

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ウスマ ジャムナク

Aspergillus flavus や *Aspergillus parasiticus* は農作物に感染し、強い毒性と発ガン性を有するアフラトキシンを農作物中に生産する。農作物のアフラトキシン汚染は、人や家畜の健康に害をなし、また甚大な経済的損失を引き起こしている。しかし現在、実用的なアフラトキシン汚染防除法はほとんどなく、より効果的な方法の開発が強く求められている。本論文は、天然物を対象とした新しいアフラトキシン生産阻害物質の探索とそれらのアフラトキシン汚染防除への応用について述べたものであり、3章より構成される。

序論に続き、第1章では、精油を対象に *A. parasiticus* のアフラトキシン生産を阻害する物質を探索した結果と得られた阻害物質およびその類縁化合物の活性について述べている。阻害活性が見出されたシラカバの精油より活性物質の精製が行われ、シリング酸メチルが活性物質として単離・同定された。シリング酸メチルは *A. parasiticus* および *A. flavus* のアフラトキシン生産を IC₅₀ 値が 1 mM 程度の強さで阻害した。その際、カビの成育には影響を与えない選択性を持つことが示された。シリング酸、没食子酸、3-*O*-メチル没食子酸、3,4,5-トリメトキシ安息香酸およびそれらのメチルエステルの 8 化合物中、*A. parasiticus* のアフラトキシン生産を選択的に阻害する化合物はシリング酸メチルだけであることが示された。またそれら 8 化合物の DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)ラジカル捕捉活性が調べられ、ラジカル捕捉活性はアフラトキシン生産阻害活性と相関しないことが示された。シリング酸メチルはアフラトキシン生合成経路初期段階の生合成中間体であるノルソロリン酸の生産を阻害した。また、アフラトキシン生合成酵素の発現を調節するタンパク質 AfIR をコードする遺伝子 *afIR* および AfIR の調節を受ける生合成酵素遺伝子 *pksA*、*omtA* の転写を抑制することより、シリング酸メチルの作用点は AfIR の発現に至るまでの制御過程にあることが示唆された。

第2章では、土壌より分離した細菌の代謝産物を対象に、アフラトキシン生産阻害物質を探索した結果得られた No. 27 株の生産する阻害物質に関して述べている。No. 27 株は *Stenotrophomonas rhizophila* に最も近縁の *Stenotrophomonas* sp. と同定された。No. 27 株の培養液上清よりアフラトキシン生産阻害物質が精製され、活性炭カラムクロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィーにより 2 種の活性物質が単離された。それらは cyclo(L-Ala-L-Pro) および cyclo(L-Val-L-Pro) と同定された。両者の *A. parasiticus* および *A. flavus* のアフラトキシン生産阻害活性は同等であり、IC₅₀ 値が 0.7 mM 程度の強さで阻害することが示された。その際、カビの成育には影響を与えなかった。cyclo(L-Ala-L-Pro)、cyclo(D-Ala-D-Pro)、cyclo(L-Ala-D-Pro)、cyclo(D-Ala-L-Pro) が調製されそれらのアフラトキシン生産阻害活性が調べられたところ、活性を示すのは cyclo(L-Ala-L-Pro) だけであること

が示された。cyclo(L-Ala-L-Pro)および cyclo(L-Val-L-Pro)はノルソロリン酸の生産を阻害し、*aflR*、*pkxA*、*omtA* の転写を抑制したことよりその作用点は AflR の発現に至るまでの制御過程にあることが示唆された。No. 27 株と *A. flavus* を共培養し、アフラトキシン生産とカビの成育に与える影響を調べたところ、アフラトキシン生産は共培養に用いた No. 27 株の菌体数に応じて阻害され、カビの成育には影響がないことが示された。

第3章では、第1章および第2章で見出されたシリング酸メチルおよび No. 27 株の効果を、自然状態でアフラトキシン汚染が見られるタイのピーナッツ貯蔵所において試験した結果について述べている。ピーナッツ貯蔵所での実験を行う前に、生ピーナッツをサンプル溶液に浸して効果を見る実験室でのモデル実験が行われ、アフラトキシン生産阻害効果が見られるシリング酸メチル溶液の濃度および No. 27 株菌体懸濁液の菌体数が調べられ、ピーナッツ貯蔵所で実験を行う際の条件が決定された。タイではピーナッツを収穫、乾燥後、殻付きの状態ですぐ袋に入れ、出荷までの数週間程度貯蔵所で保管する。その貯蔵段階でのアフラトキシン汚染が問題となっている。そこで、貯蔵開始時にシリング酸メチル溶液あるいは No. 27 株菌体懸濁液でピーナッツを浸漬処理し、3週間貯蔵した後でのアフラトキシン汚染に対する効果を調べた。シリング酸メチル 80 mM 溶液で処理した場合、有意に貯蔵後のピーナッツに含まれるアフラトキシン量の減少が見られたが効果は弱いものであった。No. 27 株の菌体懸濁液で処理した場合は菌体数に応じたアフラトキシン量の大幅な減少が見られ、No. 27 株はアフラトキシン汚染防除に有効であることが示された。

以上、本研究はアフラトキシン生産阻害活性を示す物質を新たに見出し、阻害物質あるいは阻害物質生産菌がアフラトキシン汚染防除に有効であることを示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。