

氏 名	ぐえん ち ちょん NGUYEN CHI CUONG
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 1 0 3 4 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>Study on Antimicrobial Effects of Plant Extracts on Rice Pathogens</b> (稲病原体に対する植物抽出物の抗菌効果に関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 堀内淳一 准教授 金折賢二 教授 田嶋邦彦

## 論文内容の要旨

農業分野で有用な環境に優しい抗菌剤を開発することを目的に、植物由来の抗菌物質の単離と同定、イネ病原菌に対する抗菌活性の評価を実施した。さらに、フィールド試験によって植物抽出物のイネ感染症抑制効果を明らかにし、抗菌剤としての実用化の可能性を見出した。本論文は 4 章から構成されている。

第 1 章 General Introduction : 本研究で対象とした主要イネ感染症、バクテリア *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo)によるイネ白葉枯れ病、真菌 *Pyricularia oryzae* Carva (P, *oryzae*)によるイネいもち病、真菌 *Rhizoctonia solani* (R. Solani)によるイネ紋枯病を解説した。次に、抗菌活性をもつ植物抽出物やその成分の代替抗菌剤としての可能性を説明すると共に、本研究の目的がイネ感染症の制御を目的とした植物由来の抗菌物質の研究であることを述べた。

研究の開始にあたり、30 種類の植物抽出物について上述の 3 種のイネ感染症原因菌に対する抗菌活性を評価し、抗菌活性の高かった 2 種類、キク科植物 *Praxelis clematidea* および *Ageratum conyzoides* (カッコウアザミ) を本研究に使用したこと説明した。

第 2 章 Isolation and Identification of Antibacterial and Antifungal Compounds from *Praxelis clematidea* R. M. King & H. Robinson as an Effective Potential Treatment against Rice Pathogens : キク科植物 *P. clematidea* の花を含まない地上部のエタノール抽出物の、Xoo および *P. oryzae* に対する増殖阻害活性を明らかにした。溶媒による分配によって、エタノール抽出物をクロロホルム、酢酸エチルおよび水画分に分離した。バクテリア Xoo に対する抗菌活性は酢酸エチル画分、真菌 *P. oryzae* に対する抗菌活性はクロロホルム画分に高い活性が認められた。続いて、それぞれの画分についてシリカゲルクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC による分離を繰り返し、酢酸エチル画分からバクテリア Xoo の増殖を阻害する 5 種類の抗菌物質、クロロホルム画分から真菌 *P. oryzae* の増殖を抑制する 4 種類の抗菌物質の単離に成功した。さらに、ESI-TOF マスおよび NMR 分析によって、すべての抗菌物質の化学構造を決定した。その結果、抗 Xoo 活性を示す抗菌物質 2 種が、4, 4', 4''-nitritoltriphenol およびその配糖体である 4, 4', 4''-nitritoltriphenol  $\beta$ -D-glucopyranoside と同定した。4, 4', 4''-nitritoltriphenol はこれまでにそ

の化学合成が報告されていたが、本研究において天然物質から初めて単離・同定されたものであり、抗菌活性も初めて報告した。その配糖体は化学合成品、天然物いずれも報告がなく、新規物質として報告した。これら 2 種以外の抗菌物質はいずれもフラボン類であり、水酸基に結合したメトキシ基の数、位置に違いがあった。それぞれの抗菌活性を解析し、構造と活性の相関を議論した。Xoo に対する抗菌物質はメトキシ基を持たないか、もしくは一つ持つフラボンであったのに対し、*P. oryzae* に対する抗菌物質はフラボンの水酸基が全てメトキシ化されていた。これは、真菌の増殖阻害にはメトキシ基によって付与される疎水性が必要であることを示唆している。また、抗真菌活性にはフラボンの A 環の 6 位のメトキシ基が重要であることを報告した。

第 3 章 Antifungal Activities of *Ageratum conyzoides* L. Extract against Rice Pathogens *Pyricularia oryzae* Cavara and *Rhizoctonia solani* Kuhn : カッコウアザミの花を含まない地上部のエタノール抽出物に、*P. oryzae* および *R. solani* の増殖を抑制する抗真菌活性を見出した。溶媒による分画、シリカゲルクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC によって、エタノール抽出物より 5 種類の抗真菌物質を得た。ESI-TOF マスおよび NMR 分析による構造解析の結果、Precocene II およびメトキシフラボン 4 種類と同定した。

次に、実用化の可能性を検討するために、ネットハウスでのフィールド試験を実施した。播種後 18 日目のイネ全体に *P. oryzae* の胞子を噴霧し、24 時間、高湿度に保った暗室で感染を成立させた。ネットハウスに移し、2 日後にカッコウアザミ抽出物を噴霧し、5、10、15 日目に症状が出ている葉の面積を解析することにより感染症レベルを評価した。その結果、カッコウアザミ抽出物 2 mg/mL は、市販の抗真菌薬 tricyclazole 0.625 mg/mL と同程度に *P. oryzae* 感染症を抑制することが明らかとなった。また、カッコウアザミのエタノール抽出物がイネの成長に影響を与えないことも確認した。これらは、カッコウアザミ抽出物がフィールドでの抗真菌剤として有望であることを示している。

第 4 章 Conclusions : 本研究の総括を述べている。

## 論文審査の結果の要旨

農業における課題の一つに感染症の抑制が挙げられる。イネの主要感染症であるバクテリア *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo) によるイネ白葉枯れ病、真菌 *Pyricularia oryzae* Carva (*P. oryzae*) によるイネいもち病、真菌 *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) によるイネ紋枯病は、いずれも深刻なイネ感染症であり、米収穫量に甚大な損失を与える。これらの感染症の対策として抗菌剤が広く使用されているが、生態系の破壊、残留農薬による健康被害や輸出不適合などの問題がある。申請者は抗菌物質を生産する植物に着目し、その抽出物を環境に優しい抗菌剤として応用することを目的に本研究を実施した。

30 種類の植物のエタノール抽出物を調製し、Xoo、*P. oryzae*、*R. solani* に対する抗菌活性を指標に 2 種類の植物、キク科植物 *Praxelis clematidea* および *Ageratum conyzoides* (カッコウアザミ) を選抜し、本研究に使用した。*P. clematidea* の地上部のエタノール抽出物より、Xoo に対する抗菌物質 5 種、*P. oryzae* に対する抗菌物質 4 種の単離、同定に成功した。Xoo に対する抗菌物質として同定した 4, 4', 4''-nitritotriphenol はその化学合成は報告されていたが、本研究にお

いて天然物より初めて単離され、その抗菌活性も初めて報告された。また、その配糖体はこれまでに報告されていない新規物質であった。この 2 種以外の抗菌物質はフラボン類であったが、*Bacillus Xoo* に対する抗菌物質と真菌 *P. oryzae* に対する抗菌物質における、フラボン類の構造上の違いを明らかにした。

カッコウアザミのエタノール抽出物からは、*P. oryzae* および *R. solani* の増殖を抑制する抗真菌物質を単離し、Precocene II およびメトキシフラボン 4 種類であると同定した。さらに、イネを用いたネットハウスでの *P. oryzae* 感染実験を実施し、カッコウアザミ抽出物 2 mg/mL が市販の抗真菌薬 tricyclazole 0.625 mg/mL と同程度に *P. oryzae* 感染症を抑制することを明らかにした。カッコウアザミのエタノール抽出物がイネの成長に影響を与えないことも確認した。

本研究において、*P. clematidea* のエタノール抽出物より新規抗菌物質を発見した。また、2 種類の植物抽出物から得られた抗菌物質についてその構造と活性の関係を明らかにしたことは、新規抗菌物質の開発につながる可能性のある成果として評価できる。また、フィールド試験においてカッコウアザミの抽出物がイネの *P. oryzae* 感染症を抑制することを実証し、植物抽出物が抗菌剤の代替品として有用であることを示したことは、農業分野における新たな感染症抑制方法の開発につながる意義ある成果である。学位論文は英語で記載されており、論旨も明解であった。

本論文の内容は、査読制度のある学術雑誌に掲載済みの下記 2 編の論文を基礎としている。なお、いずれも申請者が筆頭著者である。

1. Cuong C. Nguyen, Thanh Q. C. Nguyen, Kenji Kanari, Tran Duy Binh, Le Van Vang and Kaeko Kamei. Isolation and Identification of Antibacterial and Antifungal Compounds from *Praxelis clematidea* R. M. King & H. Robinson as an Effective Potential Treatment against Rice Pathogens. *Agronomy*, 11(11), 2366 (2021) doi, 10.3390/agronomy11112366

2. Cuong C. Nguyen, Thanh Q. C. Nguyen, Kenji Kanaori, Tran Duy Binh, Xuyen H. T. Dao, Le Van Vang and Kaeko Kamei. Antifungal Activities of *Ageratum conyzoides* L. Extract against Rice Pathogens *Pyricularia oryzae* Cavara and *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agriculture*, 11(11), 1169 (2021) doi, 10.3390/agriculture11111169