

Title	UV-Bダメージにより植物から遊離される生態系有用生物の忌避物質： 環境ストレスにより生産される生態系破壊型物質
Sub Title	Repellent against earthworms from UV-B damaged plant
Author	土居, 志織(Doi, Shiori) 小瀬村, 誠治( Kosemura, Seiji)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2020
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of natural science). No.67 (2020. 3) ,p.1- 16
JaLC DOI	
Abstract	Earthworms, which are very helpful in the formation of vegetable mould, though weak in sunlight, are one of the most important living creatures in relation to agricultural crops, wild plants and ecosystem functions. Increased exposure to UV-B on the surface of the earth due to the depletion of stratospheric ozone is known to cause a variety of physiological and morphological responses in plants. 3-Indolylacetonitrile as a repellent against earthworms, has been isolated from UV-B damaged cabbage ( <i>Brassica oleracea</i> L.) shoots.
Notes	原著論文
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20200331-0001">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20200331-0001</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## UV-B ダメージにより植物から遊離される生態系有用生物の忌避物質 ——環境ストレスにより生産される生態系破壊型物質——

土居志織\*・小瀬村誠治\*

Repellent against Earthworms from UV-B Damaged Plant

Shiori DOI and Seiji KOSEMURA

Summary—Earthworms, which are very helpful in the formation of vegetable mould, though weak in sunlight, are one of the most important living creatures in relation to agricultural crops, wild plants and ecosystem functions. Increased exposure to UV-B on the surface of the earth due to the depletion of stratospheric ozone is known to cause a variety of physiological and morphological responses in plants. 3-Indolylacetonitrile as a repellent against earthworms, has been isolated from UV-B damaged cabbage (*Brassica oleacea* L.) shoots.

Key Words: UV-B damage, earthworm, cabbage (*Brassica oleacea* L.),  
3-indolylacetonitrile (IAN)

### 1. 序 論

チャールズ・ダーウィンの一番偉大な仕事はなんだろうか？ 『種の起源』だろうか、それとも『人間の由来』だろうか？

農業や人類の栄養—ひいては人類の繁栄という観点から考えると C・ダーウィンの一番偉大な仕事は『ミミズの作用による栽培土壌の形成及びその習性の観察』(1881)ではないだろうか。C・ダーウィンは、その著書の中で、「鋤は最も古くからある、最も価値のある人間の発明品の一つだが、人間が存在するずっと以前から、大地は実はミミズによって規則正しく耕されていたし、また今もお耕され続けている。この下等な生き物ほど、世界の歴史に重要な役割を果たしてきた動物が、他にも多くいるかどうかは疑問である」とミミズの強さと偉大さを讃え

---

\* 慶應義塾大学日吉化学教室 (〒 223-8521 横浜市港北区日吉 4-1-1) : Department of Chemistry, Keio University, 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8521, Japan. [Received Aug. 29, 2019]

Which do earthworms prefer,

UV-B damaged plant or Dark-grown plant ?

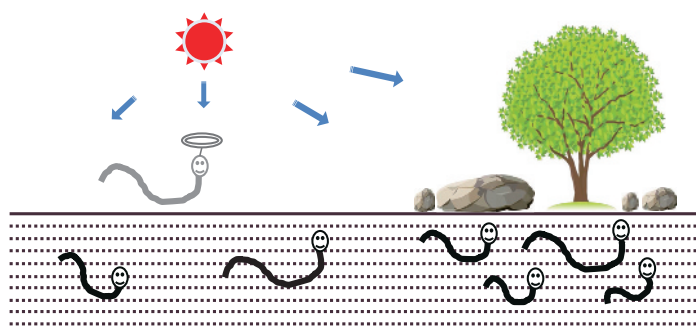


Fig. 1 UV-B Damaged Plant or Dark-Grown Prant

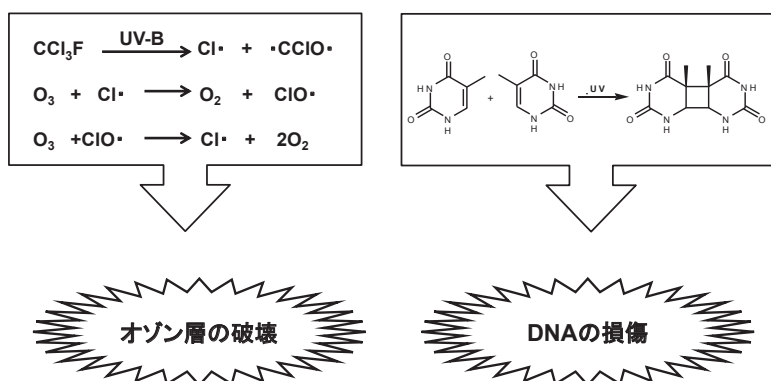


Fig. 2 Ozone Depletion by Chlorofluorocarbon and DNA Damage

ている<sup>1)</sup>。ミミズは、畑や林の土地を良い状態に保つためになくなくてはならない強くて偉大な生物なのである。ミミズの弱点の一つに「光」が上げられるが、ミミズは農業に対しては強い抵抗力を持っている。そんな「強くて偉大なミミズ」が栽培土壌から逃げ出そうとしている。それは“なぜ”であろうか (Fig. 1)。

近年、20世紀に発明された最も優れた化学物質の一つであるクロロフルオロカーボン（フロン）によるオゾン層の破壊など気圏環境の劣化による地表での紫外線放射量の増加が問題となっており、生命への悪影響が懸念されている (Fig. 2)。

そのため、植物細胞への影響に関連した研究も盛んに報告されるようになった<sup>2)</sup>。しかし、その報告の多くは植物の生理、形態学的な研究である<sup>3)</sup>。そこで、著者らは、紫外線照射量の増加による生物の直接的なダメージではなく、紫外線放射量（特に、UV-B）の増加によりダメージを受けた植物組織（日焼けをイメージしていただきたい）から遊離される化学物質がミ

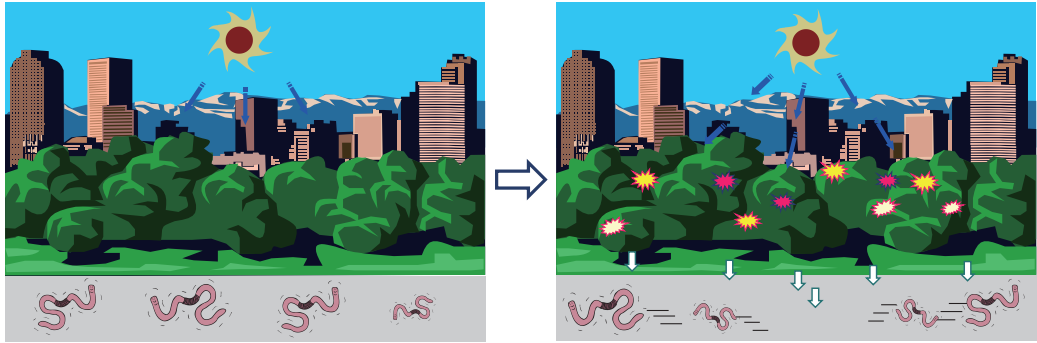


Fig. 3 Repellent Action of Earthworms with UV-B Damaged Plants I

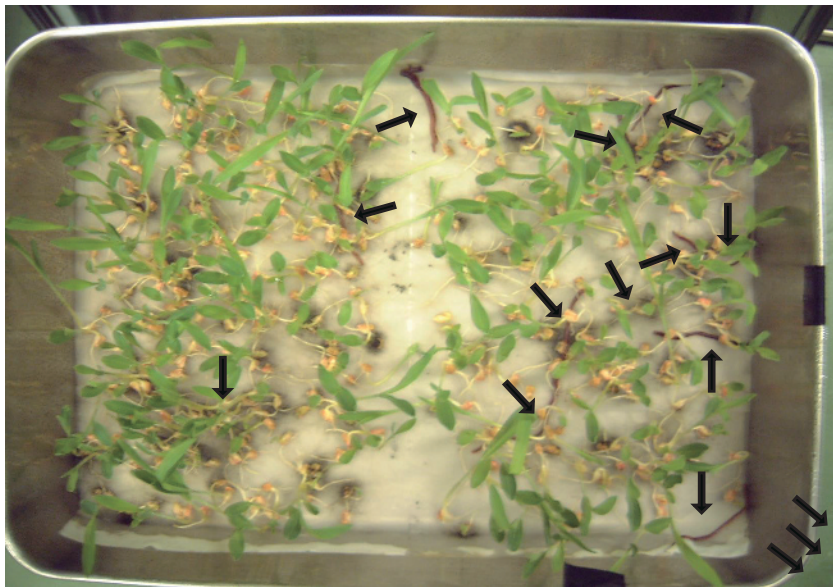


Fig. 4 Uniform dark-grown, ten-days-old seedlings were divided into two groups. One group (right) was left in darkness at 25 °C, and the other group (left) was irradiated with UV-B fluorescent tube [ $\lambda_{\text{max}}$  302 nm, Funakoshi Co., detected with UV-monitor ( $\lambda_{\text{max}}$  313 nm,  $0.22 \text{ Wm}^{-2}$ ,  $0.40 \text{ kJm}^{-2}$ , Eko Instruments Trading Co.)] at 25 °C. After 30 minutes, earthworms were released into each tray in the dark.

ミズに与える忌避作用とそれに伴う生態系への影響について研究を行ってきた (Fig. 3)。

自然生態系において、ミミズがその生息数を減らすということは肥沃な土地の減少を意味しており、この研究は紫外線放射量の増加により生態系に与える悪影響の新しい側面を明らかにできるものと考えている。

著者らは、紫外線放射量 (特に、UV-B) の増加に伴い植物組織がダメージを受け、生態系に悪影響を与える可能性のある化学物質が遊離されているかどうかを確認する必要があると考

**Earthworms prefer**

UV-B damaged maize < Dark-grown maize

in the absence of light



Disrupted maize seedling < Non-disrupted maize seedling

dark-grown, ten-days-old seedlings

Fig. 5 UV-B Damaged Maize and Dark-Grown Maize

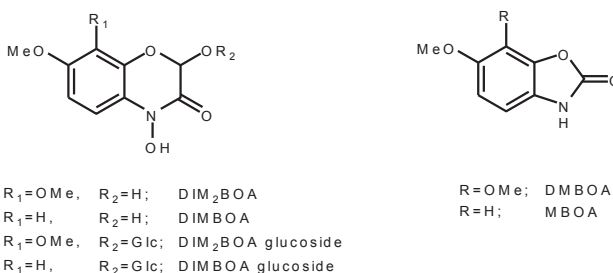


Fig. 6 Repellents and Their Precursors from UV-B Damaged Maize and Radish

	MTB-ITC	1-10 ppm
	DIM <sub>2</sub> BOA	10-50 ppm
	DIMBOA	20-60 ppm
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		50-100 ppm
	MBOA	50-100 ppm

Fig. 7 Repellent Activity against Earthworms I

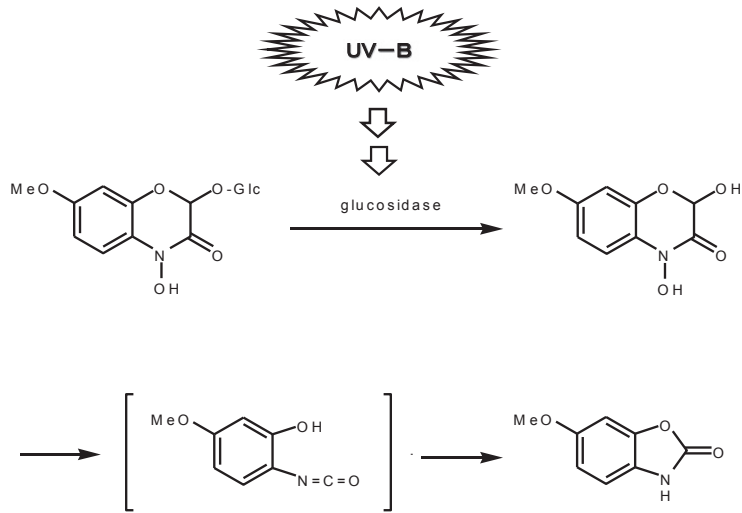


Fig. 8 Formation of DIMBOA (MBOA) from the Glucoside in Maize Tissue

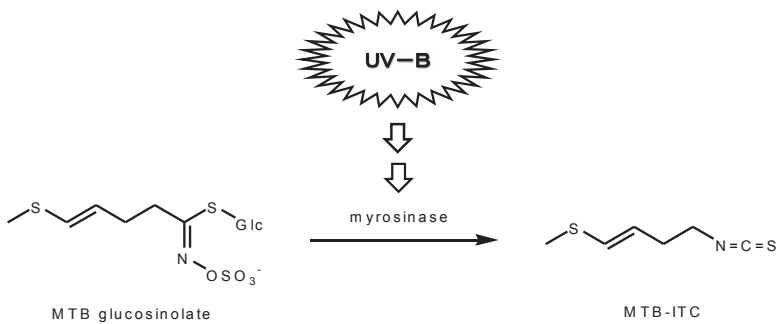


Fig. 9 Formation of MTB-ITC from the Thioglucoside in Radish Tissue

えた。そのためには UV-B ダメージを受けた植物から得られる化学物質と暗室内で栽培した植物から得られる化学物質との比較を行えばよいと考えた。

既に、UV-B ダメージを与えたトウモロコシの芽生え<sup>4)</sup>やダイコンと、暗室内で栽培したトウモロコシの芽生えやダイコンを、それぞれ暗室に置き光を嫌うミミズ<sup>5)</sup>が暗条件下において、どちらのトウモロコシやダイコンに対して忌避行動をとるのかを観察している。ミミズは明らかに UV-B ダメージを与えたトウモロコシやダイコンに対して忌避行動を示した (Fig. 4, Fig. 5。Fig. 4 でトレイ内の黒い矢印の先にミミズがいる)。

そして、UV-B という光刺激を与えたこれらの植物から遊離したミミズに対する忌避物質としてトウモロコシからはヒドロキサム酸<sup>6), 7), 8)</sup>を、ダイコンからはイソチオシアナート<sup>9), 10)</sup>をそれぞれ単離することに成功し、これらの化学物質のミミズに対する忌避活性の検討も行ってきた (Fig. 6, Fig. 7)。さらに、UV-B 刺激により遊離される化学物質の生成メカニズムも

明らかにしてきた<sup>6), 9)</sup> (Fig. 8, Fig. 9)。

また、ミミズ自身が忌避行動をとる際に警報物質 (alarm pheromone かどうかはまだ証明できていない) を放出していることも確認した。

今回、著者らは新たに UV-B ダメージを与えたキャベツ (*Brassica oleracea* L.) の芽生えからミミズの忌避物質を単離し、その構造をインドール-3-アセトニトリル (3-indolylacetonitrile, 以下 IAN) であると決定し、UV-B ダメージによる遊離のメカニズムも明らかにした。さらに IAN の標品を用いてミミズに対する忌避活性の検討も行った。

## 2. 結果および考察

ミミズは農業に対して強い抵抗力を持っているが、肥料として使用されている硫酸アンモニウムは苦手であることが分かっている。これまで硫酸アンモニウムを UV-B ダメージを与えたトウモロコシ等から単離した化学成分に対する忌避作用の指標にして忌避活性を検討してきた。

トレイ (600 x 900 x 100 mm) を用いて、25°C、暗条件下、脱脂綿上で 10 日間キャベツ (栽培期間は検討する必要がある) の芽生えを栽培した。トレイの中央付近の芽生えを取り除き、一方は暗条件を保ちつつ、もう一方を UV-モニター ( $\lambda$  max 313 nm,  $0.22 \text{ Wm}^{-2}$ ,  $0.40 \text{ kJm}^{-2}$ ) で照射量を確認しながら UV-B ( $\lambda$  max 302 nm) を 30 分間照射した後、UV-B を照射したキャベツの芽生えと暗条件を保ったキャベツの芽生えを暗室内に置き、トレイの中央の境目にミミズ 10~20 個体を放ち、どちらに移動するかを検討した (Fig. 4 のトウモロコシの実験を参照)。

その結果、トウモロコシやダイコンと同様にミミズは UV-B を照射したキャベツの芽生えを避けて暗条件で栽培したキャベツの芽生えの方に移動する割合が高いことを確認した。

上記検定試験で UV-B ダメージを受けたキャベツの芽生えからは、ミミズの忌避行動に関係する化学成分が遊離されていることを確認できたので、同条件下で、大量のキャベツを栽培して抽出を行い検定試験と合わせて忌避物質の単離および構造解析を行った。そしてその構造を IAN と推定し、各種スペクトルの詳細な解析および標品との比較によりキャベツのミミズに対する忌避物質を IAN であると決定した<sup>11), 12)</sup> (Fig. 10-Fig. 17)。UV-B ダメージによる IAN の遊離のメカニズムに関しては、すでにキャベツの光屈性に関する光誘起生長阻害物質の研究で明らかにした生合成経路によるものであると考えている<sup>12)~15)</sup> (Fig. 18)。

また、IAN の忌避活性に関しては、標品 (Aldorich, 12, 945-3) を用いて検討を行い、ミミズの硫酸アンモニウムに対する忌避行動がその濃度 50-100 ppm であるのに対して、IAN に対するミミズの忌避行動は濃度が 100-150 ppm あたりから始まることが確認できた (Fig. 19)。

これまでの研究により、紫外線 (UV-B) による植物組織のダメージ (日焼けをイメージ) とその結果として起こる化学物質の遊離、さらにその遊離物質の作用によるミミズの忌避行動が明らかになった。しかし、これらの研究成果は実験室内での人工的な環境下のものである。これらの実験室レベルで確立した方法で他の植物についてもミミズの忌避物質の探索を行うとともに、今後は、フィールドまたはフィールドに近い環境下で紫外線によりダメージを受けた



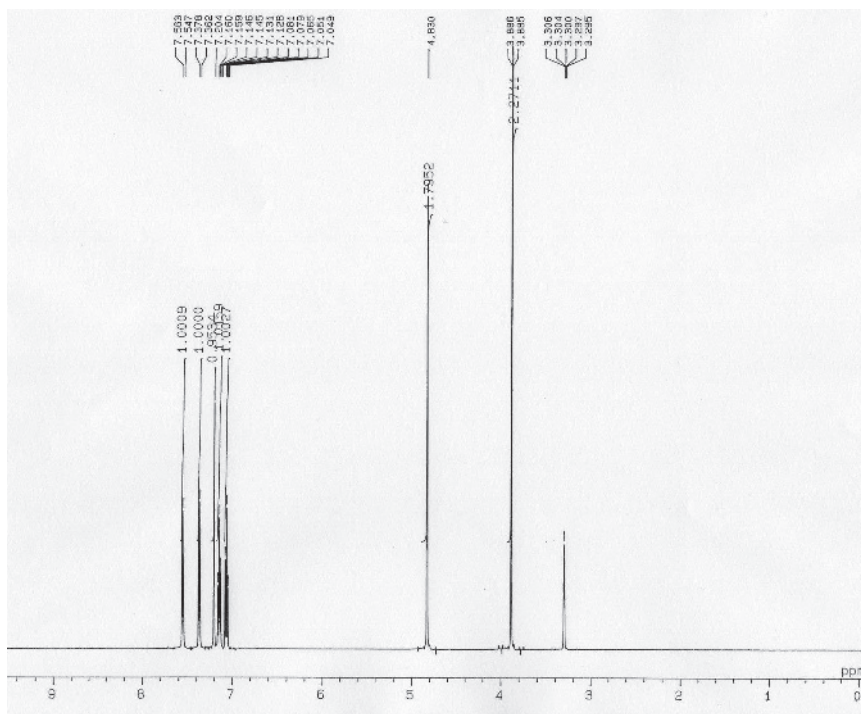


Fig. 10 <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of IAN (isolated)

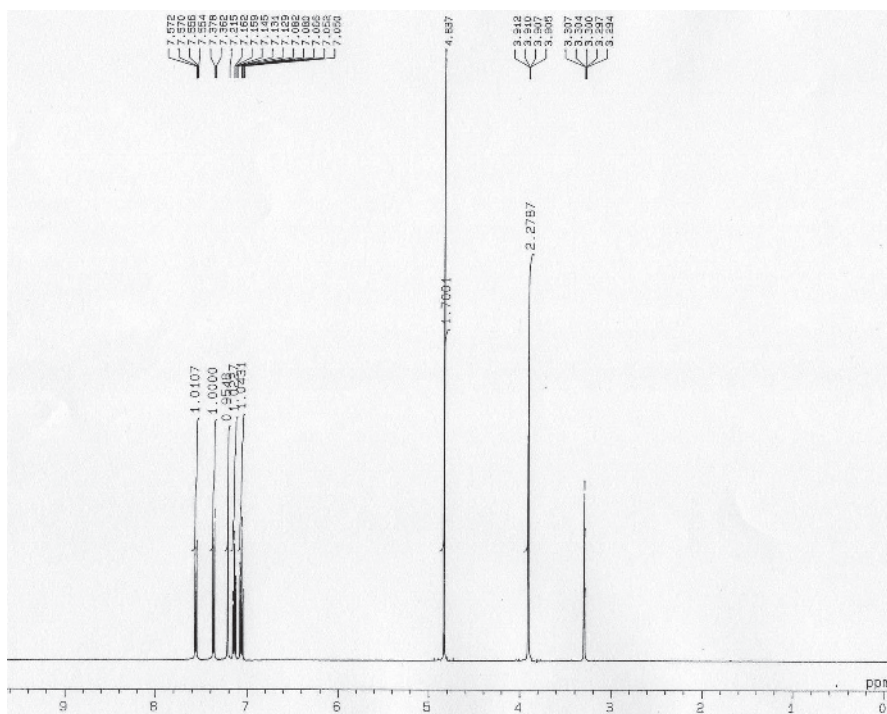


Fig. 11 <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of IAN (standard)



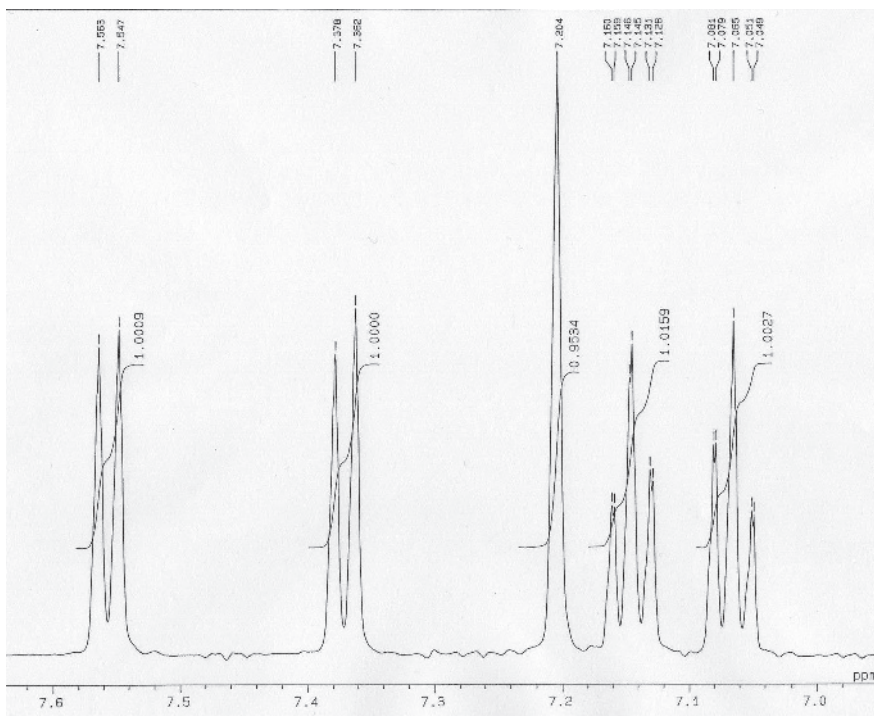


Fig. 12 <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of IAN (isolated)

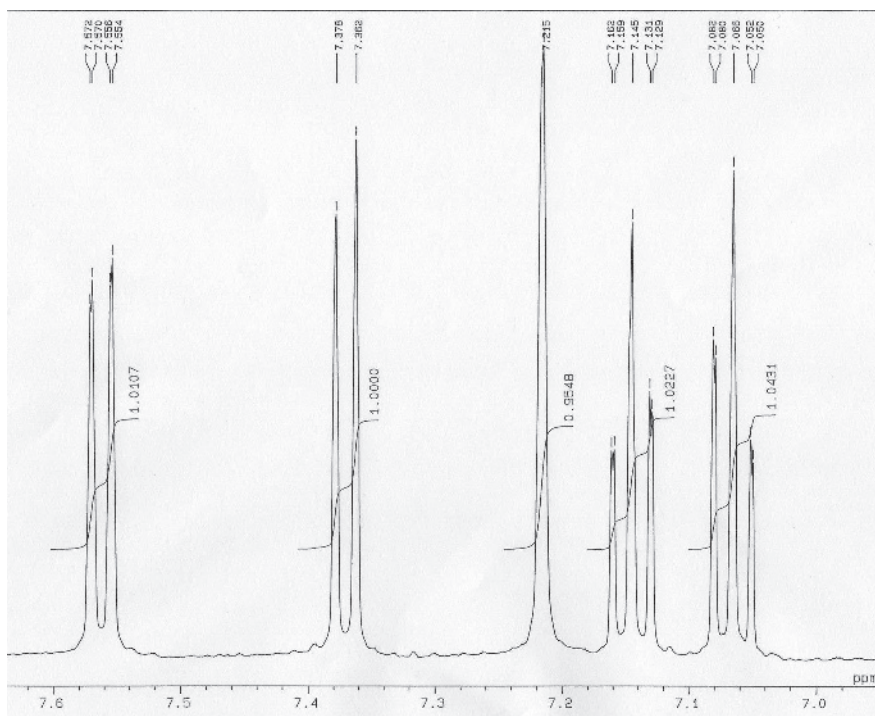


Fig. 13 <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of IAN (standard)

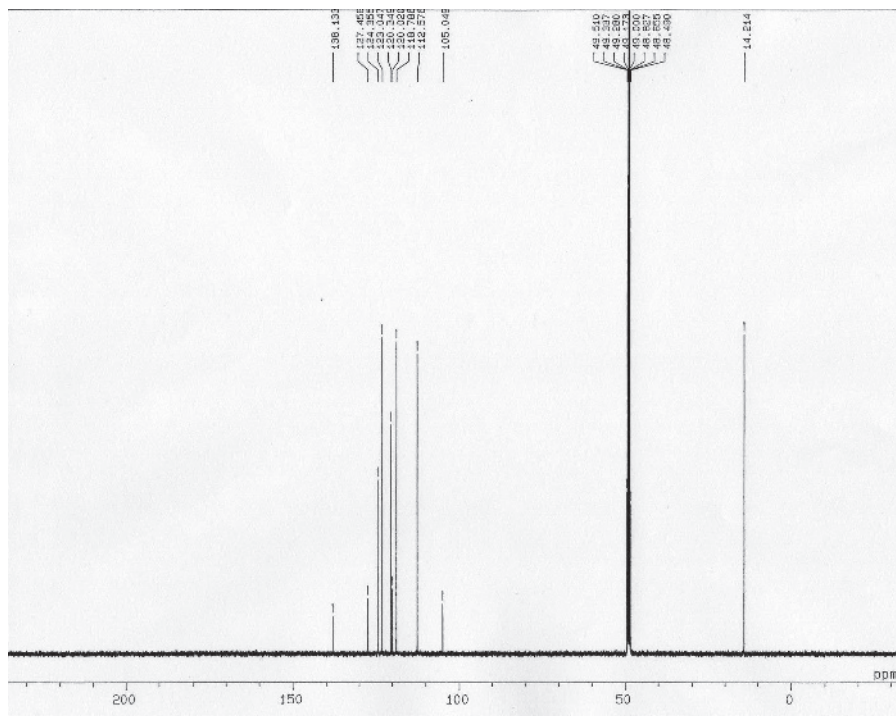


Fig. 14  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum of IAN (isolated)

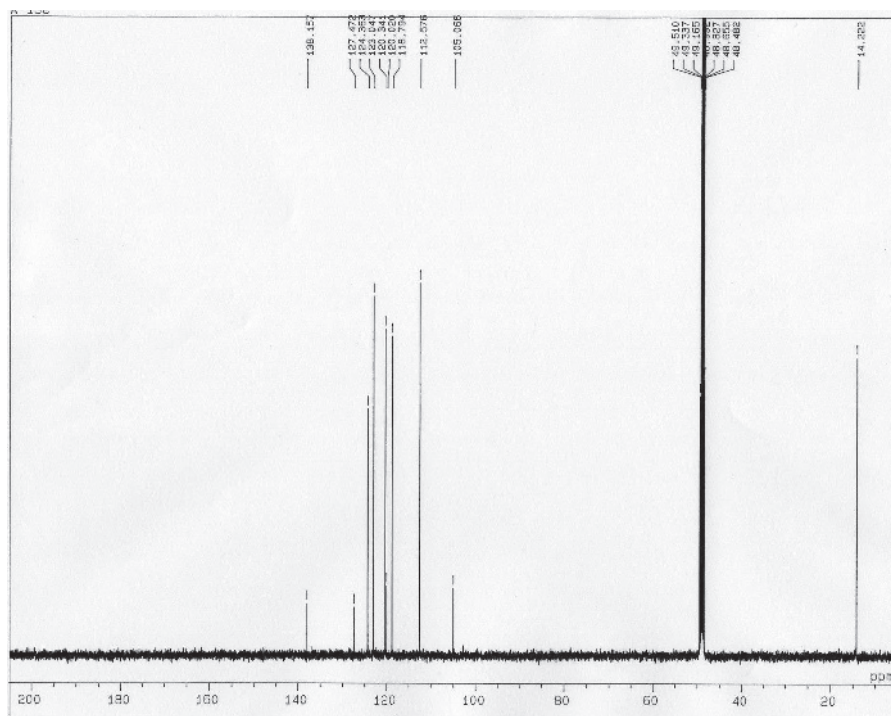


Fig. 15  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum of IAN (standard)

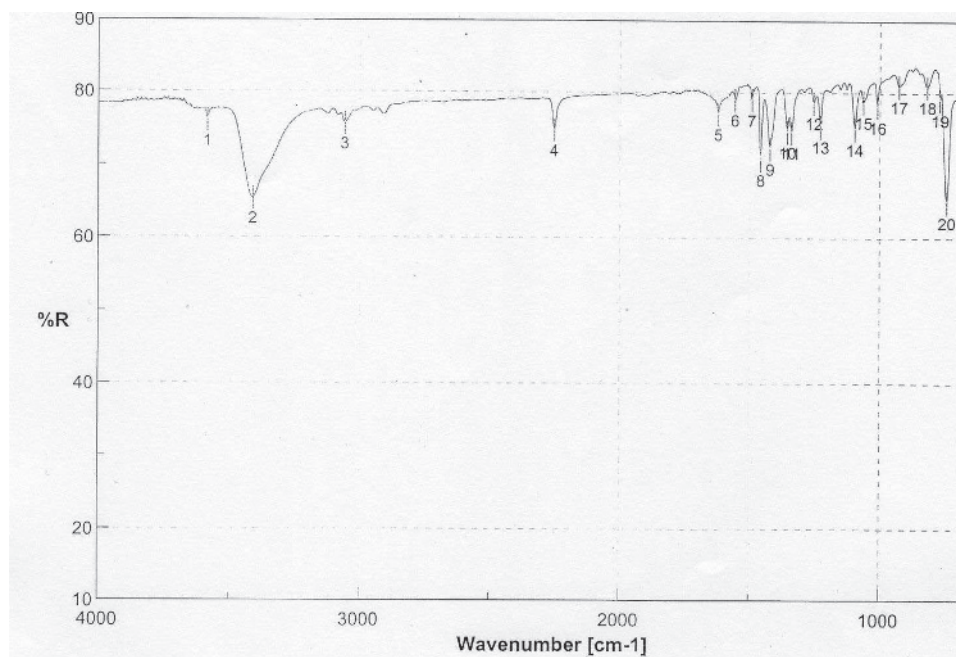


Fig. 16 IR Spectrum of IAN (isolated)

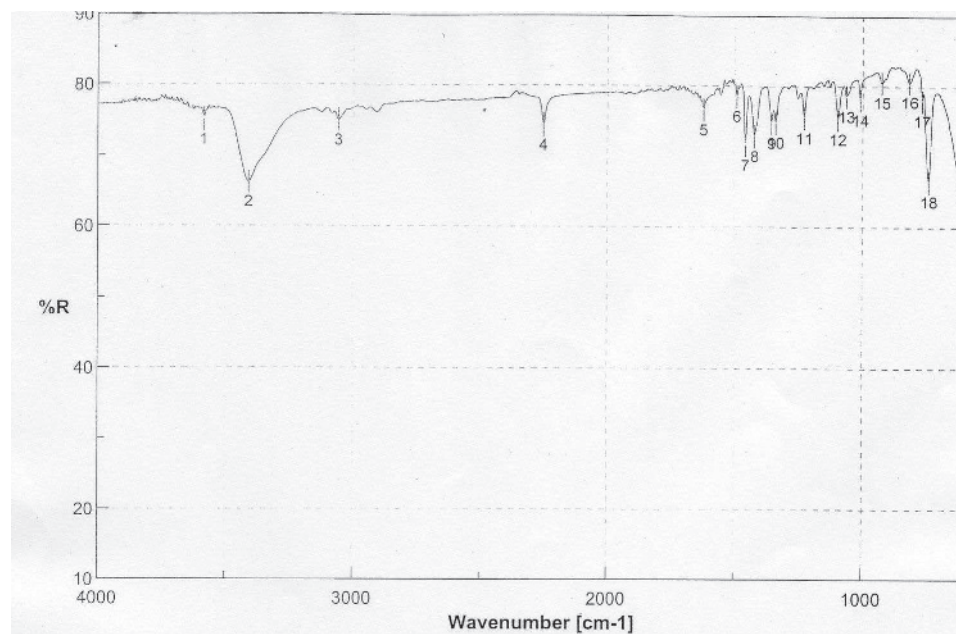


Fig. 17 IR Spectrum of IAN (standard)



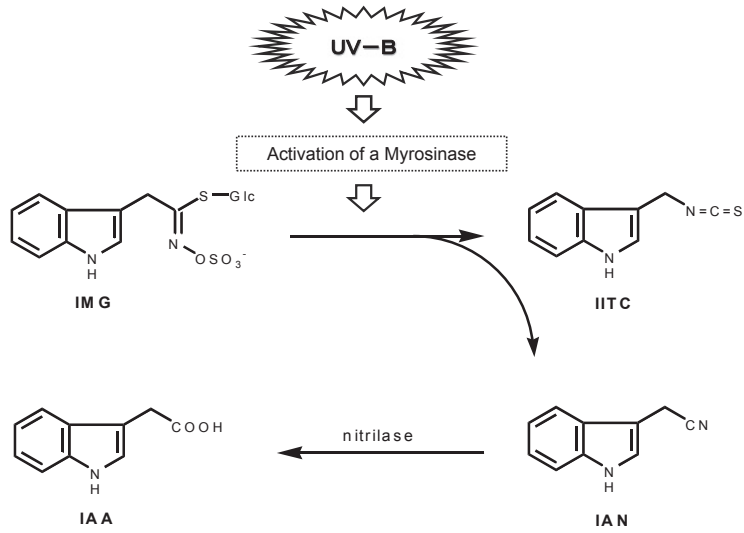


Fig. 18 Postulated Mechanism of Formation of IAN from IMG in Cabbage Tissue

<chem>CS=CCCN=C=S</chem>	MTB-ITC	1-10 ppm
<chem>COc1ccc2c(c1)oc(=O)n2</chem>	MBOA	50-100 ppm
<chem>(NH4)2SO4</chem>		50-100 ppm
<chem>C#NCC1=CN=C2C=CC=CC12</chem>	IAN	100-150 ppm

Fig. 19 Repellent Activity against Earthworms II

植物から遊離される物質とミミズの忌避行動について研究を進めなければならないと考えている。

自然生態系において、UV-B ダメージにより植物組織から遊離された忌避物質に対して、強くて偉大なミミズが忌避行動を取り大地からその数を減らすということは、肥沃な大地の減少を意味している (Fig. 20, Fig. 21)。地球の経済が究極的には、海洋・森林・農業のような基

礎的な生態系に依存していることを考えると、20世紀に発明されたもっともすぐれた化学物質の一つであるクロロフルオロカーボン（フロン）によるオゾン層の破壊，それに伴う気圏環境の劣化は決してあつてはならず絶対に防がなければならないと考えている。

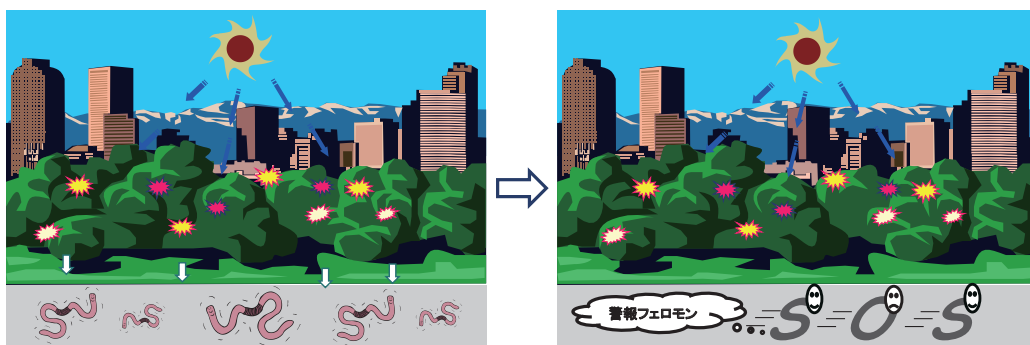


Fig. 20 Repellent Action of Earthworms with UV-B Damaged Plants II

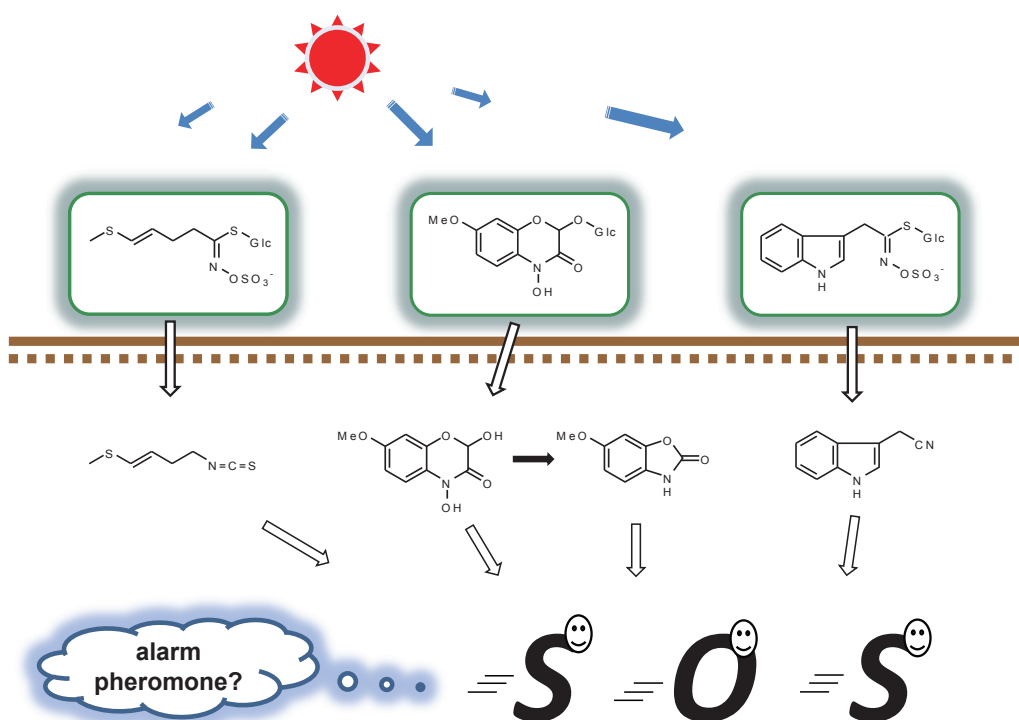


Fig. 21 Repellent Action of Earthworms with UV-B Damaged Plants III

### 3. 実験材料および方法

#### 3-1 検定用キャベツの栽培

キャベツ種子（金系 201 号甘藍，サカタのタネ）20 ml を暗条件下，24 時間流水中に浸した後，トレイ（600 x 900 x 100 mm）に置床して，25°C，暗条件下，脱脂綿上で 10 日間キャベツ（栽培期間は検討項目）の芽生えを栽培した。トレイの中央付近の芽生えを取り除き，一方は暗条件を保ちつつ，もう一方を UV-モニター（ $\lambda$  max 313 nm， $0.22 \text{ Wm}^{-2}$ ， $0.40 \text{ kJm}^{-2}$ ，Eko Instruments Trading Co.）で照射量を確認しながら UV-B（ $\lambda$  max 302 nm，Funakoshi Co.）を 30 分間照射した後，UV-B を照射したキャベツの芽生えと暗条件を保ったキャベツの芽生えの入ったトレイを暗室内に置き，検定用のキャベツの芽生えを得た。

#### 3-2 活性成分 (IAN) 単離用キャベツの栽培

キャベツ種子（金系 201 号甘藍，サカタのタネ）20 ml を暗条件下，24 時間流水中に浸した後，トレイ（600 x 900 x 100 mm）に置床して，25°C，暗条件下，0.6% 寒天培地上で 2 日間栽培後，さらに 7 日間光条件下（25°C）で栽培を続け，最後に UV-B（ $\lambda$  max 302 nm，Funakoshi Co.）を 24 時間照射した。播種 10 日後，全草を収穫してキャベツの芽生えを得た。この操作を 5 回繰り返す，キャベツの芽生えを約 3.2 kg 得た。

#### 3-3 キャベツ芽生えからの活性成分 (IAN) の単離と精製

培養によって得られたキャベツの芽生え約 3.2kg はミキサーを用いて粉碎した後，酢酸エチル（2,000 ml x 2）に浸漬した。その後，エバポレーターを用いて酢酸エチル抽出液を約 500 ml まで濃縮して，さらに分液ロートにて水層と酢酸エチル層に分配し，酢酸エチル層を濃縮して酢酸エチル抽出物 4.5 g を得た。酢酸エチル抽出物 4.5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し，ヘキサン：酢酸エチル（5：1）→（3：1）を溶出溶媒として用いて，活性成分 (IAN) を含むフラクションを得た。さらに，このフラクションを分取用の薄層クロマトグラフィ（シリカゲル：Kiesel gel PF 254）に付し，ヘキサン：酢酸エチル（3：1）を展開溶媒として用いて活性成分 (IAN) を得たのち，さらに，ヘキサン：アセトン（2：1）を展開溶媒として用いて単離を試みたところ，活性成分 (IAN, Rf 値 $\approx$ 0.5) を 26.2 mg 得ることができた（酢酸エチル抽出物 4.5 g からの収率 0.00058%）。

#### 3-4 ミミズに対する IAN の忌避活性試験

ミミズに対する忌避活性試験に関しては，既存の適当な方法がなかったため，新たに開発した活性テスト方法を採用した。

#### 単離・精製の段階における忌避活性試験：

Fig. 22 (左) の方法を用いた。0.6% 寒天培地（BA-30，伊那食品工業 K.K.）で調製したト



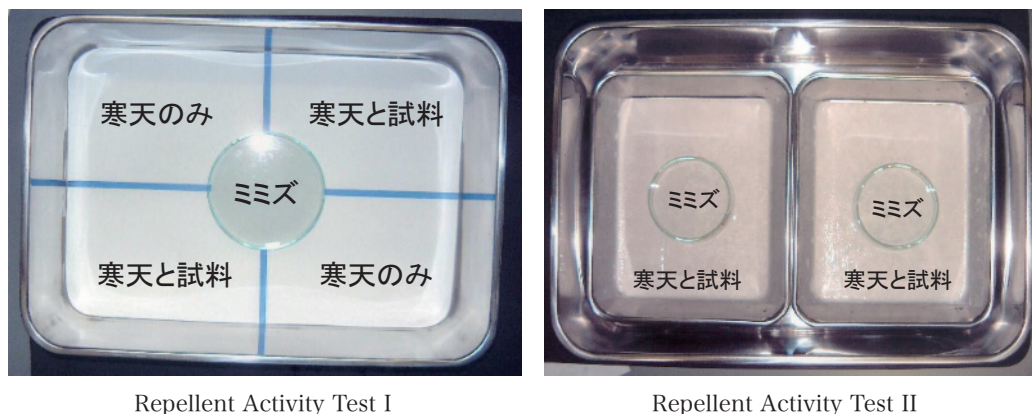


Fig. 22 Repellent Activity Test for Isolation

レイ (255 x 360 x 90 mm) の中央部にシャーレ (直径 90 mm, 深さ 20 mm) を置き, その中にミミズを入れて, 暗条件下, 目視または暗視カメラかサーモグラフィーにてミミズの行動を観察して活性フラクションの検討を行った。試料は寒天培地に塗布する方法を採用したため濃度調製に関しては厳密に行うことはできなかった (Fig. 22)。

#### 忌避物質の活性強度確定のための試験方法:

Fig. 22 (右) の方法を用いた。忌避物質は 0.6% 寒天培地に溶かし込むことで濃度 (蒸留水 + 寒天 + 試料) を決めた。

寒天に適量に IAN を溶かし込み, 大型トレイ (255 x 360 x 90 mm) の内側に IAN の濃度を調製した寒天培地の入った小型トレイ (170 x 210 x 30 mm) を 2 枚置き, その中央部にシャーレ (直径 70 mm, 深さ 15 mm) を置き, その中にミミズを入れて, 暗条件下, 目視または暗視カメラかサーモグラフィーにてミミズの行動を観察して活性強度の検討を行った。

#### 謝辞

著者らは, 平成 12 年度から平成 15 年度まで科学研究費補助金 (研究課題: 植物の光屈性に関する光誘起生長抑制物質) の助成を受けて研究を行ってきたが, 本研究「UV-B ダメージにより植物から遊離される生態系有用生物の忌避物質の探索」は, この「植物の光屈性に関する光誘起生長抑制物質」の研究がヒントとなり現在に至っている。

#### References and Notes

- 1) C. Darwin, *The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observations on their habits* (1881).
- 2) a) H. B. Bode, and A. Xeeck, *Phytochemistry*, 55, 311 (2000).

- 
- b) J. J. Pilon, H. Lambers, W. Baas, M. Tosserama, J. Rozema, and O. K. Atkin, *Phytochemistry*, **50**, 571 (1999).
  - c) C. B. Johnson, J. Kirby, G. Naxakis, and S. Pearson, *Phytochemistry*, **51**, 507 (1999).
  - d) R. Karousou, G. Grammatikopoulos, T. Lanaras, Y. Manetas, and S. Kokkini, *Phytochemistry*, **49**, 2273 (1998).
  - e) H. Kato, O. Kodama, and T. Akatsuka, *Phytochemistry*, **36**, 299 (1994).
  - 3) a) G. Ries, W. Heller, H. Puchta, H. Sandermann, H. K. Seidlitz, and B. Hohn, *Nature*, **406**, 98 (2000).
  - b) A. B. Britt, *Nature*, **406**, 30 (2000).
  - c) V. Walbot, *Nature*, **397**, 398 (1999).
  - 4) Plant material: Seeds of maize (*Zea mays* L. cv. Astro Vantam, Sakata Seed Co., Yokohama, Japan) were imbibed for 24 h in a tray in the dark in running tap water, sown on a moist filter paper, and incubated at 25 °C under red light for 1 day. The germinated seeds were then incubated on two trays of 0.6% agar in the dark at 25 °C for 10 days. Uniform dark-grown, ten-days-old seedlings were divided into two groups: one group was left in darkness at 25 °C, and the other group was irradiated with UV-B fluorescent tube [ $\lambda$  max 302 nm, Funakoshi Co., detected with UV-monitor ( $\lambda$  max 313 nm, 0.22 W m<sup>-2</sup>, 0.40 kJ m<sup>-2</sup>, Eko Instruments Trading Co.)] at 25 °C. After 30 minutes, earthworms were released into each tray in the dark.
  - 5) Earthworms, *Eisenia fetida* and one of *Pheretima* species, were collected at Hiyoshi campus in Yokohama.
  - 6) Hydroxamic acids and related compounds have been reported as growth inhibitors related to the phototropism. S. Kosemura, S. Yamamura, T. Anai, and K. Hasegawa, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 8221 (1994).
  - 7) a) V. Cambier, T. Hance, and Hoffmann, E. *Phytochemistry*, **53**, 223 (2000).
  - b) H. M. Niemeyer, *Phytochemistry*, **27**, 3349 (1998).
  - c) S. Manuwoto, and J. M. Scriber, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **14**, 221 (1985).
  - d) J. A. Klun, C. L. Tipton, and T. A. Brindley, *J. Economic Entomology*, **60**, 1529 (1967).
  - 8) K. Hasegawa, S. Togo, M. Urashima, J. Mizutani, S. Kosemura, and S. Yamamura, *Phytochemistry*, **31**, 3673 (1992).
  - 9) MTBI and related compounds have also been reported as growth inhibitors related to the phototropism. S. Kosemura, S. Yamamura, and K. Hasegawa, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 481 (1993).

- 10) P. Friis, and A.Kjaer, *Acta Chemica Scandinavica*, **20**, 698 (1966).
- 11) **Physical data for IAN:** a colorless oil; C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> [m/z 156 (M<sup>+</sup>)]; IR(film) 3410 and 2251 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD) δ 7.56 (1 H, d, J = 8 Hz), 7.37 (1 H, d, J = 8 Hz), 7.52 (1 H, s), 7.15 (1 H, dd, J = 8, 8 Hz), 7.07 (1 H, dd, J = 8, 8 Hz), and 3.91 (2 H, s); <sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD) δ 138.2 (s), 127.5 (s), 124.4 (d), 123.0 (d), 120.3 (d), 120.0 (s), 118.8 (d), 112.6 (d), 105.1 (s), and 14.2 (t).
- 12) S. Kosemura, N. Kazuki, E. Hideyuki, K. Yokotani-Tomita, K. Hasegawa, and S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8327 (1997).
- 13) D. McMeekin, *Plant Growth Regulation*, **18**, 183 (1996).
- 14) G. R. Fenwick, R. K. Heaney, and D. J. Mulin, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **18**, 123, (1983).
- 15) P. Reymond, T. W. Short, W. R. Briggs, and K. L. Poff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4718–4721 (1992).