

## 学 位 論 文 の 内 容 の 要 約

|            |  |
|------------|--|
| 氏 名        | 晴山 陽平  |
| 学位の種類      | 博士（農学）   |
| 学府又は研究科・専攻 | 生物システム応用科学府 食料エネルギーシステム科学専攻  |
| 指導を受けた大学   | 東京農工大学   |
| 学位論文題目     | <i>Aspergillus flavus</i> の生育とアフラトキシン B <sub>1</sub> 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 |

## 【論文の内容の要約】

アフラトキシン (AFs) とは、主に *Aspergillus flavus* 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 は除去や無毒化することが困難なため、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になっている。しかしながら、これまでにこの 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。

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 (ITCs) に着目した。ITCs はアブラナ科の植物などから生じることが知られる揮発性有機化合物である。様々な微生物に対する抗菌作用が報告されているが、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。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が、揮発性の高い ITCs であれば食品に直接暴露したとしても、揮発することで毒性が残らないことが期待される。そこで、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、はじめに AFs 生産菌の防除に効果的な ITCs を検討した。4 種類の ITCs が溶存態または揮発態のときに *A. flavus* の生育と AFB<sub>1</sub> 生産に及ぼす影響を調べたところ、溶存態では BITC が最も強く菌の生育を抑制したのに対し、揮発態では AITC と MITC が強い活性を示した。最も強い活性を示した 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。この結果より、目的に応じて *A. flavus* の防除に最適な ITCs は異なると考えられた。

実際に ITCs を AFs 生産菌の防除に適用することを想定すると、燻蒸剤のような形での利用が効果的かつ現実的であると考えられる。そこで第 3 章では揮発態の MITC に着目し、*A. flavus* に及ぼす影響を第 2 章よりも定量的に調べた。具体的には、MITC 溶液を沁み込ませた脱脂綿を添加した密閉容器内で *A. flavus* を培養した。培養期間中、経時的に容器内のヘッドスペース中の空気を採取し、MITC 濃度をガスクロマトグラフィーで測定した。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が、殺菌作用が表れる積算濃度は MITC の暴露時間や培養基質の違いによって異なっていた。一方で、本実験で用いたガスクロマトグラフィーの検出限界値以下という低濃度の MITC が静菌作用を示すことが示唆された。また、MITC を食品への直接的な暴露に使えない場合を想定し、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ところ、無添加区と比べて *A. flavus* の密度が有意に低下した。本実験は、三角フラスコを用いた *in vitro* での実験であったが、既存の 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、実環境も適応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。

第 4 章では、*A. flavus* に対する MITC の作用機序の推定を試みた。ITCs の主な作用機序はタンパク質との非特異的な反応によるものと考えられており、とりわけチオール基と反応性が高いことが知られている。そこで、MITC を暴露した *A. flavus* の菌体中のチオールを定量したが、非暴露区と比べて有意な差は認められなかった。そこで、RNA-seq による遺伝子発現の網羅的な解析を行ったところ、特異的な作用部位を持っているのではなく、様々な遺伝子発現に影響を及ぼしていることが示唆された。

第5章と第6章では、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* の防除に利用可能か検討した。

はじめに、*T. hassleriana* から生じる MITC の量を定量した (第5章) 。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ところ、葉で最も生成量が多く、 $1.05 \text{ mg g}^{-1}\text{-fresh weight}$  であった。茎からは検出されなかったが、種子、鞘、根、花からは MITC が生じた。この量は、*A. flavus* の生育と AFB<sub>1</sub> 生産を抑制できると考えられる量であった。

そこで実際に *T. hassleriana* が *A. flavus* に及ぼす影響を調べた (第6章) 。第3章で用い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 AFB<sub>1</sub> 生産に及ぼす影響を調べたところ、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、積算濃度の値より *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。一方、*T. hassleriana* 抽出液には *A. flavus* に対する強い生育抑制作用は認められなかった。

第7章では、*T. hassleriana* に代わる、*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て、スクリーニング試験を実施した。その結果、*Myrtus communis* (キンバイカ) 、*Banksia aemula* (ウォールム・バンクシア) 、*Solanum nigrum* L. var. *guineense* L. (ガーデン・ハックルベリー) の抽出液が *A. flavus* の生育と AFB<sub>1</sub> 生産を強く抑制した。

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。