

中山間地域での食用イシクラゲ栽培

信州大学 農学部
伊原 正喜

1. 研究の目的と背景

Nostoc commune (イシクラゲ) は、窒素ガス固定能を有する単細胞性の陸生シアノバクテリアである。イシクラゲ細胞は、直鎖状に細胞分裂して糸状性群体となるが、やがて折れたたまり、数センチの巨大なコロニーを形成する(図1)。コロニーの外側には外殻が形成され、内空間には、多糖を主成分とした多様な化合物が含まれる^{1,2}。このようなコロニー構造は、乾燥や強光、外敵からの防御機構として機能している。時折、十数個の細胞から構成されるホルモゴニアと呼ばれる次世代の群体が放出され、それぞれが成長して新たなコロニーを形成する。

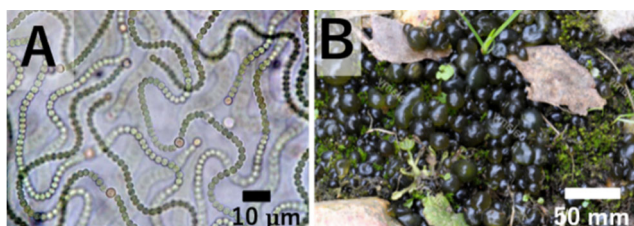


図1. *Nostoc commune* (イシクラゲ) の糸状性群体 (A) とコロニーの外観 (B)

イシクラゲは微細藻類であるが、殻をもつコロニー構造ゆえに収穫や洗浄、品質管理が容易であり、食品としての安全性を確保しやすい。実際、古来より、独特の触感が好まれて世界各地で食され、陸のワカメと言われていたものの、食が豊かになったことで、庭に生えるワカメ状で不気味なものとしてしか認識されず、駆除の対象となっているのが現状である。一方で、イシクラゲコロニー内には、ヒトに対して、抗酸化作用、血中コレステロール抑制効果、抗菌、免疫賦活、抗がん作用といった効果を持つ化合物が含まれている^{3,4}。また、イシクラゲの近種である *Nostoc flagelliforme* は、ウイルス感染予防効果を持つノストフランと呼ばれる多糖を産出している⁵。イシクラゲにも同様の多糖が含まれており、*N. flagelliforme* よりも繁殖力が高いイシクラゲは、抗ウイルス多糖生産宿主としても期待できる。

現在、食用としてのイシクラゲは自然の生息環境に近い野外で栽培した株がわずかに流通しているが、雑菌の混入や品質のばらつきが課題となっている。機能性食品として利用するためには、管理された環境で人工栽培する必要が

ある。しかし、これまでに報告されている人工栽培では、イシクラゲの特徴である外殻を持つコロニーが形成されることは少なく、明瞭な外殻を持たないゾル状コロニーとして成長することが多い(図2A)。外殻が形成されない場合、多糖などの有用化合物が培地に流出するため⁶、殻有コロニー生産のための栽培方法開発が求められていた。

イシクラゲの外殻形成過程についての研究例は、これまでほとんど報告がない。そこで、我々はまず日本各地からイシクラゲサンプルを集めて、外殻形成過程の観察や機構解明を目指した。それらの知見を基に、殻有コロニー調製方法を確立し(図2B)、調製した人工栽培コロニーの成分分析等を進め、機能性食品としての可能性を検討した。

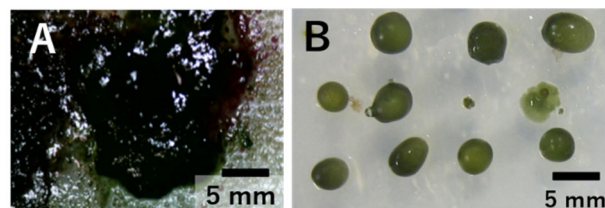


図2. イシクラゲのゾル状コロニー (A) と外殻を有するコロニー (B)

2. 研究の方法

2-1. イシクラゲの培養

イシクラゲ用培養液 (BG11₀₀) は、以下のように調製した。Na₂CO₃ 50 mg/L, K₂HPO₄ 30 mg/L, MgSO₄·7H₂O 75 mg/L, CaCl₂·2H₂O 36 mg/L, H₂BO₃ 29 mg/L, MnCl₂·4H₂O 18 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 2.2 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 3.9 mg/L, CuSO₄·5H₂O 0.79 mg/L, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.49 mg/L を含んだ水溶液を120℃、20分間オートクレーブした後、フィルター滅菌したFeCl₃·6H₂O水溶液を終濃度4.4 mg/Lとなるように添加した。全ての試薬はナカライテスク株式会社より購入した。BG11₀₀寒天培地の調製では、上記の水溶液に、1.5%になるように寒天末(ナカライテスク社)を加えてオートクレーブした後、FeCl₃·6H₂O水溶液を同様に添加し、シャーレに注いで固化させた。

本研究で使用したイシクラゲは、長野県伊那市、北海道千歳市、新潟県上越市、茨城県つくば市、愛知県名古屋市、沖縄県宮古島市から採取した。イシクラゲ天然コロ

ニー（一辺3～6センチのシート状）は、まずイオン交換水で半日間湿潤させた。その後、付着している土や枯れ葉等を洗い流し、ステンレスメッシュの上で24時間放置し、再びイオン交換水で水洗いした。この洗浄と放置を合計4回繰り返した後、5 mLの滅菌水と共に10 mL容量のガラスホモジナイザーに投入した。その後、ホモジナイザー用攪拌機に取り付けたPTFE製ペストルを差し込み、1 mm以上の固形物が無くなるまですりつぶした。この懸濁液を目開き75 μm ステンレスふるい上に注ぎ、通過液をさらに20 μm ステンレスふるい上に注いだ。20 μm ステンレスふるいの上から滅菌水を注いで数回洗浄した後、ふるい上に残ったトリコーム（細胞が直線的につながった糸状性の群体）を回収し、トリコーム懸濁液とした。BG11₀₀液体培地50 μL を加えた384ウェルマイクロプレートに、1ウェルあたり約50トリコームとなるように、トリコーム懸濁液を加えた。25~28℃の恒温室にて、約100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度（420 nm photon換算）の白色LED光を、12時間-12時間サイクルの明-暗切り替えプログラムで照射し、静置培養した。384ウェルマイクロプレート内のトリコームの様子は、1週間ごとにEVOS FL Auto（Thermo Fisher Scientific社）にて撮影した。

2-2. イシクラゲ生息地土着菌やイシクラゲコロニー付着菌

寒天培地として、1/4希釈LB培地、もしくはイシクラゲ破砕液培地を用いた。1/4希釈LB培地は以下の通り調製した。2.5 gのLB培地Lennox（ナカライテスク社）と、0.75 gの寒天末（ナカライテスク社）を、500 mLのイオン交換水に懸濁して、オートクレーブ後、シャーレに注いで固化させて、1/4LB培地とした。イシクラゲ破砕液培地の調製は、以下の通りである。2-1にて記載した通り調製したイシクラゲホモジナイズ懸濁液（250 mL）を、Microson Ultrasonic cell disruptor（Microson社）を用いて10分間超音波破砕した後、上記のBG11₀₀寒天培地と同じ試薬を加えた。また、別の容器で、0.75 g寒天末と250 mLのイオン交換水を加えた懸濁液を作製した。それぞれをオートクレーブ後混合して、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を同様に添加し、シャーレに注いで固化させ、イシクラゲ破砕液培地とした。イシクラゲ生息地の土壌懸濁、イシクラゲ外殻画分（ホモジナイズ懸濁液のうち75 μm フィルター上に残留した成分）およびコロニー内細胞外マトリックス画分（75 μm フィルターを通過したホモジナイズ懸濁液を、さらに5分間、3,000 x gの遠心分離して得られた上清）を、1/10LB培地、1/4LB培地、LB培地、およびイシクラゲ破砕液培地上にストリーキングし、2～4日間30℃でインキュベートした。

2-3. 納豆菌の培養

30 mLのイオン交換水を入れた300 mL三角フラスコ

に、0.3 mLの糖蜜（株式会社EM生活）、0.3 mLの無調整豆乳と、スプーンで砕いた納豆ひとかけらを加え、シリコ栓で蓋をし、30℃で1晩静置した。

2-4. 乳酸菌の培養

30 mLのイオン交換水を入れた50 mL遠沈管に、0.3 mLの糖蜜、スプーンなどで砕いたバナナひとかけら、乳酸菌整腸剤パンラクミン（第一三共ヘルスケア株式会社）ひとかけらを加え、ゴム栓でゆるく蓋をして、30℃で2日間静置した。

2-5. 酵母の培養

30 mLのイオン交換水を入れた50 mL遠沈管に、0.3 mLの糖蜜、ドライイースト（共立食品株式会社）少々を加え、ゴム栓でゆるく蓋をして、30℃で1晩静置した。

2-6. イシクラゲコロニー外殻の単離

約100 g（湿潤状態での重量）の長野県伊那市天然コロニーを、500 mLのイオン交換水に一晩浸し、市販フードプロセッサー、さらにガラスホモジナイザーで1ミリ以下のサイズに粉碎した。得られたスラリーを、20分間超音波処理によって細胞を破砕し、さらにドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を終濃度が2%になるように加えて、一晩室温で放置した。目開き150 μm の金篩で大きな塊を除去して、目開き50 μm の金篩で外殻破砕物を回収して、よくイオン交換水で洗浄した。

2-7. メタボローム解析

長野県伊那市、茨城県つくば市および沖縄県宮古島市で採取した天然コロニーをよく洗って、それぞれについて、2等分し、一方を乾燥させ、もう一方を上記の通りホモジナイズして寒天培地上で培養して、人工栽培コロニーを調製した。3つの地域株の天然コロニーと人工栽培コロニーの合計6サンプル（乾燥重量で10～20 mg）について、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社にてメタボローム解析を受託した。それぞれのサンプルのメタノール/水抽出物について、LCMS Agilent CE-TOFMS system（Agilent Technologies社）にて分析され、質量分析モードは、カチオンモードおよびアニオンモードの両方を採用された。

2-8. 微生物検査

直径5ミリ程度の長野県人工栽培コロニーを、イオン交換水、もしくは10 ppm次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間浸した後に、よくすすぎ、粉碎してMC-Media Pad（JNC corporation）を用いて、一般生菌、大腸菌群、サルモネラ菌、黄色ブドウ球菌、真菌・カビの細胞数を見積もった。

3. 研究内容

本研究では、日本各地から採取したイシクラゲの人工培養を試みた。人工栽培における顕微鏡観察を基に、「コロニー形成を阻害する細菌が存在する」という仮説を立て、仮説を支持する検証結果を得た。また、コロニー形成阻害菌の抑制により、コロニー形成率を大きく高めることに成功した。人工栽培コロニーは、衛生指標微生物のグラム当たりの混入数が生食用野菜以下となることが明らかとなった。またメタボローム解析により成分分析を行った。これらの結果は、機能的食品応用への扉を大きく広げるものである。現在、人工栽培コロニーのマウスへの給餌実験準備を進めている。また、外殻成分分析も進行中であり、外殻多糖のバイオプラスチック応用への可能性も検討している。

4. 研究の実施経過

4-1. イシクラゲコロニーの地域差

日本各地のイシクラゲコロニーを、よく洗って土や枝葉を取り除いた後に培養を試みた。新潟県産コロニーでは、2～3日で溶解が始まり、10日間で固形物がほぼ消失、沖縄県産コロニーでは、2週間ほどで溶解が始まり、1か月後には固形物は消失した。長野県産コロニーは、直径は1.5～2倍に増大し、1か月間溶解は確認できなかった。1か月間の観測の間、いずれの培養液中に、新しいコロニーが出現することはなかった。BG11₀₀寒天培地上では、多くのコロニーはカビなどの生物種に覆われ、変色し収縮する様子が観察された。新しいコロニーが観察されることもあったが、多くてもわずか数コロニー程度であった(図3下段)。



図3. 液体培養7日後のイシクラゲコロニー(上段, 左から長野, 沖縄, 新潟株)と寒天培地上のイシクラゲコロニー(下段)

次に、長野産、沖縄産、新潟産および茨城産のコロニーについて、よく洗った後にイオン交換水中で24時間湿潤させて柔らかくした後に、ガラスホモジナイザーで外殻を細かく粉碎するとともに、糸状性細胞群体を細かく(10～20細胞)分断した。細胞群体から外殻を除去した後

に、BG11₀₀液体培地を加えた384ウェルプレート、およびBG11₀₀寒天培地に播種した。新潟サンプルを除く、ほかの3つ地域のサンプルでは、1週間以内に細胞表面に未熟な殻が形成され、細胞はその内部で折れたたまれながら増殖し、培養開始後から2～3週間で球状コロニーとなった(図4)。沖縄産コロニーは、直径1ミリ程度の球状コロニーまで成長する期間が約3週間と、長野産や茨城産の4～5週間よりも早かった。沖縄産コロニーは、長野産や茨城産コロニーと比較すると、色は薄い緑で透明度が高かった。得られた直径1ミリのコロニーを、500 mlのBG11₀₀液体培地が入ったプラスチック容器で培養したところ、長野産および茨城産コロニーは直径5ミリ以上に成長したが、沖縄産コロニーでは、いずれも殻の周辺にほかの藻類が繁殖し成長が阻害された。新潟サンプルでは、はじめの1週間に細胞分裂が確認できたが、2週間以内にほぼすべて死滅し、その周りには無数の細菌やカビと思われる菌糸が出現していた。

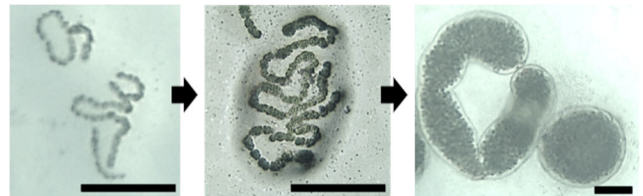


図4. 人工栽培による殻有球状コロニーの形成過程(バーのサイズは100 μm)

以上の結果から、我々は以下のような仮説を立てた。新潟産コロニーは殻形成能力がもっとも低い、もしくは殻形成を阻害する微生物が付着している。沖縄産コロニーは殻形成を阻害する微生物の付着も少ないためコロニーを形成できるが、殻形成能が低いため、密度の低い緩いコロニーとなり、またほかの藻類などに対する抵抗性が低い。長野産および茨城産コロニーは、殻形成能が高いため固い外殻を構築し、コロニーの増大速度は遅いが、外敵に対する抵抗性は強い。以上の仮説では、「殻形成を阻害する微生物」と「殻形成能」の相反する2つの因子のバランスによって、外殻を持つコロニー形成の可否が決まる。以降では、「殻形成を阻害する微生物」の制御を目指し、乾燥ストレスや殺菌剤(次亜塩素酸ナトリウム, 界面活性剤), 抗生物質, 微生物懸濁液(酵母, 納豆菌, 乳酸菌)の添加による効果を検討した。

4-2. 乾燥処理による殻有コロニー形成率変化

イシクラゲは高い乾燥耐性を有する藻類である。真夏の炎天下に、岩の上で干からびたとしても、水を加えると数時間のうちに光合成活性を取り戻す。この強みを生かして、乾燥によって、付着している微生物を不活化もしくは休止状態にすることで、コロニー形成率を向上できるかどうか

検討した。実験では、同じコロニーを3等分し、乾燥なし湿潤1日間、乾燥あり湿潤1日間、および乾燥あり湿潤4日間の3つの条件でトリコームを調製し、2週間後コロニー形成率をカウントした。図5に示す通り、乾燥あり湿潤1日間処理における殻有コロニー形成率（中央値95%）は、乾燥なし湿潤1日間（中央値18%）と比較して大きく上昇していた。一方、乾燥あり湿潤4日間では、もっとも殻有コロニー形成率が低い（中央値1%以下）結果となった。興味深いことに、乾燥あり湿潤1日間処理においても、80%以上のトリコームが死滅する外れ値が観察されたことである。これらの結果は、以下のように解釈できる。乾燥によって、殻形成阻害株が不活化もしくは休止したために殻形成が促進したが、わずかに残った活性型の殻形成阻害株が混入し繁殖したウェルでは、ほとんどのトリコームの殻形成が阻害された。また、4日間湿潤した場合、殻形成阻害株が再活性化・増殖するために、ほとんどのウェルで被害を受けたと考えられる。

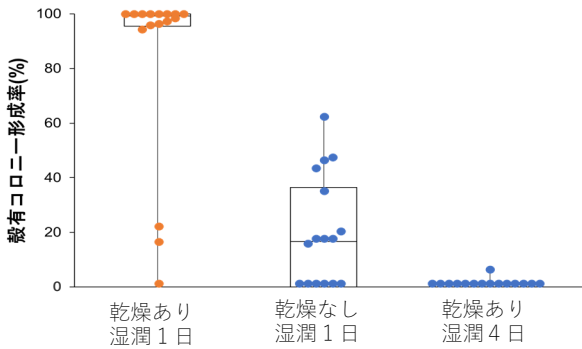


図5. 乾燥工程および湿潤時間とコロニー形成率

4-3. 各種微生物及び各種試薬添加による殻有コロニー形成率変化

上記の通り、殻形成阻害株の関与が示唆されたため、さらに検証を行うために、殻形成阻害株の混入の少ないと思われるコロニー形成率90%以上のウェル（良好ウェル）と、同率が10%以下で殻形成阻害株混入の多いと思われるウェル（不良ウェル）（図6）の懸濁液を添加して、殻有

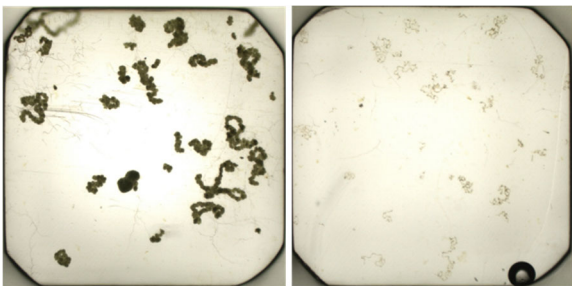


図6. 良好ウェル（左）と不良ウェル（右）

コロニー形成率を評価した。その結果、10倍希釈良好ウェル懸濁液添加では、良好ウェルの出現率が18/40であったが、10倍希釈不良ウェル懸濁液添加では、良好ウェルの出現率が0/40となり、予想通りの結果となった（図7）。

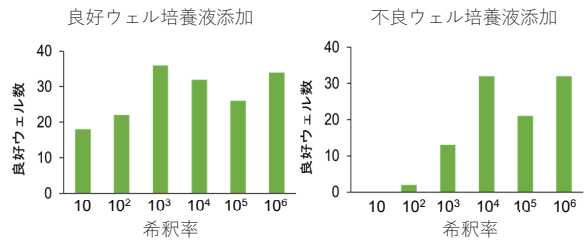


図7 良好および不良ウェル培養液添加による良好ウェル出現率変化

殻形成阻害株の寄与を正しく評価するためには、無菌化したコロニーから得たトリコームに対して、単離した殻形成阻害株を添加する必要がある。しかし今回は、まだ無菌化したコロニーが得られていないため、コロニー破砕液やイシクラゲ生息地から単離した微生物懸濁液を添加し、その影響を評価した。その結果、コロニー内多糖画分液が、不良ウェル懸濁液と同程度の殻形成阻害効果を示した（図8）。しかし、コロニー内多糖画分液やイシクラゲ生息地から得られた単離株については、同等の阻害効果は確認できなかった。また、納豆菌、乳酸菌および酵母の影響を検討したところ、納豆菌で殻形成阻害効果が確認できた。乳酸菌および酵母については、共存できることが示唆された（図8）。

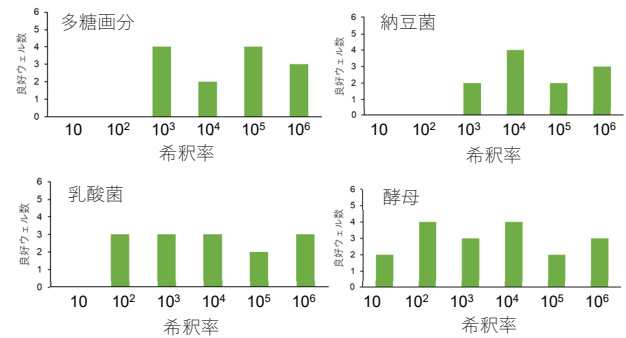


図8. イシクラゲ多糖画分および微生物懸濁液添加による良好ウェル出現率変化

抗生物質（アンピシリン、カナマイシン (Kan)、クロラムフェニコール (Cm)、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、Tween20) や養分（炭酸カルシウム、硝酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、グリセリン）、酸/アルカリ性溶液（塩酸、水酸化ナトリウム）を、乾燥なし湿潤1日間および乾燥あり湿潤4日間の条件で調製したトリコームに添加して、その影響を検証した。その結果、カナマイシン、クロラムフェニコールおよび炭酸カルシウム添加によって、乾燥あり湿潤4日間処理サンプルからも殻有コロニーを調製することに成功した（図9）。また、2.5%の高塩濃度や、0.28 mM 塩酸、1.7 mM 水

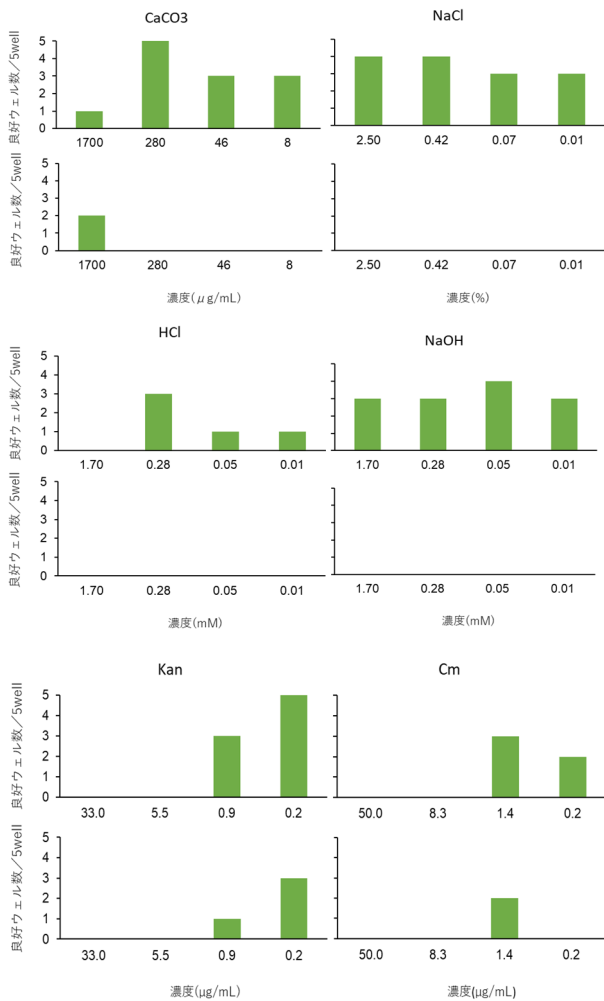


図9. 良好ウェル出現率に影響する条件の検討

酸化ナトリウム存在下でイシクラゲが生息可能であることが明らかになったが、乾燥あり湿潤4日間処理サンプルからの殻有コロニー形成は促進されなかった(図9)。これらの結果は、カナマイシンおよびクロラムフェニコールは、殻形成阻害株を不活化し、炭酸カルシウムは殻形成を促進すると推測できる。また、殻形成阻害株もしくは殻形成阻害因子は、高塩濃度や酸性、アルカリ性条件下において、不活化しないことを意味している。

4-4. 殻成分解析

イシクラゲコロニー外殻の成分について、現在報告例は無い。しかし、外殻形成機構解明に成分分析は必須である。また、外殻は全重量の半分以上を占めることから、機能性食品としての展開を考える上で成分は重要である。さらに、外殻は食感を決める因子であり、硬度の制御は商品価値に大きく影響する。前述の結果から、カルシウム添加が殻形成を促進することが初めて示唆されている。この示唆と、一部の藻類の細胞外膜のさらに外側に形成される sheath (鞘) と呼ばれる構造体がイシクラゲ外殻との間に形状的

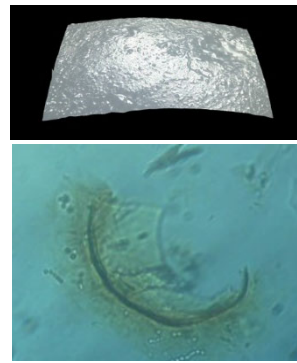


図10. イシクラゲコロニー外殻(上段)と単離した外殻の顕微鏡写真(下段)

および機能的に類似性を持ち、カルシウムを含有することから、以下のような仮説を立てた。イシクラゲ外殻は、sheathと同様に、カルシウムイオン、カルシウム結合タンパク質、多糖から成る。この仮説の検証を目的に、イシクラゲコロニーから外殻成分を単離し、原子吸光やプロテオーム解析、糖分析に供することを旨とした。今研究期間内に、外殻成分の単離方法を確立し、数グラムの分析用サンプルの調製に成功した(図10)。

現在、糖分析中である。

4-5. メタボローム解析

地域株間、および天然採取と人工栽培コロニー間の機能性の差異について分析するために、長野県伊那市、茨城県つくば市および沖縄県宮古島市で採取した天然コロニーとそれぞれから人工栽培したコロニーの6サンプルについて、メタボローム解析を行った。検出されたピークを用いて、主成分分析を行った結果を図11に示す。第1主成分得点を横軸、第2主成分得点を縦軸としてプロットした。わずかに、6点での主成分分析であるためカテゴリーは難しいが、すべての天然コロニーと長野県人工栽培コロニーは近傍にスポットされ、茨城県と沖縄県人工栽培コロニー

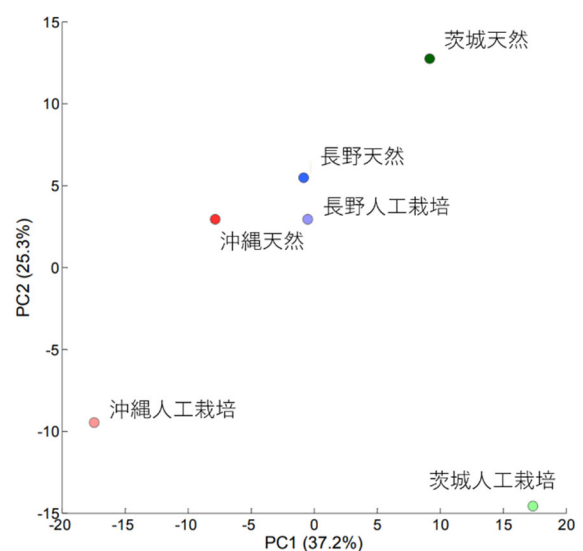


図11. 主成分分析(PC1およびPC2は、それぞれ第1主成分得点および第2主成分得点を示し、括弧内の数字は各主成分の寄与率を表す)

は、それぞれ離れてスポットされた。主要な要素の集合である第1主成分の得点差に注目すると、天然コロニーと人工栽培コロニーの間は、地域株間と比較して小さい傾向がみられた。第2主成分得点に関して、人工栽培コロニーは、天然コロニーと比較して、いずれも同じ（マイナス）方向に位置していた。検出されたピークのうち、定量値（濃度既知の内部標品ピーク強度との比較による濃度推定）を得られた化合物のうち、定量値の多いものについて、表1にまとめた。サンプル間で、すべての定量値（nmol/g）の合計に大きな差があったが、これは抽出効率や含水率などの影響があると考え、今回は、それぞれの化合物の定量値を総定量値合計で割った値で考察した。この比較からも、天然コロニーと人工栽培コロニーの間でより多くの共通傾向がみられ、培養方法による差異よりも地域株間の差異が大きいことが明らかになった。また、いずれのサンプルにおいても、アミノ酸が多く検出され、特にうまみ成分であるグルタミン酸が多いことが明らかになった。これは窒素固定が盛んに行われている結果だと推測される。また、人工栽培によって、含有率が上昇した化合物には、核酸やカルビン回路関連化合物であった。この結果は、人工栽培コロニーは光合成と細胞分裂に関する活性が盛んであることが示唆され、若いコロニーであることに起因していると考えられる。

表1. 定量された化合物の含有比パターン

| 化合物 | 沖縄 | | 長野 | | 茨城 | |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 天然 | 人工栽培 | 天然 | 人工栽培 | 天然 | 人工栽培 |
| Asp | 0.1085 | 0.0258 | 0.1483 | 0.0453 | 0.0652 | 0.0367 |
| Arg | 0.028 | 0.0302 | 0.1282 | 0.0347 | 0.1209 | 0.0535 |
| Glu | 0.3528 | 0.3538 | 0.095 | 0.1876 | 0.0365 | 0.1349 |
| Guanosine | 0 | 0 | 0.0707 | 0.0539 | 0.0052 | 0.0089 |
| Ala | 0.0248 | 0.033 | 0.0541 | 0.0706 | 0.0862 | 0.0839 |
| Cytidine | 0 | 0 | 0.0465 | 0.0594 | 0.0021 | 0.0089 |
| Leu | 0.0024 | 0.0068 | 0.0441 | 0.026 | 0.0806 | 0.0644 |
| Inosine | 0 | 0.0001 | 0.0429 | 0.0184 | 0.0043 | 0.0025 |
| Val | 0.0064 | 0.0069 | 0.0346 | 0.0163 | 0.0669 | 0.0367 |
| Lactic acid | 0.1014 | 0.0042 | 0.0322 | 0.0076 | 0.0131 | 0.0277 |
| Gly | 0.0389 | 0.0121 | 0.032 | 0.0376 | 0.0703 | 0.0328 |
| Lys | 0.0377 | 0.0187 | 0.0272 | 0.0112 | 0.0352 | 0.0325 |
| Uridine | 0 | 0 | 0.0256 | 0.0236 | 0.0049 | 0.0095 |
| Gluconic acid | 0.0057 | 0.0047 | 0.0248 | 0.1384 | 0.0036 | 0.0041 |
| Adenine | 0.0002 | 0.0006 | 0.0228 | 0.0003 | 0.0006 | 0.0016 |
| Ser | 0 | 0.0121 | 0.0206 | 0.0129 | 0.0711 | 0.0275 |
| Phe | 0.0008 | 0.0035 | 0.0203 | 0.012 | 0.0435 | 0.0237 |
| Ile | 0.0019 | 0.0036 | 0.0194 | 0.0133 | 0.0505 | 0.0319 |
| Thr | 0.0153 | 0.0101 | 0.0168 | 0.0129 | 0.071 | 0.0205 |
| Thymidine | 0 | 0.0002 | 0.0115 | 0.0125 | 0.0011 | 0.0035 |
| Asn | 0.0033 | 0.0038 | 0.0113 | 0.0047 | 0.0293 | 0.0136 |
| Betaine | 0.0136 | 0.0012 | 0.0073 | 0 | 0.0042 | 0 |
| Tyr | 0.0039 | 0.0123 | 0.0067 | 0.0065 | 0.0216 | 0.0124 |
| Gln | 0.0435 | 0.017 | 0.0066 | 0.0002 | 0.0033 | 0.0003 |
| Pyruvic acid | 0.0135 | 0.0939 | 0.0061 | 0.001 | 0.0026 | 0.0198 |
| Pro | 0.0049 | 0.0115 | 0.0058 | 0.0069 | 0.0352 | 0.0065 |
| His | 0.01 | 0.0051 | 0.0046 | 0.0028 | 0.003 | 0.0042 |
| Hypoxanthine | 0 | 0.0001 | 0.0045 | 0.0795 | 0.0046 | 0.0479 |
| Met | 0.0008 | 0.0009 | 0.0044 | 0.0017 | 0.0005 | 0.0075 |

96化合物の定量値（nmol/g）の総計で、それぞれの定量値を割った値を表示。値が高い程、濃い赤でハイライトした。

4-6. 微生物検査

人工栽培コロニーを機能性食品として応用するために、イオン交換水および10 ppm 次亜塩素酸ナトリウム水溶液ですすいだ長野県人工栽培コロニーについて、一般生菌、大腸菌群、サルモネラ菌、黄色ブドウ球菌、真菌・カビの混入数を評価した。その結果、コロニー1gあたりにつき、イオン交換水および次亜塩素酸ナトリウム水溶液のすすぎで、一般生菌はそれぞれ 10^5 および 10^4 細胞、大腸菌群はそれぞれ 10^5 および 10^3 細胞、サルモネラ菌、黄色ブドウ球菌および真菌・カビは、 10^2 細胞以下であった。それぞれ、生食用カット野菜程度な混入量であったが、さらに混入量の軽減を目指して、コロニー調製法の改良を進めている。

5. 研究の成果

著者らは、本研究期間前に、イシクラゲ栽培を成功させていたが、歩留り率にばらつきがあり、原因については不明であった。本研究中に、コロニー形成を阻害している微生物の存在を突き止め、乾燥工程や抗生物質によって制御可能であることを発見した。この発見によって、イシクラゲ人工栽培の効率を大きく改善した。また調製したイシクラゲ人工コロニーの微生物混入量は、生食可能なレベルであった。

6. 残された問題、今後の課題

メタボローム解析から、地域株間の違いを明らかにしたが、この差異については、コロニーに混入している微生物の影響である可能性を否定できない。そこで、まず無菌化したイシクラゲコロニーを調製し検討する必要があると思われる。また、機能性食品応用においても、無菌化は重要である。現在、無菌イシクラゲコロニーの調製を試みており、イシクラゲ細胞と混入バクテリアの薬剤耐性の差を利用した無菌化に成功しつつある。

また、イシクラゲ人工栽培コロニーの機能性評価のために、動物実験を予定している。イシクラゲの抗炎症効果と多糖高含有という特徴から、今回は、潰瘍性大腸炎に対する効能の検討を目指し、潰瘍性大腸炎マウスの用意を進めている。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、（公財）東洋食品研究所から多大なるご支援を戴きました（2019年度東洋食品研究所研究助成）。関係者の皆様に感謝致します。

8. 参考文献

- 1 Hill, R. Donna; Keenan, W. Thomas; Helm, F. Richard; Potts, Malcolm; Crowe, M. Lois; Crowe, H. John. Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *J. Appl. Phycol.* 1997, **9**, p. 237-248. doi:10.1023/A:1007965229567
- 2 Inoue-Sakamoto, Kaori; Tanji, Yasunori; Yamaba, Minami; Natsume, Takumi; Masaura, Takuya; Asano, Tomoya; Nishiuchi, Takumi; Sakamoto Toshio. Characterization of extracellular matrix components from the desiccation-tolerant cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2017, **64** (1), p. 15-25. doi:10.2323/jgam.2017.03.001
- 3 Zhuoyu, Li; Min, Guo. Healthy efficacy of *Nostoc commune* Vaucher. *Oncotarget*, 2018, **9**, (18), p. 14669-14679. doi:10.18632/oncotarget.23620
- 4 Ninomiya, Masayuki; Satoh, Hitoshi; Yamaguchi, Yuji; Takenaka, Hiroyuki; Koketsu, Mamoru. Antioxidative Activity and Chemical Constituents of Edible Terrestrial Alga *Nostoc commune* Vauch. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2011, **75**(11), p. 2175-2177. doi:10.1271/bbb.110466
- 5 Kanekiyo, Kenji; Lee, Jung-Bum; Hayashi, Kyoko; Takenaka, Hiroyuki; Hayakawa, Yumiko; Endo, Shunro; Hayashi, Toshimitsu. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.* 2005, **68**(7), p. 1037-1041. doi:10.1021/np050056c
- 6 山口裕司「人工培養された食用藍藻が産出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」岐阜大学博士論文. 2016, 工博甲第 496 号 <http://hdl.handle.net/20.500.12099/54555>