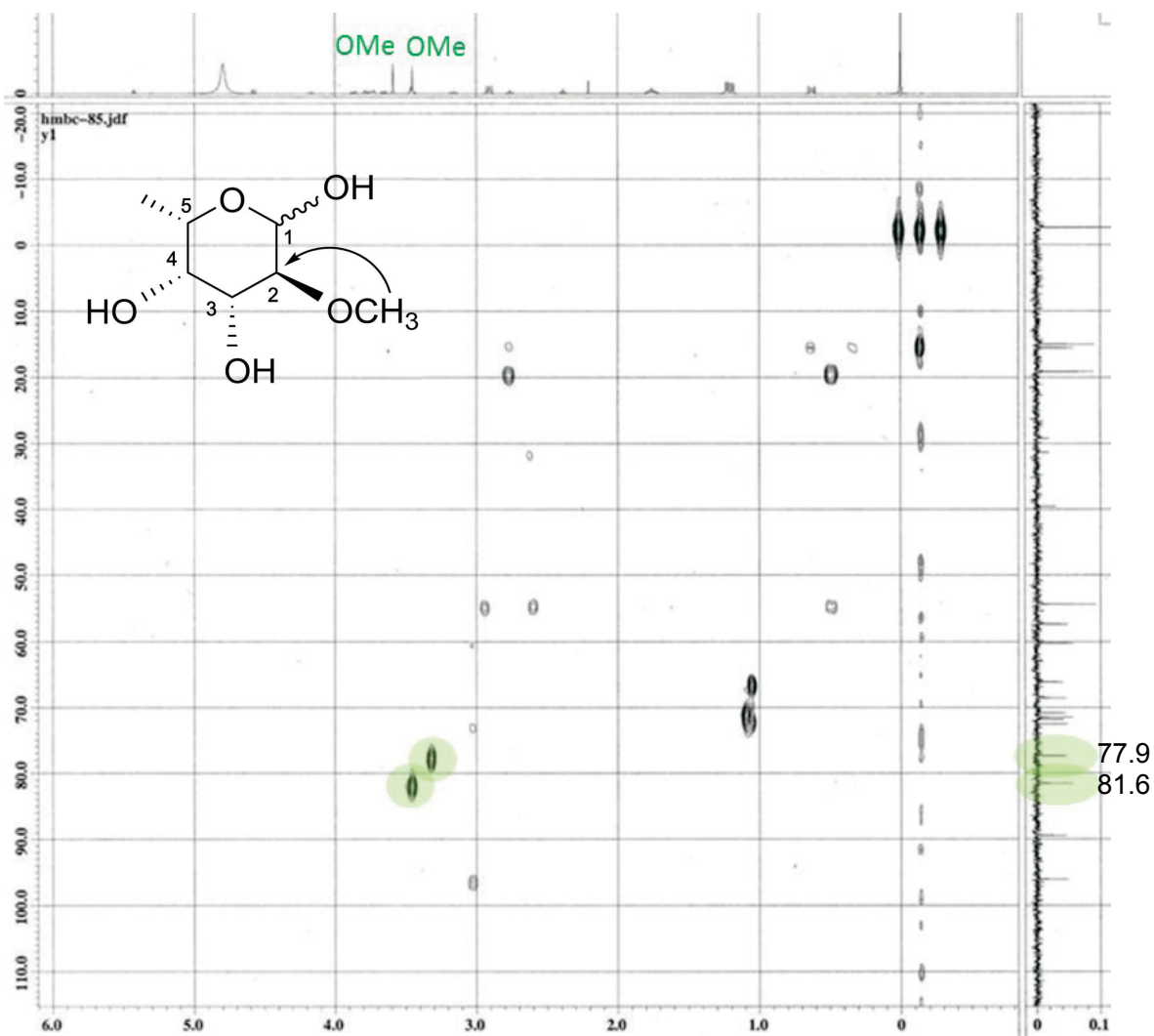


Fig. 22 HMBC of 2-O-Methylfucose fraction

Fig. 23 に HMQC を示した。HMBC でメトキシ基との相互作用が観測された δ_c 77.9 および 81.6 に対して 2 位の水素シグナルからの相関関係が確認できたのでメトキシ基の置換位置は 2 位であると決定した。以上の解析から水素を完全帰属した結果を Fig. 24 に示した。

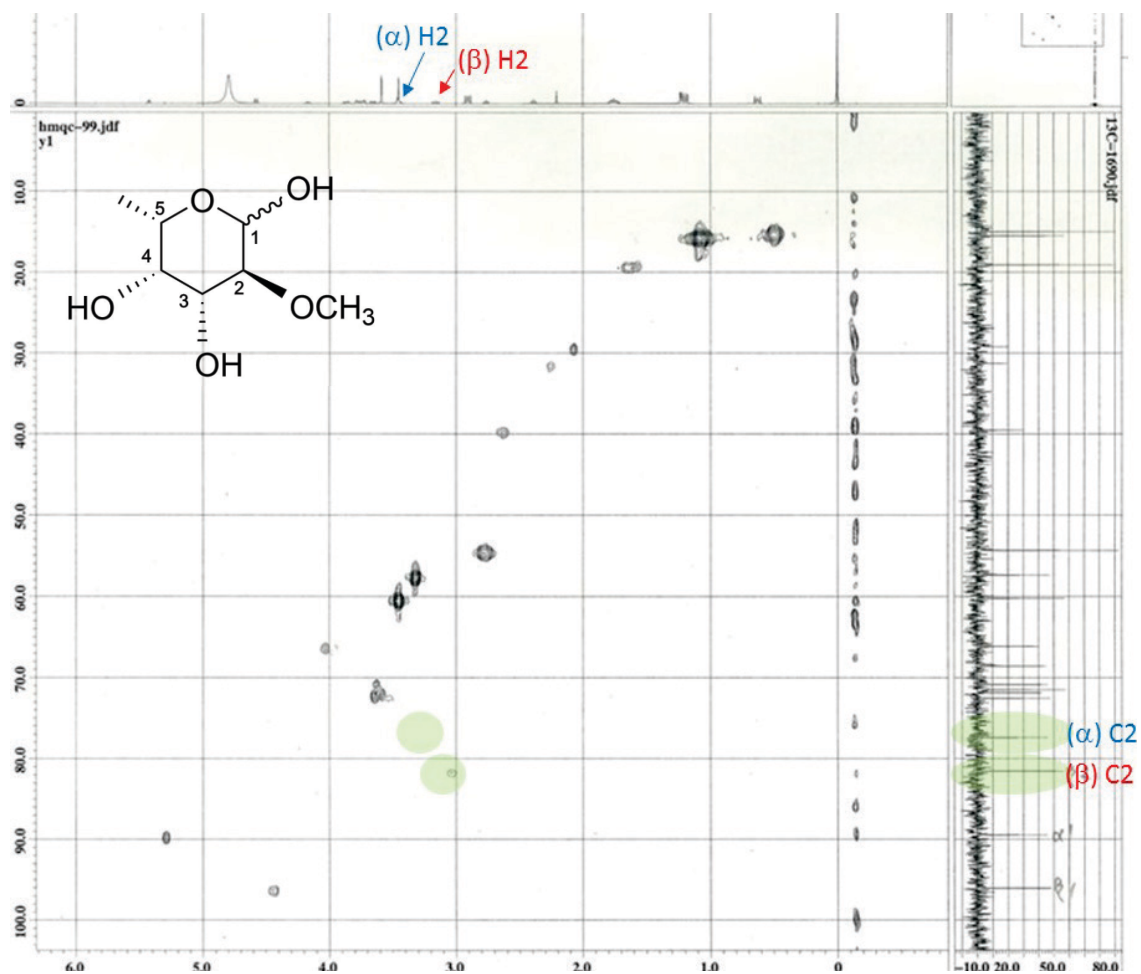


Fig. 23 HMQC of 2-O-Methylfucose fraction

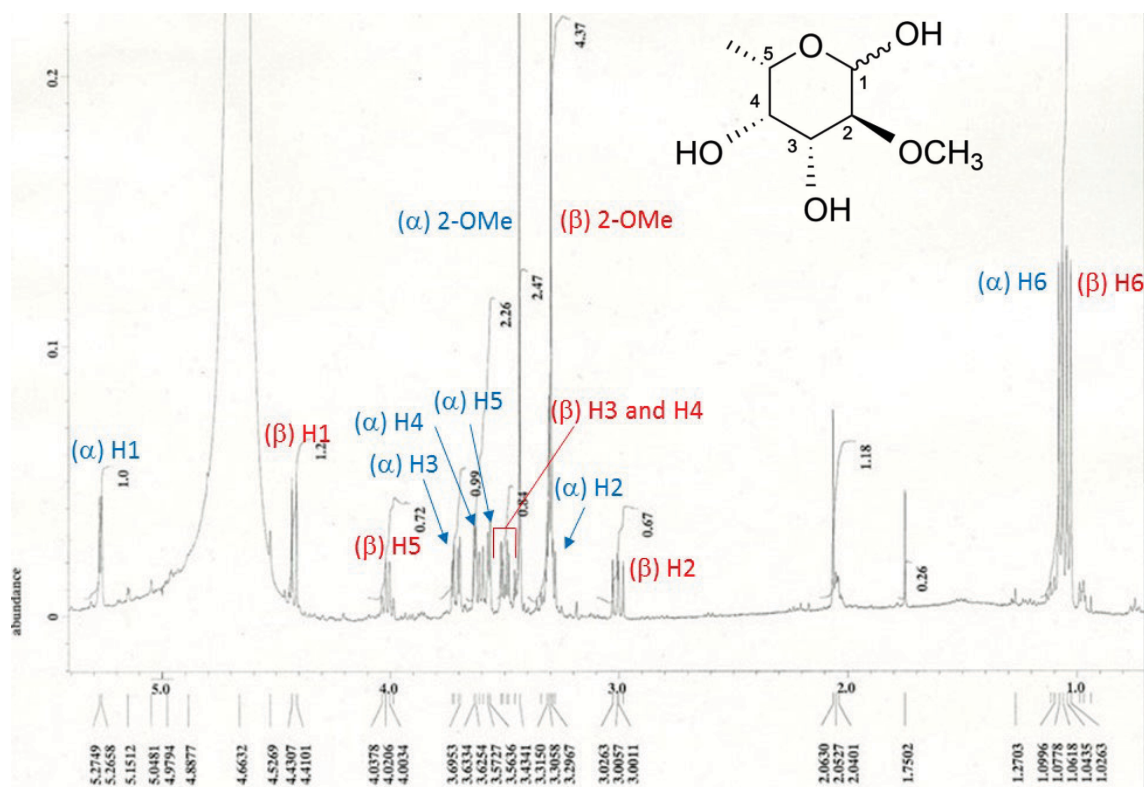


Fig. 24 Full assignment of protons of α , β -isomers

α -isomer

δ 5.27 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.71 (1H, dd, $J = 10.5, 3.2$ Hz, H-3), 3.62-3.59 (1H, m, H-4), 3.59-3.55 (1H, m, H-5), 3.32-3.28 (1H, m, H-2), 3.30 (3H, s, 2-OMe), 1.07 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6).

β -isomer

δ 4.42 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-1), 4.04-3.98 (1H, m, H-5), 3.52-3.49 (1H, m, H-3), 3.49-3.45 (1H, m, H-4), 3.43 (3H, s, 2-OMe), 3.00 (1H, dd, $J = 10.1, 8.2$ Hz, H-2), 1.05 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-6).

さらに、Fig. 25 に示した FAB-MS のスペクトルからは 2-*O*-メチルフコースの $[M+Na]^+$ として、 m/z 201 を確認した。

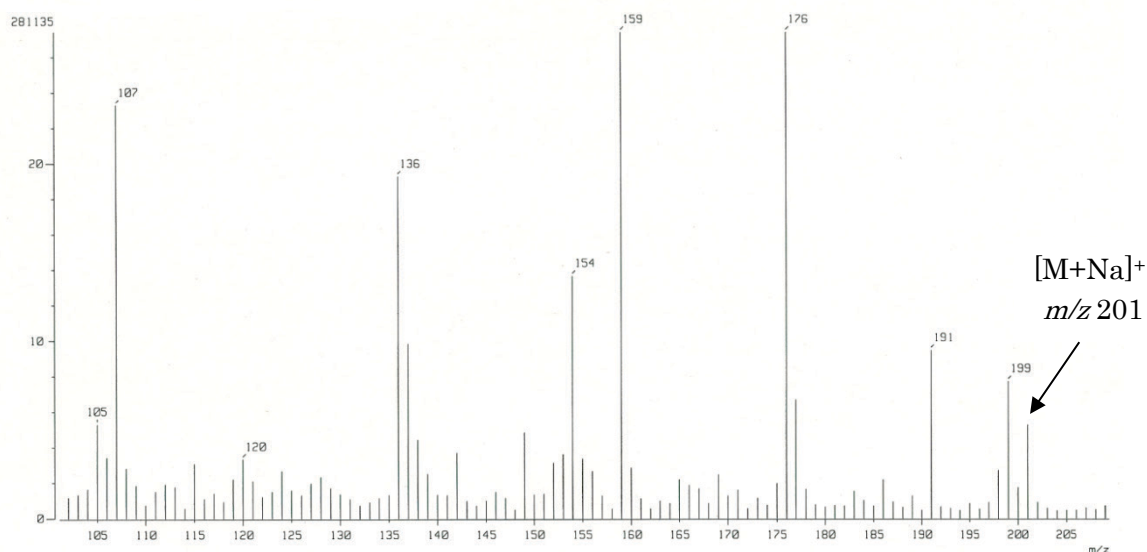
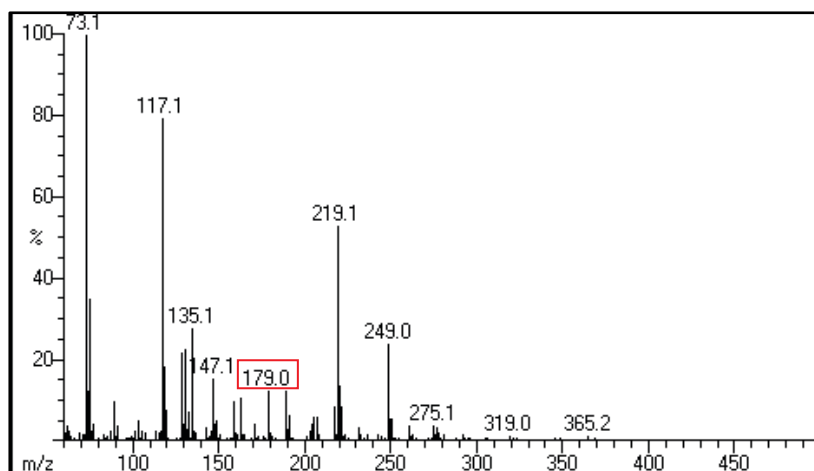


Fig. 25 FAB-MS spectrum of 2-O-Methylfucose fraction

GC-MS 分析のためにジエチルジチオアセタール-TMS 化されたフコースと 2-*O*-メチルフコースのマススペクトルを 4 節の Fig. 14 に示したが、各ピークの由来を解析した結果を Fig. 26 に示した。 m/z 73、135 ならびに 219 は両者に共通するピークであったが、 m/z 179 は 2-*O*-メチルフコースに特有のピークであった。



Mass spectrum of diethyldithioacetal-TMS derivatized 2-O-Methylfucose

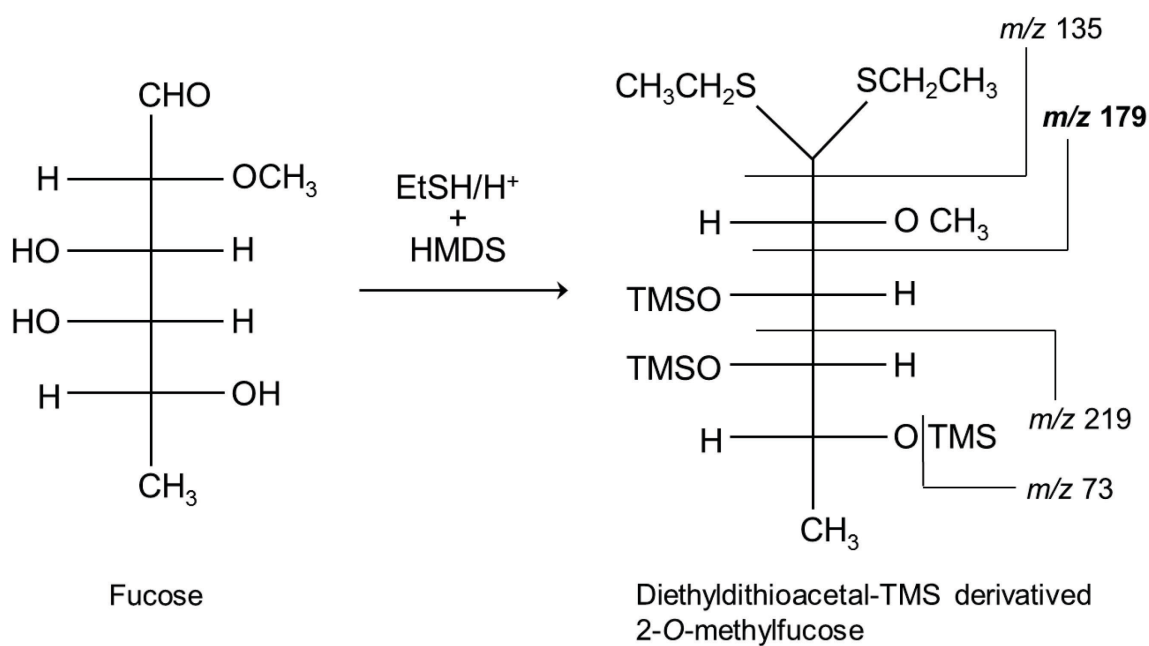


Fig. 26 Analysis of mass spectrum of diethyldithioacetal-TMS derivative
2-O-methylfucose

EtSH; Ethanethiol, HMDS: Hexamethyldisilazane

考 察

N. lobatus 抽出物から精製された Fr. III の GC-MS により、未同定物質の存在が確認された。この未同定物質を分取 TLC にて単離し、NMR による構造解析の結果、この未同定物質は 2-*O*-メチルフコースであると決定した。この 2-*O*-メチルフコースはバクテリアから検出されたとの報告があるが、^{35, 36)} 本研究において、藻類からは初めて確認された。藻類からは初めての報告ではあるが、*N. lobatus* は藍藻であり、原核生物の一種なので、バクテリアと共通の代謝経路が存在するのかもしれない。

秋山らが報告した多糖の糖組成分析法は加水分解した多糖をジエチルジチオアセタール化後に TMS 化し、GC で分析するものであった。この方法はこれまでの常法である GC や HPLC による糖分析法ではできなかった中性糖とウロン酸の同時分析が可能なのが特徴であるが、メトキシ基を有する糖の検出にも有効であった。

Motham らは TLC 分析によって、天然の *N. lobatus* にはグルコース、フルクトース、マンノースが含まれており、生息場所によってはラムノース、グルクロン酸、ガラクトースが含まれることを報告した。¹⁴⁾ したがって、培養された *N. lobatus* にもグルクロン酸が含まれる可能性があることから、本糖分析法を採用した。*N. lobatus* 多糖の主構成糖として、フコース、グルコース、マンノース、グルクロン酸および 2-*O*-メチルフコースが同定され、少量のキシロースとマンノースが同定された。したがって、培養された *N. lobatus* の構成糖は天然物とは異なっていた。Motham らがナン川で採取した天然物はグルクロン酸が含まれており、ラムノースが少ないことが特徴であったが、本研究で使った *N. lobatus* もナン川で採取した株で、グルクロン酸の存在は共通していた。

第6節 摘 要

タイのナン川から単離し、大量培養した食用藍藻 *Nostochopsis lobatus* MAC0804NAN 株の熱水抽出物に含まれるヒアルロニダーゼ阻害活性が強い多糖を陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過を用いて精製した結果、3つの多糖フラクション (Fr. I、Fr. II、Fr. III) が得られた。その中で、活性が最も強かった多糖のヒアルロニダーゼに対する IC₅₀ は 7.2 µg/ml であった。その活性の強さは抗アレルギー薬として使われているクロモグリク酸ナトリウムと比べ、14.5 倍であった。精製された *N. lobatus* の多糖は排除限界分子量が 2×10^7 のゲル濾過カラムにほとんど保持しなかったため、分子量を測定することはできず、 2×10^7 以上の高分子成分と推定された。

この精製された多糖はグルコース、グルクロン酸、フコース、2-O-メチルフコース、マンノース、ガラクトース、および、キシロースからなり、活性が最も強かったフラクションの組成比はそれぞれ、25.2、22.1、20.3、15.4、10.2、3.9、および 2.6% であった。Table 3 にそれらの結果をまとめた。これまで、バクテリアから 2-O-メチルフコースが検出された報告はあったが、藻類からの検出されたのは初めてである。

以上のことから、*N. lobatus* MAC0804NAN 株は強いヒアルロニダーゼ活性を有する巨大な分子量の多糖を多く産生することを明らかとした。さらに、その多糖には 2-O-メチルフコースという藻類では報告されていない糖を含んでいることも明らかとした。

Table 3 Profile of purified polysaccharides of
Nostochopsis lobatus strain MAC0804NAN.

	80% EtOH treat. + Dialysis	Fraction		
		I	II	III
Yield for dry alga (%)	39.5	2.6	2.7	17.9
Protein (%)	0.19	0.17	0.54	0.54
Anti-hyaluronidase activity IC ₅₀ (µg/ml)*	12.3	22.0	10.9	7.18
Sugar composition ratio (%)				
2- <i>O</i> -methylfucose		19.4	17.8	15.7
Xylose		3.4	3.8	2.6
Fucose		23.4	20.6	20.3
Glucuronic acid		17.8	21.1	22.1
Glucose		23.8	22.8	25.2
Mannose		8.2	10.0	10.2
Galactose		4.1	4.1	3.9

* IC₅₀ of DCSG as positive control was 104.4 µg/ml

第2章 人工培養した食用 *Nostoc* 属 4 種 5 株のヒアルロニダーゼ阻害活性と糖組成の比較

はじめに

日本において、先述のスイゼンジノリだけでなく、*Nostoc* 属の仲間には食用藍藻として古い歴史を持つ種がいる。それは、きれいな川に生息するアシツキ (*Nostoc verrucosum*, Fig. 27a) で、万葉集の歌に詠まれているほど、古くから知られている。⁸⁾ 現在では天然のアシツキは減少し、生息域の富山県では保護されている。⁹⁾

陸生藍藻であるイシクラゲ (*Nostoc commune*, Fig. 27b) は姉川クラゲ (滋賀) やイワキクラゲなどの地方名があるように日本各地で食べられてきた。⁸⁾ 現在、その習慣はほとんどなくなっているが、沖縄ではモアーサと呼ばれ、現在でも食習慣が残っている。⁷⁾ イシクラゲは日本だけでなく、中国などを含めた東アジアで食用にされてきた。イシクラゲの生理活性については筆者らによるコレステロール上昇抑制作用、抗酸化作用、抗菌作用をなど、いくつかの報告^{5, 39)} がある。

中国では髮菜 (*Nostoc flagelliforme*, Fig. 27c) と呼ばれる陸生の *Nostoc* 属が高級食材として知られている。髮菜は青海省や内蒙古自治区などの乾燥した沙漠地帯に生息する珍しい藍藻である。中国では髮菜と「発財 (財を生むという意味)」が同じ発音であることから、髮菜は縁起物として珍重されてきた。⁶⁾ しかし、砂漠地帯での乱獲が黄砂の原因にもなることから、現在では採集・販売が禁止されている。その後も髮菜の食文化は残っているため、髮菜の模造品が流通している。そのため、中国では髮菜の人工培養の研究も行われているが、

商業利用には至っていない。筆者らは髪菜の天然品を使って、いくつかの生理活性を報告してきた。⁵⁾ それらは我々にとって有用なものなので、人工培養による大量生産が望まれている。

一方、南米ペルーの標高の高い湖などに生息する *Nostoc sphaericum* (Fig. 27d) は Cushuro と呼ばれ、現在でも食用とされている。^{15, 16)} しかし、その生理活性についての報告はほとんどなく、Knübel らによる抗ウイルス作用が報告されているのみである。⁴⁰⁾

筆者らは天然のイシクラゲや髪菜の生理活性を調べてきたが、アシツキや Cushuro については研究に必要な天然品の確保ができなかった。本研究では、これらの 4 種の食用 *Nostoc* 属を利用するために大量培養を検討した。これまでに、天然の *N. flagelliforme* についてのみ、ヒアルロニダーゼ阻害活性が測定されているので、本研究では培養された 4 種の食用 *Nostoc* 属のヒアルロニダーゼ阻害活性を測定し、その活性と関係の深い糖組成を比較分析することを目的とした。培養された同属の藍藻について、生理活性の比較は初めての試みとなる。



a : *Nostoc verrucosum*



b : *Nostoc commune*



c : *Nostoc flagelliforme*



d : *Nostoc sphaericum*

Fig. 27 Wild colonies of edible genus *Nostoc*

第1節 *Nostoc* 属 4 種 5 株の培養

藍藻類の *Nostoc* 属に属するいくつかの種は国内外にて長い食経験があり、現在でも市場に出る種もいるが、いずれも天然物である。さらに、その生息域は極めて限定的なため、^{6, 9, 15, 16)} いずれも食品として十分な利用はなされておらず、その商業的培養も行われていない。筆者らは天然の *Nostoc flagelliforme* のヒアルロニダーゼ阻害作用を報告したが、¹⁷⁾ 他の *Nostoc* 属については報告されていない。食用 *Nostoc* 属の研究、あるいはその有用性を活用するためには大量培養を確立させる必要がある。そこで、本節では、食用 *Nostoc* 属 4 種の大量培養を検討した。

材料と方法

培養株の入手

中国から食用に輸入したイシクラゲ (*Nostoc commune*)、ならびにペルーのリマの市場で購入した Cushuro (*Nostoc sphaericum*) は窒素源を抜いた BG-11³¹⁾ (BG11-N) と一緒に乳鉢でコロニーをすり潰した。先端を細く加工したパスツールピペットで目的の細胞を吸い取り、96 穴マイクロプレートに移し、他の藻類がないコロニーを集めて増やした。単離された中国のイシクラゲ、および Cushuro をそれぞれ、*Nostoc commune* #31 株、*Nostoc sphaericum* MAC0910PER 株とした。*Nostoc commune* YK-04 株は三重大学の加藤 浩助教より、*Nostoc flagelliforme* NXU 株は中国・寧夏大学の蘇 建宇教授より、*Nostoc verrucosum* KU005 株⁴¹⁾ は金沢大学の坂本敏夫准教授よりそれぞれ提供いただいた。

培養条件

N. sphaericum MAC0910PER 株と *N. verrucosum* KU005 株は BG11-N 培地で培養した。*N. commune* #31 株、YK-04 株、および、*N. flagelliforme* NXU 株は改変した BG-11 培地で培養した。改変 BG-11 は 1 L あたり、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.8 mg、EDTA.2Na, 1 mg を添加し、 K_2HPO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、および微量元素溶液は BG-11 と同じとした。単離直後、あるいは通気培養を行うまでは 18 - 25°C の部屋の蛍光灯下（光量：40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16 時間明/8 時間暗）で培養した。

大量培養は第 1 章第 1 節で使用した 180 L 円筒形アクリル水槽を使用し、光源は 96W ツイン蛍光灯を 4 本使用した。培養温度は 20–25°C、空気をバブリングすることにより酸素、窒素の供給と攪拌を兼ねた。

結 果

中国から輸入されたイシクラゲは Fig. 28 のように、乾燥体であったので、BG11-N 培地で膨潤させた後にすり潰した。ペルーの市場で入手した *N. sphaericum* の天然物は生の状態で、Fig. 27d に示した様に、外皮がしっかりとした球形のコロニーであるが、コロニーによって色は異なっていた。この中でも色の濃いコロニーを乳鉢ですり潰し、先を細く加工したパスツールピペットを用いて短い糸状体を吸い取り、96 穴マイクロプレートに移した。天然物から単離された細胞はやがて輪郭が明瞭なコロニーを形成した (Fig. 29)。このコロニーの生長に伴って、培養液量を増やし、最終的には 180 L 円筒水槽 (Fig. 30) で培養し、外皮がしっかりとした緑褐色のコロニー (Fig. 31) を得た。細胞を増やす場合は成長したコロニーを乳鉢やガラスホモジナイザーなどで、糸状体になるまで、すり潰し、通気をせずに培養した。その後、1 週間ほどで、Fig. 32a

の様な細胞となり、さらに1カ月後には球形のコロニーを形成した (Fig. 32b)。

他の *Nostoc* 属 3 種は *N. sphaericum* の様なしっかりとしたコロニーは形成しなかったため、通気培養によって、糸状体が分裂し、増殖した。

180 L 円筒水槽での培養はバッチ式となるため、代謝産物などによって培養物の状態は悪くなるので、培養期間は2週間とした。



Fig. 28 Imported Chinese wild *Nostoc commune*

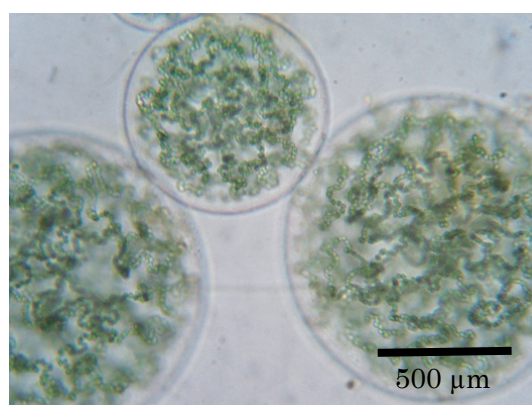


Fig. 29 Small colonies of cultured *Nostoc sphaericum*



Fig. 30 180 L tank culture of *Nostoc sphaericum*

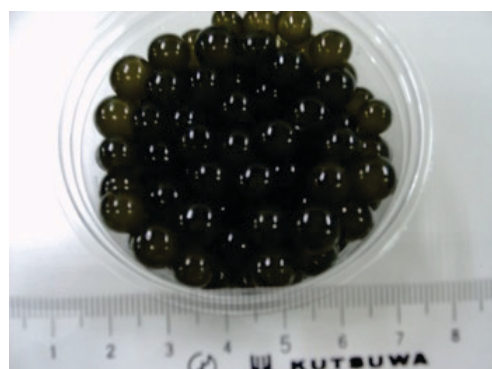


Fig. 31 Large colonies of cultured *Nostoc sphaericum*

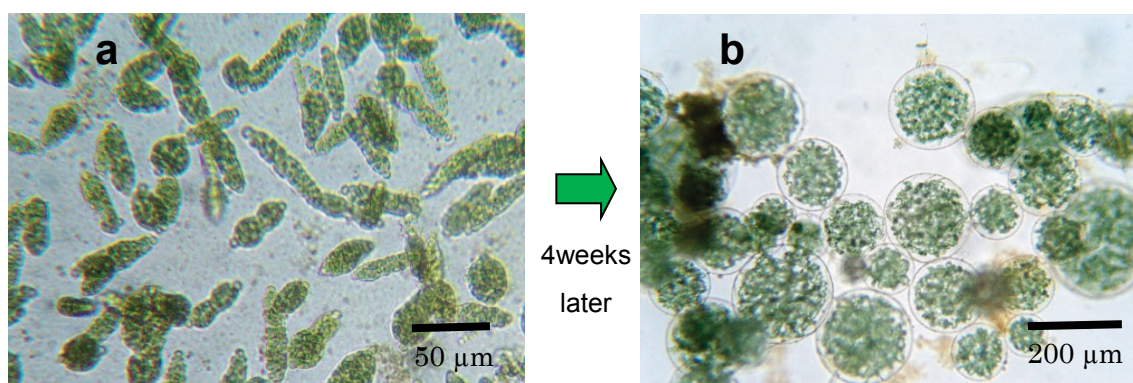
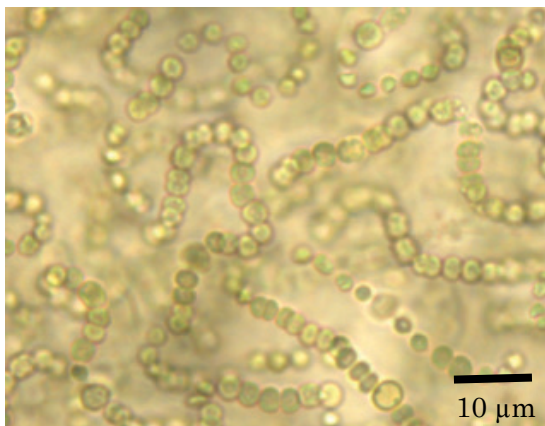
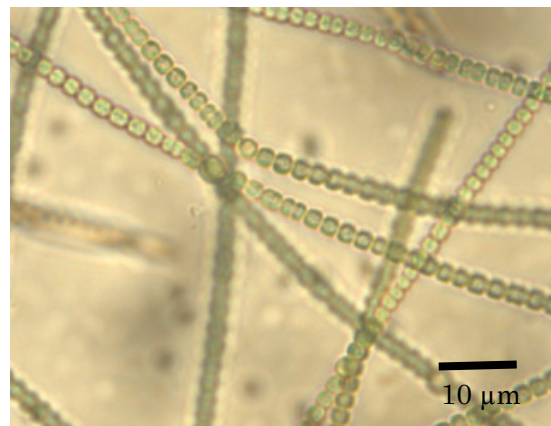


Fig. 32 Small colonies of cultured *Nostoc sphaericum*

培養された 5 株 (*N. commune* #31 株と YK-04 株、*N. flagelliforme* NXU 株、*N. sphaericum* MAC0910PER 株、*N. verrucosum* KU005 株) の顕微鏡写真を Fig. 33 に示した。いずれも、*Nostoc* 属の特徴である数珠状の糸状体を形成したが、その湾曲の程度など相違点もあった。中でも、*N. commune* の 2 株は同じ種でありながら、#31 株の糸状体はよく湾曲していたが、YK-04 株の湾曲は少なく、形状は異なっていた。



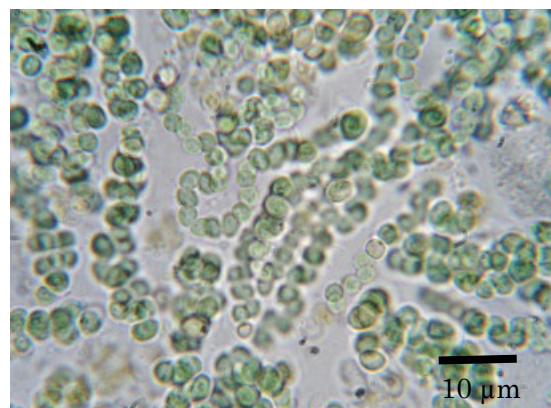
Noctoc commune strain #31



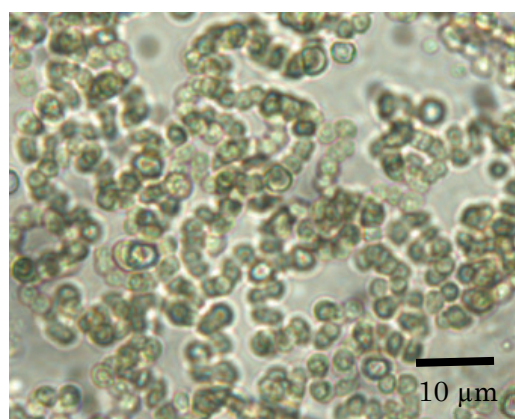
Noctoc commune strain YK-04



Noctoc flagelliforme strain NXU



Noctoc sphaericum strain MAC0910PER



Noctoc verrucosum strain KU005

Fig. 33 Microscope pictures of 5 cultured strains of *Nostoc*

考 察

これまでに、*N. sphaericum* の大量培養に関する報告はなく、本研究により、興味ある結果が得られた。例えば、*N. sphaericum* は Fig. 29 の様なコロニーを形成した後はコロニーの数は増えず、コロニーが大きくなり、増殖するという、他の *Nostoc* 属にはない増殖を示した。さらに、大きく丈夫なコロニーを形成するので、他の *Nostoc* 属より培養物の回収が格段に効率良いのも特徴であった。

商業利用のための食用 *Nostoc* 属の大量培養はなされておらず、大量培養に関する報告もほとんどない。天然の *N. flagelliforme* についてはその生理活性に関する報告がいくつかあるが、⁵⁾ 現在では天然の *N. flagelliforme* の入手はできない。⁶⁾ *N. sphaericum* や *N. verrucosum* も特殊な環境で生育する種であり、絶滅危惧種に指定されているため、^{9, 15)} これらの研究や実用化の障害になっていた。本研究によって、これら食用 *Nostoc* 属の大量培養が成功したことは、これらの有用性の研究やその活用に役立つものと考えられる。

本研究の培養装置では、180 L の培養物に対して、照明装置として、96W の蛍光灯を 4 本使用したので、その消費電力だけでも 9 kW/day となる。本装置で培養された培養物の生産コストでは実用化は容易ではないので、培養した食用 *Nostoc* 属を実用化させるためには培養コストの削減が求められる。

第 2 節 *Nostoc* 抽出物の作製

筆者らは天然の *Nostoc flagelliforme* のヒアルロニダーゼ阻害活性を報告したが、¹⁷⁾ その他の *Nostoc* 属のヒアルロニダーゼ阻害活性の報告はこれまでにはない。食用 *Nostoc* 属は第 1 章の *Noctochopsis lobatus* 同様、藍藻類の仲間であり、細胞外多糖を産生するので、その熱水抽出物にはヒアルロニダーゼ阻害活性のあることが予想される。そこで、人工培養された 4 種 5 株の *Nostoc* 属のヒアルロニダーゼ阻害活性を測定するため、本節では、*N. lobatus* と同様の方法で抽出物を作製した。

材料と方法

培養された *Nostoc* 属 5 株の凍結乾燥品 5g を 1000 ml の熱水 (90~95℃) で 3 時間攪拌抽出した。抽出物を遠心分離 (10,000 rpm、10 分) した後、ガラス繊維ろ紙 GA-100 (ADVANTEC 製) を用いて、吸引ろ過し、ろ液をエバポレーターで 100 ml まで濃縮した。ただし、*N. commune* YK-04 株と *N. sphaericum* MAC0910PER 株は濃縮液の粘性が高かったため、200 ml まで濃縮した。濃縮液に 4 倍量のエタノールを加えて凝集物を生成させ、7℃で 1 晩放置した。凝集物を遠心分離 (3,000 rpm、10 分) で回収し、なるべく少ない量の水に再溶解した。これを透析用セルロースチューブ (分画分子量 12,000–14,000、VISKASE SALES 製) に入れ、水道水の流水で 1 昼夜透析し、さらに、イオン交換水で 24 時間透析した。以下、この試料を抽出物と呼ぶことにした。

結 果

Nostoc 属 5 株の抽出物の乾燥藻体に対する収率を Table 4 に示した。*Nostoc commune* #31、*N. commune* YK-04、*N. flagelliforme* NXU、*N. sphaericum* MAC0904PER、および *N. verrucosum* KU005 の収率はそれぞれ、8.3、14.5、9.1、35.8、および、14.5%であった。*N. sphaericum* の収率は他の株の 2 倍以上多い収率であった。

Table 4 The yields of *Nostoc* extracts

Strain	Yield of dried alga (%)
<i>Nostoc commune</i> #31	8.3
<i>Nostoc commune</i> YK-04	14.5
<i>Nostoc flagelliforme</i> NXU	9.1
<i>Nostoc sphaericum</i> MAC0904PER	35.8
<i>Nostoc verrucosum</i> KU005	14.5

考 察

N. commune や *N. flagelliforme* の天然物の糖質量はそれぞれ、55.2、56.8%であった⁷⁾ ことに対し、人工培養の *N. commune* や *N. flagelliforme* の抽出物収率が 15%未満であったことは本研究における培養条件では細胞外多糖の産生量が少ないかあるいは産生された多糖が培養液中に溶出していることが考えられる。それに対し、*N. sphaericum* のコロニーは Fig. 31 のように、丈夫な外皮

に覆われているため、細胞外へ放出された多糖はコロニー内に蓄積され、培養液に溶出する量は少ないと考えられる。したがって、*N. sphaericum* は産生された多糖を効率良く利用することができる種であると考えられる。

第3節 *Nostoc*抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性の測定

Nostochopsis lobatus の熱水抽出物に医薬品の DSCG より強いヒアルロニダーゼ阻害活性が得られている。²⁹⁾ 人工培養された *Nostoc* 属についてのヒアルロニダーゼ阻害活性の報告はないので、本節では、培養された 4 種 5 株の *Nostoc* 属のヒアルロニダーゼ阻害活性を比較するために、それらの熱水抽出物を用いて比較した。

材料と方法

Nostoc 属 4 種 5 株の熱水抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性は第 1 章第 3 節と同じ方法で行った。すなわち、ヒアルロニダーゼ（牛精巢由来，タイプ IV-S）とコンパウンド 48/80 はシグマ製、クロモグリク酸ナトリウム (DSCG) は Enzo Life Sciences 製を使用し、ヒアルロン酸ナトリウム、ならびにその他の試薬は和光純薬工業製を使用した。

ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロニダーゼ、コンパウンド 48/80、塩化カルシウム、および、塩化ナトリウムは 0.1 M 酢酸緩衝液（pH4.0）に溶解した。

試料溶液 50 μ l、酢酸緩衝液 50 μ l、および 4000 unit/ml のヒアルロニダーゼ溶液 50 μ l の混合液を 37°C で 20 分インキュベーションした後、0.5 mg/ml のコンパウンド 48/80、12.5mM 塩化カルシウム、および 0.75M 塩化ナトリウムの混合液を 0.1 ml 加えて、37°C で 20 分インキュベーションした。さらに、0.8 mg/ml のヒアルロン酸ナトリウムを 0.25 ml 加えて、37°C で 40 分インキュベーションした後、0.4 M 水酸化ナトリウムを 0.1 ml 加えて反応を止め、氷冷した。10 分後、Morgan-Elson 法³³⁾ で遊離したアセチルグルコサミンを測定した。すなわち、氷冷した試料反応液に ホウ酸試液 0.1 ml を加えて沸騰水中で

3 分加熱した後、10 分再氷冷した。*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 3ml を加え、37℃で 20 分インキュベーションした後、585 nm における吸光度を測定した。

ヒアルロニダーゼ阻害率の計算法は以下の通りであった。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(A-B)-(C-D)\}/(A-B) \times 100$$

A : 試料の代わりに緩衝液を加えたときの OD₅₈₅

B : 試料とヒアルロニダーゼの代わりに緩衝液を加えたときの OD₅₈₅

C : 試料の入った OD₅₈₅

D : ヒアルロニダーゼの代わりに緩衝液を加えたときの OD₅₈₅

結 果

Nostoc 属 4 種 5 株の抽出物のヒアルロニダーゼに対する抑制率を Fig. 34 に示した。*N. sphaericum* 抽出物は他の株よりも低濃度でも強い阻害率を示した。*N. sphaericum* と *N. verrucosum* の抽出物について、最大溶解濃度はそれぞれ、58、128 µg/ml であったため、それ以上の濃度での阻害率の測定はできなかった。

この結果から求められた *N. flagelliforme*、*N. sphaericum*、および *N. verrucosum* の 50%阻害濃度 IC₅₀ はそれぞれ、46.5、14.4、および 56.2 µg/ml であった。この時、陽性対照として使用した医薬品の DSCG の IC₅₀ は 105.6 µg/ml であった (Table 5)。すなわち、これら 3 株のヒアルロニダーゼ阻害活性はいずれも、DSCG より強く、最も活性の強い *N. sphaericum* は DSCG の 7.3 倍の活性を示した。

一方、*Nostoc commune* の#31 株と YK-04 株の最大抑制率はいずれも 20% 未満であったため、 IC_{50} は求められなかった。

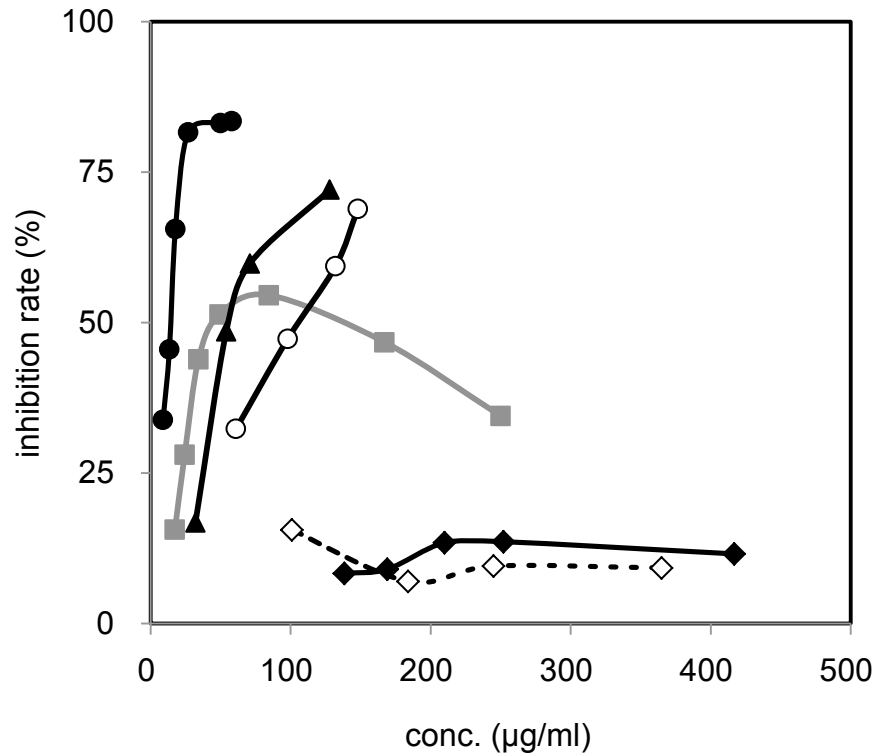


Fig. 34 Inhibition ratio of *Nostoc* extracts on hyaluronidase

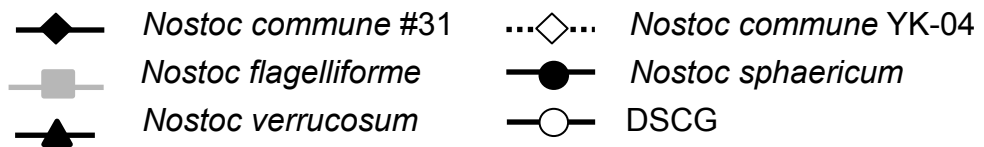


Table 5 IC₅₀ of *Nostoc* extracts on hyaluronidase

Strain	IC ₅₀ (μg/ml)
<i>Nostoc commune</i> #31	---
<i>Nostoc commune</i> YK-04	---
<i>Nostoc flagelliforme</i> NXU	46.5
<i>Nostoc sphaericum</i> MAC0904PER	14.4
<i>Nostoc verrucosum</i> KU005	56.2
DSCG	105.6

考 察

N. flagelliforme、*N. sphaericum*、および *N. verrucosum* の抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性はいずれも陽性対照の DSCG よりも強い活性を示した。しかし、*N. flagelliforme* の最大阻害率は 84.4 μg/ml において 54.5% で、それ以上の濃度での活性は急激に低下し、強い活性を示しながら、特異な抑制率を示した。*N. commune* 2 株の阻害率はいずれも低く、他の *Nostoc* 属とは大きく異なった。

IC₅₀ を求めることができた 3 株の中でも、*N. sphaericum* 抽出物の IC₅₀ は 14.4 μg/ml で、特に強い活性を示し、DSCG の 7.3 倍の活性であった。この値は第 1 章の *Nostochopsis lobatus* MAC0804NAN 株抽出物（80% エタノール処理と透析を行った抽出物）の IC₅₀（12.3 μg/ml）に匹敵する値であった。一方、強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する藻類由来の多糖としては、Katsube らの報告がある。²⁶⁾ それはワカメ胞子葉の熱水抽出物を陰イオン交換カラムで精製し

て得られた多糖で、その IC₅₀ は 12.1 µg/ml であったが、その収率は乾燥藻体に対して 3.7%あった。この多糖と同等のヒアルロニダーゼ阻害活性を有する *N. sphaericum* と *N. lobatus* の抽出物の収率はそれぞれ、39.5、35.8%であったので、これらの食用藍藻は強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する多糖を多く産生する食用藻類として、有用であることが明らかとなった。

第 4 節 *Nostoc* 抽出物の糖組成分析

Sawabe らはペクチン酸において、そのヒアルロニダーゼ阻害活性と糖組成におけるグルクロン酸の割合との間に相関があることを報告した。³⁶⁾ 培養された食用 *Nostoc* 属 4 種 5 株の熱水抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性にも差異が認められたので、本節では、それらの熱水抽出物の糖組成を調べた。

材料と方法

第 1 章第 3 節と同じ方法を用いた。すなわち、スクリュウキャップ付ガラス試験管に 10 mg の熱水抽出物と 0.85 ml の水を加え、窒素ガスを吹き込んで、試験管内の空気を窒素に置換した後、0.15 ml のトリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、105℃で加水分解した。この加水分解の時間は 3、6、および 12 時間の中で、ウロン酸の割合が最も高くなった時間とした。加水分解物の 0.2 ml を別のスクリュウキャップ付ガラス試験管に取り、減圧乾燥した後、エタンチオール-TFA (2 : 1) 混液 0.1 ml を加え、キャップをして室温で 10 分放置した。さらに、室温で、ピリジン 0.25 ml、ヘキサメチルジシラザン 0.5 ml、および TFA 0.15 ml を順次添加した後、キャップをして時々攪拌しながら 1 時間放置した。試験管を 40℃で加温しながら窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した後、水 0.25 ml とヘキサン 2 ml を加えて、無水硫酸ナトリウムで脱水したヘキサン層を GC-MS で分析した。

その条件は GC-MS (GC : Agilent 6890, MS : JEOL GC mate II) に DB-5MS キャピラリーカラム (30 m × φ 0.25 mm, J&W 製) を装備した。165℃で 2 分保持した後、235℃まで 2℃/分で昇温した。

10mM の単糖の標準液 0.2ml を減圧乾燥した後、同様に処理し、GC-MS の

リテンションタイムとマススペクトルから熱水抽出物中の糖の同定を行った。
また、フコース (Fuc)、グルコース (Glc)、ガラクトース (Gal)およびマンノース (Man)の標準品は 0.5、1.5、ならびに 5.0 mM を調製し、各濃度における GC-MS のトータルイオン強度から検量線を作成し、それぞれの熱水抽出物中の糖組成比 (モル%) を求めた。なお、ラムノース (Rha)、キシロース (Xly)およびグルクロン酸 (Glc UA)は 0.5、1.5、ならびに 2.5 mM の検量線を作成した。

結 果

Nostoc 属 5 株の糖組成は Table 2 の通りであった。5 株の多糖を構成する共通した糖はグルコース (Glc)、ガラクトース (Gal)、マンノース (Man)、キシロース (Xyl)、およびグルクロン酸 (Glc UA) であったが、*N. flagelliforme* のグルクロン酸は痕跡程度の量であった。ラムノース (Rha) とフコース (Fuc) は *N. sphaericum* では検出されず、他の 3 種に検出されたフコースは 5%未満あるいは痕跡程度であった。

いずれの株もグルコースの割合は最も高かった。*N. sphaericum* のグルクロン酸の割合は 5 株の中で最も高く、13.3%であった。抽出物の収率とヒアルロニダーゼ阻害活性が最も高かった *N. sphaericum* 抽出物のおよその糖組成はグルコース : ガラクトース : マンノース : キシロース : グルクロン酸 = 2 : 2 : 2 : 1 : 1 であった。

Table 2 Sugar composition of the extracts of cultured edible *Nostoc* (mol %)

nd : not detected, tr : trace amount

Strains	Glc	Gal	Fuc	Man	Rha	Xyl	Glc UA
<i>Nostoc commune</i> #31	36.4	15.8	2.9	20.2	11.6	11.8	1.2
<i>Nostoc commune</i> YK-04	39.5	15.8	tr	19.4	4.2	5.6	9.9
<i>Nostoc flagelliforme</i> NXU	51.9	1.1	tr	25.5	3.5	18.0	tr
<i>Nostoc sphaericum</i> MAC0904PER	28.9	25.5	nd	20.1	nd	12.1	13.3
<i>Nostoc verrucosum</i> KU005	27.8	24.8	4.5	14.4	11.5	8.8	8.3

考 察

N. sphaericum の抽出多糖が糖組成におけるグルクロン酸の割合が最も高く、ヒアルロニダーゼ阻害活性も最も高かった。しかし、他の *Nostoc* 属抽出物のグルクロン酸の割合とヒアルロニダーゼ阻害活性との関係は、完全に一致しなかった。第 1 章における *N. lobatus* から得られた 3 種の多糖や Sawabe らが報告したペクチン酸³⁶⁾ のように、同じ糖組成を有する多糖においては、グルクロン酸の割合とヒアルロニダーゼ阻害活性との相関は認められるが、糖組成が異なれば、その関係も変化すると考えられた。しかし、ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸（N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸からなる多糖）を分解する酵素であることから、ヒアルロニダーゼ阻害活性にはグルクロン酸が少なからず関与していることは考えられる。

Sakamoto らは *N. verrucosum* KU005 株から得られた多糖はグルコース、マンノース、キシロースおよびグルクロン酸が 5 : 5 : 2 : 1 の割合だったことを報

告したが、⁴²⁾ 本研究ではグルコース、マンノース、キシロース、グルクロン酸の他にガラクトース、フコースおよびラムノースも検出された。この違いは多糖の抽出法や分析法の違いによるものと思われる。

第5節 摘 要

いくつかの藍藻は古くから食用とされているが、その仲間の *Nostoc* 属にも食用とされている種がある。本研究では国内外で食用とされている *Nostoc* 属、*N. commune* #31 株、*N. commune* YK-04 株、*N. flagelliforme* NXU 株、*N. sphaericum* MAC0910PER 株、および *N. verrucosum* KU005 株の 4 種 5 株を 180 L の円筒形アクリル製水槽で大量培養を行なった。

培養された藻体の熱水抽出物を 80%エタノール処理し、得られた多糖抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性と構成糖を比較した。

N. commune #31 株、*N. commune* YK-04 株、*N. flagelliforme* NXU 株、*N. sphaericum* MAC0910PER 株、および、*N. verrucosum* KU005 株の抽出物の乾燥藻体に対する収率はそれぞれ、8.3、14.5、9.1、35.8、および 14.5%であった。さらに、*N. flagelliforme* NXU 株、*N. sphaericum* MAC0910PER 株、および、*N. verrucosum* KU005 株のヒアルロニダーゼに対する IC₅₀ はそれぞれ、46.5、56.2、14.4 $\mu\text{g/ml}$ で、いずれも、陽性対照である医薬品の DSCG (IC₅₀ : 105.6 $\mu\text{g/ml}$) より強い活性を示した。活性の最も強かった *N. sphaericum* MAC0910PER 株は DSCG の 7.3 倍の活性であった。一方、*N. commune* 2 株のヒアルロニダーゼ阻害率はいずれも 20%未満で、IC₅₀ は求められなかった。

食用 *Nostoc* 属 5 株の抽出物に含まれる多糖を構成する共通した糖はグルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、および、グルクロン酸であったが、*N. flagelliforme* のグルクロン酸は痕跡程度の量であった。ラムノースとフコースは *N. sphaericum* では検出されず、その他の 4 株に検出されたフコースは 5%未満あるいは痕跡程度の微量であった。

したがって、*N. sphaericum* MAC0910PER 株は食用 *Nostoc* 属 5 株の中で、最も多い抽出率と最も強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有しており、強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する多糖を産生する食用藍藻であることが明らかとなった。

さらに、本研究によって、これまでは天然由来でしか入手できなかった希少な食用 *Nostoc* 属の大量培養による生産が可能となったので、それらの実用化のために、ヒアルロニダーゼ阻害活性以外の研究も必要と考えられる。

要 約

日本ならびに海外で食用にされている藍藻の天然コロニーから単離した株あるいは供与いただいた単離株について、蛍光灯を照射した 180 L アクリル製円筒形水槽で培養した。その熱水抽出物について、ヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。さらに、その阻害物質の解析を行った。

タイの北部で食されている *Nostochopsis lobatus* の熱水抽出物にヒアルロニダーゼ阻害活性が認められたので、それを陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過で分画し、3 つのフラクションを得た。いずれのフラクションのヒアルロニダーゼ阻害活性は抗アレルギー薬として利用されているクロモグリク酸ナトリウム (DSCG : $IC_{50}=104.4 \mu\text{g/ml}$) よりも強く、最も活性の強かったフラクションの IC_{50} は $7.18 \mu\text{g/ml}$ であった。それらの構成糖は、グルコース、フコース、ガラクトース、キシロースおよび 2-*O*-メチルフコースであった。藻類から 2-*O*-メチルフコースが検出された報告は本研究が初めてであった。また、3 つのフラクションの構成糖は同じであったが、その組成比は若干異なっていた。さらに、グルクロン酸の割合が多いほどヒアルロニダーゼ阻害活性も強いという相関が認められた。

一方、藍藻の *Nostoc* 属には国内外で食用にされている種が複数知られている。そこで、*Nostoc commune* (イシクラゲ)、*Nostoc flagelliforme* (髪菜)、*Nostoc verrucosum* (アシツキ)、および *Nostoc sphaericum* (Cushuro) の 4 種 5 株について、その抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性と糖組成を比較した。

その結果、*Nostoc sphaericum* は抽出物の収量ならびにヒアルロニダーゼ阻害活性は他の 4 株より強い値を示した。

5 株の抽出物の構成糖において、グルコース、ガラクトース、マンノース、キ

シロース、およびグルクロン酸は共通する糖で、ラムノースとフコースは *Nostoc sphaericum* では検出されなかった。抽出物の収率とヒアルロニダーゼ阻害活性が最も高かった *Nostoc sphaericum* 抽出物のおよその糖組成はグルコース：ガラクトース：マンノース：キシロース：グルクロン酸=2：2：2：1：1 であった。多糖を構成する糖の種類が異なる場合、グルクロン酸比とヒアルロニダーゼ阻害活性との相関は完全には一致しなかったが、少なからず、ヒアルロニダーゼ阻害活性にはグルクロン酸が関与しているものと推察された。

Nostochopsis lobatus や *Noctoc sphaericum* は医薬品である DSCG よりも 7 倍以上強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する多糖を多く産生する食用藍藻であることが明らかとなった。これらの大量培養法も確立できたので、抗アレルギー食材として、実用化の可能性が示唆された。さらに、本研究で大量培養が可能となった 5 種の食用藍藻については、今後、様々な有用性に関する研究を行い、その活用へと発展させて行きたい。

参考文献

1. 竹中裕行, 第1章マイクロアルジェがつくった地球環境, 「生命の源マイクロアルジェー健康・美容・食糧・環境問題の救世主」成山堂書店, 東京. 4-5 (2004).
2. 加藤敏光, 3.スピルリナ, 「微細藻類の利用」(山口勝巳編) 恒星社厚生閣, 東京. 32-44 (1992).
3. 林修, サプリメントとしてのスピルリナの機能研究, 日本食生活学会誌, 18, 19-24 (2007).
4. Gao K, Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *J. Applied Phycol.* 10, 37-49 (1998).
5. 竹中裕行, 山口裕司, 食用藍藻: スイゼンジノリ, イシクラゲ, 髪菜の生理機能, *New Food Industry*, 52. 28-34 (2010).
6. 有賀祐勝, 第2編 藻類の応用 第3節 微細藻類の生産と利用 3 髪菜, 「藻類ハンドブック」(渡邊信監修). エヌ・ティー・エス, 東京. 655-656 (2012).
7. 竹中裕行, 山口裕司, 第2編 藻類の応用 第3節 微細藻類の生産と利用 2 ノストック(イシクラゲ), 「藻類ハンドブック」(渡邊信監修). エヌ・ティー・エス, 東京. 651-654 (2012).
8. 廣瀬弘幸, 平野實, CLASS CYANOPYCEAE 藍藻綱, 「日本淡水藻図鑑」(廣瀬弘幸, 山岸高旺編). 内田老鶴圃, 東京. 31, 99 (1991).
9. Oku N, Yonejima K, Sugawa T and Igarashi Y, Identification of the n-1 fatty acid as an antibacterial constituent from the edible fresh water cyanobacterium *Nostoc verrucosum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 1147-1150 (2014).

10. 栴田聖孝, 岡本智伸, 小田原健, 中藺孝裕, 大住啓一郎, 笹田直繁, 市川勉, 金子好雄, 荒牧昭二郎, 国指定天然記念物「スイゼンジノリ発生地」の現状及びその保護対策, 九州東海大学農学部紀要, **26**, 1-6 (2007).
11. 吉田忠生, 第2編 藻類の応用 第3節 微細藻類の生産と利用 1 スイゼンジノリ. 「藻類ハンドブック」(渡邊信監修). エヌ・ティー・エス, 東京. 648-650 (2012).
12. Peerapornpisal Y, Amomiedpison D, Rujjanawate C, Ruangrit K and Kanjanapothi D, Two endemic species of macroalgae in Nan River, northern Thailand, as therapeutic agents. *Science Asia*, **32**, 71-76 (2006)
13. Thiamdao S, Motham M, Pekkoh J, Mungmai L and Peerapornpisal Y, *Nostochopsis lobatus* Wood em. Geitler (Nostocales), edible algae in northern Thailand. *Chiang Mai J. Sci.*, **39**, 119-127 (2012).
14. Motham M, Khanongnuch C, Pathom-aree W, Pekkoh J, Pumas C and Peerapornpisal Y, Polysaccharides from *Nostochopsis* spp. In northern Thailand and its cultivation, *Proceeding in international conference on food and applied bioscience (Chiang Mai, Thailand)*, 9-14 (2012).
15. 増田昭三, ペルー南部における海岸と高地の交流. 国立民族学博物館研究報告書, **5**, 1-43 (1980).
16. Nunez J and Mendosa A, Fatty acids composition and nutritional effect in rats of Cushuro (*Nostoc sphaericum* voucher). *Pharmacologyonline*, **3**, 676-682 (2006).
17. Fujitani N, Sakaki S, Yamaguchi Y and Takenaka H, Inhibitory effects of microalgae on the activation of hyaluronidase. *J. Appl. Phycol.*, **13**,

- 489-492 (2001).
18. Liu D, Pearlman E, Diaconu E, Guo K, Mori H, Haqqi T, Markowitz S, Willson J and Sy M-S, Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7832-7837 (1996).
 19. Menzel EJ and Farr C, Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.*, **131**, 3-11 (1998).
 20. Lokeshwar VB and Selzer MG, Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 281-287 (2008).
 21. Edelstam GAB, Laurent UBG, Lundkvist ÖE, Fraser JRE and Laurent TC, Concentration and turnover of intraperitoneal hyaluronan during inflammation. *Inflammation*, **16**, 459-469 (1992).
 22. McKee CM, Lowenstein CJ, Horton MR, Wu J, Bao C, Chin BY, Choi AMK and Noble PW, Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8013-8018 (1997).
 23. Marandy EEI, Kanayama N, Kobayashi H, Hossain B, Khatun S, Liping S, Kobayashi T and Terao T, The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum. Reprod.*, **12**, 1080-1088 (1997).
 24. 掛川寿夫, 松本仁, 佐藤利夫, 種々抗炎症剤のヒアルロニダーゼ阻害作用. *炎症*, **4**, 437-438 (1984).

25. 前田有美恵, 山本政利, 増井俊夫, 杉山清, 横田正実, 中込和哉, 田中秀興, 高橋宇正, 小林利彰, 小林栄人, 茶抽出物の Hyaluronidase 阻害活性. 食衛誌, **31**, 233-237 (1990).
26. Katsube T, Yamasaki Y, Iwamoto M and Oka S, Hyaluronidase-inhibiting polysaccharide isolated and purified from hot water extract of sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 25-29 (2003).
27. Hashimoto E, Yabuta Y, Takenaka S, Yamaguchi Y, Takenaka H and Watanabe F, Characterization of corrinoid compounds from edible cyanobacterium *Nostochopsis* sp.. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **58**, 50-53 (2012).
28. Yabuta Y, Hashimoto E, Takeuchi T, Sakaki S, Yamaguchi Y, Takenaka H and Watanabe F, Characterization of a hot water extract on an edible cyanobacterium *Nostochopsis* sp. for use as an ingredient in cosme, *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 505-507 (2014).
29. Sakaki S, Tsuya Y, Yamaguchi Y and Takenaka H, Inhibitory effect on the activation of hyaluronidase contained in an edible blue-green alga, *Nostochopsis* sp. (Cyanophyta). *Algal Resources*, **5**, 17-19 (2012).
30. Kanekiyo K, Lee JB, Hayashi K, Takenaka H, Hayakawa Y, Endo S and Hayashi T, Isolation of an antiviral polysaccharide, Nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.*, **68**, 1037-1041 (2005).

31. Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M and Cohen-Bazire G, Purification and properties of unicellular blue-green algae (*Order Chlorococcales*). *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171-205 (1971).
32. Pandey U and Pandey J, Enhanced production of high-quality biomass, δ -aminolevulinic acid, bilipigments, and antioxidant capacity of a food alga *Nostochopsis lobatus*. *App. Biochem. Biotechnol.*, **150**, 221-231 (2008).
33. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
34. Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF, A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959-966 (1955).
35. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
36. Akiyama T, Yamazaki T and Tanamoto K, Analysis of thickening polysaccharides by the improved diethyldithioacetal derivatization method. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **52**, 40-46 (2011).
37. Sawabe Y, Nakagomi K, Iwagami S, Suzuki S and Nakazawa H, Inhibitory effect of pectic substances on activated hyaluronidase and histamine release from mast cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1137**, 274-278 (1992).
38. MacLennan AP and Randall HM, The occurrence of methyl esters of

- rhamnose and fucose in specific glycolipids of certain Mycobacteria. *Biochem. J.*, **80**, 309-318 (1961).
39. Sanjuan J, Carlson RW, Spaink HP, Bhat UR, Barbour WM, Glushka L and Stacey G, A 2-*O*-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8789-8793 (1992).
 40. Ninomiya M, Satoh H, Yamaguchi Y, Takenaka H and Koketsu M, Antioxidative activity and chemical constituents of edible terrestrial alga *Nostoc commune* Vauch. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2175-2177 (2011).
 41. Knübel G, Larsen KL, Moore RE, Levine IA and Patterson GML, Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the *Noctocaceae*. *J. Antibiotics*, **43**, 1236-1239 (1990).
 42. Sakamoto T, Kumihashi K, Kunita S, Masaura T, Inoue-Sakamoto K and Yamaguchi M, The extracellular-matrix-retaining cyanobacterium *Nstoc verrucosum* accumulates trehalose, but is sensitive to desiccation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **77**, 385-394 (2011).

謝 辞

岐阜大学大学院工学研究科物質工学専攻の社会人博士後期課程において、瀬 守教授より、終始、懇切なる御指導を賜りましたことに、心より厚く御礼申し上げます。

本研究の GC-MS の操作におきまして、御指導賜りました岐阜大学工学部・吉田敏教授に御礼申し上げます。NMR の操作や解析法について、御指導賜りました瀬瀬研究室・二ノ宮真之教務補佐員に深く感謝いたします。また、様々な形で、御協力いただいた瀬瀬研究室の皆様に深く感謝いたします。

本研究の材料を御提供賜りました金沢大学理工学域・坂本敏夫准教授、三重大学生命科学研究支援センター・加藤 浩助教、ならびに、中国・寧夏大学生命科学院・蘇 建宇教授に深く感謝申し上げます。

本研究の一部は一般財団法人越山科学技術振興財団の研究助成金（平成 26 年度）を受けて実施したことを付記し、御礼申し上げます。

最後に、岐阜大学大学院工学研究科の社会人博士後期課程への入学を御承認いただき、終始御助言を賜りましたマイクロアルジェコーポレーション株式会社・竹中裕行代表取締役役に深く感謝申し上げます。また、本研究の間、会社の業務や微細藻の培養をサポートしていただいたマイクロアルジェコーポレーション株式会社 MAC 総合研究所のスタッフ皆様に御礼申し上げます。