

学 位 （ 博 士 ） 論 文 要 旨
(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 Ph. D. Candidate	生物システム応用科学府 <u>食料エネルギーシステム科学</u> 専攻 一貫制博士課程 平成 <u>30</u> 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 <u>晴山 陽平</u> (Your Name(Family, First) and Seal)				
主指導教員 氏 名 Chief Advisor's Name	豊田 剛己	副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name	中田 一弥	副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name	
論文題目 Title	<i>Aspergillus flavus</i> の生育とアフラトキシン B ₁ 生産に及ぼすイソチオシアン酸エステル類及び <i>Tarenaya hassleriana</i> (セイヨウフウチョウソウ) 由来揮発性物質の阻害的作用に関する研究				
<p>論文要旨 (和文要旨(2000 字程度)または英文要旨(500words)) ※欧文・和文どちらでもよい。但し、和文の場合は英訳を付すこと。 Write a summary in Japanese (2000 characters) or in English (500words). If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.</p> <p>アフラトキシン (aflatoxins, 以下 AFs) は, <i>Aspergillus flavus</i> などの糸状菌が生産する毒素であり, 強い急性毒性と発がん性を有する。食品に混入した AFs は除去や無毒化が困難であるため, 汚染食品の廃棄による経済的被害は甚大である。さらに発展途上国では, 潜在的な暴露による発がんリスクの増加や, 急性毒性による集団食中毒などの健康被害が大きな問題となっている。しかしながら, これまでに食品の AFs 汚染問題を根本的に解決できる有効な技術は開発されていない。</p> <p>AFs 汚染を防ぐためには AFs 生産菌に対する有効な防カビ剤の開発が必要である。そこで本研究では, イソチオシアン酸エステル類 (isothiocyanates, 以下 ITCs) に着目した。ITCs はアブラナ科などの植物から生じることが知られる揮発性有機化合物である。食中毒菌など様々な微生物に対して抗菌作用を有することが報告されているものの, AFs 生産菌に対する作用を定量的に研究した例は限られている。また, AFs 生産菌に対する防カビ剤の開発が難しい理由の一つとして安全性と抗菌性の両立が難しいことが挙げられる。しかし, 揮発性の高い ITCs であれば食品に直接暴露しても, 揮発することで食品に残留しないため毒性が残らないことが期待される。そこで, 本研究では ITCs を用いた AFs 生産菌の防除が可能か検討することを目的とした。</p> <p>はじめに AFs 生産菌の防除に効果的な ITCs を検討した。Allyl ITC (AITC), butyl ITC (BITC), methyl ITC (MITC), および phenethyl ITC (PEITC) が溶存態または揮発態のときに <i>A. flavus</i> の生育と AFB₁ 生産に及ぼす影響を調べた。その結果, 溶存態では BITC と PEITC が強く菌の生育を抑制したのに対し, 揮発態では AITC と MITC が強く抑制した。最も強い抑制を示した ITC が物質の状態によって異なった理由として, 揮発性の違いによる培地中での残存時間が関係していると考えられた。すなわち, 高揮発性物質は液体培地から速やかに消失するのに対し, 低揮発性物質は培地により長く残存することで, 菌に対してより長時間作用することができると考えられる。そこで, 液体培地に添加した ITCs の濃度を経時的に調べた結果, AITC と MITC の濃度は培地に添加してから 24 時間以内に検出限界値 (LOD) 以下まで低下したのに対し, BITC と PEITC は 48 時間後でも微量ながら検出された。このことから, 溶存態の ITCs の場合, BITC と PEITC のほうが MITC と AITC よりも, <i>A. flavus</i> に対する抗菌効果をより長時間維持したため, より強い抗菌活性を示したと考えられる。これらの結果より, <i>A. flavus</i> の防除に最適な ITCs は物質の状態によって異なるため, 防除の目的に応じて異なると考えられた。</p> <p>食品貯蔵の現場において ITCs を AFs 生産菌の防除に適用することを想定すると燻蒸剤としての利用が効果的かつ現実的であると考えられる。そこで次に, 揮発態で活性が強かった AITC と MITC のうち, 土壌燻蒸剤として使われているにも関わらず, AFs 生産菌に対する影響の知見が少なかった MITC に着目し, 揮発態の</p>					

MITC が *A. flavus* に及ぼす影響をさらに定量的に調べた。MITC 溶液を添加した密閉容器内で *A. flavus* を培養し、培養期間中に容器内のヘッドスペース中の MITC 濃度を経時的に測定した。その結果、*A. flavus* を殺菌するためには一定以上の積算濃度の MITC を暴露する必要があるものの、殺菌作用が表れる積算濃度は MITC の暴露時間や培養基質によって異なることが明らかになった。また、本実験で用いたガスクロマトグラフィーの LOD 以下という低濃度において MITC が静菌作用を示すことが示唆された。

続いて、MITC を食品に直接暴露できない場合を想定し、土壌に接種した *A. flavus* に対する MITC の影響を調べた。*A. flavus* を接種した土壌に MITC 溶液を添加して培養した結果、無添加区と比べて *A. flavus* の密度が有意に低下した。MITC を用いた土壌燻蒸剤の慣行量から推定される土壌あたりの暴露量の 1/30 – 1/133 の濃度で *A. flavus* の密度を低下させたことから、実環境においても適用できると考えられる。以上の結果より、揮発態の MITC が AFs 生産菌の防除に適用できる可能性が示された。

最後に、MITC を生じることが知られるセイヨウフウチョウソウ *Tarenaya hassleriana* が *A. flavus* の防除に適用できるか検討した。MITC を生じる植物を AFs 防除に直接利用することができれば、環境調和性と経済性に優れた AFs 防除に繋がることが期待される。はじめに *T. hassleriana* から生じる MITC の量を調べた。葉の破碎方法や抽出溶媒について検討し、開花期の *T. hassleriana* から生じる MITC を部位ごとに定量した結果、葉で最も生成量が多く、1.05 mg g⁻¹-fresh weight であった。この量は *A. flavus* の生育と AFB₁ 生産を抑制できると考えられる量であった。次に、*T. hassleriana* が *A. flavus* に及ぼす影響を調べた。密閉容器を用いて、*T. hassleriana* 由来の揮発成分が *A. flavus* の生育と AFB₁ 生産に及ぼす影響を調べた結果、強い生育抑制作用が認められた。また、*T. hassleriana* を添加した容器内の空気から MITC が検出された。MITC の純品を用いた場合と比較した結果、*T. hassleriana* の *A. flavus* に対する生育阻害作用は MITC によるものと考えられた。

以上より、揮発態 MITC 及び MITC を生じる *T. hassleriana* が *A. flavus* の防除に利用できる可能性が示された。

これらのほか、*A. flavus* に対する MITC の作用機序の推定と *A. flavus* の防除に効果的な植物由来の溶存態物質の探索を目的としたスクリーニング試験も実施した。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.(300 words)

Aflatoxins (AFs) are potent toxins produced by certain fungi, e.g. *Aspergillus flavus*. Undesired contamination of AFs has caused food poisoning in developing countries and enormous economic damage. Developing antifungal agents to control aflatoxigenic fungi is required to solve these problems. Therefore, this study focused on isothiocyanates (ITCs), volatile organic compounds. At first, to identify the effective ITCs for controlling AFs contamination, the effects of four ITCs on the growth and AFB₁ production of *A. flavus* were investigated. From the results, the ITC that most strongly inhibited the growth of *A. flavus* differed between the liquid and gaseous states. Thus, the most effective ITCs for AFs control depend on the purpose and method of application.

Next, the effect of gaseous methyl ITC (MITC) on the growth of *A. flavus* was investigated more quantitatively. Exposure to MITC at an integrated concentration above a certain level showed fungicidal activity. In addition, MITC below detection limits indicated fungistatic activity. MITC also had an inhibitory effect on *A. flavus* in soil. From these results, it is considered that gaseous MITC is applicable to AFs control.

Then, the mode of action of MITC on *A. flavus* was investigated. The results of transcriptome analysis suggested that MITC nonspecifically affects gene expression in *A. flavus*.

Finally, to suppress aflatoxigenic fungi by direct application of plants which produce MITC, the amount of MITC generated from *Tarenaya hassleriana* was quantified. Approximately 1 mg g⁻¹ (fresh weight) of MITC was produced from fresh leaves. Volatile compounds from *T. hassleriana* inhibited the growth and AFB₁ production of *A. flavus*. These results indicate that *T. hassleriana* is also applicable to the control of *A. flavus*.